

CEPAS BACTERIANAS CON POTENCIAL PARA EL MANEJO DE LA SIGATOKA NEGRA

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Cuba. CP 54 830 (UCLV)

AUTORA PRINCIPAL: Mileidy Cruz-Martín

OTROS AUTORES: Yelenys Alvarado-Capó, Eilyn Mena Méndez, Mayra Acosta Suárez, Berkis Roque Morales, Tatiana Pichardo Moya

COLABORADORES: Ángel Mollineda Trujillo. Centro de Investigaciones Agropecuarias, UCLV. Santa Clara, Cuba
Dr. C. Blondy Cantó Canche: Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Mérida, México.

AUTORA PARA CORRESPONDENCIA:

Dr. C. Mileidy Cruz Martín
Instituto de Biotecnología de las Plantas.
Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. Teléfono 42 200124
E-mail: mileidy@ibp.co.cu

RESUMEN

El control de la Sigatoka negra representa un gran reto y requiere el desarrollo de programas de manejo integrado que incluyan alternativas biológicas que permitan disminuir el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, el empleo de bioproductos en Cuba para el control de esta enfermedad es limitado. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la enfermedad. Se realizaron aislamientos de la filosfera de *Musa* spp. y se comprobó la presencia de bacterias productoras de metabolitos antifúngicos (volátiles y difundidos) con características promisorias para el control biológico de *M. fijiensis*. Estos resultados constituyen un criterio importante a tener en cuenta para la selección de estas bacterias como agentes de control biológico, ya que, la multiplicidad de dichos mecanismos es importante para el reforzamiento de las propiedades antifúngicas y una mejor eficiencia en el biocontrol. Se seleccionó la cepa de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 para dilucidar los mecanismos de acción implicados en la actividad antifúngica. El filtrado de cultivo esta cepa (FC) inhibió el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis*, y provocó cambios en la morfología y estabilidad membrana citoplasmática. Además, tuvo efecto sobre el patógeno y la expresión de la enfermedad en plantas inoculadas artificialmente el cual dependió del momento de aplicación. A partir de los resultados se demostró la presencia de varios mecanismos involucrados en el biocontrol que se interrelacionan entre sí. Como aporte de este trabajo se cuenta con una colección de cepas bacterianas caracterizadas, con potencial para su

empleo en la formulación de bioproductos para el manejo de la Sigatoka negra y protocolos para la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* frente de las cepas a *M. fijiensis*. Desde el punto de vista social ha contribuido en la formación de profesionales y estudiantes en el campo de la Biología y Agronomía. Se defendió una tesis de doctorado, dos de maestría en Biotecnología Vegetal y una de Licenciatura en Biología. Los resultados se han publicado en revistas científicas de gran prestigio y se han presentado en eventos científicos. Estos resultados permitieron disponer por vez primera de candidatos bacterianos para el manejo de la Sigatoka negra en Cuba. Teniendo en cuenta las características de las cepas obtenidas en este trabajo, se vienen utilizando también en diferentes investigaciones para validar su empleo como promotoras del crecimiento en la aclimatización de plantas *in vitro* de *Musa* sp. (Biotecnología Vegetal 15(3): 2015) y plantas *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casa de cultivo (Biotecnología Vegetal 15 (2): 115 - 122, 2015).

Comunicación corta del resultado

Entre los principales problemas fitosanitarios del cultivo de plátanos y bananos en Cuba se encuentra la Sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar y está considerada como la más perjudicial a nivel mundial. El control de esta enfermedad representa un gran reto y para su control se requiere del desarrollo de programas de manejo integrado de la enfermedad que incluyan, entre otros, el uso de controles biológicos en combinación con compuestos que promuevan o mejoren los mecanismos de defensa de las plantas. Aunque se ha demostrado que determinados géneros bacterianos, y en particular los *Bacillus*, pueden ser antagonistas *in vitro* de *M. fijiensis*, son discretos los resultados que se tienen sobre el efecto de estos en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*. En tal sentido, una mejor comprensión de las interacciones que allí se establecen, en particular, microorganismo-microorganismo contribuiría a encontrar mejores métodos de control. Teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó como objetivo: Determinar el potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *M. fijiensis*.

Selección de cepas con actividad antifúngica

Se lograron seleccionar 10 aislados de *Bacillus* spp. con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* y el 55% de estos produjeron metabolitos difundidos y volátiles con efecto antifúngico (**Biotecnología Vegetal 12 (3):179-182, 2012**). Estos resultados evidenciaron que la microbiota de plátanos y bananos constituye una fuente de posibles candidatos para su uso como controles biológicos (**Biotecnología Vegetal 16(1): 53- 61, 2016**).

Se seleccionó la cepa CCIBP-C5 como modelo para realizar los experimentos posteriores y se identificó como *Bacillus pumilus*. Su filtrado de cultivo (FC) afectó las estructuras de reproducción de *M. fijiensis* e inhibió significativamente la germinación de los conidios y el crecimiento *in vitro*. Se constató el estrés oxidativo provocado en el micelio cuando se aplicó el FC que provocó daños a nivel de lípidos y/o proteínas y un cambio en la permeabilidad de las membranas, que permiten explicar en parte las

deformaciones observadas en el micelio y las estructuras de reproducción de *M. fijiensis* (**Tropical Plant Pathology**, 42:121-125, 2017). Teniendo en cuenta los daños provocado por el FC a estas estructuras, se pudiera esperar que, en condiciones naturales, pudiera reducir la concentración del inóculo del patógeno capaz de producir infección. Estos hallazgos evidencian el efecto antifúngico del FC y justifican su estudio como agente de biocontrol

Determinación del efecto de FC sobre la expresión de la enfermedad

El efecto de FC sobre el desarrollo de la enfermedad en casa de cultivo dependió del momento de su aplicación (antes o después de la inoculación de *M. fijiensis*). En las plantas del tratamiento control las hojas se observaron completamente necrosadas a los 70 días posteriores a la inoculación (dpi). En contraste, las plantas en presencia del FC mantenían gran proporción de tejido verde, las lesiones aparecieron de forma aislada y nunca coalescieron. Con una única aplicación del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 (después de inoculado el patógeno), se logró una eficiencia de 33,6 % en el control de la enfermedad a los 70 dpi. Además, se destaca que este resultado se alcanzó con solo una aplicación y que no contenía preservantes, conservantes ni estabilizantes que lo protegieran de la acción de la luz del Sol, el agua de riego, entre otros factores ambientales a los que estuvo expuesto, lo cual resalta aún más su potencial.

Efecto del filtrado de cultivo bacteriano sobre la respuesta de plantas de *Musa*

Además de la acción antifúngica directa del FC sobre *M. fijiensis*, el filtrado bacteriano induce los mecanismos de defensa de la planta: las plantas de 'Grande naine' en condiciones de casa de cultivo aumentaron la actividad de enzimas relacionadas con la respuesta de defensa vegetal así como también mostraron cambios en los niveles de ROS y de compuestos fenólicos cuando se les aplicó el filtrado bacteriano. Estas respuestas fueron detectadas también a nivel histológico, y fueron independiente de la presencia de *M. fijiensis* (**Biotecnología Vegetal**, 15(2):97-103, 2015). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que existió, además de la acción antifúngica directa del FC sobre *M. fijiensis*, una inducción de mecanismos de respuesta de defensa en la planta por el filtrado bacteriano. No siendo necesario para ello la presencia del patógeno. Estos resultados refuerzan el potencial biotecnológico del filtrado del cultivo de la cepa *B. pumilus* CCIBP-C5.

Caracterización del filtrado de cultivo

Se logró caracterizar el FC, sugiriendo la presencia de compuestos proteicos con efecto antifúngico sobre el micelio de *M. fijiensis* (**Biotecnología Vegetal** 14(1):55-59, 2014). La fracción dializada obtenida mostró similar efecto antifúngico que el FC. La corrida electroforética evidenció la presencia de proteínas en la fracción semipurificada, sugiriendo la excreción de proteínas o sustancias peptídicas al medio de cultivo por parte de la cepa CCIBP-C5. Posteriormente, se comprobó la actividad quitinolítica del FC y no se observó actividad β -1,3 glucanasa.

Como parte del proceso de caracterización del FC se obtuvieron dos fracciones mediante la extracción con acetato de etilo (fracciones acuosa y orgánica del FC). Ambas fracciones inhibieron el crecimiento del micelio y con ambas se observaron deformaciones similares en el micelio. Los resultados cromatográficos indicaron la presencia de compuestos de naturaleza lipopeptídica. La presencia de lipopéptidos en el FC fue corroborada por espectroscopía infrarroja a partir de metabolitos purificados.

Consideraciones generales

La aplicación del FC de la cepa CCIBP-C5, en plantas de banano con presencia de *M. fijiensis*, logró retardar la evolución de los síntomas, así como redujo la biomasa fúngica

inicial, lo que permitió mantener mayor cantidad de tejido fotosintéticamente activo durante el periodo evaluado (70 días) en condiciones de casa de cultivo. El desarrollo de un bioproducto a partir de la cepa CCIBP-C5 podría contribuir al control de la enfermedad en programas de manejo integrado.

Atendiendo a los resultados podría

considerarse su uso sólo o combinado con otros productos, siempre que se demuestre

su eficacia en condiciones de campo, así como su compatibilidad en las formulaciones que se elaboren, para permitir a las plantas llegar a la floración con un mayor número de hojas activas, lograr un mejor llenado del fruto y por tanto disminuir los efectos dañinos de la enfermedad.

Novedad Científica de este trabajo radica en que demostró el potencial de bacterias cubanas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de control de *M. fijiensis*. Se logró determinar el efecto del filtrado de cultivo de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP- C5 sobre el patógeno, las plantas de *Musa* cv. 'Grande naine' en casa de cultivo y la expresión de la enfermedad, así como también se evidenciaron algunos de los mecanismos de acción sobre el patógeno. Con la caracterización del filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-C5 se identificó la presencia de compuestos proteicos con actividad antifúngica, así como, de enzimas líticas. La espectroscopía infrarroja reveló la presencia de lipopéptidos en el filtrado de cultivo.

Beneficio práctico y social: En general, el control de la Sigatoka negra representa un gran reto y para su control se requiere del desarrollo de programas de manejo integrado de la enfermedad que incluyan, entre otros, el uso de nuevos fungicidas y controles biológicos en combinación con compuestos que promuevan o mejoren los mecanismos de defensa de las plantas. En Cuba es muy limitado el empleo de bioproductos para el control de esta enfermedad, es por ello que el desarrollo de estrategias sostenibles constituye una necesidad. A partir de la selección de cepas con actividad antifúngica, de determinar su efecto sobre el patógeno, la enfermedad y la respuesta en plantas así como las características de estos metabolitos, se podrá elaborar un bioproducto cubano eficaz para insertarlo en el programa de manejo de esta enfermedad.

A partir de los resultados de este trabajo se dispone de una cepa bacteriana aislada de la filosfera de *Musa* spp. productora de metabolitos de tipo

lipopéptidos y quitinasas, con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* e inductora de resistencia en plantas de *Musa* cv. 'Grande naine', cuya siguiente evaluación es en campo y la elaboración a escala comercial de un bioproducto para el control de la Sigatoka negra. Se cuenta con una colección de bacterias de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* que pueden también ser evaluadas. Además se desarrollaron protocolos para la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de bacterias y sus metabolitos frente a *M. fijiensis*, así como, su efecto sobre plantas en casa de cultivo. El trabajo también puede contribuir al desarrollo de una metodología para la selección de aislados bacterianos promisorios para el control biológico de patógenos fúngicos.

Publicaciones realizadas y que guardan relación con el trabajo presentado:

1. Antifungal activity of *Musa* phyllosphere *Bacillus pumilus* strain against *Mycosphaerella fijiensis*. Mileidy Cruz-Martín, *et al.* Trop. plant pathol. (2017) 42:121 – 125
2. Effect of *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 on *Musa-Mycosphaerella fijiensis* interaction. Mileidy Cruz-Martín, *et al.* 3 Biotech 2017 (aceptada)
3. Diversidad de cepas bacterianas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet Mileidy Cruz-Martín, *et al.*. Biotecnología Vegetal 16(1): 53 - 61, 2016
4. Respuesta histoquímica de plantas de banano cv. 'Grande naine' inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* y filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. Eilyn Mena, Mileidy Cruz-Martín, *et al.*,. Biotecnología Vegetal 15(2):97- 103, 2015.
5. Efecto de la temperatura, pH y detergentes sobre la actividad antifúngica de Mileidy Cruz-Martín, *et al.* Biotecnología Vegetal 14 (1):55-59, 2014
6. Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. Mileidy Cruz-Martín, *et al.* Biotecnología Vegetal 13 (4)219-224, 2013
7. Actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis* mediada por metabolitos difundidos y volátiles. Mileidy Cruz-Martín, *et al.* Biotecnología Vegetal 12 (3): 179-182, 2012

Eventos en los que se recogen los resultados del presente trabajo

- 1- IX Congreso de Biotecnología Vegetal BioVeg (2013)
- 2- II Simposio Internacional de Raíces, Rizomas, tubérculos, plátanos, bananos y papaya (2013)
- 3- VIII Encuentro Latinoamericano del Caribe de Biotecnología. REDBIO (2013)
- 4- X Congreso de Biotecnología Vegetal BioVeg (2015)
- 5- II Simposio Internacional de Salud Agropecuaria SISA 2015

6- XII Simposio Internacional Biotecnología Vegetal 2016

Tesis defendidas

- Potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. (Tesis de Doctorado, 2015) IBP, Cuba. Autora: Mileidy Cruz Martín
- Mecanismos de acción del filtrado de cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 en la interacción *Musa-Mycosphaerella fijiensis*. (Tesis de Maestría en Biotecnología Vegetal, 2016). IBP. Autora: Eilyn Mena Méndez
- Actividad antifúngica de metabolitos bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Tesis de diploma, 2012). Autora: Eilyn Mena Méndez
- Efecto de filtrados bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* en la interacción *Musa-M. fijiensis* en casa de cultivo (Tesis de Maestría en Biotecnología Vegetal 2010). IBP. Autora: Ivian Poveda

Premios

Premio Relevante por el Aporte Medioambiental en el Forum Provincial de Ciencia y

Técnica (2016)

Premio Destacado Forum Municipal 2017