

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



Contribuciones al estudio de la Sigatoka negra: a) desarrollo de un biofungicida-biofertilizante patentable; b) correlación entre daños foliares y acumulación de biomasa fúngica, H₂O₂ y melanina, analizadas microscópicamente.

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

DAVID ORTIZ MENDOZA

**DIRECTOR
DR. MIGUEL JUAN BELTRAN GARCÍA**

**CO-DIRECTOR
DRA. MÓNICA CARRILLO BELTRÁN**

Mexicali, B. C.

Noviembre de 2014

DEDICATORIA

A mis hijas Gabriela, Andrea y Ana Laura:

A mis padres David y Esperanza:

A mis hermanos:

A todas aquellas personas que han dado sentido a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Juan Beltrán García, por darme la oportunidad de realizar este postgrado. Pero sobre todo por su paciencia, por su ejemplo, por su guía. Por aceptar tener un alumno 10 años mayor que él con todas las complicaciones que esto conlleva.

A la Dra. Mónica Carrillo Beltrán y al Dr. Benjamín Valdez Salas, por aceptarme en el programa de MYDCI, sin su apoyo, este paso nunca hubiera sido realidad.

A mis profesores, por compartir conmigo sus conocimientos de una forma tan desinteresada.

A mis amigos y compañeros de postgrado y del Laboratorio de Sigatoka negra y Estrés Oxidativo de la UAG, por todos los momentos compartidos y por contagiarme del tesoro divino de la Juventud.

A la UABC desde ahora y para siempre mi nueva alma mater.

A la Dra. Nallely Rivera Reyna por todo su apoyo, y por hacerme sentir como en casa en mis estancias en Mexicali.

A mis compañeros y amigos Lic. Leslye Elías Nungaray y Lic. José Alfredo Rosas Jiménez, por haberme brindado su apoyo incondicional gracias al cual pude disponer del tiempo necesario para concluir este trabajo.

Al **CONACYT** por los recursos financieros otorgados para la realización del **proyecto 212875** de la Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2013.

INDICE

PRELIMINARES	i
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 Formulación e inoculación en plántulas de banano de una mezcla bacteriana con actividad Biofungicida-Biofertilizante	10
1.1 OBJETIVOS	11
1.2 ANTECEDENTES	12
1.2.1 Cultivo del plátano en México	13
1.2.2 <i>Micosphaerella fijiensis</i> del agente causal de la Sigatoka negra	14
1.2.3 Síntomas de la Sigatoka negra en las hojas de banano.	17
1.2.4 Problemática del control químico utilizado para el combate de la Sigatoka negra en México.	19
1.2.4 Potencial de uso de control biológico	21
1.2.5 Bacterias Endófitas	23
1.2.6 Beneficios obtenidos por la planta a través de organismos endófitos	
1.2.6.1 Producción de Antibióticos.....	24
1.2.6.2 Promoción de crecimiento	25
1.2.6.3 Fijación biológica de Nitrógeno.....	26
1.2.6.4 Solubilización de Fosfatos.....	30
1.2.6.5 Producción de Sideróforos.....	33
1.2.7 Proceso de Colonización de Bacterias endófitas	36
1.2.8 Reintroducción de Bacterias Endófitas	38
1.2.9 Origen y selección de las cepas bacterianas	39
1.2.10 Pruebas de selección realizadas durante la Tesis de Maestría	40
1.3 MATERIALES	48
1.4 METODOLOGÍA	51
1.4.1 Determinación de la capacidad Fijadora de Nitrógeno	51
1.4.2 Evaluación de la capacidad de Solubilizar Fosfatos	51
1.4.3 Determinación de la capacidad de producción de Sideróforos	53
1.4.4 Preparación de la Mezcla biofertilizante-biofungicida	55
1.4.5 Origen y manejo de las plántulas	56
1.4.6 Inoculación y mantenimiento de las plantas tratadas	57
1.4.7 Observación de colonización por Microscopía Epifluorescente	59

1.5 RESULTADOS	61
1.6 DISCUSION	77
1.7 CONCLUSIONES	83
CAPÍTULO 2 Técnica rápida y económica para evaluar la infección de	
<i>Micosphaerella fijiensis</i> en hoja de banana, y su validación estadística.	85
2.1 OBJETIVOS	86
2.2 ANTECEDENTES	87
2.3 MATERIALES	92
2.4 METODOS	93
2.4.1 Obtención de material vegetal	93
2.4.2 Visualización de hifas utilizando tinción con Azul de Anilina	94
2.4.3 Tinción con Diaminobencidina (DAB) para visualización de regiones ricas en H ₂ O ₂	94
2.4.4 Tinción de Melaninas	95
2.4.5 Fotodocumentación de las muestras	95
2.4.6 Medición de áreas teñidas en cortes paradérmicos	95
2.4.7 Medición de Saturación de Negros en células guardia de estomas	96
2.5 RESULTADOS	98
2.6 ANALISIS ESTADÍSTICO	105
2.7 DISCUSIÓN	110
2.8 CONCLUSIONES	113
CAPÍTULO 3 Aportaciones al artículo PLoS ONE. 2014, 9(3): e91616: doi:10.1371	115
LITERATURA CITADA	123
ANEXO 1 Artículo: Beltrán-García MJ, Prado FM, Oliveira MS, Ortiz-Mendoza D, Scalfo AC, et al. (2014). Singlet Molecular Oxygen Generation by Light-Activated DHN-Melanin of the Fungal Pathogen <i>Mycosphaerella fijiensis</i> in Black Sigatoka Disease of Bananas. PLoS ONE. 2014, 9(3): e91616: doi:10.1371/ journal.pone 0091616	s/n

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Regiones productoras de Banano en la República Mexicana.	13
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Micosphaerella fijiensis</i> (Morelet).	16
Figura 3.	Aspecto característico de la superficie de la hoja de banano desde su emergencia hasta los Estadios de Fouré.	18
Figura 4.	Relaciones entre el ciclo del nitrógeno y los compartimientos orgánicos y minerales.	28
Figura 5.	Relaciones entre el ciclo el fósforo y los compartimientos orgánicos y minerales. ..	32
Figura 6.	Ciclo de solubilización e inmovilización del fosforo en el suelo mediado por microorganismos.	33
Figura 7.	Mecanismo de actividad de sideróforos.	34
Figura 8.	Localización de los predios origen de las cepas bacterianas.	39
Figura 9.	Ejemplos de diferente capacidad de crecimiento en Quitina Coloidal a las 96 hrs de incubación.	40
Figura 10.	Ejemplos de cepas bacterianas con diferente capacidad de crecimiento en medio Agar-Micelio de Hongo a las 96 hrs de incubación.	41
Figura 11.	Inhibición del crecimiento de micelio de <i>F. oxisporum</i> causado por cepas bacterianas.	42
Figura 12.	Esquema del sistema de antibiosis indirecta en la confrontación de la cepa bacteriana y los pellets de <i>M. fijiensis</i>	43
Figura 13.	Ejemplos de Inhibición del crecimiento de micelio de <i>M. fijiensis</i> causado por cepas bacterianas.	43
Figura 14.	Resultados de desarrollo de colonias (en cm ²) en tres medios de cultivo después de un periodo de 48 hrs de incubación.	44
Figura 15.	Esquema que muestra la colonia inicial en el medio NBRIP y la manera de registrar los diámetros de la colonia y el halo de solubilización.	53
Figura 16.	Método A. Aparición de halo en cajas con bacterias capaces de sintetizar sideróforos. Método B. Preparación de cajas mixtas CAS, CASOY.	54
Figura 17.	Diluciones secuenciales para conteo. En este ejemplo se consideran los resultados del conteo de la caja 1×10^6	59
Figura 18.	Aspecto de las colonias con crecimiento bueno en Medio Norris.	62
Figura 19.	Ejemplos de los diferentes comportamientos respecto a la solubilización de fosfatos obtenidos en las 11 cepas probadas.	63
Figura 20.	Resultados obtenidos en los dos métodos utilizados para evidenciar sideróforos. ..	66
Figura 21.	Peso húmedo total promedio del lote de plantas analizadas en cada muestreo.	68
Figura 22.	Número de raíces nuevas desarrolladas durante el experimento.	70

Figura 23.	Comparación de raíces desarrolladas entre plántulas con tratamiento y testigo.	70
Figura 24.	Gráfica de desarrollo de hojas nuevas en lote con tratamiento y testigo.	71
Figura 25.	Número de UFC/ml recuperadas por estructura estudiada.	72
Figura 26.	Número de UFC/ml recuperadas por estructuras estudiadas (\log^{10}).	72
Figura 27.	Comparación de 4 tejidos de plántulas.	75
Figura 28.	A. Superficie de pelo radicular y B. Corte transversal de raíz.	76
Figura 29.	A. Corte de una célula de Cormo y B. Células del mesófilo.	76
Figura 30.	Transformación de fotografías de “color” a “escala de grises”.	92
Figura 31.	Imágenes comparativas de las 8 etapas estudiadas.	100
Figura 32.	Peróxido de Hidrógeno y Melaninas en los tejidos internos de hoja.	102
Figura 33.	Peróxido de Hidrógeno y Melaninas en células guardias de estomas.	104
Figura 34.	Gráfica de relación incremento melanina en función a peróxido acumulado.	106
Figura 35.	Gráfica de relación entre cantidad de micelio y peróxido acumulado en tejido con síntomas visibles.	107
Figura 36.	Superficie de respuesta de relaciones Etapa, Melanina, DAB.	109

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	42 cepas bacterianas seleccionadas por su capacidad quitinolítica.	40
Tabla 2.	Tabla de especies de bacterias identificadas mediante análisis de ARNr 16s.	45
Tabla 3.	Resumen de las pruebas realizadas y determinación de las cepas seleccionadas. ..	46
Tabla 4.	Capacidad de Fijación de Nitrógeno de 11 cepas.	61
Tabla 5.	Superficies del halo de degradación generado por las bacterias de la mezcla.	67
Tabla 6.	Resumen de las pruebas de secreción desarrolladas en las 11 cepas.	65

RESUMEN

La sigatoka negra del banano, provocada por el ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, es una enfermedad que afecta la producción de plátano a nivel mundial. El principal problema observado en esta patología es su creciente agresividad; provocada por la alta resistencia del agente etiológico a los fungicidas. El interés de este trabajo radica en la búsqueda de alternativas biotecnológicas que conduzcan al desarrollo de un biofungicida comercial efectivo para el control de la Sigatoka negra del banano.

En el Capítulo 1, se describe el proceso de formulación de una mezcla de diez bacterias susceptible de ser utilizada como biofungicida-biofertilizante. Inicialmente se aislaron 210 bacterias de hojas y raíces de bananos provenientes de los estados de Colima y Jalisco, de las cuales se seleccionaron las diez cepas que cumplieran con los siguientes requisitos: a) biocompatibilidad entre cepas; b) antibiosis contra *Fusarium oxisporum* y *M. Fijiensis*; c) capacidad de crecimiento en quitina coloidal y en quitina de *M. fijiensis*; d) capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y solubilizar fosfato mineral; y e) capacidad para producir sideróforos. Se micropropagaron 100 plántulas de banano en medio sintético para asegurar axenidad del tejido; dichas plántulas se inocularon con la mezcla de las diez cepas seleccionadas y se monitoreó la colonización del tejido vegetal cada siete días durante ocho semanas. Se demostró que la inoculación en rizósfera permitió la penetración de las bacterias para colonizar raíces, pseudotallo y hojas. El número máximo de colonias observadas en cada tejido fue de 22.2×10^6 UFC/ml en raíz, a los 21 días; 4.9×10^6 UFC/ml en pseudotallo, a los 14 días; y 1.22×10^6 UFC/ml en hojas a los 42 días de cultivo. A partir de 46 días de cultivo postinoculación las bacterias formaban una biopelícula en las superficies radiculares de la planta.

En el Capítulo 2, se describe el desarrollo e implementación de técnicas microscópicas para la evaluación de la infección de *M. fijiensis*. Este estudio,

correlaciona la cantidad de micelio de hongo visualizado con los seis estadios de infección descritos por Fouré más hoja cigarro y hoja asintomática con la concentración de peróxido de hidrógeno y melaninas en células del mesófilo y células guardias de los estomas. Se encontró que la infección del hongo se inicia en la fase final de la hoja cigarro desarrollando una colonización asintomática en las primeras hojas capote. Los datos se ajustaron a ecuaciones de regresión para predecir el grado de infección con coeficientes de correlación superiores a 90%. La mayor correlación de datos se presenta entre la concentración de peróxido y la etapa de Fouré, existiendo también una alta correlación entre la etapa de Fouré y las cantidades de peróxido y melanina cuantificadas por el método descrito en este trabajo.

ABSTRACT

Black Sigatoka is a devastating banana disease found in most banana producing countries worldwide. It is a fungal disease caused by the ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* which is highly tolerant to most of the employed fungicides. The main focus of this work was the search of a biotechnological alternative to develop a commercial biofungicide to control the black sigatoka of banana.

In Chapter 1, it is described the selection of native bacterial strains to formulate a biofungicide-biofertilizer mixture. First, there were isolated 210 bacteria from leaves and roots of banana plants from Colima and Jalisco selecting only ten of the whole isolates. The selection criteria included the following requisites: a) strain biocompatibility; b) antibiosis against of *Fusarium oxisporum* and *M. fijiensis*; c) ability to grow in colloidal chitin and chitin from *M. fijiensis*; d) ability to fix atmospheric nitrogen and solubilize mineral phosphorous; and e) ability to produce siderophores. Were used 100 micropropagated banana seedlings in synthetic media to ensure axenical tissues; thereafter, the seedlings were inoculated with the ten bacterial strains mixture and tissue colonization was tracked out every week for a period of eight weeks. It was demonstrated the ability of the bacteria to trespass the radicular tissue to colonize roots, pseudostem and leaves. The maximum number of colonies in roots was observed after 21 days and was quantified as 22.2×10^6 CFU/ml; in pseudostem there was a maximum accumulation of 4.9×10^6 CFU/ml after 14 days; and a maximal count of 1.22×10^6 CFU/ml was observed in leaves after 42 days of cultivation. Finally, from day 46 and thereafter it was detected a bacterial biofilm in the radicular surfaces.

In Chapter 2, it is described the development and validation of microscopic techniques to assess the likelihood of infection by *M. fijiensis*. In this study, there were correlated the observed micelliar coat, at any of the six Fouré's infection

stages including cigar and healthy leave stages, versus hydrogen peroxide and melanin in mesophyll and guardian stomatal cells. It was determined that fungal infection begins at the final stage of the cigar leaf and continues asymptotically until the first binder leaves. Data was adjusted to fit a regression model to predict the infection with correlation coefficients over 90%. The better fitting model was obtained when the peroxide concentration was correlated with the Fouré's stages; noteworthy, there was also a high multiple correlation between Fouré's stages and peroxide and melanin quantified as described in this work.

INTRODUCCIÓN

Las *Musáceas* (bananos y plátanos) son el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. En México este cultivar se encuentra en un significativa recesión, ya que en el año 2009 representaba el décimo tercer cultivo con 78,015 Ha cultivadas a nivel nacional, y una producción de 2'232,361 toneladas. En el año 2013, se colocó en el sitio decimoctavo respecto a superficie sembrada, siendo ésta de 75,010 Ha con una producción de 2'127,772 toneladas. La disminución de la producción nacional de plátano, no se explica únicamente con la reducción de la superficie cultivada, existen otros factores mucho más importantes, ejemplificándose con lo ocurrido en el estado de Jalisco, perteneciente a la región productora Pacífico-Centro.

En el año 2009 en la región Pacífico-Centro (que comprende a los estados de Nayarit, Jalisco, Colima y Michoacán) se sembraron 18,528 Ha obteniendo una producción de 465,098 toneladas. Para el año 2013, esta misma región sembró 16,373 Ha obteniendo 424,119 toneladas. A pesar de estos números en el contexto regional, debemos resaltar que la producción de plátano ha disminuido año con año pese al incremento de áreas de siembra, sobresaliendo el estado de Jalisco. En el año 2009, en ésta entidad se sembraron 2,707 Ha obteniéndose en ellas una producción de 127,595 toneladas; y para el año 2013, la superficie sembrada se incrementó a 3,432 Ha cosechándose únicamente 120,969 toneladas. El rendimiento en Jalisco disminuyó de 47.13 Ton/Ha en 2009, a tan solo 36.09 Ton/Ha en el 2013. Esto es: en Jalisco se incrementaron 724 Ha (24%) respecto a la superficie cultivada en el año 2009, sin embargo, la producción total del estado se redujo en 6,625 Ton (23.42%) (SAGARPA, SIAP, 2014).

La planta de plátano está expuesta a varias condiciones adversas que disminuyen el rendimiento (Ton/Ha) del cultivo, sin embargo la disminución de los últimos años es debida principalmente a la Sigatoka negra. Esta enfermedad es la que más afecta la producción comercial de bananos y plátanos en todas las regiones

productoras del mundo y es causada por el desarrollo del hongo ascomiceto fitopatógeno, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, (Ploetz, 2000). Esta enfermedad es estrictamente foliar, lo que causa la reducción de la tasa fotosintética de la planta. La infección produce la disminución del tamaño de fruto y su maduración prematura disminuyendo notoriamente la vida de anaquel. En México existen otras enfermedades que afectan la producción de banano, las cuales son causadas por diferentes agentes: a.- Causadas por hongos: mal de Panamá razas 1 y 2 (*Fusarium oxysporum f. sp.cubense*), mancha foliar café por cordana (*Cordana musae* A. Zimmerm), antracnosis (*Colletotrichum musae*). b).- Causadas por bacterias: moco del plátano (*Ralstonia solanacearum* raza 2), y la pudrición del pseudotallo, causada por *Erwinia*. c).- Causadas por el nematodo barrenador (*Radopholus similis* [Cobb] Thorne). Existen también otras enfermedades que amenazarían potencialmente la producción de bananos y plátanos en México en caso de ser introducidas en nuestro país: el mal de Panamá raza 4, la mancha rojiza causada por la bacteria *Ralstonia sp.*, pecas del plátano causada por el hongo *Guignardia musae*, el virus del cogollo racemoso o Bunchy top (por sus siglas en ingles: VBT) y el virus del mosaico de las brácteas (Beltrán-García 2009a).

Con el objetivo de controlar estas enfermedades, y principalmente la Sigatoka negra; se utilizan primordialmente agentes químicos, los cuales, por su uso excesivo han provocado un aumento en la tasa de resistencia en las poblaciones de hongos fitopatógenos y no patógenos en general, lo que conlleva a un alto costo de producción y daños en la salud de las personas que están en contacto directo con los fungicidas. En el laboratorio de Sigatoka negra y Estrés Oxidativo de la UAG, se han realizado diversos trabajos en los que se demostró que en los estados de Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Tabasco y Oaxaca, se tienen poblaciones de hongos resistentes a los 3 principales fungicidas sistémicos comerciales utilizados ampliamente para el control de la Sigatoka negra: Benomilo, Asoxiestrobina y Propiconazol (García-Torres 2009, Odriozola-Casas 2009, Macedo-Raygoza 2010, Castillo-Quiroz 2012).

El mecanismo por el cual los fungicidas actúan, es la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) que causan procesos de oxidación de Ac. Nucléicos, Proteínas y Lípidos de los hongos, desencadenando procesos bioquímicos que conducen a la muerte celular. Sin embargo, *M. fijiensis* cuenta con varias enzimas altamente eficientes para contrarrestar los procesos oxidativos causados por las ERO's, tales como Superóxidodismutasas, Peroxidasas alternativas y Catalasas, las cuales protegen al hongo e impiden la muerte celular (Beltrán-García et. al. 2009b). Aguilar-Barragán y colaboradores (2014) evaluaron la efectividad de seis fungicidas comerciales contra el crecimiento de micelio de *M. fijiensis* en muestras colectadas de predios con diferentes programas de fumigación, encontrando que la sensibilidad del hongo a estos decrece en los cultivos con manejo intensivo que realizan más de 25 aplicaciones por año.

Pese al conocimiento científico generado en el laboratorio, y a la experiencia empírica de los productores que viven a diario la ineficiencia de los fungicidas tradicionales, la utilización de éstos se incrementa año con año y actualmente se gastan más de 500 millones de pesos en fungicidas anualmente y se depositan en el ambiente más de 7 millones de kilos de producto activo (Beltrán-García et al, 2009a). Este uso indiscriminado contribuye a incrementar la presión de selección de cepas del hongo resistentes y tolerantes a los fungicidas, por lo que ahora se deben utilizar fungicidas cada vez más agresivos para los humanos y el medio ambiente para únicamente limitar el crecimiento del hongo. Por lo anterior, las zonas bananeras hoy en día se consideran dentro de las más contaminantes en la industria agrícola, resultando de vital importancia enfocar los esfuerzos en la búsqueda de alternativas biotecnológicas para el control de las plagas que afectan la producción de bananos y plátanos en México. El desarrollo y uso de biofungicidas es por lo tanto ya una necesidad imperiosa para los productores de banano en el País.

El control biológico por bacterias nativas tiene grandes oportunidades. Este se

fundamenta en la utilización de hongos o bacterias para reducir los efectos indeseables de los patógenos de las plantas. En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal la disminución de estos últimos en el ambiente de la planta contribuyen a que haya enfermedad en la mayoría de los casos, es decir la pérdida del equilibrio en la comunidad microbiana reduce un control biológico que funciona naturalmente (Warrior, 2000). El mecanismo general del control biológico en los hongos fitopatógenos implica la prevención de crecimiento hifal, limitando la infección del patógeno al punto inicial de infección (Gohel *et al.* 2006).

Para el control del hongo de la Sigatoka negra existen algunos acercamientos con el uso de bacterias. Por ejemplo, el biofungicida comercial Serenade^{MR}, que contiene una cepa de *Bacillus subtilis* fue utilizado para el control de la Sigatoka negra, sin embargo no se observó un efecto antagonista *in planta* (Villalta y Guzmán, 2006), esto se debió a que esta bacteria no fue capaz de sobrevivir en el ambiente del cultivo de banano, debido a que las condiciones ambientales existentes en el sitio del cuál fue aislada esta cepa, eran muy distintas a las condiciones en las que se pretendió aplicar.

También se ha probado el uso de hongos antagonistas del genero *Trichoderma*, sin embargo su efectividad no es tan notoria, esto puede ser debido a que *Trichoderma* es un hongo nativo de suelo y es afectado por la radiación UV.

En los últimos 10 años, en el laboratorio de Sigatoka negra y Estrés Oxidativo de la UAG, se han realizado trabajos siguiendo dos líneas de investigación: a).- Con cepas aisladas de bacterias epífitas obtenidas del filoplano de plantas de banano, concentrándose en aquellas que demuestren poseer una mayor actividad de enzimas quitinasas. Tuesta-Popolizio (2006) aísla 4 cepas bacterianas con actividad de quitinasa, y realizó pruebas sobre germinación de conidias de *F. oxysporum*. Las especies aisladas fueron *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus alvei* y *Serratia marcescens*. Mendoza-Ceja (2008) se concentró en

el aislamiento de bacterias del género *Bacillus*, considerando su inocuidad y el alto potencial de colonización que exhiben. Martínez-Molina (2009) logró seleccionar 12 cepas bacterianas capaces con actividad quitinolítica, y capaces de retener el crecimiento de *M. fijiensis* y *F. oxisporum*, sobresaliendo las siguientes: *Enterobacter cloacae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus thuringensis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas auruginosa*, *Raoultella viridans*, *Lactobacillus pentosus* y *Aerococcus viridans*. b).- Con cepas aisladas de bacterias endófitas (capaces de colonizar tejidos internos de las plantas sin provocar daños aparentes) provenientes de los tejidos de plantas de banano en plantaciones comerciales, seleccionándolas por su capacidad para retener el desarrollo de *M. fijiensis*, estudiando principalmente los metabolitos secretados por las bacterias que puedan tener una actividad antifúngica. Nogueira-López (2012) aisló 19 bacterias endófitas de banano, capaces de inhibir de un 60 a un 100% el crecimiento de 4 cepas resistentes a fungicidas, del hongo causante de la Sigatoka negra. Por otro lado, y como un trabajos paralelos al presente, Cisneros-Reyes (2012) determina la capacidad de producción de metabolitos secretados por esas mismas bacterias, mientras que Tinajero-Cortez (2012) realiza estudios referentes a la capacidad de colonización de las mismas bacterias.

Al lograr la reintroducción y colonización de las bacterias endófitas aisladas del mismo cultivar, presumimos que tendrá efectos benéficos para la planta al tener capacidad de promover el crecimiento (Bacterias Promotoras de Crecimiento BPC).

El uso de BPC, tendrá un impacto benéfico en los cultivos, y en los costos de producción, ya que se podrá disminuir significativamente el uso de los fertilizantes tradicionales. Anualmente, 100 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados y más de 90 millones de toneladas de fertilizantes fosfatados se usan a nivel mundial para incrementar la productividad de los cultivos. A pesar del éxito en el uso de estos compuestos para mejorar la producción, puede bajo ciertas

circunstancias, contaminar el ambiente y contribuir a problemas de salud en humanos y animales.

En las últimas décadas, el consumo de fertilizantes ha aumentado en un promedio aproximado de 3% al año. El potencial impacto negativo del uso a gran escala de los fertilizantes químicos junto con el incremento en su costo, ha incentivado a los científicos alrededor del mundo para considerar la posibilidad de reemplazar por lo menos parcialmente el uso de fertilizantes por inóculos bacterianos.

Por otro lado, los mecanismos tradicionales para evaluar el nivel de infección del hongo en las plantas de banano en huertos comerciales, se han limitado a la metodología propuesta por Stover modificada por Gauhl (1989) que evalúa la incidencia y severidad obteniendo la información sanitaria de la plantación. En esta metodología se establece una escala de 1 a 6 midiendo el área foliar enferma, siendo nivel 1 cuando se presentan menos del 10 manchas por hoja, y alcanzando 6 cuando más del 50% del área foliar está con lesiones.

Los esfuerzos más recientes para evaluar infestación están centrados en observaciones macroscópicas de estructuras externas de la planta enferma. K.P. Baiyeri y colaboradores (2004), diseñan una metodología en la que toman en cuenta el número de manos por racimo, el número de frutos, el peso, longitud, y diámetro del mismo. Mientras que Torrado-Jaime y colaboradores (2008) definieron cinco estados fenológicos: brotación y emergencia, plántula, prefloración, floración, y llenado del racimo y madurez fisiológica, encontrando que la Sigatoka se presentó desde la etapa de plántula hasta madurez fisiológica.

Otros estudios fueron centrados en la determinación de la etapa de la enfermedad basándose en análisis de imagen realizados por computadora a fotografías digitales generales del limbo foliar conteniendo las lesiones características de las etapas de Fouré (Bhamare, y colaboradores, 2014) o la digitalización de imágenes de etapas 1, 2 y 3 de Fouré y posterior transformación a tonos de grises para

estudiar el diagnóstico sistematizado de la lesión en la superficie de la hoja. Sin embargo, ninguno establece correlaciones con elementos importantes de paso de biotrofia a necrotrofia como lo son el H₂O₂ y la melanina.

Un acercamiento diferente al diagnóstico de la enfermedad, y el estudio de las relaciones parasito-huésped involucrado el uso de herramientas moleculares de última generación. Johanson, A. and Jeger, M.J. (1993) estudiaron polimorfismos de *M. fijiensis* utilizando técnicas de PCR para la amplificación del espacio interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal (ADNr). También se han realizado estudios de determinación de polimorfismos de ADN basada en la digestión e hibridación del ADN (polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción RFLP), y la amplificación del ADN con iniciadores al azar (RAPD) o iniciadores específicos como los polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Queiroz y colaboradores (2013) estudiaron la variabilidad genética de *M. fijiensis* y su tipo de infección utilizando el Fago marcador de DNA M13, obteniendo huellas genéticas de 5 cepas amplificando los polimorfismos.

Otero, A.J. y colaboradores (2007) producen un anticuerpo monoclonal de ratón (MAB) reactivo a antígenos de alto peso molecular de micelio monospórico de *M. fijiensis* en cultivos *in vitro*, el cual no es reactivo a cultivos de *M. musicola*, *M. musae* y *M. minima*. Esto permite discriminar las infecciones causadas por *M. fijiensis* de los otros hongos cercanos, y de forma simultánea, es un método para cuantificar el micelio y las proteínas secretadas por *M. fijiensis*.

Churchill, A.C.L. (2011) estudia el sistema hospedero-patógeno utilizando transformación fúngica mediada por ADN desarrollando blancos moleculares en los genes disruptores. Realiza pruebas y bioensayos cuantitativos en plantas y pruebas de diagnóstico para detectar y diferenciar polimorfismos en *M. fijiensis* de patógenos relacionados.

Sin embargo, estos trabajos moleculares de última generación, no han sido capaces de describir el mecanismo de control que permite al hongo pasar de un estado biotrófico a patógeno. Además que se concentran en pruebas de laboratorio realizadas únicamente con plántulas micropropagadas sin llegar a tomar muestras en el campo.

El presente trabajo, es parte del esfuerzo del Laboratorio de Sigatoka negra y Estrés Oxidativo, para establecer un manejo de la enfermedad causada por *M. fijiensis*, que minimice el combate tradicional a base de fungicidas, y que proporcione un método para realizar de una forma barata y accesible la evaluación de las etapas de la infección, y su correlación con la secreción de melanina y peróxido de hidrogeno como probables moléculas desencadenantes del paso biotrofia a parasitismo en *M. fijiensis* en un huerto comercial.

En este trabajo, se presentan dos contribuciones distintas descritas en tres capítulos:

Capítulo 1. Se evaluó la capacidad de colonización y reintroducción de las 10 cepas seleccionadas durante el trabajo de tesis de maestría (Ortiz-Mendoza 2010), estableciendo además la capacidad de producción de metabolitos que favorezcan la nutrición vegetal, el fortalecimiento del cultivo y la posibilidad de retener el avance de la enfermedad. Esto conducirá a la disminución del uso indiscriminado de productos químicos nocivos para la salud del hombre, proponiendo alternativas biotecnológicas en función del desarrollo de un biofungicida-biofertilizante patentable, para el control de la Sigatoka negra.

Capítulo 2. Se desarrolló una metodología de evaluación de los niveles de infestación del hongo en la hoja del banano, utilizando tres técnicas microscópicas de tinción baratas y de muy fácil implementación: Azul de Anilina para visualizar las hifas del hongo *M. fijiensis*; Tinción con DAB (Diaminobenzidina) para

visualizar las regiones ricas en Peróxido de Hidrógeno; y Tinción con Sulfato de Plata para hacer notorias las Melaninas. Este conjunto de técnicas se aplicaron a cortes paradermales de hojas de banano, y se realizaron tinciones en las células guardia de los estomas, obteniéndose correlaciones entre ellas mediante análisis estadístico que ofrecen un modelo de predicción aplicable a las diferentes etapas de infección estudiadas.

Capítulo 3. Las técnicas de tinción descritas en el capítulo 2, han permitido generar aportaciones a estudios recientes que describen el papel que desempeña el pigmento DHN-Melanina en los efectos destructivos derivados de la infestación de *M. fijiensis* en los tejidos de la hoja de banano.

CAPITULO 1

Formulación e inoculación en plántulas de banano de una mezcla bacteriana con actividad Biofungicida-biofertilizante.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la factibilidad de la utilización de 10 cepas seleccionadas de bacterianas nativas de plantaciones comerciales de banano, para ser utilizadas en la formulación de una mezcla biofungicida y biofertilizante con capacidad de controlar a *Mycosphaerella fijiensis*, analizando la producción de factores promotores de crecimiento y determinando su capacidad de colonizar eficientemente plántulas de banano.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar la capacidad de fijación de nitrógeno de 10 cepas bacterianas seleccionadas por su actividad antifúngica utilizando medio Norris.
- b) Determinar la capacidad de solubilización de fosfatos de forma cualitativa de las 10 cepas bacterianas usando el medio NBRIP.
- c) Determinar cualitativamente la capacidad de producción de sideróforos de las 10 cepas bacterianas a utilizarse en la mezcla biofertilizante-biofungicida.
- d) Determinar el proceso de colonización midiendo las Unidades Formadoras de Colonias por gramo de tejido (UFC/g) en secciones de hojas, pseudotallo y raíces colectados después de 7 días post-inoculación hasta los 56 días con una frecuencia de 7 días.
- e) Documentar el fenómeno de colonización y formación de biopelículas utilizando microscopía epifluorescente.
- f) Evaluar el desarrollo de la planta en función del número, tamaño de pseudotallo y raíces en función de los grupos de bacterias re-introducidos.

1.2 ANTECEDENTES

Los bananos y plátanos son plantas incluidas en la familia Musaceae, la cual está constituida por los géneros *Musa* y *Ensete*. El género *Ensete* es de uso exclusivamente ornamental y de hábitat subtropical y característicamente se reproduce por semilla. El género *Musa* está formado por cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*.

Eumusa es la sección con mayor importancia económica y distribución geográfica, ya que en ella se incluyen los bananos y plátanos comestibles. En esta las especies silvestres *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla, son las más importantes debido a que por hibridación y poliploidía, dieron origen a los plátanos y bananos cultivados actualmente. Se han clasificado en grupos que indican la contribución genotípica y el grado de poliploidía con que está constituida cada clon o cultivar. El grupo triploide de *M. acuminata* (AAA) contiene a los clones comerciales más difundidos (SEDER, 2005).

El origen del banano se considera del Sureste Asiático, incluyendo el norte de la India, Burma, Camboya y sur de China, así como las Islas mayores de Indonesia: Sumatra, Java y Borneo, las islas Filipinas y Taiwán.

Los plátanos y bananos se cultivan en los cinco continentes en una superficie de 10 millones de hectáreas con una producción anual de 98 millones de toneladas. Una tercera parte de esto, es producido en África, Asia, Latinoamérica y el Caribe, donde este cultivar representa una importante fuente de alimento y empleo (Frison y Sharroc, 1999).

Como alimento es considerado uno de los cultivos más importantes en el mundo, ocupando el cuarto lugar en importancia, después del arroz, trigo y el maíz. Los bananos son consumidos extensivamente en los trópicos, donde se cultivan y en las zonas templadas es apreciado por su sabor, gran valor nutritivo y por la

disponibilidad durante todo el año. El banano es un fruto muy digerible y útil en la alimentación. En los países desarrollados, las personas piensan en los bananos como una fruta sabrosa; sin embargo para más de 500 millones de habitantes en los países en vías de desarrollo (en los trópicos) es un alimento básico. Su mayor índice de consumo mundial *per capita* es en Uganda (450 kg/año), donde las palabras banana y comida tienen el mismo significado.

1.2.1 Cultivo del plátano en México.

En México el plátano o banano es producido a nivel comercial ocupando el segundo lugar en importancia económica de los frutales cultivados. Se cuenta con 82,089 hectáreas cultivadas que producen 1,964,545 toneladas de fruta, de las cuales el 95% se destina al consumo nacional y el 5% restante a la exportación (Beltrán-García, et al. 2009a). Las áreas productoras se localizan en las regiones tropicales y subtropicales de la costa del Golfo de México y Océano Pacífico. Los principales estados productores son Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Oaxaca, los cuales se agrupan en tres regiones productoras: Región del Golfo de México que ocupa el 42.6% de la superficie cultivada, comprendiendo los estados de Veracruz, Tabasco y Oaxaca. Región del Pacífico Centro con 24.4% con los estados de Nayarit, Colima, Jalisco y Michoacán. Por último, la Región del Pacífico Sur con 30.1% que comprende el estado de Chiapas (Figura 1).

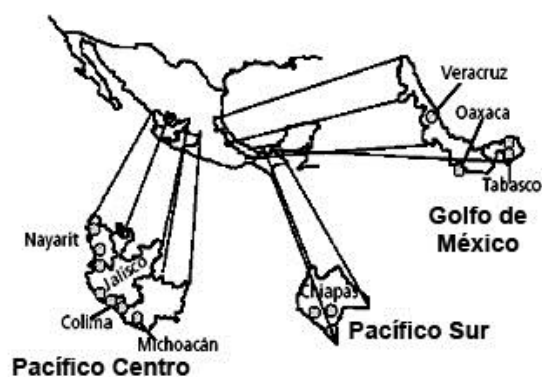


Figura 1. Regiones productoras de Banano en la República Mexicana.

Los grupos taxonómicos más importantes que se cultivan en México son: AAA (Enano Gigante y Valery, Subgrupo Cavendish), AAB (Macho y Dominico, Subgrupo Plantain), AAB (Manzano), ABB (Pera o Cuadrado) y AA (Dátil).

1.2.2 *Mycosphaerella fijiensis* del agente causal de la Sigatoka negra.

El primer reporte oficial del hongo causante de la Sigatoka negra afectando plantaciones comerciales de banano y plátano en México fue de los estados de Chiapas y Tabasco en el Sudeste del país en 1981. Sin embargo, la enfermedad fue observada por primera vez en el área de Tapachula (Chiapas) a finales de 1980 (Contreras M. 1983). Posteriormente, la Sigatoka negra se diseminó hacia los estados de Veracruz y Oaxaca en 1985. En la región del Pacífico-Centro, la sigatoka negra se detectó por primera vez en el estado de Colima en 1989 y un año después se diseminó a los estados vecinos de Michoacán, Jalisco y Guerrero. En Noviembre de 1994, la enfermedad fue encontrada en el estado de Nayarit. Con este último registro, la enfermedad se estableció en todas las áreas productoras de Musáceas en la República Mexicana (Orozco-Santos 2001).

El hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) [forma imperfecta *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton], que se reproduce tanto sexual como asexualmente, es causante de la Sigatoka negra, principal enfermedad del cultivo del banano (*Musa* spp.) a nivel mundial. *M. fijiensis* es un hongo ascomiceto haploide, perteneciente a la clase de los Dothideomycetes, orden Capnodiales, familia Mycosphaerellaceae (Churchill, 2010). *M. fijiensis* es un hongo hemibiotrófico (Hayden *et al.*, 2003) y en su fase biotrófica coloniza los espacios intercelulares de las células del mesófilo. Se mantiene en esta fase de 3 a 4 semanas antes de la aparición de lesiones necróticas. El cambio a necrótico ocurre por la liberación de toxinas, se forman conidios al inicio de la fase necrotrófica y las ascosporas al final de esta fase. Las toxinas que el hongo produce son de naturaleza lipofílica como la 2, 4, 8 trihidroxitetralona y la juglona (Stierle *et al.*, 1991; El-Hadrami *et al.*, 2005) y Cruz-Cruz *et al.*, (2009) encontraron

toxinas hidrofílicas de las cuales se desconoce su estructura. Ambos tipos de toxinas inducen la necrosis de la hoja y aunque el mecanismo de acción es diverso coincide con la formación de EOR como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 (Cruz-Cruz *et al.*, 2011).

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 (Jacome, 2002), siendo en la actualidad la enfermedad más importante que afecta la producción comercial del banano Cavendish en México.

El género al que pertenece este agente fitopatógeno es de los más numerosos, más de 1,000 especies han sido reportadas, *Mycosphaerella* es quizás, el género más grande de hongos fitopatógenos existentes en la naturaleza (Crous *et al.*, 2002; Goodwin *et al.*, 2001). Una característica general en los hongos de este género es el desarrollo de manchas foliares que dañan pero no matan a su hospedero, lo que provoca pérdidas económicas considerables sobre una amplia diversidad de cultivos incluyendo cereales, cítricos, soya, jitomate, fresa y algunos miembros perennes (Farr *et al.* 1995). También es particular que los miembros de este género penetren indirectamente a través del estoma sin la producción de un apresorio.

La infección por *M. fijiensis* disminuye la capacidad fotosintética de la hoja de plátano, reduciendo la producción desde un 50 hasta un 100%. Además provoca la maduración prematura del fruto. Ambos fenómenos impactan la economía de los agricultores y la disponibilidad de la fruta.

M. fijiensis, tiene la característica de reproducirse tanto sexual como asexualmente durante su ciclo de vida (Figura 2), lo que dificulta su manejo. La fase asexual, genera conidios que son liberados desde los conidióforos a partir de las primeras lesiones de la enfermedad (pizcas o estrías). La fase sexual produce una gran

cantidad de ascosporas desde estructuras llamadas peritecios, los cuales se forman sobre la superficie del estado de lesión más avanzado de la enfermedad (Gauhl *et al.*, 1994). Como consecuencia de la gran capacidad reproductiva del hongo, éste ha alcanzado una amplia variedad genética y patogénica que le ha permitido adaptarse a diversas condiciones ambientales (Carlier *et al.*, 1996. y Rivas *et al.* 2004).

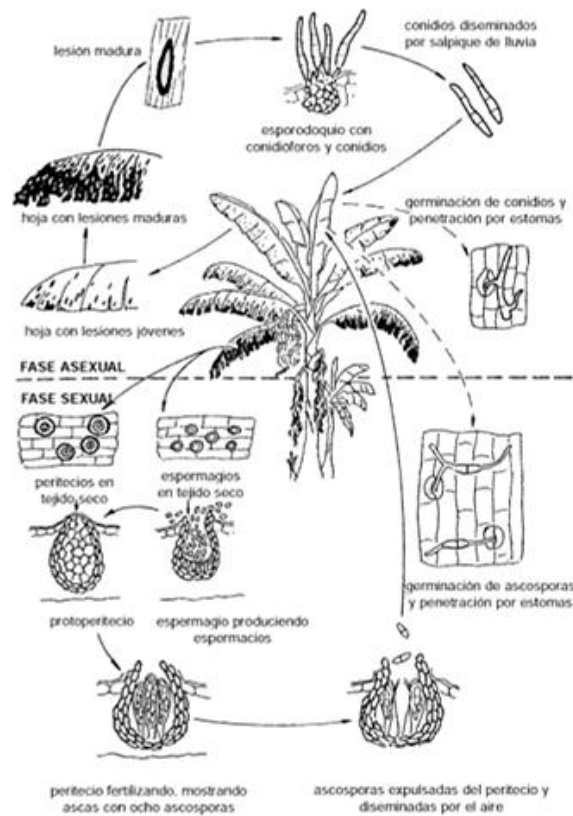


Figura 2. Ciclo de vida de *Micosphaerella fijiensis* (Morelet).

Las conidias y las ascosporas juegan un papel importante en la dispersión de la enfermedad. Las conidias se forman bajo condiciones de elevada humedad, especialmente si hay una película de agua sobre las hojas. La principal forma de dispersión es la lluvia y los chorreos, por lo que las conidias se asocian a la diseminación local de la enfermedad y son importantes en periodos de lluvias. Sin embargo, debido a que *M. fijiensis* produce pocas conidias, las ascosporas son

consideradas las más importantes en la diseminación de la enfermedad, ya que se dispersan por el viento a grandes distancias (más de 100 kilómetros) de la plantación a nuevas áreas de cultivo. Por lo tanto las variables agrometeorológicas que influyen en la germinación, penetración y éxito en la colonización de los tejidos internos y desarrollo de *M. fijiensis*, son la temperatura, la humedad relativa, el viento y la precipitación que definen la dinámica del inoculo y el impacto de la enfermedad en los rendimientos (Marín *et al.* 2003).

Cerca de 50 variedades genéticas de la familia de las Musáceas son sensibles a la Sigatoka negra, las cuales se clasifican en 3 categorías dependiendo a resistencia al fitopatógeno: a) cultivos altamente resistentes (**HR**) caracterizados por un bloqueo temprano de la infección en la hoja, b) cultivos parcialmente resistentes (**PR**) exhiben una lenta evolución de los síntomas, y cultivos susceptibles (**S**) caracterizados por un desarrollo rápido de las lesiones necróticas (Fouré *et al.*, 1990). Ejemplos de lo anterior son las variedades Yangami Km5 (AAA) (=HR), Fougamou (ABB) (=PR), y Enano Gigante (AAA) (=S), siendo esta última una de las variedades más cultivadas y consumidas alrededor del mundo (Beltrán-García, 2009a).

1.2.3 Síntomas de la Sigatoka negra en las hojas de banano.

Los síntomas de la Sigatoka negra fueron descritos por primera vez por Meredith y Lawrence en el 1969. En 1985 Fouré clasificó los síntomas observados en las hojas de plantas infectadas en seis diferentes etapas de desarrollo o estadios (Figura 3).

Etapa de desarrollo # 1. (**Pizca**) (Figura 3 C) Es el primer síntoma visible de la enfermedad en la hoja. Se observa una mancha pequeña o peca o pizca de color amarillo claro en el envés de la tercera o cuarta hoja.

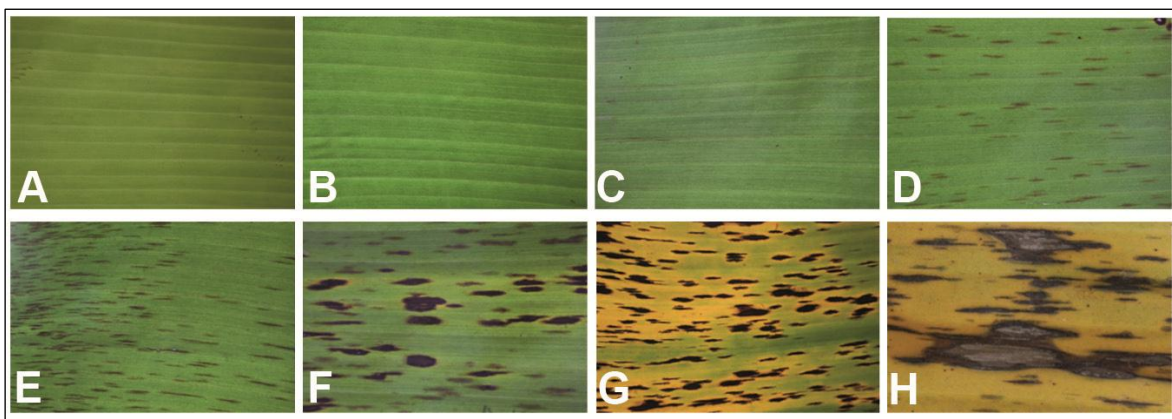


Figura 3. Aspecto característico de la superficie de la hoja de banano desde su emergencia hasta los Estadios de Fouré. **A** Hoja Cigarro, **B** Hoja Sana, **C** Pizca, **D** Raya 1, **E** Raya 2, **F** Mancha 1, **G** Mancha 2, **H** Mancha 3.

Etapa de desarrollo # 2. (**Raya 1**) (Figura 3 D) Se observa una estría o raya de color café visible en el envés de la hoja. Este color va cambiando a café rojizo y más adelante a negro en la parte de arriba de la hoja; sin embargo mantendrá el color café en el envés de la hoja.

Etapa de desarrollo # 3. (**Raya 2**) (Figura 3 E) Las estrías o rayas se mantienen del mismo color pero se hacen más grandes y pueden alcanzar una longitud de 2 a 3 cm.

Etapa de desarrollo # 4. (**Mancha 1**) (Figura 3 F) Se observan manchas de color café en el envés de las hojas, las cuales se observan de color negro en el haz o cara superior de las hojas.

Etapa de desarrollo # 5. (**Mancha 2**) (Figura 3 G) Las manchas negras se extienden al envés de la hoja y están rodeadas por una zona de color amarillo intenso.

Etapa de desarrollo # 6. (**Mancha 3**) (Figura 3 H) Las manchas comienzan a observarse hundidas y el centro se seca y adquiere un color grisáceo. Se acentúa el color negro alrededor de las manchas con bordes color amarillo brillante. Estas manchas se observan aunque la hoja se haya secado.

Esta descripción de seis estadíos es la referencia universalmente utilizada para describir los avances de los daños causados por la infección. Sin embargo hasta la fecha no se cuenta con una descripción histológica de los mismos que permita correlacionar la infestación del hongo con las actividades metabólicas que ocurren en cada etapa y que aporten datos a la comprensión del cambio de estado biotrófico a necrotrófico.

1.2.4 Problemática del control químico utilizado para el combate de la Sigatoka negra en México.

El Control químico es la estrategia empleada con mayor frecuencia en el manejo de las enfermedades de las plantas de banano y plátanos. Los compuestos utilizados son causantes de la muerte celular de los hongos. Los más utilizados en el combate de la Sigatoka negra son los inhibidores de demetilación (DMIs), aminas, inhibidores Qo (QoI o estrobilurinas) y benzimidazoles. Existiendo fungicidas de contacto como el Mancozeb y Clorotalonil.

El control químico por fungicidas representa entre el 40 y 60% de los costos de producción. Se estima que en México se gastan cerca de 500 millones de pesos anuales en la compra y aplicación de los fungicidas, según el costo promedio por hectárea/año que es de 1100 dólares (Marín et al., 2003). La enfermedad se combate mediante la aplicación de fungicidas de acción sistémica (que penetran la planta) y por fungicidas protectores por medio de avionetas. En algunas regiones productoras anualmente se aplican entre 15 y 30 ciclos de aspersión de fungicidas sistémicos y de 40 a 52 ciclos de fungicidas protectantes. Por lo que se calcula que cerca de 7 millones de kilos de ingrediente activo de fungicidas protectantes son depositados a escala nacional (Orozco-Santos et al., 2001). La dependencia excesiva de fungicidas ha ocasionado que la producción de banano sea considerada dentro de las más contaminantes en la industria agrícola, ya que

muchos de los agentes químicos usados tienen efectos adversos para la salud. De forma paralela el uso indiscriminado de los fungicidas conlleva varias consecuencias como son: La aparición de organismos secundarios al eliminar a los enemigos naturales y la acumulación de residuos en el medio ambiente y en la fruta, intoxicaciones y enfermedades en el hombre (cáncer, malformaciones genéticas e infertilidad), tanto en los trabajadores de las zonas productoras y en los vecinos a las mismas.

Estudios recientes de la de varias poblaciones de *M. fijiensis*, han mostrado la aparición de nuevos genotipos del hongo capaces de tolerar diferentes grupos de fungicidas que comúnmente se aplican en plantaciones comerciales de plátano. (Martínez-Bolaños 2012). Además provocó que el hongo desarrollara resistencia a prácticamente todos los fungicidas sistémicos utilizados, ya que el hongo de la Sigatoka negra mantiene distintas respuestas moleculares al efecto de los fungicidas que influyen en la modificación de la sensibilidad o en la resistencia.

Los trabajos de Aguilar-Barragán (2014) y García-Torres (2009) demuestran que existe resistencia a fungicidas del grupo de benzimidazoles, estrobilurinas y azoles en poblaciones del hongo aisladas del estado de Colima y del Pacífico-centro en general. (Macedo-Raygoza, 2010; García-Torres, 2009) reportan un aumento *in vitro* en las resistencias a los 8 fungicidas más utilizados, los sistémicos como: Propiconazol, Difeconazol, Carbendazim, Azoxiostrobin, Tridemorph y Pirimetanil y de contacto como: Mancozeb y Clorotalonil; en una serie de cepas de *M. fijiensis* aisladas de las regiones productoras de los estados Jalisco, Colima y Tabasco. De tal forma que sólo los fungicidas protectantes son parcialmente funcionales, como es el caso Mancozeb y Clorotonaloil. Siendo éstos demasiado tóxicos para la fauna y el hombre. El efecto de los fungicidas se limita a retener el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*, por lo que cada vez se requieren de mayores dosis y número de aplicaciones de fungicidas cada vez más agresivos en los campos de cultivos. Es probable que bajo esta dinámica de manejo de la enfermedad en algunos años sea imposible mantener la producción de plátano; al menos con la

variedad enano gigante cultivar Cavendish que es la variedad mas producida en el mundo con fines comerciales.

Sumado a esto la aplicación de fungicidas en la región Pacífico Centro ha costado a los agricultores cerca de 80 millones de pesos en el último año, por lo que se deben buscar otras estrategias.

En los últimos años, las bacterias endófitas han atraído la atención de la comunidad científica para ser usados como agentes de control biológico de patógenos de plantas como virus, bacterias y hongos debido a su capacidad de producir distintas clases de lipopéptidos antifúngicos, antibióticos y compuestos que promuevan el crecimiento de la planta brindándole protección ante agentes infecciosos (Arguelles-Arias et al. 2009).

1.2.5 Potencial de uso de control biológico

Este método de control de plagas consiste en el uso de organismos vivos o sus productos metabólicos, para eliminar o controlar a otro. Tiene su fundamento en la competencia que existe en la naturaleza entre poblaciones de organismos antagonistas, que por utilizar los mismos recursos principalmente para su nutrición, desarrollan mecanismos para establecerse en un sitio dado y desplazar a sus competidores.

El mecanismo general del control biológico contra los hongos fitopatógenos implica la prevención de crecimiento hifal, limitando la infección del patógeno al punto inicial de infección (Gohel et al., 2006). Esto puede ser dividido en efectos directos e indirectos. Los efectos directos incluyen la competencia por nutrientes o espacio, producción de enzimas líticas, inactivación de enzimas de patógenos y parasitismo. Los efectos indirectos incluyen aquellos que producen cambios morfológicos y bioquímicos en la planta hospedera, como tolerancia al estrés a través del fortalecimiento de la raíz y el desarrollo de la planta,

solubilización o secuestro de nutrientes inorgánicos y resistencia inducida (Viterbo et al., 2002).

En el laboratorio de Sigatoka negra y Estrés oxidativo de la UAG, se ha probado la actividad de quitinasas de bacterias epífitas aisladas de la hoja de banano pertenecientes a los *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus* (Tuesta-Popolizio, 2006); Mendoza-Ceja (2008), aisló 11 bacterias de suelo y hoja de bananos sanos, de las cuales 4 (*B. circulans*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* y *B. megaterium*) fueron seleccionadas por su habilidad para crecer en un medio con quitina coloidal como única fuente de carbono y que en pruebas de antagonismo directo lograron retener el crecimiento del hongo e incluso provocar su lisis; Pérez-Hernández (2009), probó la eficiencia del medio de quitina proveniente del hongo para promover el desarrollo bacteriano, así como la influencia que tiene el medio de desarrollo en la producción de metabolitos capaces de retener el crecimiento del patógeno. En 2010, Martínez-Molina, aisló y caracterizó 12 cepas de bacterias epífitas del banano con actividad quitinolítica capaces de inhibir el crecimiento de *M. fijiensis* en pruebas de antagonismo directa desde un 83 hasta un 100%, además desarrolló un método mediante el cual se realizan pruebas de antagonismo indirecto con lo que se prueba la producción de metabolitos bacterianos capaces de inhibir el crecimiento del patógeno; Cruz-González, (2011) probó el efecto inhibitorio del sobrenadante libre de células de 5 bacterias endófitas del banano: *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus amyloquefaciens* y *Bacillus thuringiensis*, sobre el crecimiento de 5 cepas de *M. fijiensis*, reteniendo su crecimiento en porcentajes que van desde el 29 hasta el 60% de inhibición en comparación con los controles; Nogueira-López (2012) logró aislar 55 bacterias endófitas del banano, de las cuales mediante pruebas de antagonismo indirecto, seleccionó 19 capaces de retener el crecimiento del patógeno causal de la sigatoka negra desde un 60 hasta un 100%.

1.2.6 Bacterias endófitas

Las plantas pueden ser consideradas como un complejo microecosistema donde los diferentes hábitats son explotados por una gran variedad de bacterias (McInroy and Kloepper, 1994). Estos hábitats no solo están representados por los tejidos externos donde habitan los microorganismos epífitos, sino, dentro de los tejidos internos hay una variedad de microorganismos con la capacidad de penetrar al hospedero y sobrevivir, donde son capaces de interactuar entre los diferentes grupos taxonómicos y establecer un equilibrio. La microflora ubicada en la rizosfera juega un papel muy importante en el desarrollo de la planta y en la capacidad de sobrevivir al estrés ambiental (Choudhary and Johri, 2008).

Las bacterias endófitas son aquellas capaces de vivir en los espacios intercelulares de la planta y no provocar daños aparentes, y pueden ser aislados de tejidos cuya superficie haya sido previamente desinfectada (Hallmann et al., 1997). Pueden provenir tanto de microorganismos presentes en el suelo, como de aquellos introducidos por prácticas de la agricultura (Gordon y Okamoto, 1992). En muchos casos, la asociación de endófito-hospedero se considera mutualista (Saikkonen, 2004), las plantas se benefician en términos de aumento de crecimiento y reproducción y desarrollo de resistencia a estrés biótico y abiótico (Postma y Rattink, 1991; Larkin et al., 1996).

Las bacterias endófitas colonizan la región intercelular en diversas plantas, siendo la raíz el sitio de mayor entrada y nicho (Bacon et al., 2002), pero también son capaces de colonizar las partes aéreas a través de su entrada por estomas y heridas, y su distribución a través de los tejidos, pudiendo ser aisladas de hojas, capullos, flores y frutos (Bacon y Hinton, 2006).

Las especies bacterianas identificadas como endófitos no son propias de una sola especie vegetal, pues se han aislado los mismos organismos de diferentes

cultivos, como *Bacillus pumilus* en cítricos (Araujo et al., 2002), Equinacea (Lata et al., 2006), arroz (Jha et al., 2011), algodón (McInroy y Kloepper, 1994) y banano (Nogueira-López-2012).

Numerosos reportes han demostrado que los microorganismos endófitos tienen la capacidad de actuar como agentes de biocontrol contra los patógenos de plantas (Wilhelm et al., 1998; Cao et al., 2004), sintetizar metabolitos antifúngicos (Taechowisan et al., 2005), y que son capaces de disminuir o prevenir los efectos perjudiciales de ciertos organismos patógenos *in vitro* e *in vivo* (Ryan et al., 2008).

Los mecanismos de biocontrol que ejercen las bacterias endófitas contra los organismos fitopatógenos, son: competencia del nicho ecológico o el sustrato, producción de compuestos inhibidores, y la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR) en la planta hospedante.

1.2.6.1 Producción de antibióticos

Existe una amplia variedad de antibióticos secretados por bacterias endófitas que han sido identificadas, incluyendo compuestos como amfisina, 2,4-diaceticloroglucinol (DAPG), cianuro de hidrogeno, omicina A, fenazina, pioluteorina, pirrolnitrina, tensina, tropolona, y lipopéptidos cíclicos como iturinas, surfactinas, fengicinas. Todos estos compuestos juegan un papel fundamental en la supresión de los fitopatógenos en las plantas (Compant et al., 2005). También existen diversas enzimas hidrolasa (proteasas, quitinasas, glucanasas), que pueden ser secretadas por varias especies de bacterias que actúan en la supresión del desarrollo de los patógenos (Choudhary and Johri, 2009). En el banano (*Musa spp. AAA*), la bacteria endófitas de raíz *Pseudomonas aeruginosa* con la biosíntesis de DAPG, ejerce control sobre el desarrollo de *F. oxysporum cubense* (Ayyadurai, 2006). En la uva (*Vitis vinífera*) la bacteria *Acinetobacter lwoffii* con la producción de β -1,3-glucanasa y quitinasa inhibe el desarrollo de *Botrytis cinerea* (Magnin-Robert et al., 2007).

La antibiosis es uno de los mecanismos más importantes contra infecciones causadas por hongos. Los agentes supresores de hongos más reconocidos son las *Pseudomonas fluorescens*, haciendo de este grupo el más ampliamente estudiado como productores de antibióticos en la rizósfera. Siendo los derivados de la fenazina, los más implicados en el biocontrol, contribuyendo a la supresión de enfermedad (Gohel et al., 2006). Las poblaciones microbianas evolucionan y se asocian formando una biopelícula en las raíces y suelo de superficies particulares. Una vez establecidos en la fitósfera, los aislados de *Bacillus* pueden desplegar un arsenal de antibióticos. (Ongena y Jacques 2007). Se demostró que la rizósfera de las plantas de banano constituyen un microambiente favorable para las bacterias de suelo (Sutra et al., 2000).

Uno de los organismos más usados y bien estudiados, es la rizobacteria *Bacillus subtilis* donde el 4- 5 % de su genoma contiene información para la síntesis de antibióticos y cuenta con el potencial de producir más de dos docenas de compuestos antimicrobianos estructuralmente diversos (Stein, 2005).

Los antibióticos peptídicos son una clase abundante de metabolitos especiales producidos por muchas especies microbianas, incluidas las bacterias Gram positivas. (von der Weid et al., 2003). Tres importantes tipos de moléculas se encuentran involucradas en el antagonismo de las bacterias provenientes de la rizósfera contra los patógenos fúngicos: sideróforos, antibióticos y ácido cianhídrico (HCN) (Loper y Schroth 1986; O'Sullivan y O'Gara 1992).

1.2.6.2 Promoción de Crecimiento

Los endófitos promueven el crecimiento y un mayor número de raíces y pelos radiculares laterales (Pillay y Nowak, 1997), así como altura de la planta, peso del brote y diámetro (Yates et al., 1997), estos fenómenos son atribuidos a la producción de promotores de crecimiento (Porter et al., 1979).

El crecimiento en plantas se puede deber a factores como síntesis de AIA, ácido giberélico, citocininas, sideróforos, α -1,3-glucanasas, quitinasas, antibióticos, supresión de patógenos, fijación de nitrógeno, etileno y solubilización de nutrientes minerales (Cattelan et al., 1999). Los efectos positivos de las bacterias promotoras de crecimiento se pueden observar a través de dos mecanismos:

Mecanismos indirectos: los metabolitos producidos pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia.

Mecanismos directos: ocurren cuando los metabolitos producidos son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta. (Jiménez-Delgadillo, et. al. 2001)

Entre los organismos promotores de crecimiento podemos encontrar los pertenecientes a la rizósfera como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Bacilli*, capaces de producir fitohormonas (Tang, 1994; Halda-Alija, 2003).

1.2.6.3 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno, es uno de los macroelementos indispensables para el desarrollo de todos los seres vivos, ya que forma parte de moléculas esenciales tales como los aminoácidos, y las bases nitrogenadas de los nucleótidos. Sin embargo y de manera paradójica, pese a que la atmósfera de nuestro planeta está conformada por un 78% de este elemento, el nitrógeno molecular (N_2) no puede ser incorporado por la inmensa mayoría de los seres vivos. Los únicos seres vivos capaces de realizar la reacción de reducción del nitrógeno a través de la nitrogenasa son las *Eubacteria* y *Archaea*. Este fenómeno biológico, conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) debería asegurar la disponibilidad de

nitrógeno en los organismos, sin embargo, en la mayoría de los cultivos intensivos existen déficit de este nutriente, convirtiéndose éste en un factor limitante para el crecimiento y desarrollo, y debiendo ser suplementado a través del uso de fertilizantes nitrogenados.

El nitrógeno es uno de los nutrientes limitantes más determinantes en la producción agropecuaria, generalmente se tiene un desbalance entre la demanda por la planta y la cantidad de nitrógeno suministrado por los fertilizantes, representando en una pérdida del 50 al 70% al ambiente (Ladha et al., 1997).

El ciclo del nitrógeno (Figura 4) en la biosfera comprende principalmente la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2), la mineralización, la nitrificación, la desnitrificación (Hayatsu *et al.*, 2008) y la oxidación anaeróbica del amonio Annamox (Hu *et al.*, 2011), procesos mediados principalmente por microorganismos presentes en el suelo (Klotz y Stain, 2008). El nitrógeno entra en la biosfera por fijación química y biológica del nitrógeno molecular (N_2) y se remueve de la misma por desnitrificación. Para entender qué direcciona la dinámica del N, es necesario comprender la intrincada red de procesos que dependen de la actividad microbiana (McGrath *et al.*, 2010). Sin embargo, es poco lo que se sabe acerca de dichos procesos y de la diversidad microbiana involucrada.

La atmósfera contiene alrededor de 10^{15} toneladas de gas N_2 , y se estima que la fijación biológica contribuye globalmente con 180 millones de toneladas métricas de amonio por año y que el aporte actual de nitrógeno por fertilizantes químicos es comparable con el aporte biológico (Tilak *et al.*, 2005). Desde su descubrimiento, se ha reconocido la importancia de la fijación biológica para la productividad y sostenibilidad de los cultivos (Rees *et al.*, 2005).

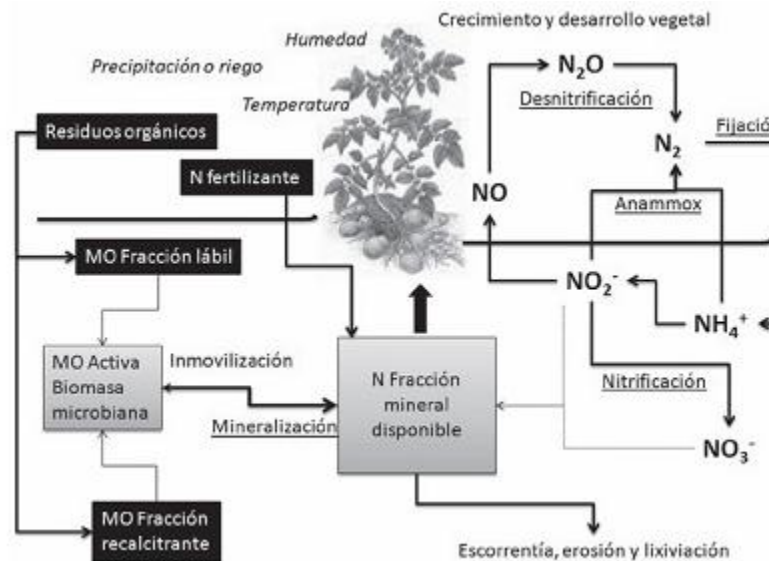


Figura 4. Relaciones entre el ciclo del nitrógeno y los compartimientos orgánicos y minerales. Los cuadros negros son entradas al sistema, los cuadros grises representan fracciones disponibles.

Los procesos de fijación los llevan a cabo gran variedad de bacterias que poseen nitrogenasas, enzimas que rompen el triple enlace del nitrógeno molecular y producen amonio. Las bacterias diazótrofes puede ser simbióticas (obligadas, asociativas o endófitas) y de vida libre, ejemplos de simbióticas obligadas son *Rhizobium* y *Frankia* mientras que *Cyanobacteria*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* ejemplifican las asociativas o endófitas; las no simbióticas están representadas por *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* y *Xanthobacter*.

Para los sistemas agrícolas la incorporación de nitrógeno es esencial para la fertilidad del suelo y por tanto para la productividad vegetal. No existe un consenso sobre los efectos de la fertilización orgánica o mineral a largo plazo sobre la diversidad diazótropa en suelos (Tang, *et al.*, 2012).

Los procesos de mineralización del nitrógeno son determinantes para la disponibilidad del elemento en los ecosistemas terrestres (Nourbakhsh y Sheik-

Hosseini 2006). Estos procesos son principalmente por la deaminación y degradación de materia orgánica, de modo que responden a la cantidad y tipo de enmiendas orgánicas. Se ha demostrado que existen efectos vegetales sobre la composición de las múltiples fracciones de materia orgánica, que pueden tener una importante influencia sobre la biodegradabilidad y biodisponibilidad del nitrógeno, dichos efectos están relacionados con la dinámica del N de los detritos radiculares y la composición funcional vegetal, que a su vez tienen influencia sobre las tasas netas de mineralización. Se conoce que la asimilación microbiana (inmovilización) es un proceso crítico que controla la disponibilidad de N para las plantas (Forana *et al.*, 2011).

Los péptidos y proteínas son los compuestos más abundantes de la fracción de N orgánica, se ha demostrado (Nannipieri y Eldor, 2009) que una gran porción de estos se encuentra asociada con compuestos húmicos. El principal mecanismo de movilización del nitrógeno orgánico es la proteólisis, la hidrólisis de proteínas puede liberar aminoácidos y péptidos que son metabolizados por la mayoría de los organismos, por esto se considera crucial para mantener la calidad del suelo, la productividad y sostenibilidad de la agricultura (Fuka *et al.*, 2008). Se ha propuesto (Fuka *et al.*, 2009) que las proteasas de origen bacteriano (*Vibrio ssp.*, *Bacillus ssp.*, *Thermoactinomyces ssp.*, *Paenibacillus ssp.*, *Clostridium ssp.*, y *Alicylobacillus ssp.*) son las principales responsables de la degradación proteica en los suelos.

El uso de biofertilizantes pretende dar una solución económica a través de la aplicación de inóculos microbianos capaces de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. Los organismos asociados y de vida libre capaces de fijar nitrógeno, han sido denominados como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (RPCP), con la habilidad de incrementar significativamente el rendimiento de los cultivos bajo condiciones controladas y de campo (Bashan, 1998).

Las rizobacterias pueden fijar nitrógeno en asociación con las raíces de arroz de manera interna y externa, es convertido a ion amonio (NH_4^+) en el citoplasma de

las bacteria y excretados al citoplasma del hospederos a través de un proceso downhill, esta liberación puede ser inhibida por la presencia ambiental del mismo ion. La mayoría del nitrógeno fijado por las bacterias es aprovechado una vez que se han mineralizado después de su muerte (Mia y Shamsuddin, 2010).

En Brasil, se ha empleado con éxito la fertilización biológica de soya con *B. japonicum* y 0% de aporte de N como fertilizante químico, ello ha conducido a que este país sea el segundo productor de soya a nivel mundial (Baca et al. 2000).

1.2.6.4 Solubilización de fosfatos

El fósforo, es otro de los macroelementos indispensables para los organismos, debido a su participación en la construcción de nucleótidos, tanto polimerizados (ADN Y ARN), como monoméricos (ATP, NAD⁺). El principal problema para su biodisponibilidad estriba en que en los suelos tropicales, hasta un 85% del fosforo existente es fijado por procesos de mineralización y en consecuencia permanece inaccesible para las plantas.

Este elemento proviene de las apatitas y depósitos de fosfato natural de donde es liberado a través de procesos de meteorización, lixiviación, erosión y extracción industrial como fertilizante. El fosfato liberado paulatinamente de las apatitas lo absorben las plantas y la biomasa microbiana, luego se incorpora en la materia orgánica de los suelos y sedimentos, y nuevamente se deposita en formas minerales poco solubles. El fósforo inorgánico (Pi) se presenta generalmente fuertemente fijado en forma de fosfatos de Ca²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ y Al³⁺, especialmente en arcillas del grupo de las caolinitas y ocluido en los óxidos de hierro y aluminio. Incluso el P, aplicado como fertilizante en forma de superfosfato, puede fácilmente constituir compuestos inorgánicos inutilizables, debido a su inmovilización sobre la materia orgánica y arcillas.

Las plantas han desarrollado varias estrategias para la adquisición de fósforo bajo limitación de este nutriente (Bunemann, 2008; Turner *et al.*, 2003), que incluyen

modificaciones morfológicas de la raíz, adaptaciones fisiológicas, alteraciones bioquímicas que promueven asociación con microorganismos de la rizósfera. El ciclo del P (Figura 5), a diferencia del ciclo del nitrógeno, no incluye cambios en la valencia. Los principales procesos en el suelo involucran, toma por las plantas y su retorno a través de los residuos vegetales y animales, reacciones de fijación a las superficies de arcillas y óxidos y el recambio biológico dado por procesos de mineralización-inmovilización y solubilización dependientes de la actividad microbiana (Stevenson y Cole, 1999).

La principal contribución a la recirculación del fósforo en los suelos está dada por el recambio de los procesos de mineralización-inmovilización microbianos (Richardson y Simpson, 2011), que poseen un papel esencial especialmente en la rizósfera. Los microorganismos que colonizan la rizósfera pueden excretar ácidos orgánicos que incrementan la solubilidad del P y enzimas con actividad fosfatasa que hidrolizan mono, di y tri ésteres de fosfato, junto con las asociaciones micorrízicas que son críticas en la disponibilidad para muchas plantas (Graham y Miller, 2005).

El aislamiento de bacterias nativas capaces de solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno es un paso importante cuando se estudia su capacidad inherente para beneficiar los cultivos y ser capaces de soportar los factores de estrés abiótico impuestos por las características del sitio a tratar (Ramachandran et al., 2007). Las fosfatasas extracelulares que se requieren para la mineralización/hidrólisis de los ésteres orgánicos de P, las producen microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Nostoc* sp., *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Corynebacterium glutamicum*) y plantas.

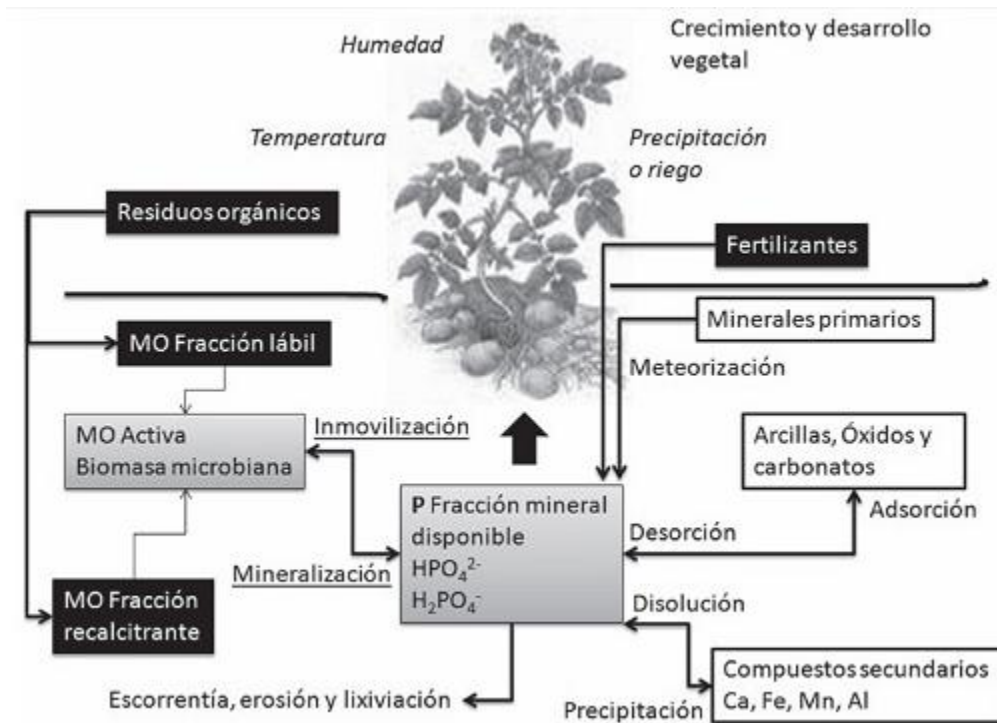


Figura 5. Relaciones entre el ciclo el fósforo y los compartimentos orgánicos y minerales. Los cuadros negros son las entradas al sistema, los grises las fracciones disponibles, sin color las fracciones minerales.

La determinación de su actividad en el suelo se utiliza como indicador del potencial de mineralización de fósforo orgánico y de actividad biológica (Acosta y Tabatabai, 2000). Sakurai *et al.*, (2008) encontraron que la actividad y biomasa microbiana poseen un papel fundamental en la mineralización de este elemento, especialmente en la rizosfera. Estos microorganismos incrementan la disponibilidad del fósforo para las plantas al mineralizar el fosfato orgánico en el suelo y solubilizar los fosfatos precipitados. Se estima que en el suelo promedio del 1 al 50% de todas las poblaciones de bacterias son solubilizadoras de fosfatos (Khan *et al.*, 2009).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos se han utilizado como biofertilizantes desde 1950. Los microorganismos aumenta la disponibilidad del fósforo para las plantas al mineralizar el P orgánico en el suelo y solubilizar los fosfatos precipitados (Figura 6).

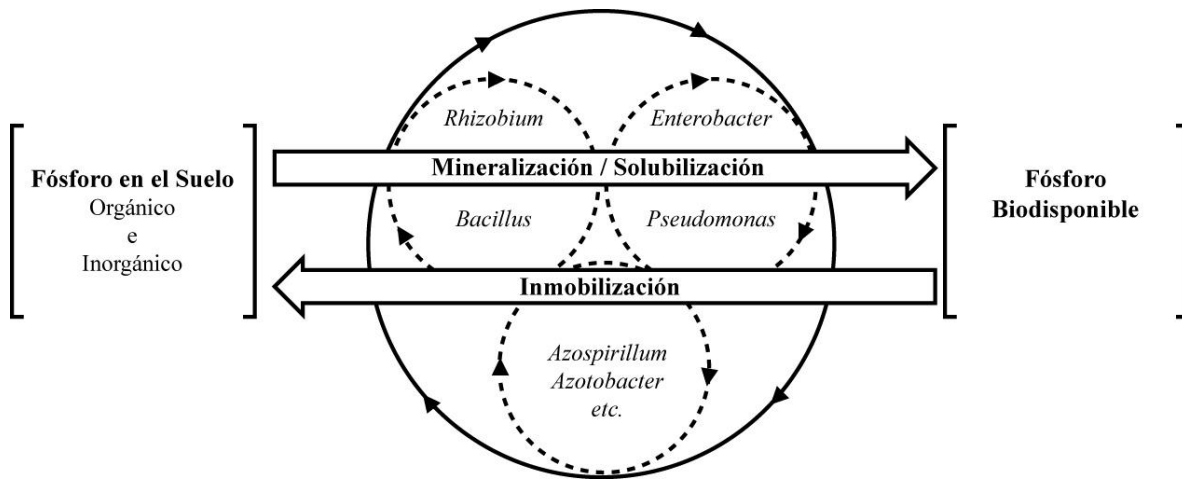


Figura 6. Ciclo de solubilización e inmovilización del fósforo en el suelo mediado por microorganismos.

1.2.6.5 Producción de Sideróforos

El hierro es el cuarto metal más abundante en los suelos (Crichton y Charlotheaux-Wauters, 1987) y es uno de los micronutrientes esenciales para prácticamente todos los seres vivos, a excepción de las bacterias ácido lácticas en las cuales el manganeso y el cobalto son utilizados en lugar de este metal (Weinberg, 1997). Este metal es esencial para el metabolismo celular como cofactor numerosas enzimas (Wandersman y Delepelaire, 2004), además de cumplir diversas funciones en procesos biológicos esenciales, como transporte de oxígeno, síntesis de ADN, fijación de nitrógeno, respiración y fotosíntesis (Greenshields *et al.*, 2007). A pesar de su abundancia en la naturaleza, en condiciones fisiológicas (presencia de oxígeno y pH neutro) este elemento es escasamente disponible debido a la rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y la subsecuente formación de hidróxidos insolubles (Harrington y Crumbliss, 2009).

Cuando muchos microorganismos crecen en ambientes cuya cantidad disponible de hierro es muy limitada, producen compuestos queladores de hierro de bajo peso molecular y altamente específicos llamados sideróforos. Los sideróforos microbianos son moléculas secretadas por microorganismos en condiciones de

deficiencia de hierro para secuestrar el hierro de su entorno. son moléculas de bajo peso molecular de 0.5 a 1.0 kDa, solubles en soluciones acuosas a pH neutro (Dybas *et al.*, 1995) que son sintetizados por bacterias, principalmente Gram negativas, hongos, levaduras y algunas plantas (fitosideróforos), particularmente gramíneas (Drechsel y Jung, 1998).

Las bacterias productoras de sideróforos, poseen un sistema de transporte y un receptor de membrana específico, que reconocen el complejo sideróforo- hierro III, por lo cual estos sirven como vehículo de este elemento hacia el interior de la célula bacteriana. La síntesis de estas moléculas incrementa cuando los microorganismos se encuentran en condiciones limitativas de hierro (Ratledge y Dover, 2000).

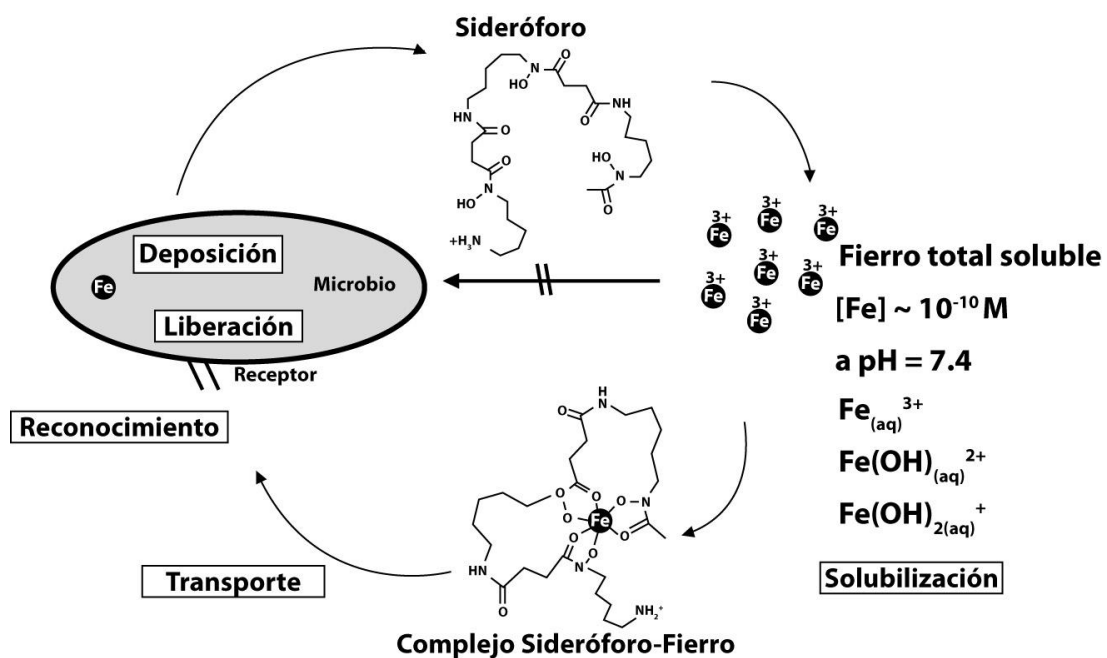


Figura 7. Mecanismo de actividad de sideróforos.

Existen numerosas referencias que describen el uso de bacterias asociadas con plantas para estimular su crecimiento y como agentes mejoradores del suelo y de la sanidad vegetal (Welbaum *et al.*, 2004). Este grupo de bacterias son llamadas rizobacterias (o simplemente bacterias) promotoras del crecimiento de las plantas (RPCV o BPCV) (Glick *et al.*, 1995; Kloepper y Schroth, 1999).

Se ha demostrado que la concentración de este complejo es en ocasiones lo suficientemente alta para beneficiar la nutrición de las plantas (Crowley *et al.*, 1987). De hecho, los exudados radicales, particularmente los compuestos fenólicos, tienen un efecto importante en la proliferación de microorganismos productores de sideróforos en la rizosfera de las plantas, especialmente en situaciones de baja disponibilidad de hierro (Jin *et al.*, 2010)

La producción de sideróforos por organismos endófitos facilita la asociación planta-bacteria y contribuye a la colonización de raíces, tallo y hojas (Compant *et al.*, 2005).

Loaces *et al.* (2011) demuestra la ventaja de la producción de sideróforos por parte de endófitos del arroz, los cuales permiten a las bacterias mantener la interacción con la planta y una permanencia en los tejidos, de igual forma, evita la muerte de la raíz al secuestrar las formas más solubles de Fe (II) liberadas de complejos hidratados de óxidos de hierro a medida que el suelo se vuelve anóxico con el desarrollo del cultivo, por lo que establecen que el papel de los endófitos productores de sideróforos puede cumplir dos propósitos: Capturar Fe (III), generado por la oxidación de Fe (II) en micro-nichos oxidantes de la planta y la rizósfera, incrementando la disponibilidad local de hierro o reducir la toxicidad de Fe (II) hacia la planta por acumulación del metal secuestrado en el interior de las células bacterianas.

Sin embargo, la producción de sideróforos como un mecanismo de secuestrar el hierro disponible en el medio ambiente puede ocasionar que se logre limitar el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Dowling *et al.*, 1996). Recientemente se ha encontrado que, por ejemplo, la bacteria *Azospirillum brasilense*, distinguida por su capacidad para fijar nitrógeno y producir ácido indolacético (AIA), también es capaz de controlar al hongo

fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* en cultivos de fresa mediante la producción de sideróforos (Tortora *et al.*, 2011).

1.2.7 Proceso de Colonización de las bacterias endófitas.

La gran mayoría de las plantas contienen bacterias endófitas, las cuales normalmente deberán lograr penetrar en ellas, con la excepción de las bacterias transmitidas por las semillas que se encuentran presentes desde antes de su germinación. En general, la entrada al tejido de la planta puede ser vía estoma, lenticelas, áreas de emergencia lateral de las raíces y radículas de germinación (Huang, 1986). De forma reciente el proceso de colonización ha adquirido importancia entre la comunidad científica para entender el fenómeno de simbiosis y todas las propiedades que se derivan en favor del desarrollo de la planta. Las raíces de las plantas son el principal sitio en el que sucede la colonización de hongos y las bacterias endófitas. Para el caso de las bacterias el proceso ocurre en varias etapas. En la primera: acontece la movilización de la bacteria del suelo hacia la raíz de la planta. Esto sucede pasivamente debido al flujo del agua en el suelo, o activamente debido a una inducción específica del movimiento flagelar causada por compuestos relacionados con la raíz de la planta (Quimiotaxis). En la segunda el contacto físico entre la bacteria y la superficie de la raíz, se presenta una adherencia no específica. Tercera: como resultado de lo anterior, se desarrollan interacciones específicas o complejas entre bacteria-célula de raíz, entre estos la generación de exudados por la inducción de expresiones de determinados genes en ambos participantes, conocido como fenómeno de anclaje. Por ejemplo, algunos flavonoides, compuestos fenólicos, aumentan el proceso de colonización en la planta *Arabidopsis thaliana* por *Herbaspirillum seropedicae* y *Azorhizobium caulinodans* (Webster *et al.* 1998). El anclaje, produce una relación permanente entre los dos organismos, sin embargo ocurre exclusivamente en la superficie de las células de los pelos radiculares. Es en la cuarta etapa cuando se lleva a cabo la penetración de las bacterias ancladas a través de las pequeñas lesiones que ocurren de forma natural debido a los propios fenómenos de

crecimiento que se ocasionan en las uniones epidérmicas y superficies de las células de la raíz o por la capacidad celulolítica, pectinolítica, de endoglucanasas y poligalacturonasas de los microorganismos. De forma alternativa, las bacterias endófitas son capaces de utilizar organismos vectores, penetrando directamente a través de las lesiones derivadas de la actividad de organismos rizófagos, e incluso, por las pequeñas perforaciones ocasionadas por una amplia variedad de insectos de hábitos alimenticios perforadores-chupadores. La penetración de las bacterias al interior de los tejidos vegetales no garantiza su permanencia, una vez que se encuentran en el interior, las bacterias deben lograr la última fase de la colonización (Hardoim et al., 2012). Quinta etapa: Establecimiento En esta fase, usualmente las bacterias benéficas pueden colaborar al mantenimiento de la salud de las plantas colonizadas, principalmente a través de la producción de compuestos reguladores y fitohormonas como el ácido indolacético (IAA), acetoina (3-hidroxi-2-butanona), 2-3-butanodiol, o bien, metabolizar compuestos como ácido fenilacético (PAA), gamma-aminobutyrate (GABA) o precursores de etileno 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) (Taghvi et al. 2010). Cambios en la fisiología de las plantas puede llevar a modificaciones de la población de endófitos, alterando la colonización. Un régimen de fertilización con alto contenido de nitrógeno modifica el patrón de colonización, debido a una disminución en la cantidad de sacarosa disponible, que es usada como fuente de carbono por los microorganismos (Fuentes-Ramírez et al. 1999).

Varios estudios de colonización demuestran la permanencia y migración de las bacterias y hongos a través de los tejidos de las mismas. Otras investigaciones han demostrado que bacterias endófitas no patogénicas o no simbióticas, desaparecen rápidamente del interior de los tejidos radiculares, presumiblemente por que éstas son degradadas por la propia planta (Paungfoo-Lonhienne et al. 2010), esto abre líneas de estudio que servirán para entender como las plantas obtienen fuentes de nitrógeno en ambientes muy limitados de materia orgánica.

1.2.8 Reintroducción de bacterias endófitas.

Existen muy pocos estudios realizados que establezcan una metodología para la reintroducción de endófitos. Bressan et al., en 2004, probaron la efectividad de 5 métodos de reintroducción de bacterias endófitas en plantas de maíz definiendo como su mejor opción el sumergir la raíz en una suspensión bacteriana, demostrando que éstas pueden ser recobradas de los tejidos después de realizar inoculaciones. En la planta *Morus alba* fue posible determinar la población bacteriana de *Burkholderia cepacia* por medio de la cuantificación de colonias aisladas de raíz, tallo y hojas previamente desinfectadas de la superficie, esta bacteria se puede recuperar después de 7 días de la inoculación en tejidos de raíz y tallo pero en el caso de las hojas esto se logró hasta los 14 días post inoculación lo que nos indica que las bacterias difunden de la raíz hacia las hojas. 49 días post inoculación, la bacteria puede ser recobrada de cualquier estructura de la planta. Las poblaciones recuperadas de esta cepa oscilaron entre 1 y 5 x10⁵ UFC/ g de tejido fresco (Ji et al., 2010). Por otra parte Sachdev y col. en 2009, obtuvieron diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la rizósfera de trigo con la capacidad de producir fitohormonas (AIA). Se buscó la re-introducción de estas bacterias en las semillas del trigo inoculando con 1 ml de un cultivo de bacterias de menos de 24 hrs ajustado a una absorbancia de 0.5 a 540 nm equivalente a 10⁶–10⁷ células por mililitro.

Recientemente, el uso de técnicas de biología molecular y microscopía confocal han sido una herramienta para evaluar la colonización de un microorganismo en particular. Un ejemplo de esto es la bacteria *E. cloacae* KKWB-10 aislada de banano y que ejerce un efecto de inhibición en *Fusarium*. La adición del gen de la proteína verde fluorescente a un promotor, ayudó a determinar la colonización de la bacteria diez días después de inoculada. Sin embargo, esta técnica se limita al uso de una sola cepa transformada para poderla detectar *in situ*. Los acercamientos experimentales para evaluar la colonización han medido la presencia de una sola bacteria introducida. En el presente trabajo, se pretende

evaluar la reintroducción y colonización en plántulas de banano usando una mezcla de 10 bacterias.

1.2.9 Origen y selección de las cepas bacterianas utilizadas.

Para la obtención del grado de Maestro en Ciencias, se realizó un trabajo de aislamiento y selección de cepas bacterianas con potencial antifúngico para el control de la Sigatoka negra. Se logró aislar un total de 387 cepas provenientes de muestras de material procedente de hoja y suelo de dos predios de producción comercial: a) Rancho “La Uva”, en Cihuatlán, Jalisco, y b) Rancho “Valdovinos”, ubicado en Armeria, Colima, como se muestra en la Figura 8.

Estas 387 cepas, fueron sometidas a pruebas de selección, con la finalidad de concentrar el trabajo en aquellas que presentaran mayor potencial antifúngico. Las pruebas de selección utilizadas, probaron que estas cepas bacterianas producen metabolitos que pueden degradar la pared celular fúngica (quitinasas), lograban la retención de crecimiento del micelio de 2 hongos fitopatógenos y demostraron una afinidad hipotética para colonizar el banano. Las pruebas se resumen a continuación:

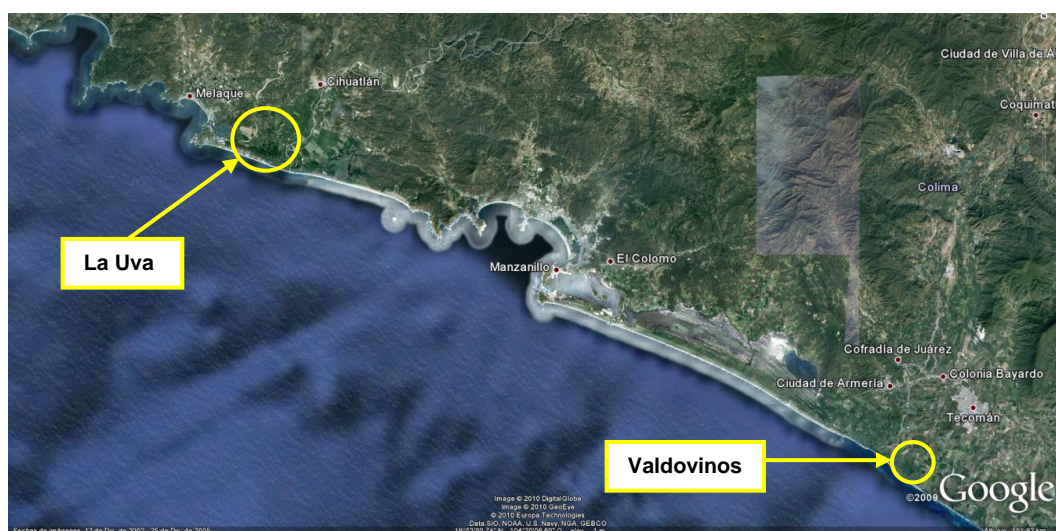


Figura 8. Localización de los predios origen de las cepas bacterianas: Rancho “La Uva”, en Cihuatlán, Jalisco, y Rancho “Valdovinos”, en Armeria, Colima.

1.2.10 Pruebas de selección realizadas durante la Tesis de Maestría

a. Selección de Bacterias que puedan utilizar la quitina coloidal como su fuente de carbono.

La primera prueba de selección fue la capacidad de crecer en un medio de quitina coloidal como única fuente de carbono, permitiendo reducir el número de cepas bacterianas a 42. Ejemplos de esta prueba se presentan en la Figura 9 y las 42 cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 1.

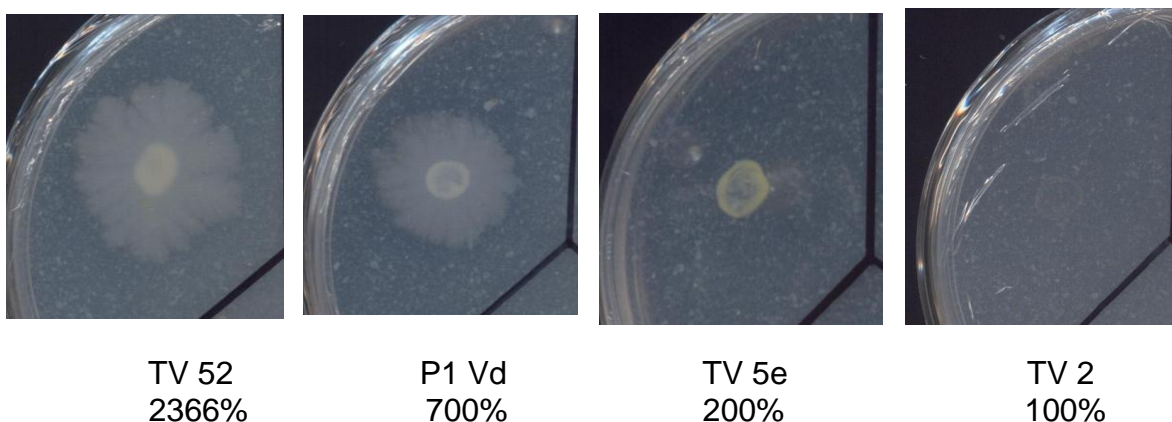


Figura 9. Ejemplos de diferente capacidad de crecimiento en Quitina Coloidal a las 96 hrs de incubación.

Tabla 1. 42 cepas bacterianas seleccionadas por su capacidad quitinolítica.

CEPA	CEPA	CEPA	CEPA
P1 Va	P4 Vb dg	P6 Vb dg	Tv 42 a
P1 Vb	P4 Vc dg	P6 Vc	Tv 42 cc A
P1 Vd	P4 Vc1	P6 Ve	Tv 42 cc B
P1 Ve	P4 Vc2	P6 Vf	Tv 51 ac
P1 Vg	P4 Vd	P6 Vh	Tv 52
P2 Va	P5 Vb dg	Tv 1c	Tv 5b
P2 Vb	P5 Vd E dg	Tv 1 cA	Tv 5 e
P2 Vb dg	P5 Vg dg	Tv 2	Tv 5f
P2 Ve	P6 Va	Tv 3c	Tv 5g
P4 Va dg	P6 Va dg	Tv 41 ac	Tv 5 ñc
	P6 Vb	Tv 41 bc	

b. Selección de Bacterias que puedan utilizar micelio de *M. fijiensis* como su fuente de carbono.

Se prepararon cajas de petri con medio de cultivo Agar-Hongo, utilizando para ello micelio de *M. fijiensis* de cultivos puros obtenidos en el laboratorio. El micelio se colectó, se filtró y lavó con agua destilada, se seco y se fragmentó utilizando hasta obtener un polvo que se tamizó por malla de 100 μm . Se prepararon placas de Agar-Hongo a .35% en cajas de petri de 5 cm de diámetro. Se sembró con isopo una colonia en el centro de la caja, abarcando la menor área posible, y se incubaron por 48 hrs a 37°C. Se realizaron mediciones del área sembrada, y del área colonizada a las 96 horas de incubación. Ejemplos de los resultados obtenidos se presentan en la figura 10.

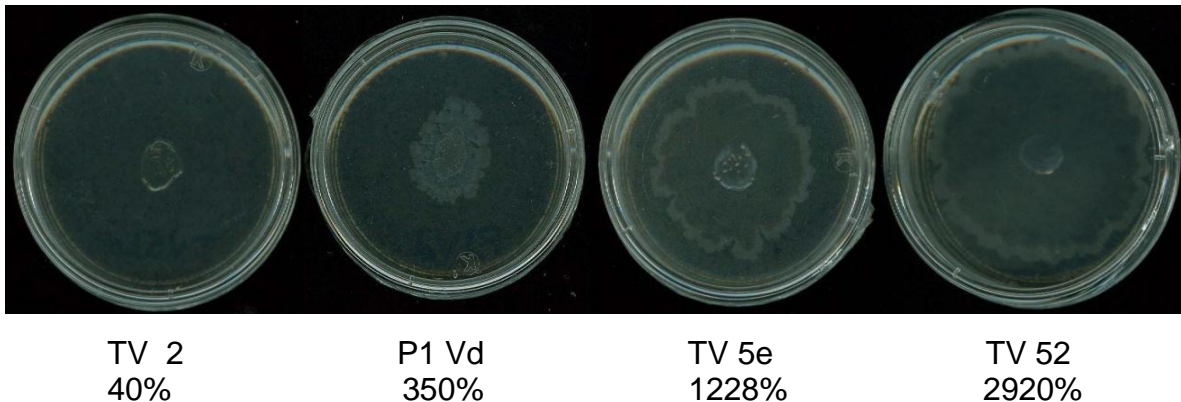


Figura 10. Ejemplos de cepas bacterianas con diferente capacidad de crecimiento en medio Agar-Micelio de Hongo a las 96 horas de incubación. Se indica el porcentaje de incremento de la colonia con respecto al área originalmente sembrada.

c. Prueba de antibiosis contra *Fusarium oxysporum*.

Debido a que *M. fijiensis* presenta un crecimiento de micelio sumamente lento, se decidió utilizar el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (agente causal del mal de Panamá en banano) para analizar la efectividad de las bacterias contra una cepa de este hongo. Se prepararon cajas de petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), y se marcaron dos líneas en los extremos opuestos, cada una a 1.5 cm del

borde de la caja, mediando una distancia de 4 cm entre cada una. En una de las áreas, se inoculó con una cepa bacteriana. En el otro extremo se colocaron 2,500 conidias de *F. oxysporum*. Se incubaron a temperatura ambiente, en obscuridad y se procedió a medir el área cubierta por el crecimiento del hongo cada 48 horas, el experimento se dio por concluido cuando el micelio testigo de *F. oxysporum* tocó la línea del área de siembra de las bacterias. Ejemplo de los resultados se presentan en la Figura 11.

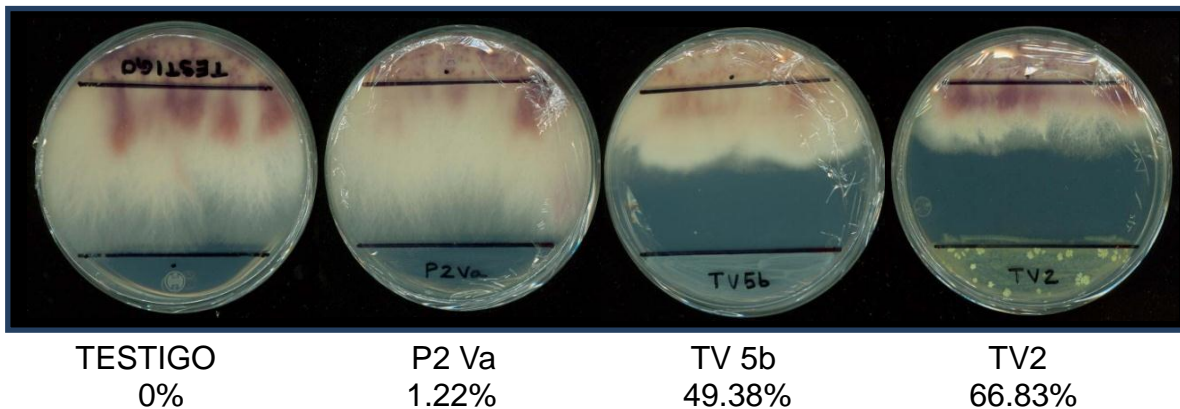


Figura 11. Inhibición del crecimiento de micelio de *F. oxysporum* causado por cepas bacterianas. El crecimiento del micelio en el testigo, tocó la línea inferior, el retado con P2Va creció prácticamente a la par del testigo, mientras que el micelio enfrentado a TV5b cubrió la mitad del área, y con TV2 únicamente la tercera parte.

d. Prueba de antibiosis indirecta contra *M. fijiensis*.

Con la finalidad de demostrar la capacidad de las cepas bacterianas para inhibir el crecimiento de *M. fijiensis*, se prepararon cajas de petri de 5 cm de diámetro, con medio PDA, en las que se sembraron bacterias cubriendo totalmente la placa de agar. Se incubaron por 24 horas a 37°C., posteriormente se cubrieron con una capa fina de agar de 2 mm de espesor de tal forma que las bacterias quedaron separadas del hongo por la membrana de agar, a través de la cual las bacterias pudieron difundir sus productos de secreción sin entrar en contacto directo con el micelio. Se procedió a colocar tres pellets de 2 mm de diámetro de *M. fijiensis*

provenientes de un cultivo en medio líquido (Caldo PD) de 10 a 12 días, como se muestra en la Figura 12.

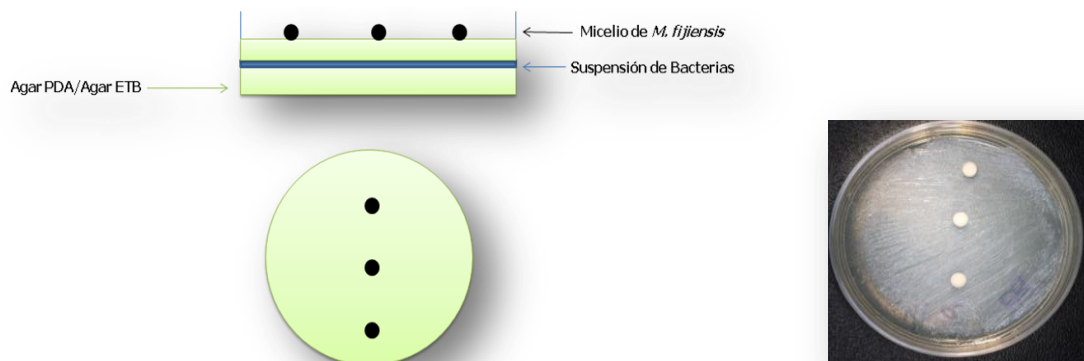


Figura 12. Esquema del sistema de antibiosis indirecta en la confrontación de la cepa bacteriana y los pellets de *M. fijiensis*.

Las cajas selladas se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por 12 días, se midió el diámetro de crecimiento de los pellets, y se calculó el volumen de crecimiento de los mismos. El resultado sugiere que en caso de haber inhibición del crecimiento del micelio, este será causado por productos difundidos a través del agar. Ejemplos de los resultados de esta prueba se presentan en la Figura 13.

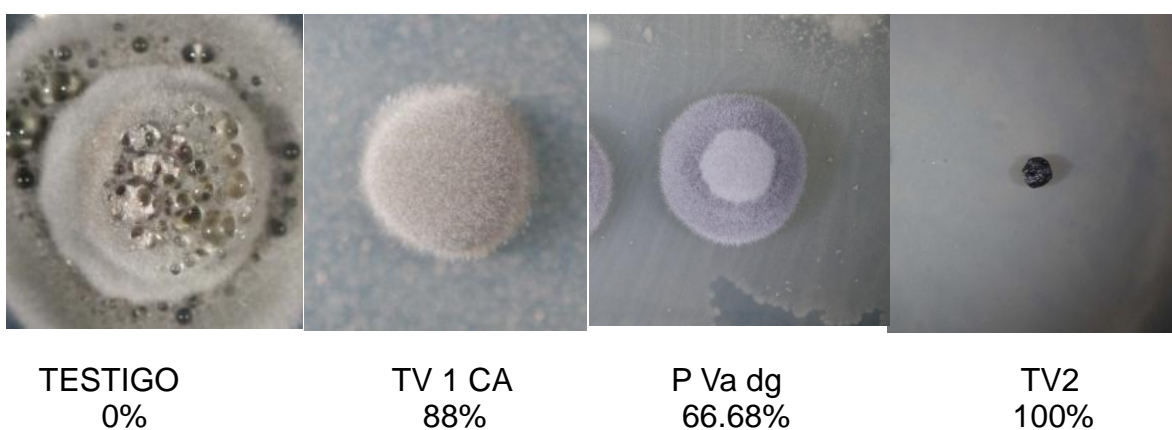


Figura 13. Ejemplos de Inhibición del crecimiento de micelio de *M. fijiensis* causado por cepas bacterianas. En el testigo, es notorio que además del crecimiento del pellet, el micelio se desarrolla sobre la capa de agar, mientras que el efecto de la cepa TV2 impide totalmente el desarrollo del hongo.

e. Establecer afinidad hipotética al hospedero mediante cultivos a base de extractos de hoja de banano.

Se prepararon cajas de petri de 5 cm de diámetro, con tres medios de cultivo diferente. **a.** Medio Trypticaseína de Soya CASOY (TESTIGO). **b.** Medio Agar bacteriológico-Extracto de Hoja de banano a una concentración final del extracto V/V de 10%, y **c.** Medio Agar CASOY-Extracto de Hoja de banano. Se inocularon con siembra de isopo al centro y se incubaron por 48 hrs a 37 °C, y se procedió a obtener las áreas de crecimiento. Los resultados se muestran en la Figura 14.

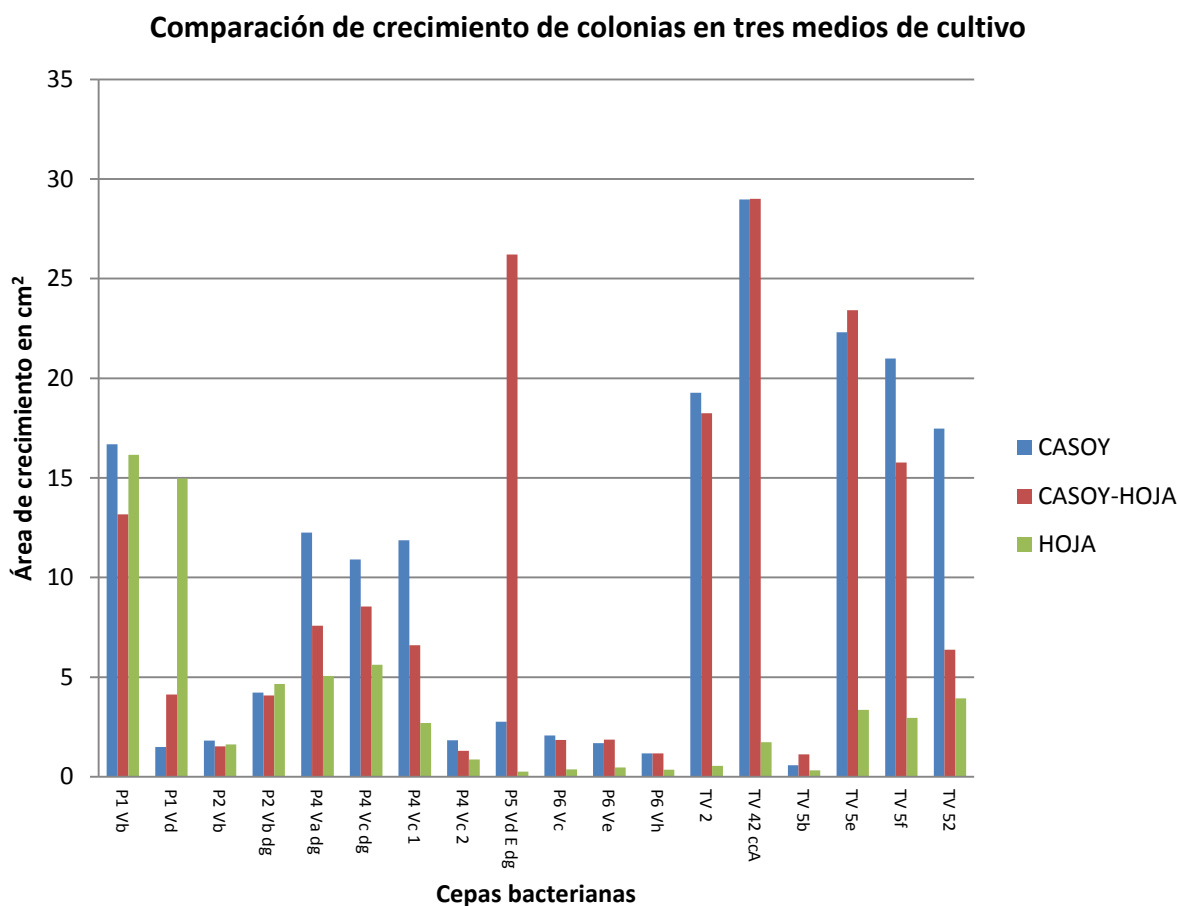


Figura 14. Resultados de desarrollo de colonias (en cm²) en tres medios de cultivo después de un periodo de 48 hrs de incubación.

f. Identificación de las especies mediante análisis de RNA 16s.

La identificación molecular de las cepas seleccionadas, fue realizada en los Laboratorios MACROGEN Sequencing Service (www.macrogen.com) usando el primer 907R (5'-CCG TCA CTT C(N*)T TTG AGC TT-3') a partir de un producto de amplificación de 800 pb del ADNr 16s. La comparación de la secuencias del ADNr 16S se realizó a través de internet con las depositadas en dos bases de datos libres: National Center for Biotechnology Information (NCBI), www.ncbi.nlm.nih.gov y con la European Molecular Biology Laboratory (EMBL) www.embl.de Las especies mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Tabla de especies de bacterias identificadas mediante análisis de ARNr 16s.

CEPA	Género y especie
P1 Vb	<i>Bacillus sp.</i>
P1 Vd	<i>Bacillus subtilis</i>
P2 Vb	<i>Bacillus cereus</i>
P2 Vb dg	<i>Bacillus megaterium</i>
P4 Va dg	<i>Bacillus cereus</i>
P4 Vc dg	* ND
P4 Vc1	<i>Bacillus cereus</i>
P4 Vc2	* ND
P5 Vd E dg	<i>Enterobacter cloacae</i>
P6 Vc	<i>Escherichia coli</i>
P6 Ve	<i>Enterobacter sp.</i>
P6 Vh	** <i>Bacillus/Lysinobacillus fusiformis</i>
Tv 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Tv 42 cc A	** <i>Bacillus/Lysinobacillus sphaericus</i>
Tv 52	<i>Bacillus cereus</i>
Tv 5b	** <i>Enterococcus/Bacillus faecalis</i>
Tv 5 e	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Tv 5f	<i>Bacillus cereus</i>

*ND fueron organismos que no desarrollaron y por lo tanto no fue posible su identificación. **Actualmente existe controversia con la ubicación taxonómica de éstas especies, considerándose una sinonimia entre los géneros *Bacillus* y *Lysinobacillus* en las especies señaladas.

La Tabla 3, muestra un resumen de las pruebas realizadas durante la Tesis de Maestría, que permite hacer una selección de las cepas bacterianas con las que se continuará el presente trabajo.

Tabla 3. Resumen de las pruebas realizadas y determinación de las cepas seleccionadas. La marca X significa que superó la prueba.

CEPA	Inhibición de <i>F. oxisporum</i>	Inhibición de <i>M. fijiensis</i>	Crecimiento en Quitina	Crecimiento en Micelio	Gram	SELECCIONADA
P1 Va	X		X			
P1 Vb	X	X	X		negativo	P1 Vb
P1 Vd	X	X	X		negativo	P1 Vd
P1 Ve		X	X			
P1 Vg		X	X	X		
P2 Va			X			
P2 Vb	X	X	X		negativo	P2 Vb
P2 Vb dg	X	X	X	X	positivo	P2 Vb dg
P2 Ve		X	X	X		
P4 Va dg	X		X	X	positivo	
P4 Vb dg		X	X	X		
P4 Vc dg	X		X	X	positivo	
P4 Vc1	X	X	X	X	positivo	
P4 Vc2	X	X	X		negativo	
P4 Vd			X			
P5 Vb dg			X	X		
P5 Vd E dg	X	X	X	X	negativo	P5 Vd E dg
P5 Vg dg		X	X			
P6 Va		X	X			
P6 Va dg			X			
P6 Vb			X			
P6 Vb dg			X			
P6 Vc	X	X	X		negativo	
P6 Ve	X	X	X		negativo	P6 Ve
P6 Vf			X			
P6 Vh	X	X	X		positivo	P6 Vh
Tv 1c		X	X			
Tv 1 cA		X	X			
Tv 2	X	X	X		negativo	Tv 2
Tv 3c			X	X		
Tv 41 ac		X	X			
Tv 41 bc			X			
Tv 42 a			X			
Tv 42 cc A	X	X	X		positivo	Tv 42 cc A
Tv 42 cc B		X	X			
Tv 51 ac			X			
Tv 52	X		X	X	positivo	
Tv 5b	X	X	X		positivo	Tv 5b
Tv 5e		X	X	X	positivo	
Tv 5f	X		X	X	positivo	
Tv 5g			X			
Tv 5 ñc	X		X			

La selección de cepas obedeció a los siguientes criterios en orden de importancia:

- 1.- Compatibilidad para ser cultivadas en conjunto.
- 2.- Mayor retención de crecimiento de micelio de *M. fijiensis*.
- 3.- Mayor retención de crecimiento de micelio de *F. oxisporum*.
- 4.- Mayor crecimiento en Quitina coloidal.
- 5.- Mayor crecimiento en Agar-Micelio de Hongo.
- 6.- Las 5 mejores Gram (+) y las 5 mejores Gram (-)

La cepa TV2 (*Pseudomonas aeruginosa*), pese a haber mostrado la mejor capacidad de retención de ambos hongos, no pudo ser utilizada para formular la mezcla biofertilizante-biofungicida, ya que resulto totalmente incompatible con el resto de las cepas debido a que al ser inoculada en un medio de cultivo líquido o sólido, solamente desarrollaba TV2. Esta cepa será estudiada más adelante con el objetivo de aislar las biomoléculas que le proporcionan ésta agresividad.

1.3 MATERIALES

Medios de cultivos

Agar bacteriológico (Bioxon)
Agar cuenta estándar (Bioxon)
Agar Eosina Azul de metileno (EMB) (Bioxon)
Agar Trypticaseína de Soya (Bioxon)
Caldo Trypticaseína de Soya (Bioxon)
Peptona de carne (Bioxon)

Reactivos

Aceite de inmersión (Resolve)
Acetona (Analytyca)
Ácido clorhídrico (Sigma)
Ácido nitrilotriacético (Sigma)
Ácido perclórico al 70% (Sigma)
Carbonato de Calcio (Baker)
Chrome Azurol S (Sigma)
Cloruro de Amonio (Baker)
Cloruro de Magnesio hexahidratado (Sigma)
Cloruro de Potasio (Baker)
Cloruro de Sodio (Baker)
Cloruro Férrico hexahidratado (Baker)
CTAB (Cetylmethyl ammonium bromide)
Dextrosa anhidra (Baker)
Fosfato de potasio dibásico (Baker)
Fosfato de Tricalcio [Ca₃(PO₄)₂] (Sigma)
Glucosa (Baker)
Hidróxido de Sodio (Baker)
Molibdato de Sodio (Sigma)
Pipes (Sigma)
Sulfato de Amonio (Sigma)

Sulfato de Magnesio heptahidratado (Baker)

Sulfato ferroso (Sigma)

Colorantes

Azul de Anilina (Sigma)

Diaminobencidina (DAB) (Sigma)

Naranja de Acridina (Sigma)

Reactivos de tinción GRAM

Equipos

Agitador orbital (Lab- line)

Asas bacteriológicas de Nicromo

Balanza analítica (Ohaus)

Bomba de vacío (Gast)

Cajas de Petri

Cámara bioclimática (Thermo scientific).

Cámara fotográfica digital (Canon 40D)

Campana de bioseguridad (Labconco).

Campana de flujo laminar (Veco)

Estufa de incubación (Felisa)

Esterilizador

Equipo de Filtración (Milipore)

Membranas de Nitrocelulosa de 0.45 μm (Milipore)

Microscopio Epifluorescente Axiolab (Carl Zeiss)

Plancha con agitador (Felisa)

Potenciómetro

Portaobjetos y Cubreobjetos (Corning)

Material Biológico

CEPA	ESPECIE
P1 Vb	<i>Bacillus sp.</i>
P1 Vd	<i>Bacillus subtilis</i>
P2 Vb	<i>Bacillus cereus</i>
P2 Vb dg	<i>Bacillus megaterium</i>
P5 Vd E dg	<i>Enterobacter cloacae</i>
P6 Ve	<i>Enterobacter sp.</i>
P6 Vh	<i>Lysinobacillus fusiformis</i>
Tv 42 cc A	<i>Lysinobacillus sphaericus</i>
Tv 5b	<i>Enterococcus/Bacillus faecalis</i>
C 2	<i>Enterobacter cloacae</i>
Tv 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

1.4 METODOLOGÍA

1.4.1 Determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno.

La capacidad de fijar nitrógeno de las diferentes cepas bacterianas, se determinó a través del análisis de la capacidad de crecimiento de las bacterias en un medio selectivo libre de Nitrógeno (Medio Norris). Las cepas se sembraron inicialmente en agar tripticaseína de soya (CASOY) y se incubaron a 30°C por 24 h para asegurar su viabilidad. Posteriormente se tomó una colonia aislada y se resembró por estriado en cajas con medio Norris, y se dejaron incubar por 4 días a 30°C, las cepas capaces de desarrollar fueron resembradas por segunda vez en cajas con medio Norris nuevas para corroborar su capacidad de fijar nitrógeno y descartar la posibilidad de haber arrastrado pequeños fragmentos de agar CASOY en el momento de la resiembra que hubieran permitido a las bacterias desarrollarse sin la necesidad de activar el mecanismo de la enzima nitrogenasa. Las bacterias nuevamente se dejaron incubar a 30°C por 4 días.

El medio Norris se prepara de la siguiente manera: 10g Dextrosa anhidra, 1g fosfato de potasio dibásico, 0.2g sulfato de magnesio, 1g carbonato de calcio, 0.2g cloruro de sodio, 0.005g molibdato de sodio, 0.1g sulfato ferroso y 15g agar bacteriológico en 1 litro de agua destilada. Se diluye perfectamente y se esteriliza en autoclave. Se vierte en cajas de Petri grandes (90x15 mm) evitando la formación de burbujas. Las placas de agar tienen un aspecto gris claro de apariencia translúcida.

1.4.2 Evaluación de la capacidad de Solubilizar Fosfatos.

Cuando una bacteria es sembrada en agar que contiene calcio precipitado, al crecer producen zonas claras alrededor de la colonias cuando son capaces de

solubilizar fosfatos (Ramachandran et al., 2007), por lo que se utilizó el medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) una modificación del medio de Pikovskaya, según Nautiyal, 1999 que contiene fosfato de tricalcio como única fuente de fósforo.

Para preparar 1 litro de medio NBRIP, se procede de la siguiente manera: Se diluyen 20g glucosa, 5g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 KCl y 0.1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 1 litro de agua destilada. Una vez disueltos todos los reactivos, se ajusta el pH a 7, y se agregaron 15 g de Agar bacteriológico, el medio resultante se esteriliza por autoclave y se prepararon cajas de Petri chicas (50x15 mm).

Las cepas se sembraron en agar CASO por estriado para aislar colonias, y se incubaron a 30°C por 24 h, con un asa bacteriológica para picado se tocó una sola colonia y se colocó un punto de la bacteria en el centro de la caja de medio NBRIP, se inoculó cada cepa por triplicado. Se dejó en incubación a 30°C por 14 días, al final de los cuales se registraron los diámetros de las colonias y de los halos de solubilización (Figura 15).

El factor de eficiencia de solubilización se calculó con la fórmula propuesta por Nguyen et al. (1992):

$$E = \left(\frac{\text{Diámetro de solubilización (R2)}}{\text{Diámetro de crecimiento (R1)}} \right) * 100$$

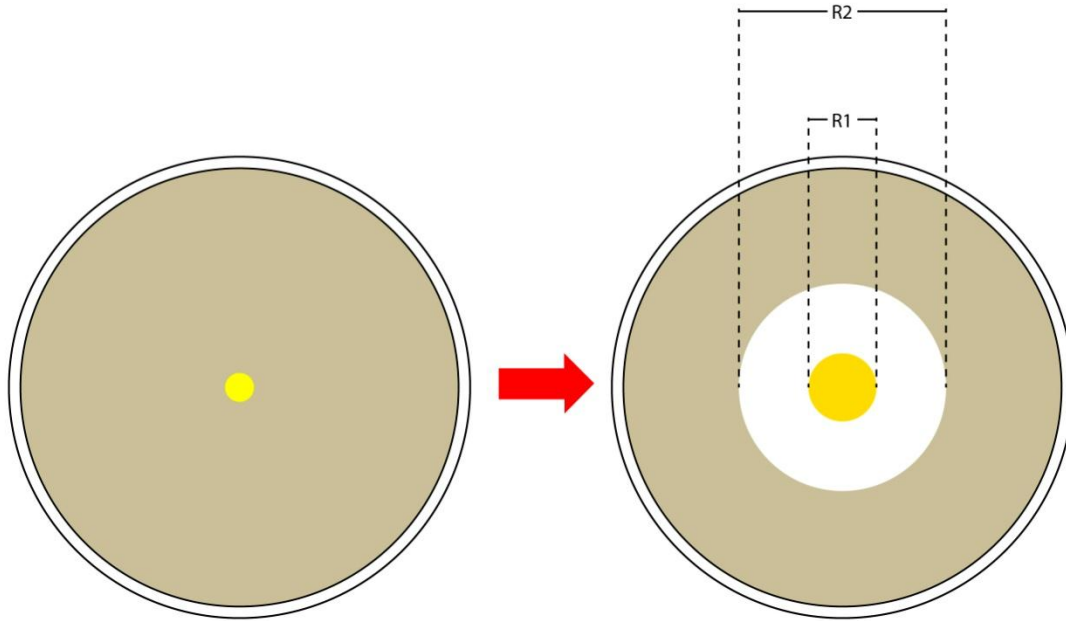


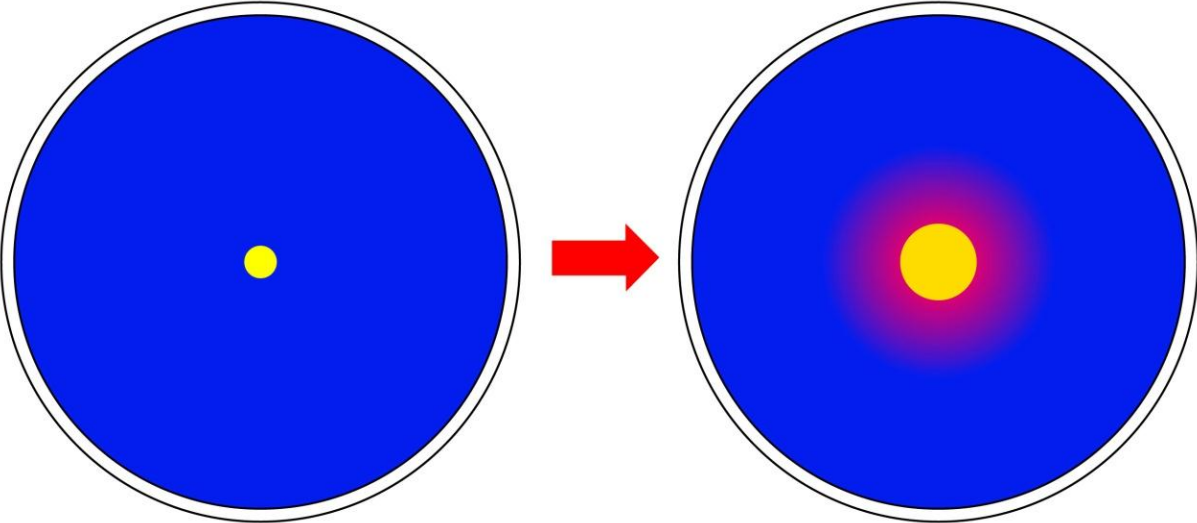
Figura 15. Esquema que muestra la colonia inicial en el medio NBRIP y la manera de registrar el diámetro de crecimiento de la colonia (R1), y el diámetro del halo de solubilización (R2),

1.4.3 Determinación de la capacidad de producción de Sideróforos.

Se realizó una detección mediante siembra en medio Chrome Azurol S (CAS) de acuerdo a Schwyn y Neilands (1997). Para descartar la posibilidad de que el medio CAS por si mismo tenga una actividad inhibitoria en el desarrollo de las cepas bacterianas, se procedió a realizar la prueba por dos métodos diferentes:

Método A. Con un asa bacteriana, se tomó una colonia aislada de 24 h desarrollada en Agar CASOY, y se procedió a sembrarla en el centro de la caja con medio CAS, procurando hacerlo en un área menor a 3 mm de diámetro(Fig. 16). Las cajas se incubaron a 30°C por 6 días. Los cambios en la coloración de azul a naranja, morado o magenta indican la capacidad de producción de sideróforos.

METODO A



METODO B

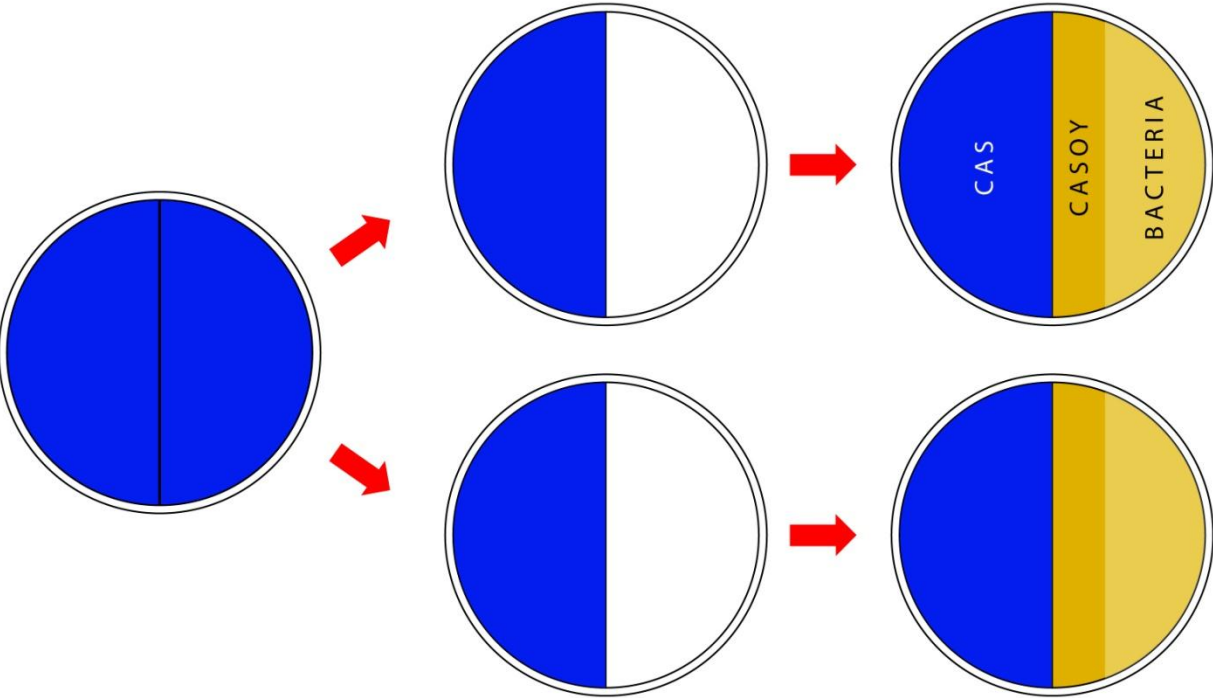


Figura 16. Método A. Aparición de halo en cajas con bacterias capaces de sintetizar sideróforos. Método B. Preparación de cajas mixtas CAS, CASOY y siembra extensiva.

Método B. Se tomaron cajas preparadas con Medio CAS, y bajo condiciones de esterilidad se procedió a cortar el agar exactamente por la mitad. Una de las mitades, se retiró de su caja y se colocó cuidadosamente en una caja de Petri nueva y estéril de tal forma que cada caja tuviera únicamente la mitad de su superficie cubierta con Medio CAS. La mitad vacía fue llenada cuidadosamente con Agar CASOY esterilizado, para tener toda la superficie cubierta. Se mantuvieron cerradas a temperatura ambiente por 48 h para desechar aquellas que pudieran haberse contaminado durante el proceso de elaboración. Posteriormente, se toma una colonia aislada de 24 h desarrollada en Agar CASOY, y se procedió a sembrarla extensivamente en la superficie de la sección de agar CASOY, cuidando que la siembra se mantuviera alejada a una distancia de 1 cm del punto de contacto de los medios CAS y CASOY. Las cajas se incubaron a 30°C por 6 días.

Para preparar el medio CAS, se vierten 60.5 mg de CAS en 50 ml de Agua destilada y desionizada, una vez disuelto, se agregan 10 ml de solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM y HCl 10 mM; en agitación continua. Esta mezcla se agrega a una solución de 72.9 mg de CTAB en 40 ml de agua. Se esteriliza por autoclave. De forma paralela, se diluyen 15 g de agar bacteriológico, 30.24 g de Pipes y 12 g de una solución 50% w/w de NaOH en 750 ml de agua destilada y desionizada la cual se esteriliza en autoclave. Una vez estériles ambas soluciones, se mezclaron y se agitaron con cuidado evitando la formación de espuma. El medio CAS se vacía en cajas Petri.

1.4.4 Preparación de la Mezcla Biofertilizante-Biofunguicida.

Con la finalidad de realizar los estudios de reintroducción de bacterias, fueron utilizadas las 10 cepas bacterianas seleccionadas por su alta capacidad antifúngica (Tabla 3), sustituyendo la cepa TV2 por la cepa C3 obtenida por Martínez-Molina (2010). Estas cepas fueron mantenidas en viales con peptona de carne como medio de conservación a largo plazo (3 gr de peptona, 0.3 gr de NaCl

y 1.5 gr de agar, en 100 ml de agua). La reactivación de las bacterias se logra cuando se añade un caldo nutritivo y se incuban por 18-24 hrs para activarlas metabólicamente, y resembrarlas en placas de agar CASOY teniéndolas disponibles para las pruebas que se requieran.

Para lograr la suspensión de células mencionada, las 10 cepas fueron inoculadas por separado en medio líquido casoy y se incubaron durante 16 horas para obtener una población bacteriana metabólicamente activa y en fase de crecimiento, después, las bacterias fueron filtradas de forma independiente con una bomba de vacío utilizando un filtro de 0.22 micras para concentrarlas formando una pastilla de células. Esta pastilla se utiliza para ajustar una suspensión de inoculación a una lectura de absorbancia de 0.2 a 600nm de longitud de onda (equivalente a 1×10^6 UFC/ml).

Una vez ajustada la absorbancia de la suspensión de todas las cepas bacterianas, se preparo una mezcla con las 10 cepas bacterianas seleccionadas, mezclando volúmenes iguales de las 10 suspensiones independientes.

1.4.5 Origen y manejo de las plántulas tratadas.

Se obtuvieron 250 plántulas de banano micropropagadas en etapa en explante provenientes del laboratorio Agromod en Chiapas. Se seleccionaron 6 plantas al azar, para realizar pruebas de conteo de endófitos y prueba de senescencia con la finalidad de garantizar que estuvieran libres de endófitos. Estas plántulas fueron numeradas y trasplantadas a macetas (5 x 5 x 7 cm) conteniendo tierra previamente esterilizada en autoclave por un período de 60 min a 125 psi. Las características fenológicas de cada plántula (altura, número de hojas, peso húmedo y longitud) de raíz fueron registradas. Las plántulas fueron aclimatadas en una cámara bioclimática bajo fotoperiodo de 12 horas luz y 12 oscuridad, temperatura 28°C y 85% de humedad relativa durante por 24 horas. Las plantas

fueron regadas cada 2 días con 50 ml de agua potable esterilizada por filtración con un cartucho de membrana millipore 0.45 micras.

1.4.6 Inoculación y tratamiento de las plántulas.

100 plántulas (Grupo tratamiento) fueron inoculadas directamente en la zona adyacente a la rizósfera con la mezcla de 10 bacterias, utilizando como vehículo 20 ml de un caldo casoy a una densidad de 1×10^6 UFC/ml. Otras 100 plántulas (Grupo testigo) fueron seleccionadas e inoculadas con caldo casoy estéril.

Cada 7 días por un periodo de 56 días se realizó un muestreo seleccionando 5 plántulas al azar, y sacrificándolas para analizar por separado raíz, pseudotallo y hojas de cada grupo para cuantificar por el método de cuenta estándar en agar las bacterias endófitas provenientes de éstos tejidos.

Cada plántula seleccionada fue sometida al siguiente tratamiento:

- 1.- Lavado de la plántula para eliminar la tierra en raíz con agua corriente.
- 2.- Las plántulas fueron pesadas y medidas para mantener un registro de su desarrollo.
- 3.- Se diseccionaron las plántulas en hoja, pseudotallo, raíz.
- 4.- La superficie de cada sección vegetal se esterilizó por separado sumergiéndola completamente en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, seguido de un tratamiento similar en una solución de etanol al 85% durante 3 min, para finalizar con tres lavados en agua estéril para eliminar los residuos de las soluciones ya mencionadas.

5.- Se tomó una alícuota de 1 ml del agua destilada del tercer enjuague y se sembró en caja de Petri con agar cuenta estándar, con la finalidad de mantener un control sobre la eficacia del proceso de esterilización de las superficies.

6.- Las secciones desinfectadas se maceraron en un mortero estéril adicionando 10 ml de solución por cada gramo de material vegetal.

7.- Se tomó 1 ml del extracto de cada sección de la planta y se diluyó en 9 ml de solución salina estéril al 0.9% homogenizando perfectamente y se repitiendo el proceso de dilución hasta 8 veces (1 : 100,000,000) para asegurar que las bacterias puedan ser contadas.

8.- Se tomó 1 ml de la dilución con bacterias y se colocó en una caja petri con medio de agar cuenta estándar dispersándolas por toda la caja la cual se deja secar antes de ser incubadas.

9.- Las cajas inoculadas fueron incubadas a 30°C durante 24 horas.

10.- Se realizó el conteo de las colonias formadas, en placas que contengan un número no menor de 30 colonias pero que no exceda las 300 colonias (Figura 17).

11.- Este proceso se repite cada 7 días durante 56 días y registrando el proceso de evolución de la colonización e través del número de bacterias contabilizadas dentro de cada fracción de la planta.

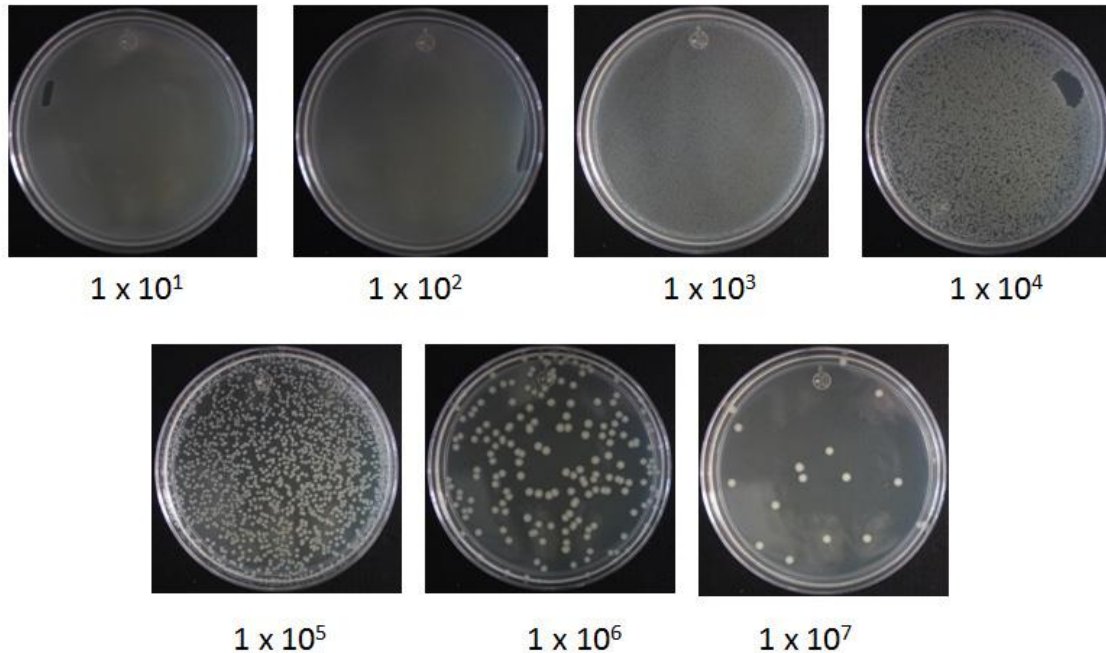


Figura 17. Diluciones secuenciales para conteo. En este ejemplo se consideran los resultados del conteo de la caja 1×10^6

1.4.7 Observación de colonización por Microscopía Epifluorescente.

Con la finalidad de observar a las bacterias en el interior de los tejidos vegetales, se utilizó la técnica de tinción con naranja de acridina (Hobbie et. al. 1977). La acridina tiene una alta afinidad por el ADN, siendo un potente genotóxico. Emite fluorescencia al ser irradiada con UV por lo que se utiliza de manera frecuente para teñir bacterias.

Se preparó una solución de naranja de acridina al 1% esterilizada por filtración con una membrana de nitrocelulosa Millipore de 0.22 micras. Para la tinción de las muestras vegetales se diluyen 25 μL de la solución de acridina al 1% en 20 ml de agua destilada estéril, las muestras vegetales se sumergen en esta solución durante 1 minuto. Se realizan cortes de las 3 secciones de las plántulas en los diferentes días de muestreo del tratamiento (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días). Se realizan preparaciones en fresco montándolas en portaobjetos y añadiendo 3 gotas de agua destilada, para posteriormente colocar el cubreobjetos. Las

muestras son observadas en un microscopio Carl Zeiss modelo Axiolab con objetivos A-Plan equipado con fuente de iluminación HBO 50, y utilizando un set de exitación .09 de la misma marca. Se revisan los cortes cuidadosamente localizar las bacterias endófitas en los tejidos de las plantas en tratamiento y en plantas testigo. Se obtienen fotografías utilizando una cámara digital Canon 40D acoplada al prisma 100 vis/100doc del microscopio mediante un fototubo 2.5x. Las fotografías son obtenidas mediante la función disparo con visión directa que proporciona el Software EOS Utility v2.3 de Canon.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno por crecimiento en medio Norris libre de Nitrógeno.

La fijación biológica de Nitrógeno se lleva a cabo mediante la actividad de la enzima nitrogenasa, presente en ciertos grupos de bacterias pertenecientes a las *Eubacterias* y *Archaea*. De las 11 cepas probadas para su actividad de nitrogenasa mediante su crecimiento relativo en medio Norris libre de Nitrógeno, 5 cepas: P6Ve (*Enterobacter sp.*), P6Vh (*Lysinobacillus fusiformis*), TV42ccA (*Lysinobacillus sphaericus*), C2 (*Enterobacter cloacae*), y TV2 (*Pseudomonas aeruginosa*), se desarrollaron de una manera muy limitada o nula, siendo prácticamente imperceptible su crecimiento; 2 cepas: P5VdEdg (*Enterobacter cloacae*) y TV5b (*Enterococcus/Bacillus faecalis*), tuvieron un crecimiento deficiente, mientras que 4 cepas: P1Vb (*Bacillus sp.*), P1Vd (*Bacillus subtilis*), P2Vb (*Bacillus cereus*), y P2Vbdg (*Bacillus megaterium*), fueron capaces de tener un crecimiento abundante en el medio, (Tabla 4).

Tabla 4 Capacidad de Fijación de Nitrógeno de 11 cepas bacterianas

CEPA	CRECIMIENTO	CEPA	CRECIMIENTO
P1 Vb	BUENO	P6 Ve	NULO
P1 Vd	BUENO	P6 Vh	NULO
P2 Vb	BUENO	TV 42ccA	NULO
P2 Vbdg	BUENO	TV 5b	DEFICIENTE
P5 VdEdg	DEFICIENTE	C2	NULO
		TV2	NULO

El aspecto de las colonias que tuvieron el mejor desarrollo, se muestra en la Figura 18. Las colonias son muy evidentes, sin embargo con tamaños muy inferiores a los que presentarían al crecer en medios de cultivo que tuvieran nitrógeno entre sus nutrientes. La morfología de las colonias bacterianas se ve

modificada al desarrollarse en un medio libre de nitrógeno como es el caso del medio Norris. Las colonias pierden su coloración característica.

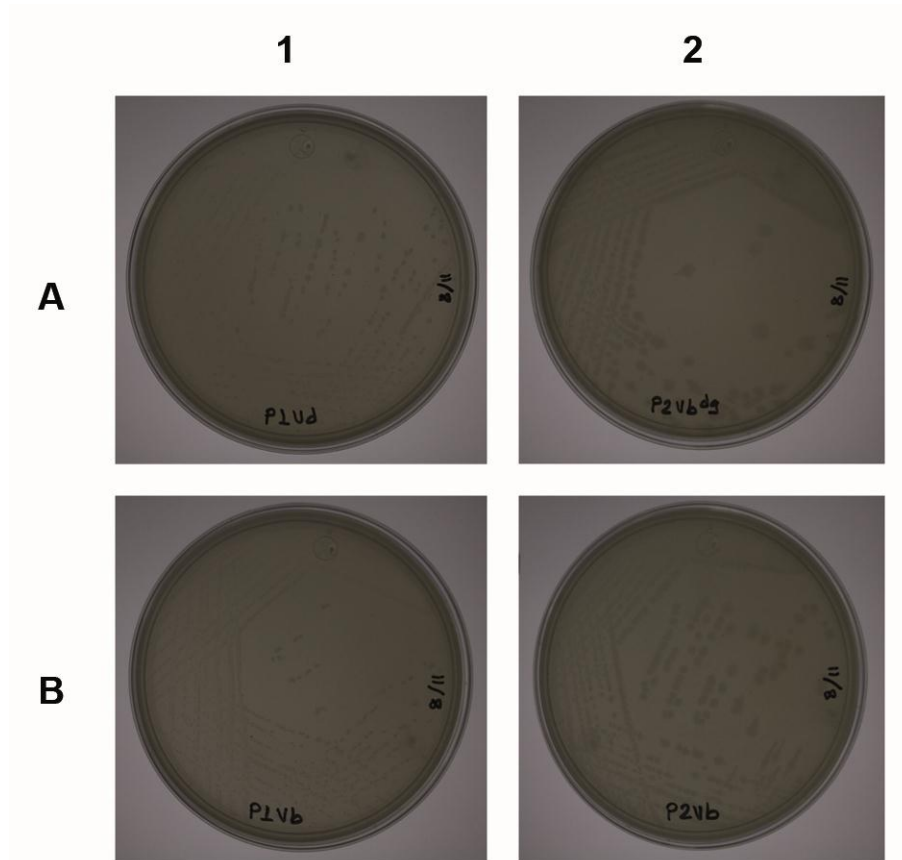


Figura 18. Aspecto de las colonias con crecimiento bueno en Medio Norris, lo que manifiesta su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

1.5.2 Determinación de la capacidad de solubilización de fosfatos por crecimiento y desarrollo de halo de degradación en medio NBRIP con Fosfato de Tricalcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Únicamente 2 de las 11 cepas seleccionadas, P1Vb (*Bacillus sp.*) y P2Vb (*Bacillus cereus*) no tienen capacidad para solubilizar fosfatos. De las 9 restantes, 3 de ellas P2Vbdg (*Bacillus megaterium*), P6Ve (*Enterobacter sp.*) y C2 (*Enterobacter cloacae*) generaron halos de degradación que al menos duplicaron la superficie sembrada, mientras que 6 cepas P1Vd (*Bacillus subtilis*), P5VdEdg (*Enterobacter*

cloacae), P6Vh (*Lysinobacillus fusiformis*), TV42ccA (*Lysinobacillus sphaericus*), TV5b (*Enterococcus/Bacillus faecalis*) y TV2 (*Pseudomonas aeruginosa*), generaron halo de una superficie menor a la inoculada, pero exhiben claramente el halo de solubilización generado. Los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 5, mientras que la Figura 19 ejemplifica los 3 grupos obtenidos como resultado del halo de solubilización de las diferentes cepas.

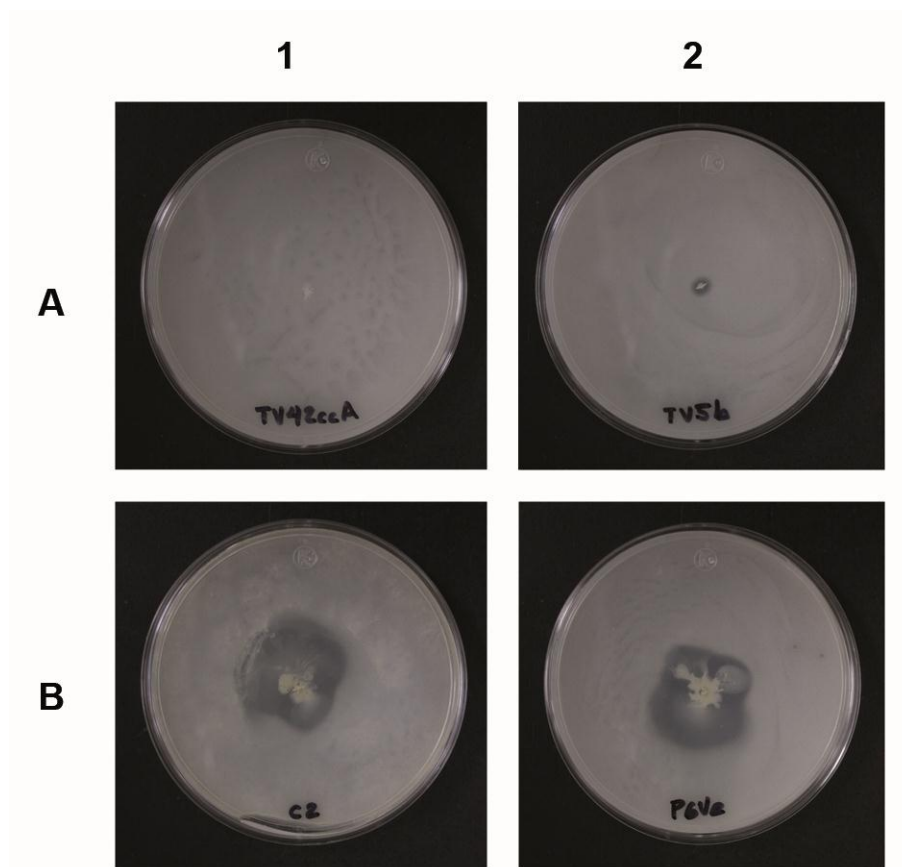


Figura 19. Ejemplos de los diferentes comportamientos respecto a la solubilización de fosfatos obtenidos en las 11 cepas probadas. A1 Halo No Generado, B1 Superficie del Halo inferior al área sembrada. A2 y B2 Halos superiores al doble del área sembrada, mostrando una alta capacidad para solubilizar fosfatos.

Tabla 5. Superficies del halo de degradación generado por las bacterias de la mezcla. El área corresponde al área total del halo, menos el área de crecimiento de la colonia.

CEPA	ÁREA DEL HALO	CEPA	ÁREA DEL HALO
	en cm2		en cm2
P1 Vb	0	P6 Ve	7
P1 Vd	1	P6 Vh	0.4
P2 Vb	0	TV 42ccA	0.2
P2 Vbdg	4.6	Tv 5b	0.2
P5 VdEdg	0.3	C2	8.3
		TV2	0.3

1.5.3 Identificación de cepas bacterianas con capacidad de producción de sideróforos por desarrollo de halos en medio CAS.

Para identificar las bacterias productoras de sideróforos, se emplearon dos métodos. El propuesto por de Schwin y Neilands (1997), (Método 1) que evidencia esta actividad al formarse un halo de decoloración en un medio adicionado con CAS y se demostró la no toxicidad del medio sobre las cepas bacterianas al utilizar el Método 2.

Las cepas examinadas, mostraron comportamientos muy variados pero consistentes en los triplicados, sin embargo las 11 cepas fueron capaces de crecer en medio CAS, pero mostrando un comportamiento distinto al sembrarlas con los dos diferentes métodos. Podemos generalizar el hecho de que todas ellas modificaron el medio CAS aledaño cuando fueron sembradas en cajas con doble medio (Método 2) como se muestra en la Fig. 20, incluso, es muy notorio que el crecimiento en la mitad de la caja con Medio CASOY, fue desbordado invadiendo notoriamente y desarrollando sobre el medio CAS.

De las 11 cepas examinadas por el Método 1, todas ellas presentaron halo de decoloración. Sin embargo 3 cepas: P6Vh (*Lysinobacillus fusiformis*), TV42ccA (*Lysinobacillus sphaericus*), y TV5b (*Enterococcus/Bacillus faecalis*) formaron halos muy poco evidentes considerándolos DEFICIENTES. De las 8 cepas restantes, 6 de ellas: P1Vb (*Bacillus sp.*), P1Vd (*Bacillus subtilis*), P2Vb (*Bacillus cereus*), P2Vbdg (*Bacillus megaterium*) y P5VdEdg (*Enterobacter cloacae*), mostraron halos de decoloración muy evidentes, pero sin un notorio cambio de coloración, por lo que fueron consideradas como BUENO. De manera sobresaliente, las cepas P6Ve (*Enterobacter sp.*) y TV2 (*Pseudomonas aeruginosa*), fueron capaces de formar grandes halos de decoloración, y además cambiaron la tonalidad de azul a tonos de violeta y café muy claro, mostrando su capacidad para producir compuestos que atrapan el hierro del medio de cultivo.

De igual forma, las 11 bacterias examinadas por el Método 2, tuvieron la capacidad de crecer masivamente en la mitad de la caja que contenía el medio CASOY, y 8 de ellas crecieron tan abundantemente que desarrollaron profusamente sobre la mitad de la caja que contenía medio CAS. Únicamente tres cepas P6Vh (*Lysinobacillus fusiformis*), TV42ccA (*Lysinobacillus sphaericus*) y TB5b (*Enterococcus/Bacillus faecalis*), desarrollaron únicamente sobre medio CASOY, siendo incapaces de crecer sobre medio CAS. Sin embargo, estas tres cepas fueron capaces de decolorar el medio CAS. (Figura 20. B4, C4 y D4). Lo anterior explica el escaso crecimiento de estas cepas al ser sembradas directamente sobre medio CAS como se muestra en la Figura20, B3, C3 y D3.

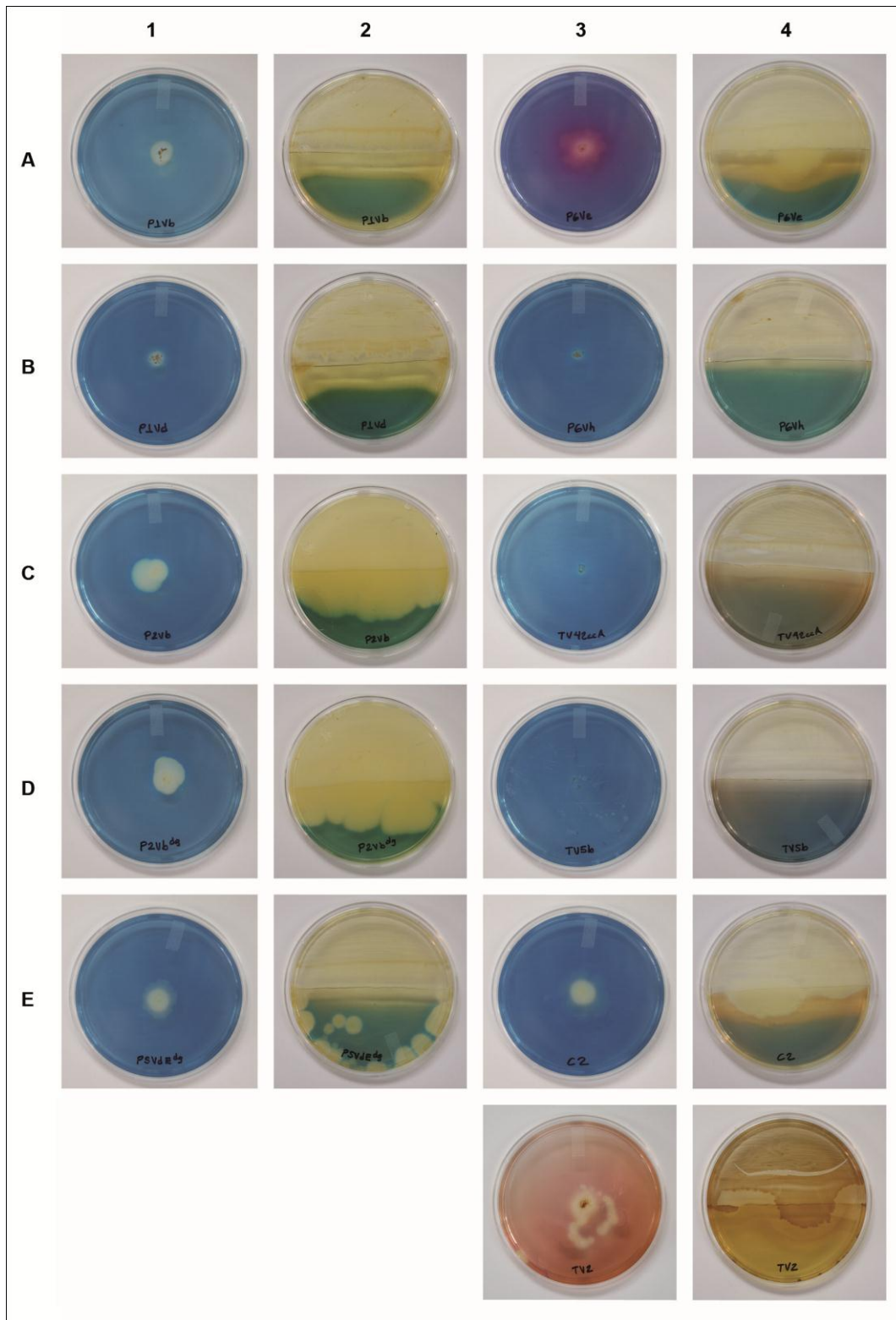


Figura 20. Resultados obtenidos en los dos métodos utilizados para sideróforos. Todos los organismos son capaces de modificar el medio CAS cuando son sembrados en cajas de doble medio como se muestra en las columnas B y D. Los cambios notorios en la coloración se presentaron exclusivamente en las cepas P6Ve (6 A) y TV2 (6 C).

Tabla 6. Resumen de las pruebas de secreción desarrolladas en las 11 cepas seleccionadas por su actividad antifúngica

CEPA	Fijación de Nitrógeno	Solubilización de Fosfatos	Producción de Sideróforos
P1 Vb <i>Bacillus sp</i>	BUENO	NULO	BUENO
P1 Vd <i>Bacillus subtilis</i>	BUENO	BUENO	BUENO
P2 Vb <i>Bacillus cereus</i>	BUENO	NULO	BUENO
P2 Vbdg <i>Bacillus megaterium</i>	BUENO	BUENO	BUENO
P5 VdEdg <i>Enterobacter cloacae</i>	DEFICIENTE	DEFICIENTE	BUENO
P6 Ve <i>Enterobacter sp.</i>	NULO	EXCELENTE	EXCELENTE
P6 Vh <i>Lysinobacillus fusiformis</i>	NULO	DEFICIENTE	DEFICIENTE
TV 42ccA <i>Lysinobacillus sphaericus</i>	NULO	DEFICIENTE	DEFICIENTE
Tv 5b <i>Enterococcus faecalis</i>	DEFICIENTE	DEFICIENTE	DEFICIENTE
C2 <i>Enterobacter cloacae</i>	NULO	EXCELENTE	BUENO
TV2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NULO	DEFICIENTE	EXCELENTE

Como se muestra en la Tabla 6; 8 de las 11 bacterias probadas mostraron al menos una capacidad como promotoras del crecimiento de las plantas en categoría de EXCELENTE o BUENO.

En el caso de las 3 restantes, tienen la capacidad de contribuir a la promoción del desarrollo, de manera limitada pero al menos en dos de las tres pruebas realizadas.

1.5.4 Reintroducción de bacterias endófitas seleccionadas.

1.5.4.1 Efectos sobre la Promoción del Crecimiento.

Las plántulas de banano inoculadas con la mezcla de bacterias seleccionadas por su actividad antifúngica, y estudiadas respecto a su capacidad de biofertilización, fueron monitoreadas en muestreos realizados cada 7 días desde el día 0 (día de

inoculación) hasta el día 56. Se dio seguimiento a varios parámetros, los cuales fueron medidos y expresados como el promedio de la muestra. Es muy importante tener en cuenta que las técnicas de muestreo son de naturaleza destructiva, por lo que no se puede dar seguimiento a un organismo en particular por todo el período del estudio, y por lo tanto en cada muestreo se utilizarán 5 plántulas diferentes que serán totalmente destruidas.

1.5.4.2 Efectos sobre el peso total de la plántula

Todas las plántulas fueron etiquetadas, medidas y pesadas el día de su recepción. Se construyó una tabla con los datos de peso inicial, obteniéndose un peso promedio de 1.625 g. Cada día de muestreo, se peso cada una de las plantulas de ambos lotes (Tratamiento y Testigo) que fueron sacrificadas. El peso inicial registrado de cada plántula fue restado al peso registrado el día del muestreo obteniéndose el porcentaje de incremento del peso de cada plántula respecto al día 0 o peso inicial. Se promedió este porcentaje de incremento de peso de los organismos de cada lote, presentándose en la Figura 21.

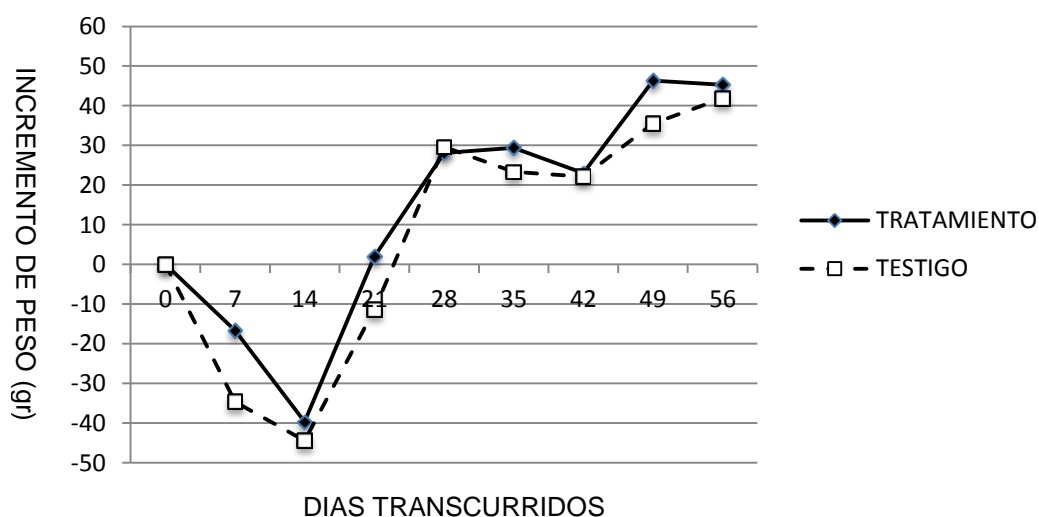


Figura 21. Incremento de Peso Húmedo promedio del lote de plantas analizadas en cada muestreo. Expresado en gramos.

Como podemos observar, las plantas llegaron a perder hasta el 40% del peso inicial como consecuencia del explante de agar a maceta con tierra, recuperando

el peso con el que fueron recibidas hasta el muestreo del día 21. Del día 21 al 28 las plántulas presentan un incremento de peso del 30% respecto a su peso inicial, debido a la aparición de hojas nuevas. Durante el período del día 28 al 42, los pesos totales de las plantas se mantienen, debido a que a medida que crecen las hojas nuevas, las hojas iniciales se secan paulatinamente en un proceso de sustitución. La aparición de un segundo par de hojas ocurre entre los muestreos de los días 42 al 49, incrementando su peso promedio hasta el 48% del peso inicial, presentándose nuevamente un proceso de sustitución hasta el último muestreo en el día 56. El comportamiento es muy similar entre el Tratamiento y el Testigo, no habiendo diferencia estadísticamente significativa.

1.5.4.3 Efecto sobre el desarrollo de sistema radicular.

Parte de los datos registrados con la llegada de las plántulas, incluyó el número total de raíces con las que fueron recibidas y sembradas en macetas. Esto nos permitió realizar un conteo de las raíces nuevas desarrolladas por las plántulas durante el tratamiento con la mezcla de bacterias, y en los organismos testigo. Cada día de muestreo, se contaron y registraron las raíces nuevas desarrolladas respecto al número con las que las plantas fueron recibidas. Estos datos se muestran en la gráfica de la Figura 22.

En la figura 22, podemos observar que a 7 días de la inoculación, las plántulas con tratamiento han desarrollado un promedio de 9 raíces, mientras que las testigo muestran únicamente una raíz nueva. A los 14 días de inoculación, las plántulas tratadas han desarrollado 10 raíces nuevas, contrastando con los tratamientos que solo han desarrollado 4. Esta tendencia se mantiene de tal forma que invariablemente las plantas tratadas superan a las testigo en el número de raíces. Para el muestreo realizado a 49 días de la aplicación de la mezcla, las plantas tratadas han desarrollado un promedio de 19 raíces nuevas, contra únicamente 8 en promedio de las plantas testigo. Con lo anterior se demuestra la actividad promotora de enraizamiento de la mezcla biofunguicida-biofertilizante.

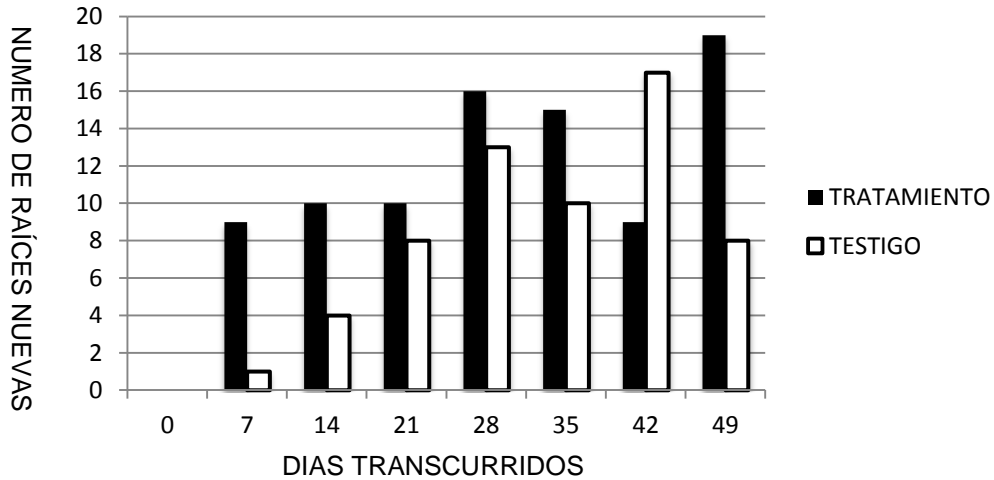


Figura 22. Número de raíces nuevas desarrolladas durante el experimento, y medidas el día del muestreo.

La actividad promotora de enraizamiento no solo incrementa el número de raíces; además de lo anterior, las raíces son mucho más largas y vigorosas como se muestra en la Figura 23.

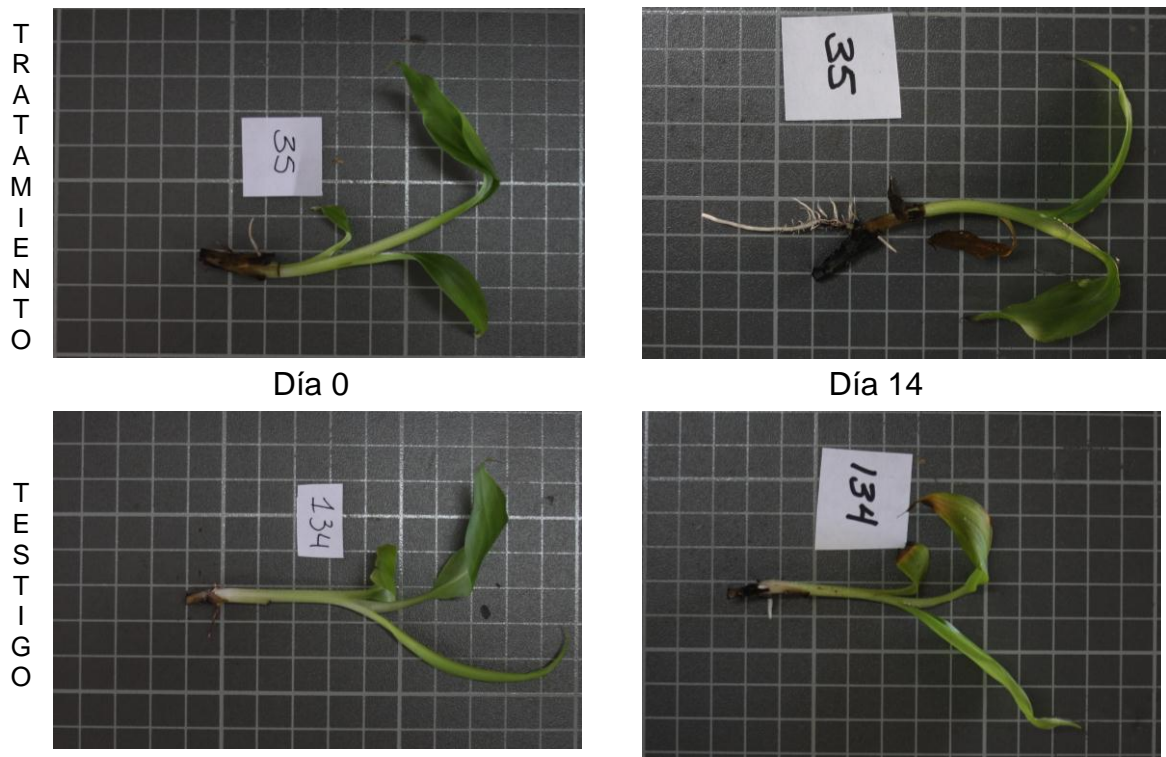


Figura 23. Comparación de raíces nuevas desarrolladas entre plántulas con tratamiento y testigo.

1.5.4.4 Efecto sobre el número de hojas nuevas.

El efecto de la aplicación de la mezcla biofunguicida-biofertilizante, también ocurre con respecto al número y la velocidad de desarrollo de las hojas. Hasta los 21 días postinoculación, no fue posible detectar el desarrollo de hojas nuevas. Pero para el día 28, las plantas pertenecientes al grupo tratamiento, habían desarrollado 4 hojas nuevas contra 1 hoja del grupo testigo. Del día 28 al 42 postinoculación, ambos lotes disminuyen la cantidad de hojas nuevas, habiendo 2 para tratamiento y 1 para testigo. Sin embargo, para el día 49 de tratamiento, las plántulas tratadas han desarrollado 8 hojas nuevas contra 6 del grupo testigo. Estos datos se muestran en la Figura 24.

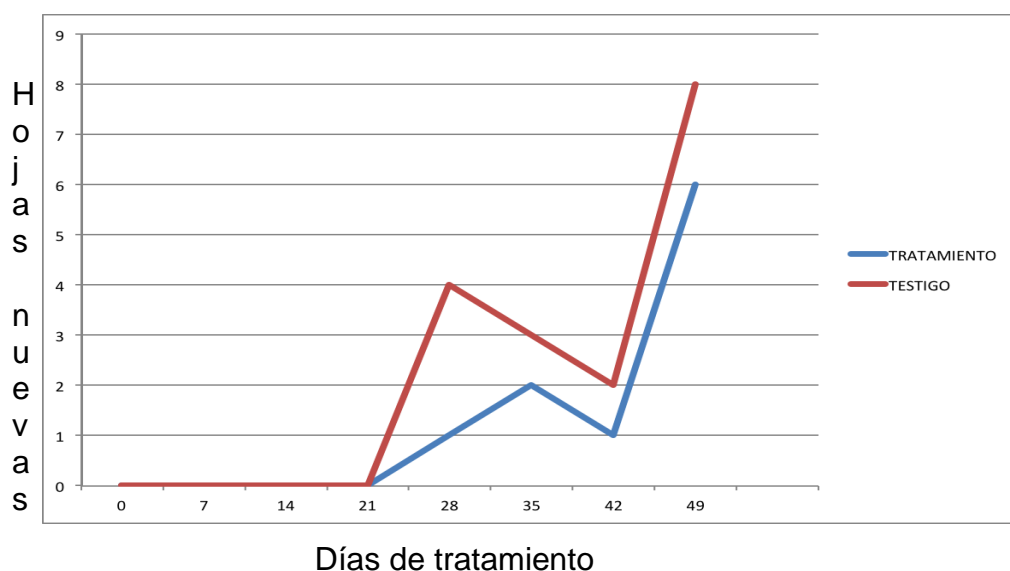


Figura 24. Gráfica de desarrollo de hojas nuevas en lote con tratamiento y testigo.

1.5.4.5 Bacterias recuperadas de raíz, pseudotallo y hojas.

Cada día de muestreo se sacrificaron 5 plantas de cada lote. Se procesaron por separado raíz, pseudotallo y hojas, con las que se procedió a recuperar las bacterias endófitas después de haber esterilizado las superficies. Por tratarse de plántulas muy jóvenes, en algunos casos la muestra procesada no alcanzó 1 g de peso húmedo, por lo que se decidió procesar toda la estructura, contabilizar las

bacterias recuperadas y ponderar a 1 g de peso cada resultado con fines de comparación.

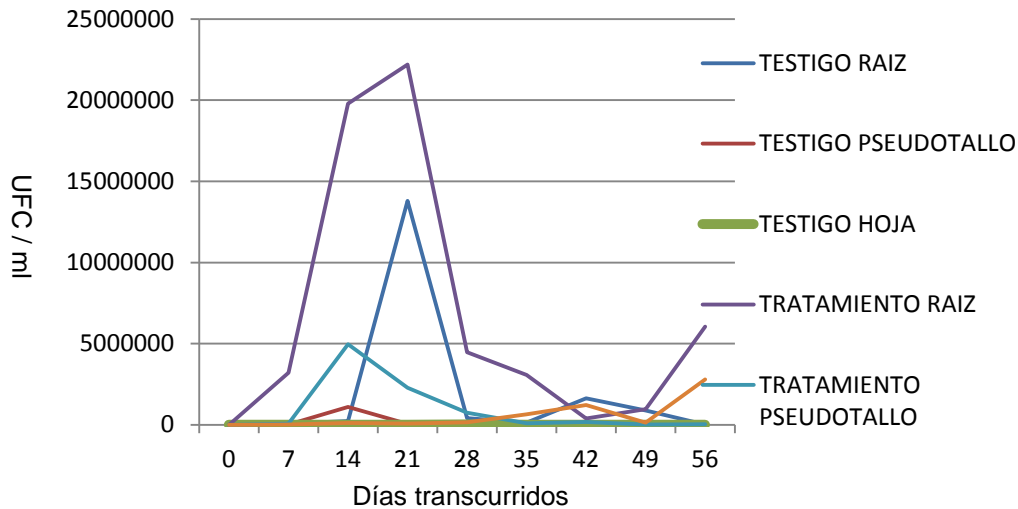


Figura 25. Número de UFC/ml recuperadas por estructura estudiada.

En la Figura 25 se grafican las cantidades de bacterias recuperadas, resultando muy difícil establecer comparaciones debido a la disparidad de los datos obtenidos que oscilan entre quinientos mil hasta 22 millones de UFC/ml. Por lo anterior, se decidió construir una gráfica \log^{10} que se presenta en la Figura 26.

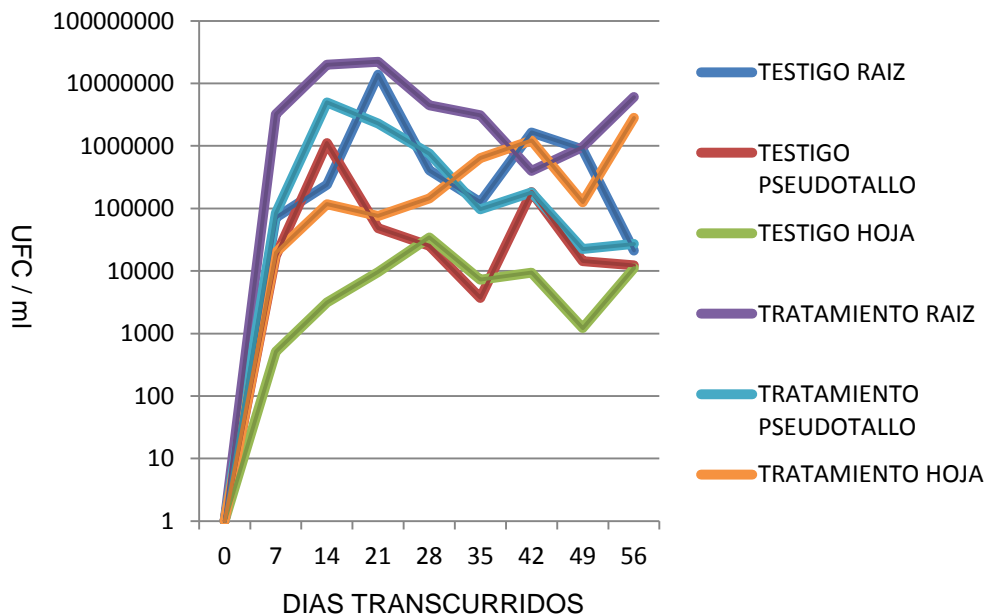


Figura 26. Número de UFC/ml recuperadas por estructura estudiadas (\log^{10})

Como podemos observar en las figuras 25 y 26, la cantidad de bacterias endófitas recuperadas de la raíz es mayor siempre comparada con las demás estructuras de la plántula en ambos grupos monitoreados: tratamiento y control, lo que nos indica la preferencia de estas bacterias por colonizar la raíz de las plantas.

La raíz es la principal estructura para la colonización, y para el muestreo del día 7, la raíz de plantas tratadas nos permite recuperar cantidades mayores a 1 millón de UFC /ml mientras que de raíz testigo solo alcanza cifras de 100,000 UFC/ml.

El incremento exponencial se produce en el muestreo del día 14 llegando a cifras de 19.8 millones de UFC/ml, y teniendo la máxima concentración el día 21 postinoculación alcanzando cifras de 22.2 millones de UFC/ml. A partir de éste punto, se inicia un notorio descenso en el número de UFC/ml reduciéndose drásticamente para el día 28 y teniendo su mínima cifra el día 42 con 1.64 millones de UFC/ml. A partir de éste punto se inicia una nueva fase de crecimiento.

La raíz no tratada, alcanza su máxima concentración el día 21, llegando a cifras de 13.8 millones de UFC/ml, pero descendiendo rápidamente a 0.74 millones para el día 28. A partir de éste punto se inicia una nueva fase de crecimiento.

La segunda estructura en ser colonizada fue el pseudotallo tratado. Esta estructura alcanza su máxima colonización en el día 14 postinoculación, llegando a contener 4.9 millones de UFC/ml. Cifra que decae hasta 2.3 millones de UFC/ml en el día 21 y continúa su descenso hasta alcanzar la cifra de 97 mil UFC/ml en el día 35. A partir de este momento se inicia un lento ascenso hasta el día establecerse en cifras que oscilan de 22 mil a 27 mil UFC/ml en los días 49 y 56 postinoculación. La cifra máxima alcanzada por el pseudotallo testigo fue de 1.1 millones de UFC/ml en el día 14, teniendo una breve recuperación el día 35 alcanzando 35 mil UFC/ml. Esta cantidad mínima siguió descendiendo hasta estabilizarse en cifras que oscilaron entre 14 mil y 12 mil UFC/ml para los días 49 y 56 del experimento.

En ambos lotes, tratamiento y testigo, las hojas fueron la última estructura en ser colonizada. La hoja tratamiento exhibe su máxima concentración hasta el día 42 postinoculación alcanzando 1.22 millones de UFC/ml. La máxima concentración de hoja testigo, ocurrió el día 28 del experimento, alcanzando una cifra de 34 mil UFC/ml, cifra muy por debajo de la encontrada en las hojas de las plántulas tratadas. A partir de éstos máximos, se inicia un descenso en las concentraciones de UFC/ml de ambos lotes, alcanzando sus mínimos el día 49 para ambos casos y con una concentración de 1220 UFC/ml para testigo y 126 mil para tratamiento. Estas cifras mínimas tendieron a recuperarse alcanzando concentraciones de 11 mil UFC/ml para hoja testigo y 2.8 millones en hojas de planta tratada.

1.5.4.6 Análisis de la colonización de bacterias reintroducidas utilizando por microscopía epifluorescete.

La población bacteriana a los 7 días post inoculación, no represento una cantidad significativa de bacterias, incluso son demasiado escasas en la superficie de la raíz. A los 14 días del tratamiento las plántulas del grupo control siguen sin presentar una cantidad significativa de bacterias incluso en la raíz. Es hasta el día 21 postinoculación, cuando las bacterias están presentes en su máxima concentración en varias estructuras y hasta entonces se logro visualizarlas.

En la Figura 27, se muestran imágenes comparativas de 4 estructuras de las plántulas: Pelos absorbentes, superficie de Raíz, corte transversal de Cormo, y corte paradermal de Hoja. Estas imágenes corresponden a plántulas sacrificadas en el muestreo del día 21 postinoculación, y se logran visualizar algunas bacterias endófitas señaladas en cada imagen.

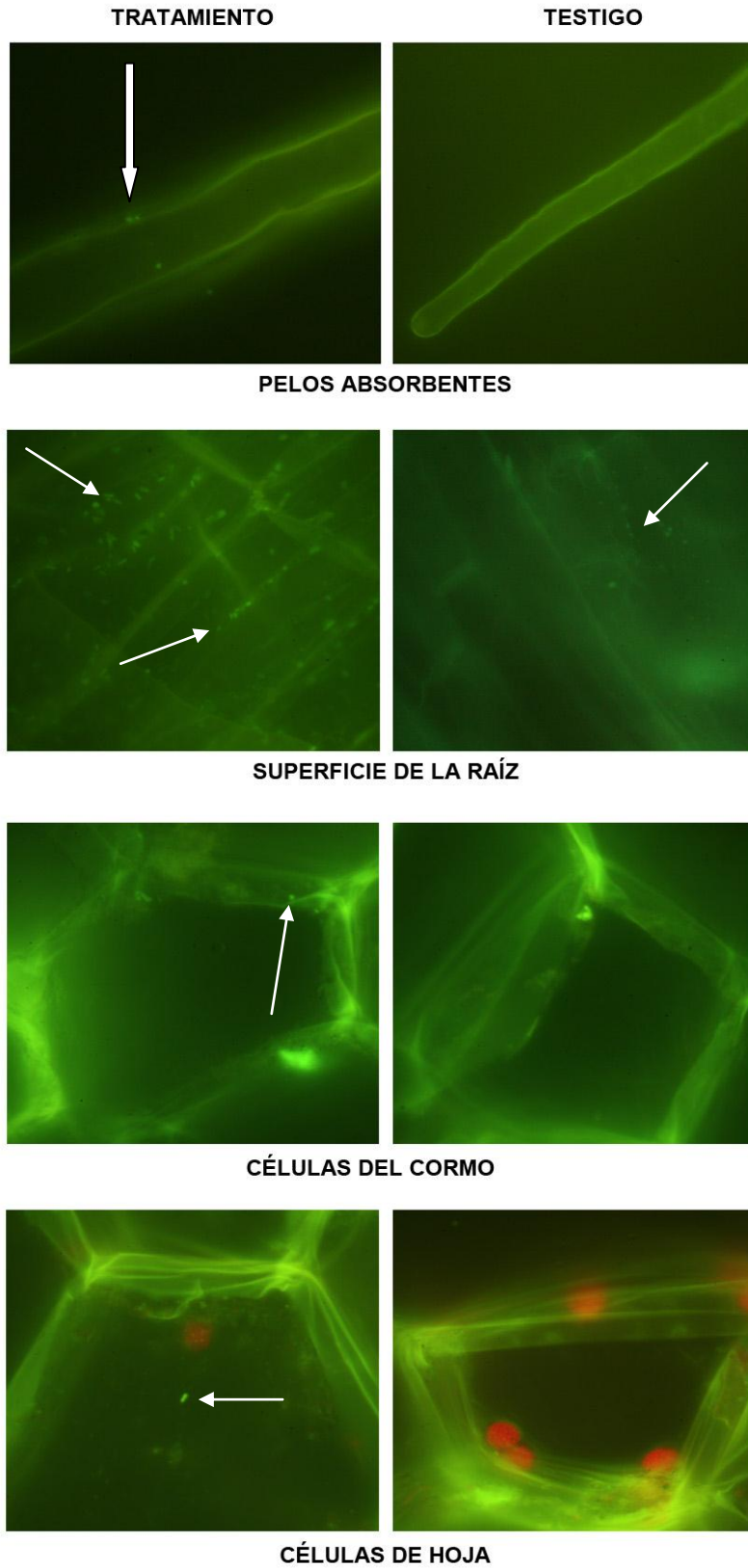


Figura 27. Comparación de 4 tejidos de plántulas tratadas y no tratadas obtenidas el día 21 del experimento.

A partir del día 46 de postinoculación, en el grupo tratamiento las bacterias presentes en la raíz aumentan y empiezan a formar una biopelícula en las superficies radiculares de la planta, el número de bacterias endófitas aumenta, y es posible tomar algunas fotografías de ellas. Para esta misma fecha, aparentemente se localizan agrupaciones de bacterias dentro de las células del mesófilo de las hojas.

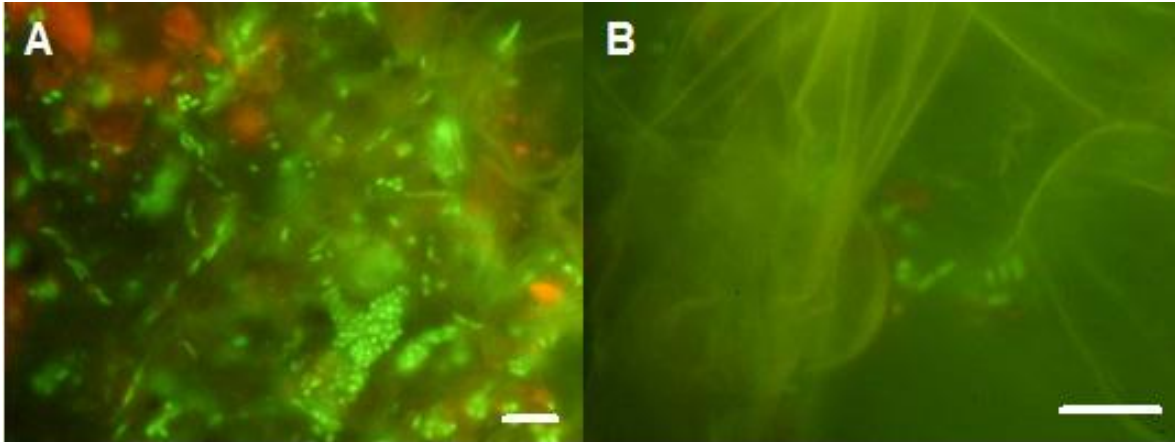


Figura 28. A. Superficie de pelo radicular de planta de banano después de 49 días de inoculación. Es perceptible la formación de biofilms de bacterias y las agrupaciones diferenciales entre bacillus y cocos. La distribución geométrica en cuadrícula sigue los patrones de unión célula a célula. **B.** Corte transversal de raíz en el que se aprecian bacterias en el interior del tejido. Las líneas de referencia en las imágenes corresponden a 10 μ m.

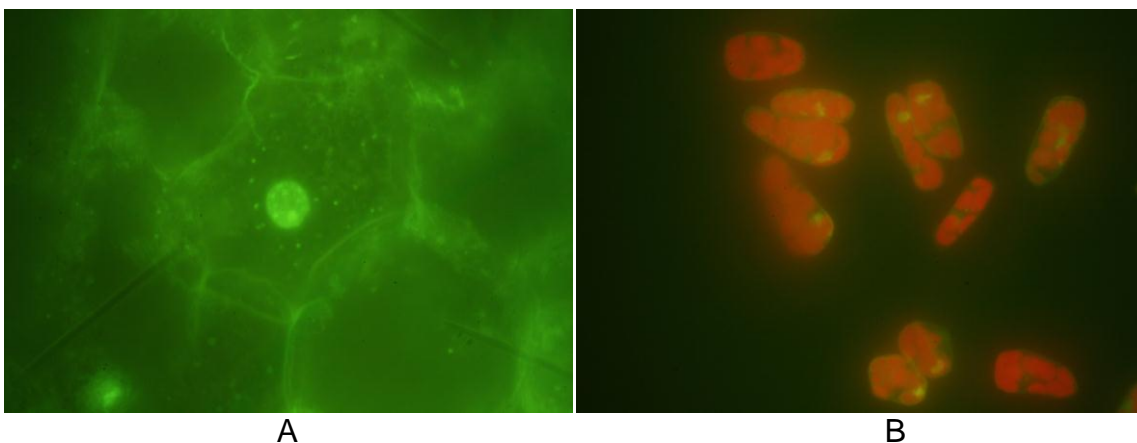


Figura 29. A. Corte de una célula de corno de planta de banano después de 49 días de inoculación. Es notoria la presencia en el citoplasma celular. **B.** Células del mesófilo de las hojas mostrando agrupaciones de bacterias entre los cloroplastos visualizados en rojo por un fenómeno de autofluorescencia. Corte transversal de raíz en el que se aprecian bacterias en el interior del tejido. Las líneas de referencia en las imágenes corresponden a 10 μ m.

1.6 DISCUSIÓN

El uso de los biofertilizantes-biofungicidas en la agricultura moderna es una tendencia que cada día adquiere mayor importancia, el CONACYT otorgó en 2014 un premio especial al desarrollo de un biofertilizante. Fungifree AB® El diseño de un biofertilizante se basa en la búsqueda y análisis de organismos pertenecientes al mismo cultivo y al mismo nicho que las plantas a tratar, con lo que se garantiza la capacidad de colonización de los suelos y en el caso de los endófitos, el desarrollo en los tejidos internos de las plantas. Estos microorganismos, son capaces de proveer una gran cantidad de metabolitos que estimulan el crecimiento de los cultivos o en su caso ayudan a fortalecer su resistencia contra patógenos a través de la activación de la Respuesta Sistémica Inducible (RSI).

La importancia del uso de esta alternativa en los cultivos plataneros alrededor del mundo y en especial en nuestro país radica en las altas tasas de contaminación encontradas en suelos y cuerpos de agua que rodean a las plantaciones, lo que representa un importante problema de salud pública para los trabajadores y las comunidades cercanas, así como para la vida silvestre del lugar.

Los organismos endófitos analizados en este trabajo, forman parte del esfuerzo conjunto de nuestro laboratorio por generar una solución al problema de la Sigatoka negra, estos microorganismos fueron retados en pruebas de antagonismo indirecto para seleccionar a las mejores cepas capaces de inhibir el desarrollo de los hongos fitopatógenos *M. fijiensis*, y *F. oxysporum* desde un 60 hasta un 100% (Ortiz-Mendoza, 2010), con el objetivo de identificar aquellas cepas que en relación a su potencial antifúngico y el estudio de sus factores promotores de crecimiento sean la mejor opción para el desarrollo de un biofertilizante capaz de actuar como un agente de biocontrol.

Las 11 bacterias analizadas pueden agruparse en 5 géneros:

Bacillus.- Presentes en 4 cepas, P1Vb (*Bacillus* sp.), P1Vd (*B. subtilis*), P2Vb (*B. cereus*), P2Vbdg (*B. megaterium*).

Enterobacter.- Representado por 3 cepas, P5VdEdg(*E. cloacae*), P6Ve (*E. sp.*), y C2 (*E. cloacae*).

Lysinibacillus.- Con 2 cepas presentes: P6Vh (*L. fusiformis*), y TV42ccA (*L. sphaericus*).

Enterococcus.- Con solo 1 cepa TV5b (*C. faecalis*).

Pseudomonas.- También con 1 sola cepa TV2 (*P. aeruginosa*)

La capacidad de fijación de nitrógeno de algunos géneros de Enterobacterias como *Klebsiella* y *Enterobacter* han sido reportados como beneficios para diversos cultivos como pastos, caña de azúcar, arroz y maíz (Elmerich, 2007). Cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* aisladas por Martínez et al. (2003) como endófitos fijadores de nitrógeno de cultivos de banano en la región platanera de Colima, México, han sido probados para su capacidad de recolonización de los tejidos, siendo aislados de plantas micropropagadas inoculadas hasta 50 días después del tratamiento, así mismo, se observan diferencias en el desarrollo de las plantas inoculadas a diferencia del control, de igual forma, Zhang et al. (2007) reportó la capacidad de incrementar la productividad de cultivos de arroz por los mismos géneros bacterianos, al aportar grandes cantidades de nitrógeno fijado biológicamente a la planta.

Entre los géneros preferidos para la estimulación del crecimiento de plantas encontramos *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Bacillus*, capaces de incrementar rendimientos de los cultivos y enlongar las raíces a través de la síntesis de

fitohormonas (Mia et al., 2010). Se han identificado cepas de *B. megaterium* y *pumilus*, endófitos de arroz y betabel respectivamente, capaces de fijar nitrógeno y potencializar el crecimiento de la planta a través de la producción de AIA y la colonización de sus tejidos promoviendo el desarrollo de nuevas hojas y aumentando la producción de los cultivos (Shi et al., 2006 y Stoltzfus et al., 1997). Los organismos solubilizadores de fosfatos se encuentran altamente representados por los géneros de bacterias endófitas, donde un 59 a 100% de los aislados de Fresa, Soya, Girasoles y Cactus son capaces de solubilizar fosfatos en placa (Hardoim et al., 2012), de igual forma, Kuklinsky-Sobral et al. (2004) mencionan que todas las bacterias endófitas solubilizadoras de fosfatos tiene otras propiedades benéficas para las plantas como son la capacidad de crecer en medios libres de nitrógeno y la producción de fitohormonas, las cuales se encuentran en mayor abundancia en las etapas de desarrollo de las plantas, mientras que sus poblaciones se ven altamente disminuidas cuando las mismas entran en estados de senescencia. Hardoim et al. (2012) ejemplifica como diferentes cepas de *B. subtilis* y *cereus* son capaces de solubilizar fosfatos y producir AIA en diferentes grados, así como la capacidad de cepas de *K. oxytoca* y *E. cloacae*, fijadores de nitrógeno, o *B. megaterium*, un productor de AIA para atrapar excesos de Cobre, así como la capacidad de *Enterobacter sp.* un solubilizador de fosfatos capaz de producir Acetoin y 2,3-butanediol, fitohormonas relacionadas con la promoción del crecimiento y la activación de la Respuesta Sistémica Inducida (RSI) cuando se encuentran en presencia de sacarosa secretada por la planta hospedera.

Nuestros resultados coinciden con los anteriores autores en los géneros reportados como bacterias benéficas endófitas, y en su capacidad para contribuir a la nutrición de las plantas así como por ser capaces de activar su respuesta sistémica inducida.

Sin embargo, una parte fundamental de la línea de investigación y desarrollo tecnológico que sigue el laboratorio de Sigatoka negra y Estrés Oxidativo de la

UAG, encabezado por el Dr. Miguel Juan Beltrán García, trata de desarrollar un biofunguicida-biofertilizante que reduzca significativamente tanto la contaminación ambiental y la intoxicación crónica de los habitantes de las regiones bananeras, como abatir los costos de producción incluyendo los gastos derivados de las aplicaciones de agroquímicos. Para lograr lo anterior, se está desarrollando esta mezcla de organismos, con la idea de que tengan un período de resistencia muy alto tanto en el suelo, como en los tejidos de la planta del banano al ser reintroducidos como endófitos.

El método de reintroducción que se probó fue la inoculación directa sobre la raíz ya que como lo señala Huang, (1986) a excepción de las bacterias que se encuentran en la semillas y que desde un inicio están dentro de las planta, las bacterias deben colonizar la raíz como un paso obligado previo a su entrada a la planta. La aplicación de esta mezcla biofunguicida-biofertilizante, pretende ser una estrategia de combate contra la Sigatoka negra, que represente bajos costos de aplicación, por lo que no será aplicada foliarmente vía aérea como la mayoría de los pesticidas, sino con aplicación directa a la rizósfera de las plantas a tratar utilizando aparejos como mochilas o cuellos de cisne.

De acuerdo con los resultados obtenidos del monitoreo de las concentraciones de bacterias a los distintos días del tratamiento, las plántulas que fueron inoculadas con las bacterias endófitas selectas presentaron una mayor concentración de bacterias endófitas en comparación con el grupo control, según los resultados del conteo de las poblaciones endófitas de los dos grupos experimentales, las poblaciones bacterianas son mucho mayores en la raíz (22×10^6 UFC/ml) que en las demás secciones de la planta seguido por las poblaciones en el tallo (4.9×10^6 UFC/ml) y por último las poblaciones de bacterias en las hojas (1.2×10^6 UFC/ml) considerando las concentraciones encontradas en el grupo Tratamiento. Como menciona Martínez et al. (2003) en los resultados que obtuvieron al re-aislar unas cepas de *Enterobacter* cinco meses después de ser inoculadas donde la concentración de estas bacterias en la raíz alcanzaron números de hasta

2.38x10⁵ UFC. Los resultados de Lamb et al. (1996) menciona que la densidad bacteriana en la raíz es mayor que en las demás secciones de las plantas esto se debe a que la rizósfera se considera como la principal fuente de colonización endófitas (Sturz, 1995; Hallmann et al., 1997; Mahafee y Kloepper, 1997). Además esta región contiene altas concentraciones de nutrientes como los exudados, los cuales son tomados por las bacterias como fuente de alimento (Lodewyckx et al., 2002 y Compant et al., 2009).

Los resultados obtenidos en el monitoreo del desarrollo de las plántulas muestran que las plántulas con tratamiento de bacterias endófitas fueron las que presentaron un mayor desarrollo tomando en cuenta los valores de peso, número de hojas y producción de raíces, se observó un crecimiento más rápido en las plántulas tratadas en comparación con el grupo control. El mejor desarrollo de las plántulas se atribuye a que las bacterias inoculadas tienen capacidad de fijar nitrógeno según los resultados obtenidos al resembrar estas bacterias en el medio selectivo Norris para bacterias fijadoras de nitrógeno, estos resultados concuerdan con Martínez et al., (2003) donde mencionan que las bacterias endófitas recuperadas del banano pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *citrobacter* tienen la capacidad de fijar nitrógeno.

Con estos resultados destacamos la importancia de estas bacterias en la industria del banano ya que además de las propiedades antifúngicas que exhiben, son bacterias promotoras del crecimiento vegetal, lo que convierte a nuestra mezcla en una suspensión biofungicida-biofertilizante, otorgándole resistencia a la planta a través de mecanismos directos e indirectos, como lo menciona Jiménez-Delgadillo et al. (2001) explicando que los mecanismos directos son aquellos en los que los metabolitos producidos por algunas bacterias tienen un efecto directo sobre el crecimiento de la planta, mientras que los mecanismos indirectos son aquellos en los que los metabolitos producidos por ciertas bacterias tienen un mecanismo de acción en contra de algunos patógenos de la planta hospedero, en muchos casos

la asociación endófito- hospedero es vista como mutualismos, donde tanto la planta como el microorganismo se ve beneficiado, la planta hospedera se ve beneficiada en términos de promoción del crecimiento y tolerancia a estrés biótico y abiótico, mientras que los endófitos tienen acceso a una gran cantidad de nutrientes (White y Owens 1992; White et al. 1997), estos endosimbiontes promueven la formación de raíces laterales y vellos radicales, el incremento del peso y aumento en el diámetro de los brotes (Yates et al. 1997).

Es importante señalar que la nutrición de las plantas es un aspecto importante en la salud de éstas, ya que una planta bien nutrida se encuentran bajo un menor estrés que una a la que se encuentre en ausencia de nutrientes y por lo tanto existe una mayor resistencia hacia el ataque de sus respectivos patógenos.

La decisión de producir una mezcla biofungicida-biofertilizante utilizando 10 cepas bacterianas compatibles entre sí, probadamente antagonistas del desarrollo de dos hongos fitoparásitos, y que además manifiestan propiedades complementarias respecto a sus capacidades como biofertilizantes, es una idea novedosa y que no ha sido utilizada en ninguna parte del mundo.

1.7 CONCLUSIONES

Las 11 cepas estudiadas, fueron seleccionadas por su alta actividad antifúngica. Sin embargo, el presente trabajo muestra que en conjunto, son capaces de comportarse como una mezcla bacteriana promotora del crecimiento.

Lo anterior se debe a que la mezcla en conjunto es capaz de solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno y producir sideróforos.

De las 11 bacterias probadas 7 mostraron al menos una capacidad como promotoras del crecimiento de las plantas en categoría de EXCELENTE o BUENO.

En el caso de las 3 restantes, tienen la capacidad de contribuir a la promoción del desarrollo, de manera limitada pero al menos en dos de las tres pruebas realizadas.

Lo anterior, sumado al hecho del procedimiento de selección basado en su capacidad antifúngica, nos permite concluir que la mezcla propuesta favorece doblemente a los organismos en las cuales se inoculan. Por un lado, coadyuva a retardar la aparición de la sintomatología de la enfermedad, y por otro lado, estas bacterias colaboran en la promoción del crecimiento de la planta.

Aunado a lo anterior, se demostró con plántulas de banano que estas bacterias pueden ser reintroducidas a los tejidos de la planta, comportándose entonces como organismos endófitos.

El principal tejido de colonización es la raíz, y de ahí se presenta un fenómeno de migración hacia pseudotallo y hojas. Este movimiento, debe estar controlado de alguna forma, ya que se presenta una baja considerable entre los microorganismos recuperados en raíz y los otros dos tejidos.

Es muy importante en el momento de realizar la formulación del biofungicida-biofertilizante, haber realizado pruebas de compatibilidad. En este trabajo, se tuvo que desechar la cepa TV2 (*Pseudomonas aeruginosa*) por resultar incompatible con el resto de las bacterias utilizadas al limitar su crecimiento.

CAPÍTULO 2

Técnica rápida y económica para evaluar la infección de *Micosphaerella fijiensis* en hoja de banana, y su validación estadística.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica sencilla y económica para evaluar las lesiones causadas por hifas de *Mycosphaerella fijiensis* en la hoja de banano *Mussa acuminata* var. Cavendish AAA, determinando el grado de infestación del hongo y su relación con la producción de peróxido de hidrógeno y melaninas en hoja cigarro, hoja asintomática (sana), y los seis estadios de Fouré.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Describir histológicamente en cortes paradermales de hojas del banano el grado de de infestación de hifas del hongo *Micosphaerella fijiensis* utilizando tinción Azul de Anilina.
- b) Evaluar la concentración de Peróxido de Hidrógeno en cortes paradermales de hojas del banano utilizando tinción DAB (Diaminobencidina).
- c) Evaluar la concentración de Melaninas en cortes paradermales de hojas del banano utilizando tinción con Sulfato de Plata.
- d) Evaluar la concentración de Peróxido de Hidrógeno en células guardia de estomas de hojas del banano utilizando tinción DAB (Diaminobencidina).
- e) Evaluar la concentración de Melaninas en células guardia de estomas de hojas del banano utilizando tinción con Sulfato de Plata.
- f) Analizar estadísticamente las correlaciones existentes entre las lecturas obtenidas *in silico* de los tres tipos de tinción en estomas y cortes paradermales.

2.2 ANTECEDENTES

La presencia de microorganismos que existen de forma natural dentro de los tejidos vegetales sin causar daños aparentes (organismos endófitos), debe ser considerada como una interacción natural compatible entre el microorganismo y la planta, pero por otro lado, la invasión de un fitopatógeno a los mismos tejidos debe ser considerada como interacción incompatible entre ambos protagonistas. Durante el desarrollo de ésta última relación, uno de los efectos que más tempranamente se detecta es la rápida acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). ROS incluye al anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y oxígeno en singulete (1O_2) los cuales se producen cotidianamente en los procesos energéticos de fotosíntesis y respiración. (Wojtaszek, 1997).

Dependiendo de sus concentraciones, las ROS pueden jugar un papel dual en las plantas. Cuando la producción de ROS excede el potencial celular antioxidante, se considera fitotóxico y conduce a la necrosis de los tejidos. La producción incontrolada de ROS, genera daños muy variados en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Bajo condiciones de estrés abiótico, las ROS pueden acumularse hasta llegar a causar síntomas necróticos. (Berlet 1997).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una ROS, que es ampliamente generada en muchos sistemas biológicos. El H_2O_2 es generalmente considerado como un metabolito celular tóxico, pero evidencias recientes sugieren que el H_2O_2 es una molécula señalizadora en plantas, mediando en un amplio rango de respuestas a estrés biótico y abiótico, como el ataque de un patógeno, el déficit de agua, la radiación UV, fitohormonas como ABA.

Varios estudios han mostrado que el H_2O_2 participa en la regulación de muchos procesos de crecimiento y desarrollo, juega también un papel muy importante en varios procesos relacionados con la biología de la raíz, tales como interacciones

rizobiales, gravitropismo, crecimiento de la raíz, y elongación de pelos radiculares. Incrementos localizados de acumulación de ROS ocurren además en varios órganos en crecimiento como semillas germinando, y hojas en crecimiento. Muchos estudios han demostrado que las ROS desempeñan varios papeles esenciales en la respuesta defensiva durante las interacciones planta-patógeno, tales como inducir una actividad antimicrobiana directa, generar una respuesta hipersensible localizada, modificación de las paredes celulares vegetales a través de la actividad peroxidasa que cataliza enlaces cruzados uniendo polímeros con proteínas, y funcionando como segundos mensajeros para la inducción de genes de respuesta defensiva (Lamb y Dixon 1997; Bolwell 1999).

Estudios previos han mostrado que el peróxido de Hidrógeno H_2O_2 es un compuesto señalizador muy importante de la interacción de plantas con microorganismos patógenos y la producción controlada de éstas moléculas es necesaria para generar una respuesta al ataque de un fitopatógeno. Especies reactivas de oxígeno (ROS) han sido observadas en fases tempranas y tardías de la interacción hongo fitopatógeno-huésped, y es comparado con el incremento sustancial de ROS ocasionado por la infección de bacterias patógenas. Durante el período de invasión a los tejidos, se incrementa la concentración de H_2O_2 proveniente de la célula lesionada, como parte de la respuesta hipersensible, sin embargo, si la infección no se controla, el H_2O_2 puede llegar a niveles críticos causando la necrosis celular. (Chen-Fang et. al. 2010).

La localización de las acumulaciones de H_2O_2 es un punto crucial que nos proporcionará datos acerca del proceso de infección del fitopatógeno *M. fijiensis* en las células de las hojas de banano, durante la fase invasiva de la enfermedad Sigatoka negra.

La producción y acumulación de H_2O_2 ha sido estudiada en interacciones incompatibles patógeno-planta, realizando estudios histoquímicos utilizando azul de nitrotetrazolio (NTB) y 3-3 diaminobenzidina (DAB) para visualizar

microscópicamente la presencia de superóxido y peróxido respectivamente. Se ha demostrado que la interacción no compatible fitopatógeno-planta, desarrolla mayor acumulación de peróxido en las células guarda de los estomas durante la etapa de penetración y formación de apresorios, y en las células del mesófilo durante el avance de la infección.

Por otro lado, se sabe que muchos organismos tienen la capacidad de sintetizar una serie de pigmentos de color oscuro llamados genéricamente melaninas. Estas provienen de vías enzimáticas de síntesis, o por la autooxidación de una gran variedad de compuestos cíclicos, heterocíclicos, fenólicos u otras moléculas resonantes estabilizadas. Estas melaninas, confieren protección contra agentes diversos como radiación UV, enzimas líticas y sobre todo, protegen a los organismos que las sintetizan de la actividad tóxica derivada de la presencia de ROS.

Muchos hongos, producen melaninas que son depositadas en sus paredes celulares, jugando un papel importante de protección contra ROS en los procesos de infección. Sin embargo, existen principalmente dos tipos de melanina: DOPA-Melanina que utiliza como precursor la dihidroxifenilalanina (DOPA), y la llamada DHN-Melanina que tiene como precursor el 1,8-Dihidroxi-naftaleno.

La tinción tradicional de Melaninas desarrollada por Warthin-Starry basada en la acumulación de plata, funciona bien con la DOPA-Melanina, pero es inconsistente con las DHN-Melaninas fúngicas, por lo cual, si pretendemos visualizar las hifas de *M. fijiensis* en su proceso de infección, se deberán utilizar las modificaciones a la tinción desarrolladas por Bulter (2005), el cuál tomó como base el método para la demostración histológica de acumulación de sulfatos de metales pesados en tejidos de mamíferos, demostrándose que existe una correlación entre observaciones realizadas con microscopio óptico y con electrónico para la detección de melaninas fúngicas.

Thonthat y colaboradores (1995) utilizando Espectrometría de Absorción Atómica y microscopía electrónica, demostraron que la melanina producida por las hifas del hongo ascomiceto *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, puede ser calculada por adición de Sulfato de Plata y Sulfato de Cobre.

Recientemente, se han realizado esfuerzos para realizar detecciones tempranas del nivel de infección del hongo *M. fijiensis* utilizando Técnicas de Procesamiento de Imágenes (Bhamare, et. al. 2014). Esta técnica permite procesar una fotografía digital tomada del limbo de la hoja, descomponiéndola digitalmente para obtener datos de área afectada, colores presentes y región de la hoja afectada. El análisis *in silico* de la imagen permite ser más exacto en la determinación de la infestación que el ojo humano. Sin embargo, requiere para su implementación de un programa de análisis de imagen que opera en tres etapas: a).- Pre-Procesamiento, consistente en discriminar la imagen de la hoja del fondo de la fotografía, eliminando también manchas no relacionadas con la infección tales como excretas de organismos como aves e insectos. b).- Post-Procesamiento, que consiste en señalar en la imagen las lesiones detectadas permitiendo el almacenamiento de esos datos en la memoria del programa. c).- Clasificación y gradación de las lesiones. Cada lesión detectada en la etapa anterior, debe ser clasificada por expertos en la enfermedad, generando una base de datos de comparación que será utilizada en análisis posteriores automatizados de fotografías de limbos foliares infectados.

Un trabajo similar para detección de etapas de Sigatoka negra en hoja de Banano fue desarrollado por Modenese y colaboradores (2014) concentrándose en las etapas 1, 2 y 3 del avance de la lesión. En éste trabajo, las hojas con las lesiones representativas fueron digitalizadas en un escáner de cama a una resolución de 140 x 140 pixeles. Las imágenes obtenidas fueron descompuestas en los tres colores primarios del sistema RGB. Cada componente se calculó utilizando histogramas de los niveles de intensidades de gris (256 niveles). Esta técnica, permite clasificar las lesiones observables en la parte externa de la hoja, sin

embargo la única información que arroja es la determinación de la etapa de Fouré de forma automatizada y sistemática.

Para este trabajo, se consideró de primordial importancia correlacionar las etapas de descritas por Fouré para el avance de la enfermedad, con la cantidad observable de micelio de *M. fijiensis* localizado en los tejidos internos de la hoja infectada, y con las concentraciones detectables por medio de tinción y análisis óptico de Melanina y Peróxido de Hidrógeno.

2.3 MATERIALES

Reactivos

Aceite de inmersión (Resolve)

Ácido clorhídrico (Sigma)

Ácido láctico (Sigma)

Buffer Tris-HCl

Buffer de Citrato

Hidroquinona

Lactato de Plata

Sulfato de Cobre (Sigma)

Sulfito de Sodio (Baker)

Colorantes

Azul de Anilina (Sigma)

Diaminobencidina (DAB) (Sigma)

Equipos

Agitador orbital (lab- line)

Balanza analítica (Ohaus)

Bomba de vacío (Gast)

Cajas de Petri

Cámara bioclimática (Thermo scientific)

Cámara fotográfica digital (Canon 40D)

Campana de flujo laminar (Veco)

Estufa de incubación (Felisa)

Equipo de Filtración (Milipore)

Membranas de Nitrocelulosa de 0.2 μm (Milipore)

Microscopio AxioLab (Carl Zeiss)

Plancha con agitador (Felisa)

Portaobjetos y Cubreobjetos (Corning)

2.4 MÉTODOS

2.4.1 Obtención de material vegetal

Se colectaron hojas provenientes de plantas adultas de parcelas de producción del Rancho La Uva, en el municipio de Cihuatlán, Jalisco, México (19° 12' 52.76" N y 108° 34' 25.62" W) a una altitud de 8 m snm. Se eligieron muestras que fueran representativas de los seis estadios de infección (Fouré 1985) además de muestras provenientes de hoja candela y de hoja capote 1 con aspecto totalmente sano en la que no hubiera la presencia de ninguna lesión en ninguna parte del limbo foliar. Todas las hojas seleccionadas fueron cortadas desde su base. De manera inmediata, se separó el limbo foliar de la nervadura central de la hoja la cual fue desechada. Los limbos foliares se colocaron dentro de bolsas de papel de 80 x 60 cm, para ser transportadas al laboratorio manteniéndolas a 4 °C en una hielera con la finalidad de evitar el desarrollo de modificaciones histológicas. Las bolsas se mantuvieron secas evitando el contacto directo con el hielo.

En el laboratorio, se seleccionaron fragmentos de 20 x 20 cm, elegidos de la superficie de la hoja que contengan lesiones que representen lo más fielmente posible cada uno de los 6 estadios de Fouré mas los correspondientes a hoja sana (totalmente libre de lesiones) y hoja cigarro. La superficie adaxial y abaxial de estos fragmentos, fueron cuidadosamente limpiadas utilizando agua destilada, para retirar cualquier material no deseado. Posteriormente, se disecaron 10 lesiones en fragmentos de 1 x 3 cm y se realizaron cortes paraderrales de cada una de las 8 muestras. Para realizar los cortes, el fragmento de 1 x 3 cm fue colocado en una superficie de vidrio, y se colocó una navaja de bisturí no. 5. en un ángulo menor a 5° y deslizando cuidadosamente la navaja separando la superficie adaxial y abaxial de la muestra. Se seleccionaron las áreas mejor cortadas, las cuales se aislaron en fragmentos de 1 x 1 cm para ser teñidas con tres colorantes: Azul de Anilina, Diaminobencidina y Sulfato de Plata.

2.4.2 Visualización de hifas utilizando Tinción Azul de Anilina.

Con la finalidad de obtener un registro de la relación existente entre los síntomas de la hoja infectada con respecto al desarrollo e invasión de las hifas del hongo en los tejidos de la hoja de banano, se utilizó la técnica de tinción con Azul de Anilina (Sigma) al 1% en Ácido Láctico (White, J.F. 2012. Com. pers.).

El colorante se preparó diluyendo 1 gr de azul de anilina en polvo en 100 ml de ac. láctico al 50%. Se mezcló utilizando un agitador magnético por 1 h y posteriormente se filtró utilizando filtro de nitrocelulosa de 0.2 micras. El colorante fue almacenado en refrigerador a 4 °C hasta su utilización.

Los cortes paradormal de las hojas, se incubaron a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos sumergidos totalmente en el colorante Azul de anilina al 1%, y posteriormente se enjuagaron por 30 min en agua destilada estéril, realizando un segundo enjuague por 10 min también en agua destilada estéril. Los cortes se montan en fresco, y se observaron al microscopio de campo claro (Axiolab Carl Zeiss con objetivos A-Plan de 40 y 100x) buscando las zonas de presencia de hongo que estará teñido de azul oscuro.

2.4.3 Tinción con Diaminobencidina (DAB) para visualización de regiones ricas en H₂O₂.

Se siguió la metodología de Ai-Xia y colaboradores (2011). Los cortes se incubaron por 5 h en obscuridad a 30 °C en buffer Tris-HCl conteniendo 1 mg/ml de DAB. Transcurrido este tiempo, se enjuagaron en agua destilada por 10 minutos y los cortes tratados se montaron en fresco en portaobjetos analizándose de forma similar buscándose áreas teñidas de color pardo oscuro.

2.4.4 Tinción de Melaninas:

La tinción se realizó mediante el método de Dranscher (1981) modificado por Bulter (2005), utilizado para tejidos animales. Las muestras de cortes se pretrataron incubándolas por 1 hr en una solución 10mM de sulfato de cobre en agua destilada a temperatura ambiente. Posteriormente, se enjuagaron en agua destilada por 1 minuto, y se sumergieron completamente en una solución al 1% de sulfito de sodio manteniéndolas a 50 °C por 1 hora en oscuridad. Posteriormente las muestras fueron enjuagadas en agua destilada por 1 minuto, y se secaron al aire por 3 minutos. Posteriormente se sumergieron en una solución de 22mg de lactato de plata y 170 mg de hidroquinona diluidos en buffer de Citrato (0.1 M , pH 3.7) por 1 hora a una temperatura de 26 °C. Los cortes tratados se montaron en fresco en portaobjetos analizándose de forma similar buscándose áreas teñidas de color café oscuro.

2.4.5 Fotodocumentación de las muestras:

Las muestras fueron fotografiadas utilizando un microscopio de campo claro Carl Zeiss Modelo Axiolab con prisma 100 vis 100 doc equipado con fototubo 2.5x. Se montó una cámara Canon 40D y se utilizó la función disparo remoto a través del Software EOS Utility. Todas las fotografías fueron tomadas utilizando los siguientes parámetros: Resolución alta de 3888 x 2592 pixeles con 24 bits de profundidad, con un tiempo de exposición de 1/25 s, a una velocidad ISO-800, el foco se obtuvo con los objetivos Carl Zeiss A-Plan 20x, 40x y 100x.

2.4.6 Medición de áreas teñidas en cortes paradermales:

Para la medición de los porcentajes de área cubierta, se utilizaron en todos los casos las fotografías obtenidas con objetivos 40x.

Las fotografías fueron analizadas con el software Images Plus 2.0 calibrado para objetivo 40x.

Las fotografías fueron abiertas con este software, y se procedió a medir el área total fotografiada utilizando la herramienta “áreas regulares”. Posteriormente, utilizando la herramienta “áreas irregulares” se midieron por triplicado las áreas teñidas con cada uno de los colorantes. Las áreas obtenidas, fueron registradas en una hoja de cálculo de Excel con la que se calculó el porcentaje del área teñida respecta al área total.

2.4.7 Medición de saturación de negros en células guardia de estomas:

Como en los cortes paradermales, las fotografías fueron tomadas utilizando un microscopio Carl Zeiss Modelo Axiolab con prisma 100 vis 100 doc equipado con fototubo 2.5x. Se montó una cámara Canon 40D y se utilizó la función disparo remoto a través del Software EOS Utility. Todas las fotografías fueron tomadas utilizando los siguientes parámetros: 3888 x 2592 pixeles con 24 bits de profundidad, con un tiempo de exposición de 1/25 s, a una velocidad ISO-800, el foco se obtuvo con los objetivos Carl Zeiss PlanApocromat 40x. Se centró la atención únicamente en las células guardias de los estomas para asegurar que no hubiera un efecto indeseable debido al grosor de la muestra.

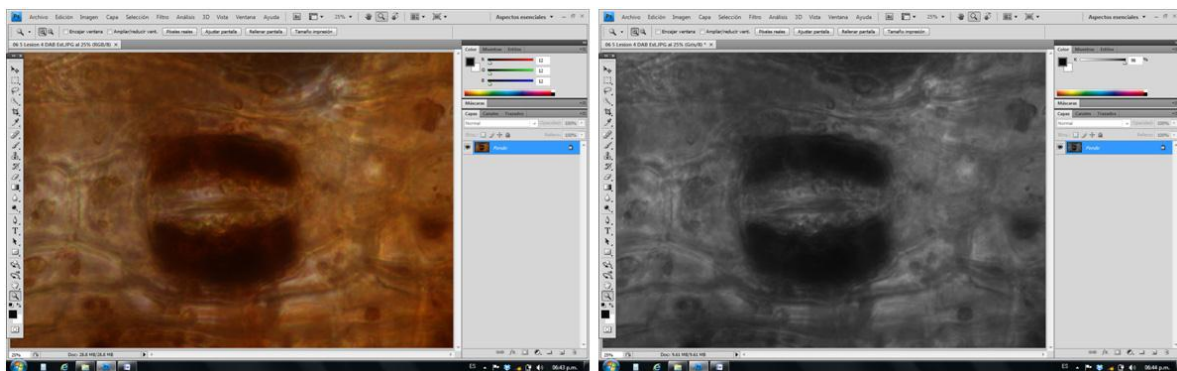


Figura 30. Transformación de fotografías de “color” a “escala de grises” utilizando Adobe Photoshop CS 4 Extended.

Una vez tomada e identificada cada fotografía, se abrió en computadora utilizando el programa Photoshop CS4 extended V. 11.0 procediéndose a transformar cada imagen a “Escala de Grises” (256 tonos) descartándose la información de color (Figura 30).

Se selecciona la herramienta Zoom, ampliando la fotografía hasta obtener el 100% de ampliación. Posteriormente se elige la herramienta Selector de Colores, estableciendo un tamaño de muestreo de “Promedio de 101 x 101 píxeles”. De ésta forma, se obtiene un valor promedio de los píxeles evitando las grandes variaciones generadas por la lectura de un solo píxel. Se da doble click en el cuadro de identificación de color, apareciendo la ventana de Selector de Control registrándose el valor de K, (Black).

2.5 RESULTADOS

Desarrollo del hongo y producción de Peróxido y melaninas.

Se tiñeron las hifas de *M. fijiensis* con azul de anilina observándose el incremento de la infección a través de las etapas (Figura 31); los cortes paradermales de tejidos de conducción y células del mesófilo de las hojas fueron teñidos con DAB para observar la acumulación de melanina, y con Sulfato de Plata para peróxido de hidrógeno, logrando establecer una diferencia notoria entre la acumulación de ambos compuestos en las diferentes etapas (Figura 32); se aplicaron estas mismas técnicas de tinción a la superficie abaxial de las hojas con la finalidad de teñir células guardia de los estomas, que tienen como función proteger al estoma de la penetración de organismos ajenos a la planta, midiendo en ésta ocasión la concentración de los compuestos antes mencionados y no la superficie de cobertura (Figura 33).

Hoja Cigarro. Representa la hoja más joven de la planta de banano, se mantiene enrollada durante su fase de crecimiento y conforma el centro del pseudotallo desde el cormo (meristemo apical) hasta la parte más alta de la planta. Es de un color verde amarillento al encontrarse en la fase de fotoactivación de cloroplastos. Los cortes y tinciones realizadas con este material evidencian que es la única etapa totalmente libre de micelio de *M. fijiensis*, debido a que en los cortes estudiados de ésta etapa, no se observaron las coloraciones características para cada compuesto (Figura 31, A e I). Lo mismo ocurre en las imágenes de estomas A e I de la Figura 32.

Hoja Sana (asintomática). Hojas totalmente abiertas (hoja capote) aledañas a la hoja cigarro. Tiene el color verde característico de la especie, y no presenta ninguna marca o lesión en sus superficies adaxial y abaxial. Las áreas teñidas en los campos estudiados, revelan que en promedio el 27% del interior de la hoja es teñido con azul de anilina. En ésta misma etapa, los cortes de hoja teñidos con

DAB muestran un área de 7.38% de las imágenes, mientras que la tinción con sulfato de plata solo se localiza en el 1.06% de las mismas áreas estudiadas (Figura 32 B y J). Las tinciones con éstos mismos colorantes realizadas en los estomas (Figura 33 B y J), muestran una saturación de negros con un valor de 38 para DAB, mientras que la correspondiente a sulfato de plata alcanza únicamente un valor de 9.4.

Lesión 1 (Pizca). Es el primer síntoma visible de la enfermedad en la hoja. Se observa una mancha pequeña: peca o pizca de color amarillo claro en el envés de la tercera o cuarta hoja. Como se muestra en la Figura 31 C2, las áreas teñidas con azul de anilina se concentran en los tejidos de conducción y las células del mesófilo cubriendo en promedio el 26% de las áreas estudiadas. De manera simultánea, en los cortes de hoja teñidos con DAB el 9.95% de las áreas observadas fueron coloreadas, mientras que las tinciones obtenidas mediante sulfato de plata se han incrementado y se localiza en el 8.99% de las mismas áreas (Figura 32 C y K). Las tinciones en estomas (Figura 33 C y K), muestran que la saturación de DAB alcanza un valor de 66 habiendo duplicado su concentración, mientras que la correspondiente a sulfato de plata mantiene un valor de 9.

Lesión 2 (Raya 1). Se observa una estría o raya de color café visible en el envés de la hoja. Como se muestra en la Figura 31 D2, la tinción con azul de anilina se mantiene totalmente distribuida en los tejidos de conducción y las células del mesófilo en promedio cubriendo el 26.68% del interior de la hoja. De manera simultánea, los cortes de hoja (Figura 32 D y L), teñidos con DAB revelan un incremento importante del área teñida llegando al 22.63% de las imágenes, mientras que las áreas teñidas con sulfato de plata se han incrementado ligeramente tiñéndose el 11.71% de las mismas áreas. Las tinciones en estomas (Figura 33 D y L), muestran que la tinción con DAB mantiene su concentración, con un valor de saturación de 67 mientras que la correspondiente a sulfato de plata mantiene un valor de 8.7.

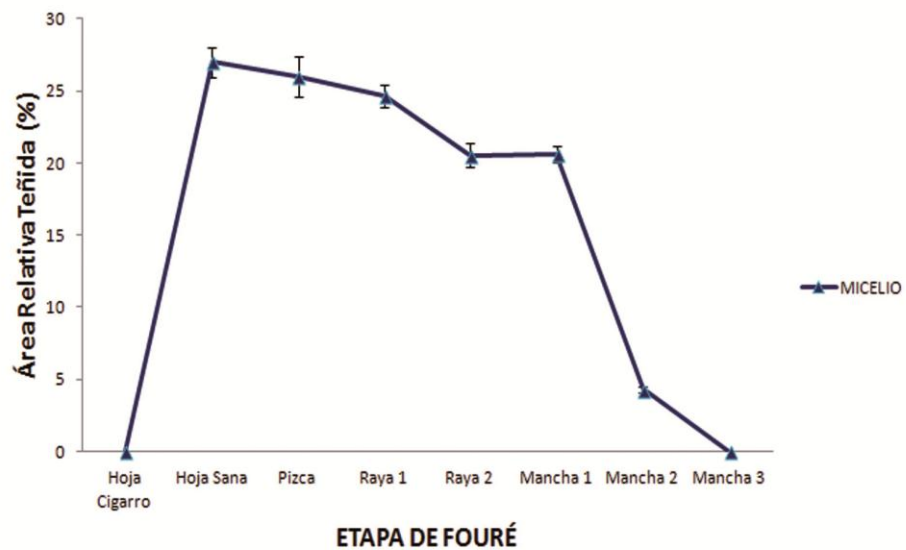
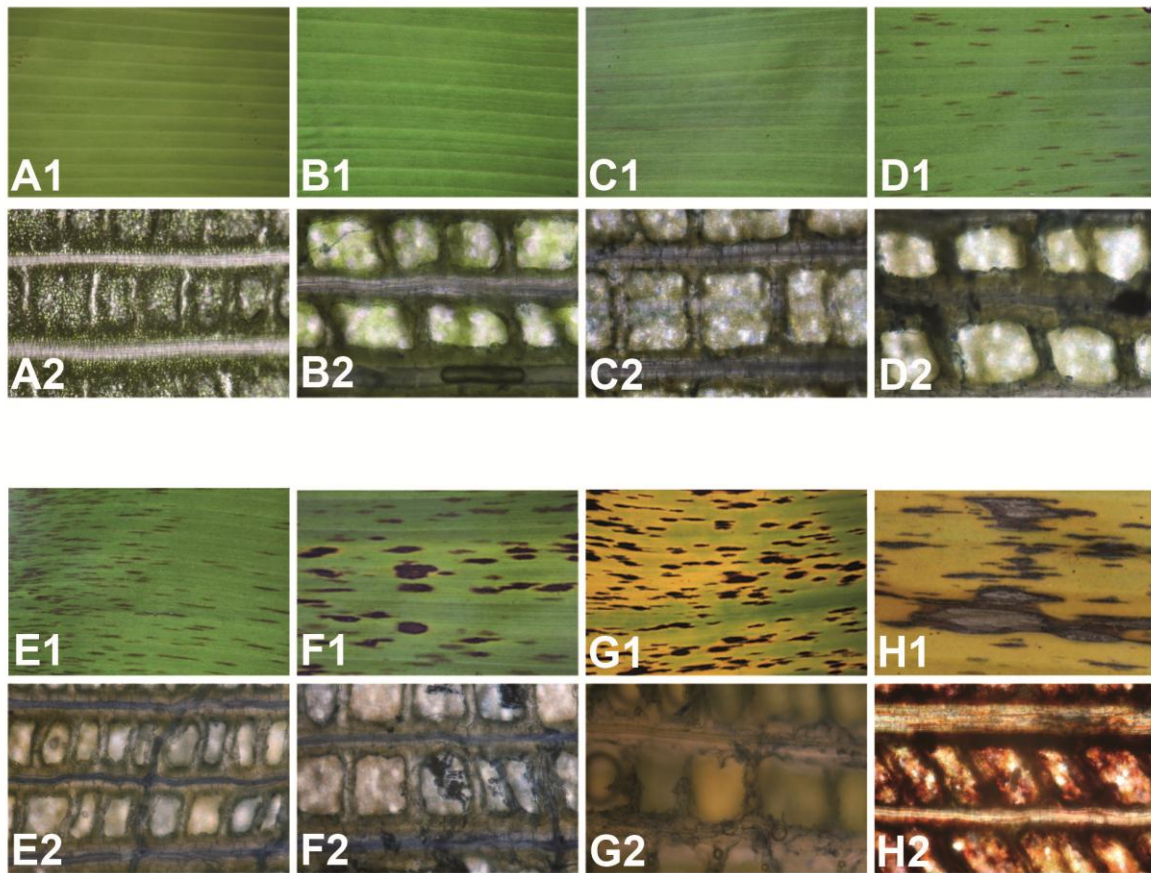
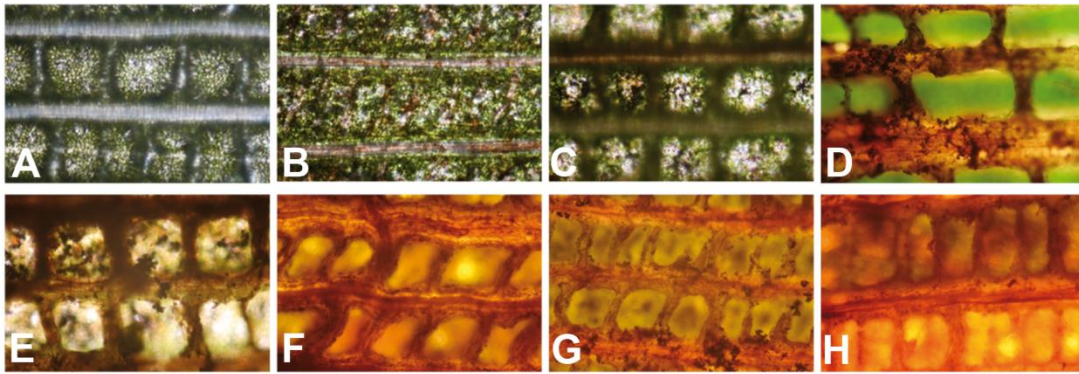


Figura 31. Imágenes comparativas de las 8 etapas estudiadas mostrando el aspecto de la superficie de la hoja (serie 1) y la colonización interna de hifas de *M. fijiensis*. (serie 2). Todas las imágenes se corresponden (A1 con A2), (B1 con B2), etc.

Lesión 3 (Raya 2). Las estrías o rayas se mantienen del mismo color pero se hacen más grandes y pueden alcanzar una longitud de 2 a 3 cm. Como se muestra en la Figura 31 E2, la tinción con azul de anilina se mantiene distribuida en los tejidos de conducción y las células del mesófilo teniendo una pequeña baja en su cobertura promedio cubriendo el 20.54% de las áreas observadas del interior de la hoja. De manera simultánea, los cortes de hoja teñidos, con DAB revelan un incremento importante del área teñida llegando a la máxima concentración observada en todas las etapas al alcanzar el 38.76% de la superficie de las imágenes, mientras que la coloración obtenida con sulfato de plata continúa incrementado y ha alcanzado el 22.95% de las mismas áreas (Figura 32 E y M). Las tinciones en los estomas muestran que la tinción con DAB tiene un ligero descenso alcanzando un valor de saturación de 60 mientras que la correspondiente a sulfato de plata también desciende hasta un valor de 6.3 (Figura 33 E y M).

Lesión 4 (Mancha 1). Se observan manchas de color café en el envés de las hojas, las cuales se observan de color negro en el haz o cara superior de las hojas. En la Figura 31 F2, la tinción con azul de anilina mantiene su valor promedio cubriendo el 20.64% de las áreas observadas. Los cortes de hoja (Figura 32 F y N) teñidos con DAB muestra un descenso del área teñida llegando al 27.20% de las imágenes, mientras que la tinción obtenida con sulfato de plata ha alcanza su valor máximo y se localiza en el 30.05% de las mismas áreas. Las tinciones en estomas (Figura 33 F y N), muestran que el valor de saturación para DAB alcanza su máxima concentración, llegando a 83.3; mientras que la saturación correspondiente coloración de sulfato de plata incrementa ligeramente mostrando un valor de 9.7.

PEROXIDE STAIN



MELANIN STAIN

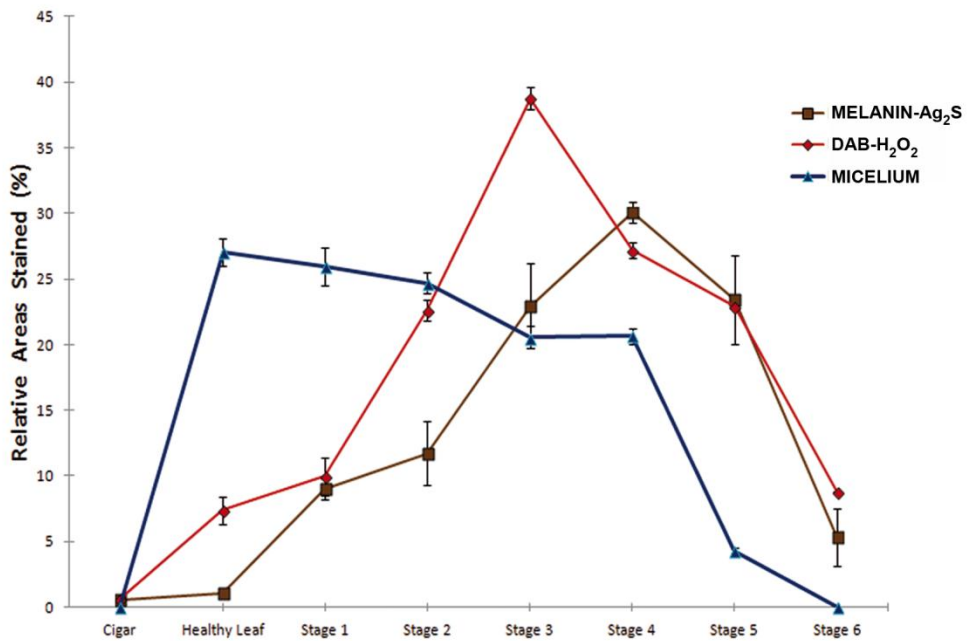
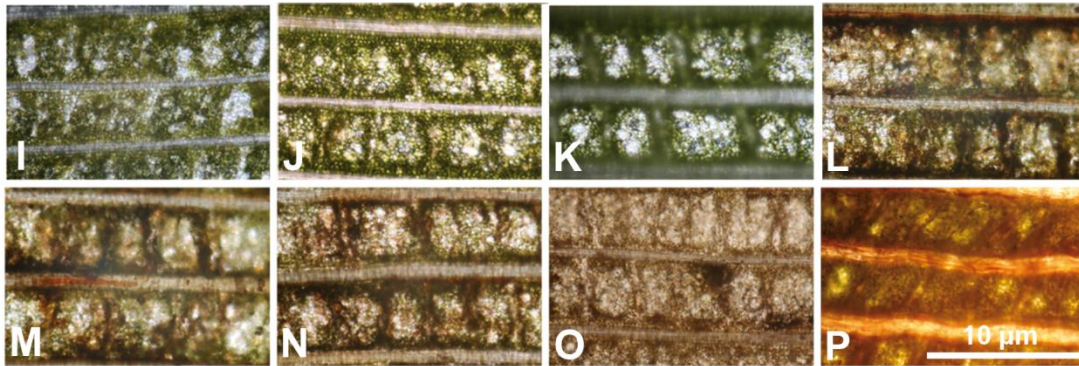
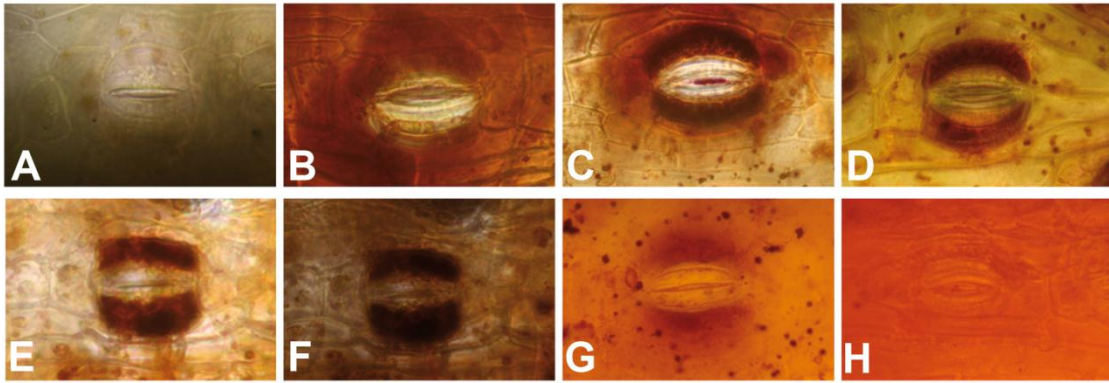


Figura 32. Peróxido de Hidrógeno y Melaninas en los tejidos internos de hoja de banano y gráfica de áreas relativas teñidas por la coloración específica.

Lesión 5 (Mancha 2). Las manchas negras se extienden al envés de la hoja y están rodeadas por una zona de color amarillo intenso. Las áreas teñidas con azul de anilina se reducen drásticamente cubriendo el 4.32% del interior de las áreas observadas (Figura 31 G2). Como se muestra en la Figura 32 F y G, los cortes de hoja teñidos con DAB muestran un descenso del área teñida llegando al 22.94%, mientras que las teñidas con sulfato de plata también decrecen cubriendo el 23.42% de las mismas áreas. Las tinciones en estomas (Figura 33 G y O), muestran que el valor de saturación para DAB desciende notoriamente alcanzado una saturación de 37.3 mientras que la correspondiente a sulfato de plata se incrementa ligeramente hasta un valor de 10.4.

Lesión 6 (Mancha 3). Las manchas comienzan a observarse hundidas y el centro se seca y adquiere un color grisáceo. Se acentúa el color negro alrededor de las manchas con bordes color amarillo brillante. Estas manchas se observan aunque la hoja se haya secado. La tinción con azul de anilina ya no muestra áreas teñidas (Figura 31 H2). Los cortes de hoja teñidos con DAB muestra un descenso del área teñida llegando al 8.7%, mientras que las teñidas con sulfato de plata se localiza en el 5.31% de las mismas áreas (Figura 32 H y P). En los estomas el valor de saturación de DAB desciende hasta alcanzar un valor de 8.7 mientras que la correspondiente a sulfato de plata incrementa ligeramente hasta un valor de 8.9 (Figura 33 H y P).

PEROXIDE STAIN



MELANIN STAIN

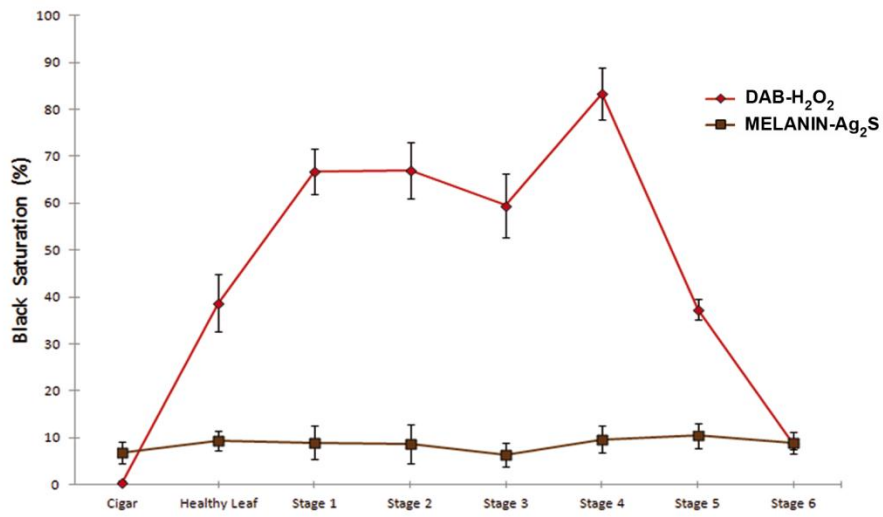
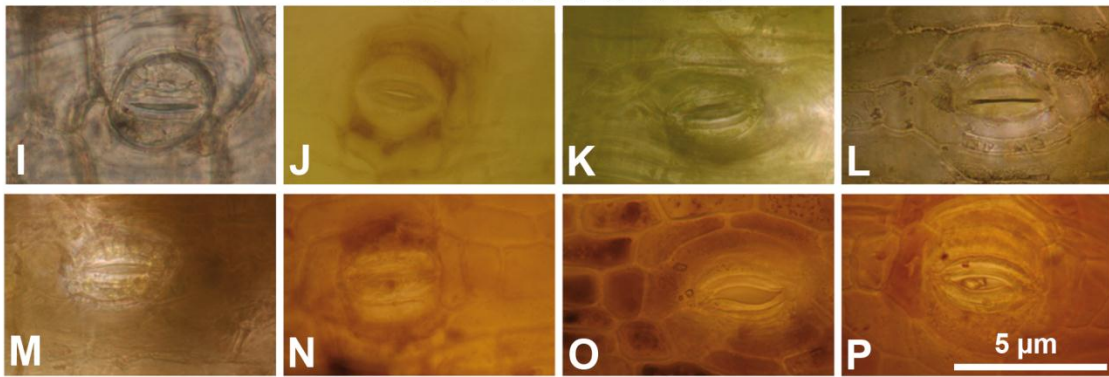


Figura 33. Peróxido de Hidrógeno y Melaninas en células guardias de estomas de hoja de banano y gráfica de saturación de negros como medida relativa de concentración.

2.6 ANALISIS ESTADISTICOS

Con la finalidad de validar los métodos indirectos semicuantitativos utilizados en este capítulo 2, se realizaron Análisis de Varianza Multifactoriales (ANOVA), se construyeron modelos de regresión lineal, y gráficas de superficie de respuesta para cada una de las variables estudiadas. Se utilizó el software de estadística Statgraphics Centurion XVI.

Para realizar los análisis estadísticos, se utilizaron los datos desde Hoja Cigarro, Hoja Sana, Pizca Raya 1, Raya 2, Mancha 1. No se consideraron los datos obtenidos en Mancha 2 y Mancha 3, ya que existe una evidente necrosis del tejido vegetal y destrucción de las hifas, por lo cual la concentración de peróxido y melanina detectable es meramente residual.

2.6.4 RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDO Y MELANINA EN TEJIDOS DE HOJA

De la misma forma que con las tinciones de estomas, se realizó un análisis de regresión para establecer la dependencia entre las concentraciones de peróxido y las concentraciones de melanina en tejidos de hoja. La ecuación 1 es útil para predecir, con 94.5% de certeza, la cantidad de melanina que se producirá una vez que se tenga una cantidad de peróxido en el tejido.

$$\% \text{ de melanina en hoja} = e^{0.107 * \% \text{ de peróxido en tejido}}$$

La ecuación muestra un incremento exponencial de la melanina en función de la cantidad de peróxido acumulado en el tejido. Esto es, la concentración de melanina se incrementa exponencialmente en un factor de 10% con respecto al porcentaje de peróxido acumulado en la hoja (Figura 34).

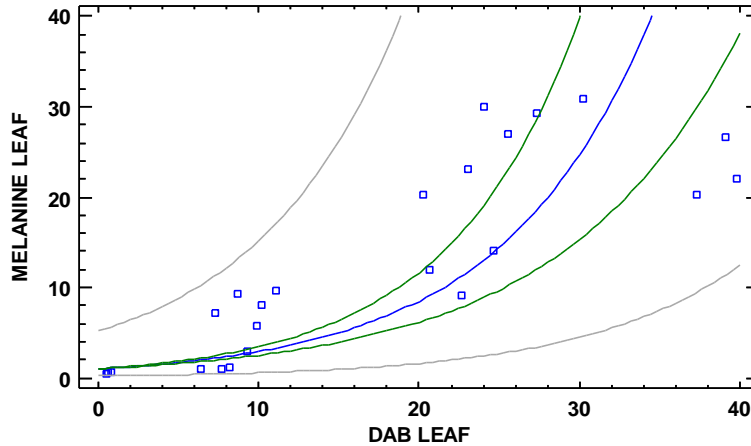


Figura 34. Gráfica de relación incremento melanina en función a peróxido acumulado.

2.6.5 RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE MICELIO Y CONCENTRACIÓN PERÓXIDO EN TEJIDOS DE HOJA

Se analizó la relación entre la producción de peróxido y la biomasa fúngica en el tejido sintomático, encontrándose una relación exponencial entre la producción de peróxido y la acumulación de micelio en el tejido con una confianza de 98.9%, lo que implica que la producción de peróxido crece exponencialmente con el crecimiento del hongo en sus etapas necrotróficas (desde la etapa pizca hasta la etapa Mancha 2), Figura 35. La cantidad de peróxido producido dependerá de la cantidad de micelo acumulado dentro del tejido con un factor de incremento de 13.07% (Ecuación 2).

$$\% \text{ de peróxido} = e^{0.1307 * \% \text{ de cobertura de micelio en hoja}}$$

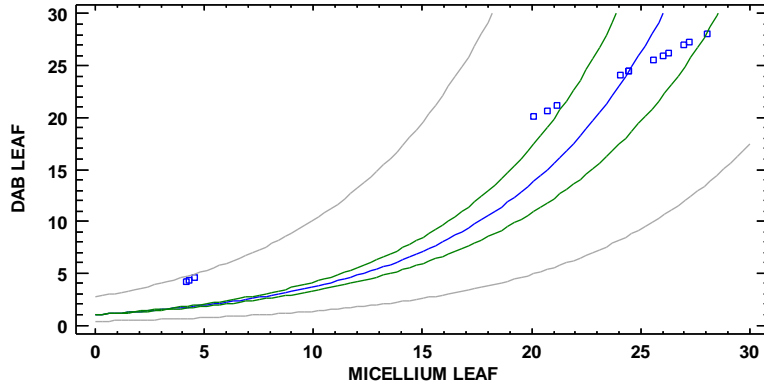


Figura 35. Gráfica de relación entre cantidad de micelio y peróxido acumulado en tejido con síntomas visibles.

2.6.1 RELACIÓN ENTRE ETAPA DE FOURÉ Y CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDO EN ESTOMA

Se realizó un análisis de regresión simple para relacionar la concentración de peróxido con la etapa de Fouré. La concentración de peróxido se utilizó como indicador de la etapa de Fouré; de tal forma que al medir una concentración de peróxido se pueda establecer la etapa de Fouré (Ecuación 3).

$$\text{Etapa de Fouré} = \frac{\text{Concentración de Peróxido}}{15.34}$$

Con la fórmula anterior, es posible determinar con 96% de certeza, que cuando la infección pasa de una etapa inferior a una superior la concentración de peróxido se incrementa en 15.34%. Esto es válido para tinciones hechas desde Hoja Cigarro hasta Mancha 1, correspondientes al cambio biotrófico a necrotrofico de la infección.

2.6.2 RELACIÓN ENTRE ETAPA DE FOURÉ Y CONCENTRACIÓN DE MELANINA EN ESTOMA

Se realizó un análisis de regresión simple para relacionar la concentración de melanina en estoma con las etapas de Fouré. La concentración de melanina en estoma se utilizó como indicador de la etapa de Fouré; de tal forma que al medir una concentración de melanina se pueda establecer la etapa de Fouré (Ecuación 4).

$$\text{Etapa de Fouré} = \frac{\text{Concentración de melanina}}{2.16}$$

Con la relación anterior, es posible determinar con 83% de certeza, que cuando la infección pasa de una etapa inferior a una superior la concentración de melanina en estoma se incrementa en 2.16%. Esto es válido para tinciones hechas desde Hoja Cigarro hasta Mancha 1, correspondientes al cambio biotrófico a necrotrofico de la infección.

2.6.3 RELACIÓN ENTRE ETAPA DE FOURÉ Y CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDO Y MELANINA EN ESTOMAS

Se realizó un análisis de regresión múltiple, para relacionar las etapas de Fouré con las mediciones de concentración de peróxido y melanina en estomas. El análisis muestra que es posible predecir con un 93.6% de confianza la etapa de Fouré una vez teniendo los valores de concentración de peróxido y melanina (Ecuación 5).

$$\text{Etapa de Fouré} = 0.69 * \% \text{ de peróxido} + 0.12 * \% \text{ de melanina} - 0.0031 * \\ \% \text{ de peróxido} * \% \text{ de melanina}$$

Las predicciones de la etapa de Fouré, dadas las concentraciones de peróxido y melanina en estomas se pueden encontrar gráficamente en la figura 36. Al cruzar la información del % de peróxido y % de melanina medidos en estomas, se

obtiene un punto de color específico, este color corresponde a la etapa de Fouré en que se encuentra la infección.

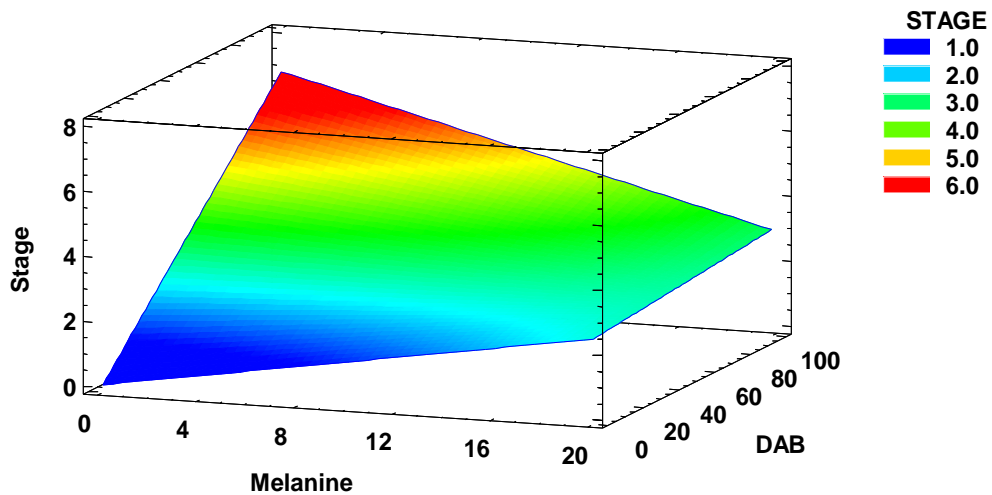


Figura 36. Superficie de respuesta de relaciones Etapa, Melanina, DAB

2.7 DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el método propuesto para monitorear los tres componentes del proceso de infección (hifas, melaninas y H_2O_2) arrojan datos con validez estadísticamente significativa que guardan una relación que puede ser descrita con un modelo de regresión lineal, con índices de correlación superiores al 90%, por lo que puede utilizarse de manera predictiva, resultando una técnica económica y de fácil acceso frente a métodos más sofisticados como la PCRq, la Espectrometría de Masas y la Microscopía Electrónica utilizada por Thonthat y colaboradores (1995).

La técnica de tinción con Azul de Anilina en Ácido Láctico de White, J.F. (2012), resultó funcional, rápida y de menor complejidad que otras técnicas publicadas. La propuesta por Mori T. (2006) es más compleja ya que requiere de un proceso previo de despigmentación de la muestra (clarificación). González M.S. (2011) propone técnicas de tinciones basadas en colorantes naturales que resultan inaplicables en éste tipo de estudios por la interferencia de la clorofila. Hood y Shew (2006) utilizan KHO-Azul de Anilina, buscando realizar observaciones bajo microscopio fluorescente excitando la anilina con un filtro de interferencia de 360 nm de longitud de onda. Sin embargo, pese a mostrar excelentes resultados en estudios de interacciones plantas patógenos, sus observaciones fueron hechas en especímenes de herbario, o fragmentos vegetales esterilizados en autoclave. En éste estudio, el mayor inconveniente resultó la autofluorescencia del tejido de la hoja de banano.

Chen-Fang (2010) detecta una diferencia marcada en la generación de ROS en plantas colonizadas con microorganismos endófitos y patógenos. La producción de ROS es significativamente mayor en plantas inoculadas con microorganismos no compatibles en comparación con las acumulaciones detectables en interacciones compatibles. Este mismo fenómeno es observable en las diferentes etapas de la infestación de banano por *M. fijiensis*, En hoja candela, la producción

de peróxido es indetectable, sin embargo en hoja asintomática ya infectada por hongo, se detectan concentraciones bajas de H_2O_2 . Esta concentración se incrementa rápidamente manifestando una relación exponencial entre la producción de peróxido y la acumulación de micelio en el tejido sintomático, lo que implica que la producción de peróxido crece exponencialmente con el crecimiento del hongo en sus etapas necrotróficas (desde la etapa pizca hasta la etapa Mancha 2). Chen-Fang considera que las acumulaciones de ROS son un componente muy importante en la virulencia de un microorganismo. En el presente trabajo, existe también una correlación del 98% entre el incremento de ROS y el inicio de las manifestaciones necróticas de la enfermedad.

Sin embargo, en los métodos discutidos con anterioridad los resultados son únicamente cualitativos; esto es, se detecta la presencia de alguno de los tres componentes estudiados (hongo, Melanina y H_2O_2). En ésta metodología, la diferencia estriba en que los tres componentes son tratados de forma semicuantitativa, permitiendo dar valores numéricos que conllevan mayor información. Al analizar las correlaciones existentes entre la superficie teñida con DAB (H_2O_2) y la superficie teñida con Sulfato de Plata (Melanina) se obtiene una ecuación que es útil para predecir, con 94.5% de certeza, la cantidad de melanina que se producirá una vez que se tenga una cantidad de peróxido en el tejido.

El análisis de la concentración de las tinciones en estomas mediante análisis de imagen y cuantificación a través de saturación de negros, es una aportación novedosa. En éste caso, existe una correlación de 96% lo que nos permite predecir la concentración de peróxido en estomas con solo saber la etapa de Fouré que representa.

Otra aportación importante, es la demostración que en las células guardia de los estomas, no existe una relación entre la cantidad de peróxido que se detecta y la concentración de melanina existente. Los datos sugieren que en éstas células, la melanina no se sintetiza pese a tener altas concentraciones de peróxido, lo cual

rompe el paradigma de la relación directa peróxido-melanina presente en las células del mesófilo.

Los métodos diseñados por Bhamare, y colaboradores (2014) basándose también en Técnicas de Procesamiento de Imágenes, permiten únicamente estandarizar el diagnóstico de la etapa de la enfermedad en un huerto comercial estandarizando el diagnóstico después de cumplir con tres etapas complejas de procesamiento previo. Mientras que Modenese y colaboradores (2014) también digitalizan imágenes y las transforman a tonos de grises para estudiar el diagnóstico sistematizado de la lesión en la superficie de la hoja. Sin embargo, ninguno establece correlaciones con elementos importantes de paso de biotrofia a necrotrofia como lo son el H_2O_2 y la melanina.

2.8 CONCLUSIONES

El proceso de infección del hongo, se inicia en etapas muy tempranas de desarrollo de la hoja en los huertos comerciales. Consideramos que el momento de la penetración vía estomas se produce en la fase final de hoja candela o cigarro, en cuanto ésta se encuentra en el proceso de desdoblamiento.

Este trabajo muestra que pese a que las hojas capote pueden permanecer asintomáticas, con un aspecto exterior libre de toda manifestación, en las células del mesófilo y los tejidos de conducción ya está instalada la infección como se pudo detectar con Azul de Anilina. Aparentemente, las células infectadas tanto de mesófilo como los estomas, generan una producción de H_2O_2 con la finalidad de agredir a las hifas del hongo invasor, el cual resulta inmune a este mecanismo de defensa.

Una vez establecido el hongo, se inicia la síntesis de melaninas de manera simultánea con la aparición de las primeras lesiones. La síntesis de H_2O_2 se mantiene durante todo el proceso siendo particularmente notorio en células guardias de estomas, llegando a su nivel más alto con el amarillamiento de la hoja.

Al necrosarse el tejido, bajan considerablemente las densidades de las hifas, y en consecuencia, la concentración de H_2O_2 y melaninas.

Los descensos tan notorios en las etapas Mancha 2 y Mancha 3, se explican al considerar que las células de la planta han muerto, y las moléculas estudiadas que localizamos no son más que presencia residual de etapas anteriores.

Lo anterior nos indica que el hongo se localiza dentro de los tejidos de la hoja, pero no mantiene una actividad de generación de peróxido de hidrógeno directamente proporcional al grado de colonización o biomasa. Esto es, puede haber mucho hongo y poca síntesis de peróxido, y en un momento dado, esta

misma concentración de hongo producen grandes concentraciones de peróxido. Sin embargo, la concentración de melanina si guarda una relación directa con la síntesis de peróxido como lo muestra el punto 2.6.4 del análisis estadístico.

La mayor correlación de datos se presenta entre la concentración de peróxido y la etapa de Fouré como se explica en el punto 2.6.1. Y existe también una alta correlación entre la etapa de Fouré y las cantidades de Peróxido y Melanina cuantificadas por éste método.

CAPÍTULO 3

Aportaciones para la publicación del artículo.

Beltrán-García MJ, Prado FM, Oliveira MS, Ortiz-Mendoza D, Scalfo AC, et al. (2014) **Singlet Molecular Oxygen Generation by Light-Activated DHN Melanin of the Fungal Pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in Black Sigatoka Disease of Bananas.** PLoS ONE 9(3): e91616. doi:10.1371/journal.pone.0091616

Las técnicas de tinción descritas en el capítulo 2, han permitido generar aportaciones a estudios recientes que describen el papel que desempeña el pigmento DHN-Melanina en los efectos destructivos derivados de la infestación de *M. fijiensis* en los tejidos de la hoja de banano.

El termino melanina, agrupa a un heterogéneo grupo de sustancias poliméricas amorfas, sin una estructura definida, que confieren propiedades pigmentarias desde negros, café y hasta rojos. Esta sustancia es altamente insoluble en agua y solventes orgánicos, pero es susceptible de ser blanqueada por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). De forma natural, existen tres tipos de melaninas: eumelaninas y feomelaninas derivadas de DOPA (dihidroxyfenilalanina), allomelaninas formadas por la polimerización de 1,8-dihidroxy-naftaleno (DHN). Eumelaninas contienen átomos de nitrógeno, las feomelaninas contienen átomos de nitrógeno y azufre y las allomelaninas no contienen ninguno de los anteriores. La protección contra la radiación UV proporcionada por las melaninas a los organismos que las producen, es ampliamente aceptada (Liu, 2010. Kunwar 2012).

En los hongos patógenos, la melanina contribuye a incrementar la virulencia tanto contra animales como contra plantas. La melanina provee protección contra los mecanismos de defensa que involucran agentes oxidantes generados por el hospedero, protegiendo de la lisis a los conidios y otras estructuras mielinizadas (Butler 1998). Mutantes isogénicos de *M. fijiensis* que se caracterizan por presentar una pigmentación rosada en el micelio y un muy bajo contenido de melanina; son capaces de penetrar en los tejidos de la hoja de banano, pero la infección es bloqueada en etapas muy tempranas. Las lesiones que se generan en estos casos, son resultado de la respuesta defensiva del propio huésped (Donzelli, 2007).

Como resultado de estas observaciones, se propuso la hipótesis en la que se considera que la melanina por si misma está involucrada en un proceso que induce necrosis y muerte celular en tejidos de plantas infectadas por el hongo causante de Sigatoka negra.

Existe un gran número de publicaciones relacionadas con la melanina fúngica 1,8-DHN, enfocadas principalmente en la caracterización de los genes involucrados en su vía de biosíntesis, en su caracterización espectrofotométrica, en su localización ultraestructural, en la medición de su capacidad antioxidante y en el comportamiento patogénico de cepas deficientes en melanina. Considerando este último punto, se ha propuesto que la melanina fúngica actúa como un agente antioxidante contra los mecanismos de defensa del huésped (Nosanchuk, 2003. Mednick, 2005).

En este artículo, se estudió el pigmento melanina de *M. fijiensis* acumulada en las paredes celulares del hongo y la secretada al medio de cultivo, a través de aplicaciones de las técnicas espectrofotométricas como UV, IR y espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight).

Se identificaron los pigmentos secretados y no secretados como 1,8-DHN-melanina. Además, se investigó la producción de O_2 (1D_g), por melaninas *M. fijiensis* y por los productos intermedios generados en la presencia de inhibidores de la biosíntesis de melanina (triciclazol y piroquilon) por fotólisis de flash con láser Nd: YAG a 532 nm. La identificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en tándem con Ionización por Electrospray (ESI HPLC-MS / MS) de productos intermedios en los cultivos líquidos bloqueados por triciclazol y piroquilon confirmaron la generación de O_2 (1D_g).

Surge entonces la necesidad de relacionar la presencia de melanina en el tejido foliar infectado de forma natural con el estadio de la enfermedad. Se parte de la hipótesis que propone que la melanina producida por *M. fijiensis* genera O_2 (1D_9) que puede funcionar como un " toxina foto activada " que desencadena la muerte celular en las hojas infectadas, lo que resulta en los síntomas destructivos de la enfermedad Sigatoka negra en bananos y plátanos.

Para evaluar esta hipótesis de que la melanina se asocia con la necrosis de las hojas, se obtuvieron muestras de hojas de la variedad de banano susceptible (gigante enano, Cavendish AAA) de 8 a 10-meses de edad, de un huerto comercial con una alta incidencia de la Sigatoka negra. Fragmentos de hojas en diferentes estadios de la enfermedad se observaron al microscopio y se compraron con las hojas "cigarro" y las hojas infectadas por el hongo asintomáticas. Se analizó la presencia de melanina y H_2O_2 en los tejidos foliares relacionándolos con el progreso natural de la infección y el desarrollo de lesiones necróticas.

Con la finalidad de mostrar la presencia de melanina en los tejidos mediante tinción con sulfuro de plata y su importancia en la generación de daños en el tejido de la hoja, se realizó un análisis semi cuantitativo del área cubierta con el hongo (basado en la incorporación de azul de anilina en hifas de los hongos) y la presencia de H_2O_2 en el tejido de la planta (tiñendo con DAB y detectado como un color marrón rojizo) en cada una de las etapas de la enfermedad como se muestra en la figura 37.

La figura 37A muestra un fragmento de hoja en desarrollo llamada "cigarro" o "candela", hoja que se utilizó como control para la tinción de melanina. El hongo no infecta la hoja cigarro y no se detectaron melanina ni H_2O_2 en los tejidos.

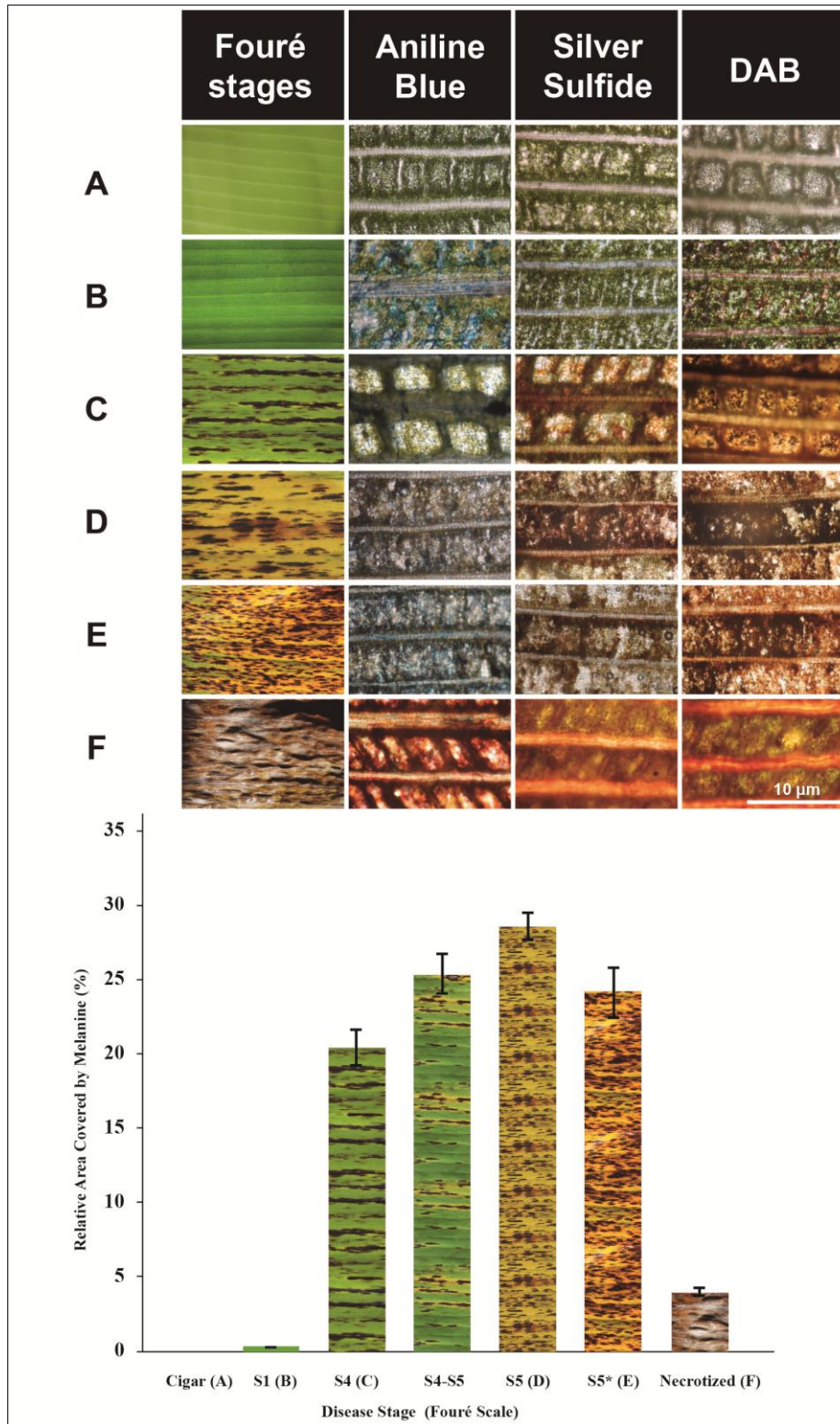


Figura 37. Contenido de melanina fúngica relacionada con los daños necróticos en hoja de banano naturalmente infectado.

La figura 37 B muestra un fragmento de hoja en etapa 1 de infección (S1) de acuerdo con la escala Fouré (1985). Las hojas de esta etapa tienden a perder el color verde pálido adquiriendo un tono verde oscuro. A nivel microscópico, la mancha azul de anilina muestra una mayor tinción de hifas fúngicas (en azul profundo) distribuidos entre las células de la capa de empalizada y los espacios intercelulares del mesófilo; con hifas que cubre aproximadamente el 27% del área foliar analizada (Figura 37 S5). En esta etapa de la infección, no se detecta melanina en el tejido de la hoja o en zonas donde se encuentran las hifas, sin embargo se detectó H₂O₂ en el 7.4% de la superficie analizada.

En la Figura 37 6C el fragmento de hoja tiene manchas marrones más amplias en la etapa S4 (también llamada "la etapa de mancha 1") con decoloración y pérdida de vigor. Microscópicamente, se observó estructuras fúngicas, incluyendo conidios asexuales, en las células del mesófilo. No se encontraron diferencias significativas en las áreas cubiertas por el hongo en comparación con etapas anteriores. La melanina ha cubierto el 20,43% de la superficie observada de la hoja. Sin embargo la tinción DAB muestra 40% de la superficie con presencia de H₂O₂ en los espacios intercelulares y en las células de la capa de empalizada. Es difícil distinguir si es el hongo o la planta el responsable de la acumulación de peróxido de hidrógeno en este sitio.

En la transición desde la etapa S4 a S5 no se observó ningún cambio en el área cubierta por el hongo, pero el nivel de H₂O₂ se ha acercado a 50%. En la transición desde la etapa S4 a S5 la melanina aumentado en un 5%.

Los síntomas de la etapa S5 o "etapa de mancha 2" en la hoja del plátano se muestran en la figura 37 D. Esta etapa se caracteriza por muchas manchas negras con halos amarillos. En esta etapa el hongo ha penetrado en las células causando cambios estructurales irreversibles en las células del mesófilo. Los daños por penetración membranas celulares de las plantas aumentan la pérdida de nutrientes intracelulares. Aunque la zona de hongos ha disminuido un 5%, el número de

estructuras reproductivas (pseudotecios) aumentó. La melanina alcanza el valor máximo de 28,6% en esta etapa de la progresión de la enfermedad. La cantidad de H_2O_2 en esta etapa es mayor que en las etapas anteriores de infección. Se estima que esta etapa se produce después de 50-60 días post-penetración del hongo por los estomas. Este hallazgo sugiere que la cantidad de melanina de hongos depositados dentro de los tejidos foliares está directamente relacionado con la muerte de células del mesófilo y la necrosis de la hoja.

Figura 37 E muestra una hoja en avanzada etapa S5 *. Se presenta un aumento en las regiones cloróticas, y las manchas negras son más grandes. Hay una disminución en el contenido de micelio de los tejidos vegetales y las morfologías celulares de las células de las plantas están alteradas. Se observó una disminución en el contenido de melanina y acumulación de H_2O_2 . En la Etapa 6 (figura 37 F), las hojas pueden estar completamente necrosadas con manchas negras con centro gris y puntos negros (pseudotecios) dentro de ellos. Microscópicamente, se observó una pérdida de la estructura de tejido de la planta y una disminución en el contenido de micelio llegando a un 5% del área observada.

Por las evidencias anteriores aportadas, nos permite concluir que la acumulación y secreción de DHN-melanina en *M. fijiensis* actúa como una "toxina fotoactivada". La hoja en la etapa S1 (Figura 38 B) está infectada por el hongo pero no mostró presencia de melanina. El H_2O_2 se localizó en las células del mesófilo adyacentes al micelio en hojas sin daños aparentes. Hojas en etapas posteriores de la enfermedad, mostraron acumulación de melanina y H_2O_2 , lo que sugiere que los tejidos de las hojas estaban bajo el estrés oxidativo y esto se pone de manifiesto por la destrucción de las células del mesófilo.

Los niveles más altos de acumulación de H_2O_2 se produjeron en la etapa S1 y en la transición S4-S5. En hojas necróticas el área en la que se detectó H_2O_2 disminuye (Figura 37 F). La detección de melanina se inicia después de la etapa

S1 y tiene su máxima acumulación en S5. El análisis estadístico muestra un coeficiente de H₂O₂ / melanina de 0.9669. Sin embargo H₂O₂ aparece en una etapa anterior, lo que sugiere que el H₂O₂ puede ser secretada por la planta como parte del mecanismo de defensa y probablemente actúa como inductor de la síntesis de melanina fúngica. Es importante señalar que en hojas totalmente necrosadas la presencia de melanina no se observó, pero encontramos estructuras fúngicas reproductivos (pseudotecios), que indican que el ciclo de vida de hongos se ha completado.

Todas las plantas necesitan luz para crecer y algunos microbios requieren luz para la patogénesis (Idnum, 2009). Las hojas de banano están expuestas diariamente a ciclos de 14 horas de luz solar intensa. Después de penetrar a través de los estomas, *M. fijiensis* vive en la planta como micelio endofítico asintomáticos durante un par de semanas antes de la manifestación inicial de síntomas. Factores como la respuesta de defensa de la planta o la acumulación de biomasa fúngica asociada con necesidad de nutrientes pueden estimular la síntesis de melanina. Cuando esto ocurre, el hongo es más resistente a las ROS generados por la planta o el hongo. Además, la melanina acumulada probablemente actúa como protector solar que reduce la fotosíntesis, debilitando aún más a la planta infectada. La producción de oxígeno molecular en singulete mediada por melanina conduce a la peroxidación lipídica y la descomposición de las membranas plasmáticas de las células de la planta infectada. A este respecto, la melanina probablemente actúa como un fitotoxina fotoactivada. Esto proporciona al hongo acceso a las células del huésped y a los nutrientes, ya que la colonización de la hoja se limita inicialmente a los espacios intercelulares de la misma.

3. LITERATURA CITADA

- Acosta-Martínez V., Tabatabai. M.A. (2000). Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of soils*. 31(1): 85-91.
- Aguilar-Barragan, Alejandra, García-Torres, Ana Elisa, Odriozola-Casas, Olga, Macedo-Raygoza, Gloria, Ogura, Tetsuya, Manzo-Sánchez, Gilberto, James, Andrew C., Islas-Flores, Ignacio, & Beltrán-García, Miguel J. (2014). Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 359-364.
- Ai-Xia H., Xiao-Ping S., Bao-Hua C. and Yun R. (2011). Distribution of hydrogen peroxide during adventitious roots initiation and development in mung bean hypocotyls cuttings. *Plant Growth Regul* 64:109–118
- Araujo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W. Jr, Van Elsas, J.D., Van Vuurde, J.W.L. y Azevedo, J.L., (2002). Diversity in endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4906-4914.
- Arguelles-Arias, A. y Ongena, M. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA I as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Bio. Med. Central* 8: 63.
- Ayyadurai N., P.R. Naik., M. S. Rao., R.S. Kumar., S.K. Samrat., M. Manohar y N. Sakthivel. (2006). Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 926-937.

- Baca, B.E., Soto-Urzúa, L. y Pardo-Ruiz, Ma. P.A. (2000). Fijación biológica del nitrógeno. *Elementos* 30:43-49.
- Bacon, C.W., Glenn, A.E. y Hinton, D.M. (2002). Isolation, in planta detection and culture of endophytic bacteria and fungi. In: Hurst, C.J, Crawford, R.L., McInerney, M.J., Knudsen, G.R. y Stetzenbach, L.D. (eds.) *Manuak of environmental microbiology*, 2nd edn, ASM, Washington, D.C. pp: 543-553.
- Bacon, C.W. y Hinton, D.M. (2006). Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants and its utility. In: Gnanamanickam, SS (ed) *Plant associated bacteria*. Springer, New Delhi, pp: 155-194.
- Bahamare SP, Samadhan C.K. (2014) Detection of Black Sigatoka on Banana Tree using Image Processing Techniques. *Journal of Electronics and Communication Engineering*. IOSR-JECE. 60-65
- Baiyeri, K.P., A. Tenkouano, B.N. Mbah and J.S.C. Mbagwu¹ (2004) Phenological and yield evaluation of Musa Genotypes under alley and sole cropping systems in Southeastern Nigeria. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 2004(4): 137 – 144.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.*, 16: 729-770.
- Beltrán-García, MJ, Manzo-Sánchez G., Orozco- Santos M., Ogura T. (2009a). Sigatoka negra: el cáncer de la producción de banano. *Revista Ciencia y Desarrollo*, Junio Vol. 35, no. 232, p. 58-63.

Beltrán-García MJ, Manzo-Sanchez G, Guzmán-Gonzalez S, Arias-Castro C, Gomez-Mendiola M & Ogura T. (2009b). Oxidative stress response of *Mycosphaerella fijiensis*, the black sigatoka pathogen of banana to hydrogen peroxide and paraquat stress conditions. *Can. J. Microbiol.* 55:887-94.

Beltrán-García MJ, Prado FM, Oliveira MS, Ortiz-Mendoza D., Scalfio AC, et al. (2014). Singlet Molecular Oxygen Generation by Light-Activated DHN-Melanin of the Fungal Pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in Black Sigatoka Disease of Bananas. *PLoS ONE* 2014, 9(3): e91616: doi: 10.1371 /journal.pone0091616.

Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* ;272:20313e6.

Bolwell GP (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr Opin Plant Biol* 2:287–294

Bressan, W. y M.T. Borges. (2004). Delivery methods for introducing endophytic bacteria into *maize*. *Biocontrol* 49: 315-322.

Bunemann E.K. (2008). Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. *Soil Biology and Biochemistry.* 40: 2116-2129.

Butler MJ, Day AW (1998) Fungal Melanin: a review. *Can J Microbiol* 44:1115–1136.

Butler MJ, Gardiner RB, Day AW (2005) Fungal melanin detection by the use of copper sulfide-silver. *Mycologia.* 97:312-319

- Cao L., Z. Qui., X. Dain., H. Tan., Y. Lin y S. Zhou. (2004). Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 501-504.
- Carlier J, Lebrun MH, Zapater MF, Dubois C. and Mourichon X. (1996). Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol. Ecol.* 5: 499-510.
- Castillo-Quiroz, D.M. (2012). Análisis de mutaciones de los genes CYP51 y -tubulina para determinar la resistencia a Bensimidazoles y Azoles en el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G. y Fuhrmann, J.J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science society of American journal*, 63: 1670-1680.
- Chen-Fang W. et al. (2010) Cytochemical localization of reactive oxygen species (O_2^- and H_2O_2) and peroxidase in the incompatible and compatible interaction of wheat *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74 : 221e229
- Choudhary, D.K. and Johri, B.H. (2009). Interactions of *Bacillus spp.* And plants-with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research* 164:493-513.
- Churchill, A.C.L. (2010). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2010.00672.X.

- Cisneros-Reyes, C.I. (2012). Factores bioquímicos de promoción del crecimiento en plantas: análisis de 23 bacterias endófitas aisladas del banano. Tesis profesional. Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Crous PW, Groenewald JZ, Aptroot A, Braun U, Mourichon X, and Carlier J. (2002). Integrating morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on Musa. Pp 34-57 in: proc 2nd Int. Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas. INIBAP, Montpellier, France.
- Crowley D. E., C. P. P. Reid, P. J. Szaniszlo. (1987). Microbial siderophores as iron sources for plants. *In: Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*. G Winkelmann, D Van der Helm, J B Neilands, V C H Weinheim (eds). Germany. pp:375–386.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. y Ait Barka E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microb* 71(9):4951–4959.
- Compant, S., Clément, C. y Sessitsch, A. (2009). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1-10.
- Contreras, M. de E.M. (1983). *Revista de Geografía Agrícola* v.4, p.61-102.
- Crichton, R.R., Charloteaux-Wauters, M. (1987). Iron transport and storage. *Eur J Biochem* 164(3): 485-506.

- Cruz-Cruz C.A., K. García-Sosa., F. Escalante-Erosa., L.M. Peña-Rodríguez. (2009). Production of hydrophilic phytotoxins by *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of General Plant Pathology* 75:191–195.
- Cruz-Cruz C., K. García-Sosa., F. Escalante-Erosa, L.M. Peña-Rodríguez. (2011). Physiological effects of the hydrophilic phytotoxins produced by *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black sigatoka in banana plants. *Journal of General Plant Pathology* 77: 93–100.
- Cruz-González, B. Y. (2011). Inhibición de cepas resistentes a los fungicidas de *Mycosphaerella fijiensis* por sobrenadantes de bacterias endófitas del banano cultivadas en quitina de camarón. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Donzelli BGG, Churchill ACL (2007) A quantitative assay using mycelia fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathol* 97: 916–929.
- Dowling, D.N., O'Gara, F. (1996). Rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* sp. B24 genetically modified to use additional ferric siderophores. *FEMS Microbiol Ecol* 19:215–225.
- Danschler, G. (1981). Histochemical demonstration of heavy metals: A revised version of the sulfide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* 71:1–116.
- Drechsel, H. and Jung, G. (1998). Peptide siderophores. *J. Pept. Sci*, 4, 147-181.
- Dybas, M.J., Tatara, G.M., and Criddle, C.S. (1995). Localization and characterization of the carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. strain KC. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 758–762.

- El-Hadrami A., D. Kone., Lepoivre. (2005). Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to Black Leaf Streak Disease. *European Journal of Plant Pathology* 113: 241-254.
- Elmerich, C. Newton W.E. (2007). *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Springer, The Netherlands.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. (1995). *Fungi on plants and plants products in the United States*. APS Press, st. Paul, MN.
- Frison, E. y Sharrock, S. (1999). The economic, nutritional and social importance of bananas in the world. In: Picq ,C., Fouré, E., Frison, E.A., (eds) *Banana and food security. Proceedings of international Syposium on bananas and food security, Douala, Cameron*, pp 221.
- Fuentes-Ramírez, L. E., Caballero-Mellado, J., Sepúlveda, J. y Martínez-Romero, E. (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 117-128.
- Fouré, E. (1985). Black leaf streak disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the diseases in Gabon. IRFA, Paris, France.
- Fouré E., Mouliom A., Pefoura, y Mourichon X. (1990). Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant a divers groupes génétiques. *Fruits* 45: 339-345.

- Fuka M.M., Engel M., Gattinger A., Bausenwein U., Sommer M., Munch J.C., Schloter M. (2008). Factors influencing variability of proteolytic genes and activities in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 1646-1653.
- Fuka M.M., Engel M., Hagn A., Munch J.C., Sommer M., Schloter M. (2009). Changes of diversity pattern of proteolytic bacteria over time and space in an agricultural soil. *Microbial Ecology*. 57:391-401.
- García-Torres E. (2009). Primer reporte de resistencia a fungicidas sistémicos en aislados del hongo *Mycosphaerella fijiensis* de la región productora de plátanos y bananos pacífico-centro de México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Gauhl, F. (1989). Untersuchunge zurepidemiologie un okoloigie de Schuwargen sigatoka krankheit (*mycosphaerella fijiensis* Morelet) an kockbonanen (musa sp.) in Costa Rica. Thesis Univ. Gottingen (west germany), 128 p.
- Gauhl, F. (1994). Epidemiology and ecology of black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana in Costa Rica, Central América. INIBAP Montpellier, France. 120 pp.
- Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant-growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Gohel V., A. Singh., M. Vimal, P. Ashwini y H. S. Chhatpar. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African J. Biotech.* 5: 54-72.

- González, M.S., Diego Diamont, Bárbara Gutiérrez. (2011) Técnicas de Tinción de estructuras fúngicas con Colorantes Vegetales como una alternativa no contaminante. *Bioagro* 23(1) 65-68.
- Goodwin SB, Dunkle LD, Zismann VL. (2001). Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648-658.
- Goodwin SB, Waalwijk C, and Kema GHJ. (2004). genetics of *Mycosphaerella graminicola*: a model of Dothideales. In *Applied Mycology and Biotechnology. An International Series, Vol. 4 Fungal*.
- Gordon, T.R. y Okamoto, D. (1992). Population structure and relationship between pathogenic and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 82: 73-77.
- Graham J., Miller R. (2005). Mycorrhizas: gene to function. *Plant and Soil*. 274: 79-100.
- Greenshields, D. L., Liu, G., Feng, J., Selvaraj, G., and Wei, Y. (2007). The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full Fusarium graminearum virulence. Mol. Plant Pathol. 8,411–421.*
- Halda-Alija, L. (2003). Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus*. *L. Can. Microbiol.* 49: 781-787.

- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. y Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Hardoim, P.R., Nissinen, R. y van Elsas, J.D. (2012). Ecology of bacterial endophytes in sustainable agriculture. In: Maheshwari, D.K. (ed.). *Bacteria in agrobiología: Plant Probiotics* 97-126.
- Harrington, J.M., Crumbliss, A.L. (2009). The Redox Hypothesis in the Siderophore-mediated Iron Uptake. *Biometals* 22: 679-138.
- Hayatsu M., Tago K., Saito M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*. 54: 33-45.
- Hayden H.L., Carlier J., Aitken E.A.B. (2003). The genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands. *Plant Pathology* 52: 703-712.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(5):1225-8.
- Hu B., Shen L., Xu X., Zheng P. (2011). Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems. *Biochemical Society transactions*. 39(6): 1811-6. doi:10.1042/BST20110711.
- Huang, J. S. (1986). Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annu. Rev. Phytopatol.* 24: 141-1457.

- Idnurm A, Crosson S (2009) The Photobiology of Microbial Pathogenesis. PLoS Pathog 5(11): e1000470. doi:10.1371/journal.ppat.1000470.
- Jacome L., P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero y J.V. Escalante. (2002). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. INIBAP. 1-317.
- Jha, Y., Subramanian, R.B. y Patel, S. (2011). Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oriza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. Acta Physiologiae Plantarum, 33 (3): 797-802.
- Ji, X., Lu, G., Gai, Y., Gao, H., Lu, B., Kong, L. y Mu, Z., (2010). Colonization of *Morus alba* L. by the plant grown-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain LU 10-1. BMC Microbiology 10: 242-255.
- Jin C W, G X Li, X H Yu, S J Zheng. (2010) Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. Ann. Bot. 105: 835–841.
- Jímenez-Delgadillo, R., Virgen-Calleros, G., Tabares-Franco, S. y Olalde-Portugal, V. (2001). Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agrobiotecnología. Avance y perspectiva vol. 20:395-400.
- Johanson, A. and Jeger, M.J. (1993) Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. muscicola*, the causal agents of sigatoka leaf spots in banana and plantain. Mycological Research 97:670-674
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S, y Rasheed, M., (2009). Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanismis and their role in crop production. J. Agric.Biol.SCI 1(1): 48-58.

- Kloeppler, J.W., Rodríguez-Kabana, R., Zhnder, G.W., Murphy J.F., Sikora, E., Fernandez, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soil-borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australas Plant Pathol.* 28:21-26.
- Klotz M.G., Stain L.Y. (2008). Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiological Letters.* 278: 146-156.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, WL., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A. y Azevedo, J.L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol.* 6(12):1244-51.
- Kunwar A, Adhikary B, Jayakumar S, Barik A, Chattopadhyay S, et al. (2012) melanin, a promising radioprotector: mechanism of actions in a mice model. *Toxicol Appl Pharmacol* 264: 202–211.
- Ladha, J.K., de Bruijn, F.J. y Malik, K.A. (1997). Introduction assessing opportunities for nitrogen fixation in rice a frontier Project. *Plant soil*, 194: 1-10.
- Lamb, C., Dixon R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:251–275
- Lamb, T.G., Tonkyn, D.W. y Kluepfel, D.A., (1996). Movement of *Pseudomonas aerofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can. J. Microbiol* 42: 1112-1120.
- Larkin, R.P., Hopkins, D.L., Martin, F.N. (1996). Supression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other

microorganisms recovered from disease-suppressive soil. *Phytopathology* 86: 812-819.

Lata, H., Li, X.C., Silva, B., Moraes, R.M. y Halda-Alija, L. (2006). Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropopagated Echinacea plants using 16s rRNA sequencing. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 353-359.

Liu, J.J., Fisher D.E. (2010) Lighting a path to pigmentation: mechanism of MITF induction by UV. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 741–774.

Loaces, I., Ferrando, L. y Fernández-Scavino, A. (2011). Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb Ecol* 61: 606-618.

Lodewyckx C., J. Vangronsveld., F. Porteous., E.R.B. Moore., S. Taghavi., M. Mezgeay y D. Von der Lelie. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev.Plant Sci.* 21:583-606.

Loper J.E., y Schroth M.N. (1986). Importance of siderophores in microbial interactions in the rizosphere. In iron siderophores and plant diseases. Swinburne, TR Plenum Publishing Company.

Macedo Raygoza G.M. (2010). Análisis fisiológico y molecular de la sensibilidad a fungicidas en cepas del hongo *Mycosphaerella fijiensis* obtenidas de las regiones productoras de plátano en Jalisco, Tabasco y Colima: Desarrollo de un mapa geográfico de resistencia. Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Autónoma de Guadalajara.

Magnin-Robert M., P. Trotel-Aziz., D. Quantinet., S. Biagianti and A. Aziz. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated

bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3-glucanase activities under field conditions. *European Journal Plant Pathology* 118: 43-75.

Mahaffee, W.F. y Kloepper, J.W. (1997). Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. *Can. J. Microbiol.* 43:344-353.

Marín, DH., Romero, RA., Guzman, M., Sutton, D. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis* 87: 208-222.

Martínez-Bolaños L, Teliz-Ortiz D, Rodriguez-Maciel C, Mora-Aguilera JA, Nieto-Angel D, Cortes-Flores I, Mejia-Sanchez D, Nava-Diaz C, Silva-Aguayo G (2012). Fungicide resistance on *Mycosphaerella fijiensis* populations of southeastern Mexico. *Agrociencia* 46:707-717.

Martínez, L., Caballero-Mellado, J., Orozco, J. y Martínez-Romero, E., (2003). Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant and Soil* 257: 35-47.

Martínez-Molina C. (2009). Selección de bacterias epífitas nativas de la planta de banano como alternativa biotecnológica para el biocontrol de hongos fitopatógenos. Fase 1 del desarrollo de un biofunguicida para la industria bananera. Tesis profesional. Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.

McGrath K.C., Mondav R., Sintrajaya R., Slattery B., Schmidt S., Schenk P.M.. (2010). Development of an environmental functional gene microarray for soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(21): 7161-7170.

- McInroy J.A. y J.W. Kloepper. (1994). Novel bacterial taxa inhabiting internal tissue of sweet corn and cotton. In: Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. Ryder M.H., P.M. Stephens y G.D. Bowen. Eds., CSIRO, Melbourne, Australia, pp. 19-27.
- Mednick AJ, Nosanchuk JD, Casadevall A (2005) Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect Immun* 73: 2012–2019.
- Mendoza-Ceja N. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* del filoplano de la hoja de banano: Agente potencial para el control biológico de hongos fitopatógenos. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Meredith D.S., J.S. Lawrence. (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society* 52: 459-476.
- Mia, M.A.B. y Shamsuddin, Z.H. (2010). Nitrogen fixation and transportation by rhizobacteria: a scenario of rice and banana. *International journal of botany* 6(3): 235-242.
- Modenese Gloria de Silva, S.H., da Silva Moraes W., do Nascimento Bendini H., Padovani CR., Dominguez Lima J., Rozane DE., Modenese JF.(2014) Digital Image Processing for Identification of Black Sigatoka. UNES/Botucatu-Brazil.
- Mori T., Kuroiwa H., Higashiyama, T., and Kuroiwa T. (2006). Generative Cell Specific 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nature Cell Biology* 8(1): 64-71.

- Nannipieri P., Eldor P. (2009). The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biology and Biochemistry*. 41(12): 2357-2369. doi:10.1016/j.soilbio.2009.07.013.
- Nautiyal, C. S., (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology letters*, 170: 265-270.
- Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F. y Lapayrie, F., (1992). Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire). P.D. Orton. *Plant and soil* 143: 193-199.
- Nogueira-López, G. (2012). Bacterias endófitas del banano para el control in vitro de cepas resistentes a los fungicidas del hongo causante de la sigatoka negra: Análisis bioquímico y molecular de 55 aislados. Tesis Profesional. Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Nosanchuk JD, Casadevall A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 5: 203–223.
- Nourbakhsh, F., Sheik-Hosseini A.R. (2006). Plant residue quality influences the response of nitrogen mineralization to salinity. *Archives of Agronomy and Soil Science* , vol. 52, no. 5, pp. 571-577.
- Odriozola-Casas O.E. (2009). Análisis de la expresión de genes que codifican para factores antioxidantes en *Mycosphaerella fijiensis*. Tesis Profesional. Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.

- Ongena M, Jaques P., (2007). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16:115-125.
- O'Sullivan D. J. y F. O'Gara. (1992). Traits of Fluorescent Pseudomonas spp. involved in Suppression of Plant Root Pathogens. Microbiol. Rev. 56: 662-676.
- Orozco-Santos, M, J. Farías-Larios, G. Manzo-Sánchez y S. Guzmán-González. (2001). La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en México. INFOMUSA 10 (1): 33-37.
- Ortiz-Mendoza D. (2010). Bacterias nativas obtenidas de la planta de banano subgrupo Cavendish "Enano gigante" (*Musa acuminata* AAA) con potencial antifúngico para el control de la Sigatoka negra: aislamiento, selección y caracterización. Tesis de Maestría. Instituto de Ingeniería. Universidad Autónoma de Baja California.
- O'Sullivan, D.J., and F. O'Gara. (1992) Traits of *fluorescent Pseudomonas spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol. Rev. 56* (1992) 662-676.
- Otero, A. J., Sarracent, J., Hernández, H., Sánchez, M., Muirragui, D., Villamar, M., Moreta, D., Jiménez, M. I., Pérez, L. and Maribona, R. H. (2007), Monoclonal Antibody-based TAS-ELISA for Quantitative Detection of *Mycosphaerella fijiensis* Antigens. Journal of Phytopathology, 155: 713–719. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01305.x
- Paungfoo-Lonhienne C., Rentsch, D., Robatzek, S., Webb, R.I., Sagulenko, E., Näsholm, T., Schmidt, S. y Lonhienne, T.G.A. (2010). Turning the table: plants consume microbes as a source of nutrients. PLOS One 7: 11915.

- Pérez-Hernández, A.M. (2009). Diseño de un medio de cultivo a base de fragmentos de micelio del hongo *Mycosphaerella fijiensis* para el desarrollo de bacterias quitinolíticas. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Pillay, V.K. y Nowak, J. (1997). Inoculum density, temperature and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol* 43: 309-314.
- Ploetz, R. (2000). Black sigatoka. *Pesticide Outlook* 11:19-23.
- Porter, J.K., Bacon, C.W. y Robbins, J.D. (1979). Lysergic acid amide derivatives from *Balansia epichloe* and *Balansia claviceps* (Clavicipitaceae). *J. Nat Prod* 42: 309-314.
- Postma, J. y Rattink, H. (1991). Biological control of Fusarium wilt of carnation with nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Bot.* 70: 1199-1205.
- Queiroz C.B., E.C. Miranda, R.E. Hanada, N.R. Sousa, L. Gasparotto, M.A. Soares and G.F. Silva (2013) Distribution of mating-type alleles and M13 PCR markers in the black leaf spot fungus *Mycosphaerella fijiensis* of bananas in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 12 (1): 443-452 (2013)
- Ramachandran, K, Srinivasan, V., Hmaza, S. y Anandaraj, M. (2007). In: Velázquez, E. y Rodríguez-Barrueco, C. (eds.), First international meeting on microbial phosphate solubilization. 325-331.

- Ratledge, C. and Dover, L. G. (2000). *Iron metabolism in pathogenic bacteria*. Annual Review of Microbiology, 54, 881–941.
- Rees D.C., Tezcan A., Haynes C.A., Walton M.Y., Andrade S., Einsle O., Howard J.B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*.363 (1829): 971-984.
- Richardson A. E., Simpson R.J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*. 156(3): 989-996. doi:10.1104/pp.111.175448.
- Rivas, G.G., Zapater, M.-F., Abadie, C. and Carlier, J. (2004). Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol. Ecol*. 13:471-482.
- Ryan R.P., K. Germaine., A. Franks., D.J. Ryan y D. N. Dowling. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1-9.
- Sachdev, D.P., Chaudhari, H.G., Kasture, V.M., Dhavale, D. D. y Chopade, B. A. (2009). Isolation and characterization of ondole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 993-1000.
- SAGARPA SIAP, (2014). Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera. www.siap.sagarpa.gob.mx (consulta Mayo 2014).
- Schwyn, B. y Neilands, J.B. (1997). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Bio-chem*. 160, 46–56.

- Saikkonen, K., Wali, P., Helander, M., y Faeth, S.H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends plant Sci* 9: 275-280.
- Secretaría de desarrollo rural del gobierno del estado de Colima (SEDER). (2005). Paquete tecnológico para el cultivo del plátano. Paquetes tecnológicos para cultivos agrícolas, en el estado de Colima.
- Shi, Y., Zhao, W., Zhang, W., Ye, Z., Zhao, J., (2006). Regulation of intracellular free calcium concentration during heterocyst differentiation by HetR and NtcA in *Anabaena* sp Pcc7120. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11334.
- Stoltzfus, J.R., So, R., Malarvithi, P.P., Ladha, J.K., (1997). Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* 194, 25–36.
- Sutra L., Resède J.M. and Gardan, L. (2000). Isolation of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 289-293.
- Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56 (4), 845–857.
- Stevenson F.J., Cole M.A. (1999). Phosphorous. En: *Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorous, Sulfur, Microbutrients*. John Wiley & Sons, Inc. New York. p 279-329.
- Stierle AA., R. Upadhyay., J. Hershenhorn., G.A. Strobel., G. Molina. (1991). The phytotoxins of *M. fijiensis*, the causative agent of black sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* 47:853–859.

- Sturtz A. V., B. R. Christies y B. G. Matheson., (1998). Associations of bacterial endophytic populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal Microbiology* 44: 162-167.
- Taechowisan T., C. Lu., Y. Shen y S. Lumyong. (2005). Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology* 151: 1691-1695.
- Taghavi, S., van der Lelie, D., Hoffman, A., Zhang, Y., Walla, M.D., Vangronsveld, J., Newman, L. y Monchy, S. (2010). Genome Sequence of the Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Enterobacter* sp. *PLoS Genet.* DOI: 10.1371/Journal.pgen.1000943.
- Tang, W.H. (1994). Yield-increasing bacteria, (YIB) and biocontrol of sheath blast of rice. In: Ryder, M.H., Stephens, P.M. y Bowen, G.D. (eds.) *Improving plant productivity with rhizobacteria* (pp. 276-278). Commonwealth scientific and industrial research organization, Adelaide, Australia.
- Tang H., Yu M., Wang Y., Han X., Wang X., Jin W., Chi F., Wei D. (2012). Effects of long-term fertilization on *nifH* gene diversity in agricultural black soil. *African Journal of Microbiology Research*. 6(11): 2659-2666. doi:10.5897/AJMR11.1074.
- Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., De R., Saxena A.K., Shekhar Nautiyal C., Shilpi Mittal, Tripathi A.K., Johri B.N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*. 89(1): 136-150.
- Tinajero-Cortés, E. (2012). Evaluación de la reintroducción y colonización de bacterias endófitas en plántulas micropropagadas de banano enano gigante, subgrupo Cavendish. Tesis profesional. Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.

- Tonthat T C , K F Van Ommen, G G Geesey and J M Henson. (1995). Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5) 1968-1975
- Torrado-Jaime M., Castaño-Zapata J. (2008) Incidence and severity of black (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) and yellow (*Mycosphaerella musicola* Leach *et* Mulder) sigatokas of plantain according to the phenological stages. *Agronomía Colombiana* 26(3), 435-442, 2008
- Tortora, M., Díaz-Ricci, J.C., Pedraza, R. (2011). Azospirillum brasilense siderophores with antifungal activity against Colletotrichum Acutatum. *Arch. Microbiol.* 193:275-286.
- Tuesta-Popolizio D. (2006). Selección de bacterias epífitas de hojas en plátano variedad cavendish con actividad de quitinasa como alternativa para el biocontrol de hongos que afectan el cultivo de plátano. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Turner B.L., Mahieu N., Condrón L.M. (2003). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. *Soil Science Society of America Journal.* 67: 497-510.
- Van Loon, L.C., and Glick V.R. (2004). Increased plant fitness by rhizobacteria. In: *Molecular Ecotoxicology of Plants*. Sandermann H. (ed.). Springer-Verlag. Berlin Heidelberg pp 177-205.

- Villalta, R; Guzmán, M. (2006). Evaluación de prácticas para la reducción de inóculo interno de *Mycosphaerella fijiensis*. Pag. 6568. *In* Informe Anual 2005, Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Viterbo A., O. Ramot, L. Chernin, L. Chet. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Anton. Leeuwen.* 81: 549-556.
- Von der Weid. (2003). Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J Appl Microbiol.* 2003;95(5):1143-51.
- Wandersman C, Delepelaire P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:611-47.
- Warrior P. (2000). Living systems as natural crop protection agents. *Pest Manag. Sci.* 56:681-687.
- Webster G, Jain, V., Davey, M.R., Gough, C., Vasse, J., Dénarié, J., Cocking, E.C. (1998). The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Plant Cell Environ.* 21: 373–383.
- Weinberg, E. D. (1997). The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Persp. Biol. Medic.* 40:578-583.
- Welbaum, G.E., A.V. Sturz, Z. Dong, and J. Nowak. (2004). Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23, 175–193.

- White, J.F. Jr. y Owens, J.R. (1992). Stromal development and mating system of *Balansia epichloe*, a leaf colonizing endophyte of warm-season grasses. *Appl Environ Microbiol* 58: 513–519.
- White J.F. Jr., Bacon C.W. y Hinton D.M (1997). Modifications of host cells and tissues by the biotrophic endophyte *Epichloe amarillans* (*Clavicipitaceae*; *Ascomycotina*). *Can. J. Bot* 75: 1061–1069.
- Wilhelm E., W. Arthofer., R. Schafleitner y B. Krebs. (1998). *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 105-108.
- Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.* 322:681e92.
- Yates, I.E., Bacon, C.W. y Hinton, D.M. (1997). Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Dis* 81: 723-728.
- Zhang L., Hurek T., Reinhold-Hurek B. (2007). A *nifH*-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-fixing microorganisms. *Microbial Ecology*. 53(3): 456-470.

ANEXO 1

Beltrán-García MJ, Prado FM, Oliveira MS, Ortiz-Mendoza D (2014). Singlet Molecular Oxygen Generation by Light-Activated DHN-Melanin of the Fungal Pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in Black Sigatoka Disease of Bananas. PLoS ONE. 2014, 9(3): e91616: doi:10.1371/journal.pone0091616