

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**Antagonismo *in vitro* de bacterias y hongos endófitos y de la rizosfera de banano  
contra *Fusarium oxysporum***

**Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga**

**DANIELA ALEJANDRA GUARDERAS LOGROÑO**

**Quito, 2022**



**DEDICATORIA**

Para mi papá Fabián Guarderas Jijón, quien falleció cuando cursaba mi tercer semestre, pero siempre me brindo su apoyo y me inculcó la importancia de la educación y de seguir adelante en la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a mi mamá Jannett, por brindarme su apoyo incondicional y siempre motivarme para seguir adelante. A mi hermana Cristina y mi sobrino Juan David por siempre estar a mi lado y darme fuerzas en los momentos que más necesitaba.

A Emilia Obando, que más que mi prima es mi hermana, le agradezco por haber estado ahí para apoyarme en los buenos y malos momentos y por siempre creer en mí. Agradezco a mi tía y a mis primos, Milita, Felipe y Gabriel, por siempre estar en cada triunfo y derrota a mi lado, también por siempre brindarme su apoyo y consejos.

A mi tía Grace, mi tío José Gonzales y mi primo Nicolás, gracias por siempre estar a mi lado, hacerme reír y apoyarme incondicionalmente. Agradezco a mi tío José Logroño y mis primos Martín y Ricardo, por siempre acompañarme y apoyarme en cada momento.

A mis abuelitos Abdón Logroño y Alcirita Cedeño, les agradezco por su apoyo incondicional durante toda mi vida. A mi Amalita Ramírez, quien siempre ha sido como otra abuelita para mí, le agradezco por siempre estar cuidándome y apoyándome.

A mi mejor amigo, Felipe Moreno, le agradezco porque que ha estado ahí para apoyarme en cada momento desde que nos conocimos cuando teníamos cinco años.

Agradezco a la Mtr. Jennifer Yáñez, mi directora de disertación, por haberme brindado la confianza para formar parte de este proyecto y por apoyarme en cada paso, no solo durante la tesis sino durante toda la carrera. De igual manera agradezco al Doctor Martin Marcial, por compartir conmigo su infinidad de conocimiento y ser un apoyo permanente durante toda mi tesis.

A los profesores de la carrera de Microbiología, gracias por ser excelentes profesionales y seres humanos que me enseñaron a perseverar y nunca darme por vencida, también gracias por inculcarme el amor hacia la microbiología y ayudarme a convertirme en una gran profesional.

Finalmente, agradezco a mis compañeros de clase por el apoyo durante estos años de carrera universitaria, especialmente agradezco a Domenica Aguilar, Bryan Sangoquiza, Sofia Quintana, Gabriela Felicita, Sharon Villamarín, Shirma Caicedo, Ana Ortega e Ivonne Iza por ser un grupo increíble de personas y siempre brindar una mano amiga a quien lo necesite.

**TABLA DE CONTENIDOS**

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>5</b>
5.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y HONGOS ENDÓFITOS Y RIZOSFÉRICOS.....	5
5.2. PRESERVACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS .....	6
5.3. ENSAYOS PRELIMINARES: TAMIZAJE Y ANTAGONISMO.....	6
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	7
5.5. ANÁLISIS MOLECULAR DE BACTERIAS Y HONGOS .....	7
5.6. AMPLIFICACIÓN DEL ADN.....	8
5.7. ELECTROFORESIS Y SECUENCIACIÓN .....	9
5.8. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....	9
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>9</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>32</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>32</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Aislamiento de bacterias endófitas y rizosféricas .....	10
Figura 2. Aislamiento de hongos endófitos y rizosféricos .....	10
Figura 3. Purificación de bacterias endófitas y rizosféricas .....	11
Figura 4. Purificación de hongos endófitos y rizosféricos .....	11
Figura 5. Fase de tamizaje para evaluar el antagonismo de aislamientos fúngicos frente a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	16
Figura 6. Fase de tamizaje para evaluar el antagonismo de aislamientos bacterianos frente a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	17
Figura 7. Comparación de PICR de los enfrentamientos duales de bacterias endófitas y rizosféricas.....	17
Figura 8. Comparación de PICR de los enfrentamientos duales de hongos endófitos y rizosféricos.....	18
Figura 9. Antagonismo de hongos promisorios.....	18
Figura 10. Antagonismo de bacterias promisorias .....	19
Figura 11. Bacterias con mayor porcentaje de inhibición .....	19
Figura 12. Hongos con mayor porcentaje de inhibición.....	20
Figura 13. Identificación molecular de bacterias antagonistas.....	25
Figura 14. Identificación molecular de hongos antagonistas .....	26

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Descripción macroscópica de colonias bacterianas endófitas y rizosféricas....	12
Tabla 2. Descripción macroscópica de colonias fúngicas endófitas y rizosféricas .....	13
Tabla 3. Descripción microscópica de los aislados bacterianos promisorios seleccionados.....	20
Tabla 4. Descripción microscópica de los aislados fúngicos promisorios seleccionados. .....	22

## 1. RESUMEN

A nivel mundial, el banano es uno de los alimentos más consumidos y en áreas tropicales su producción puede llegar al 80%. Esta planta se ve afectada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causante de la marchitez del banano o mal de Panamá, debido a esto el presente estudio evaluó la capacidad antagónica de bacterias y hongos endófitos aislados de rizosfera de cultivo banano contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Bacterias y hongos de la rizosfera de banano se aislaron y enfrentaron al hongo fitopatógeno mediante pruebas duales. Las bacterias y hongos con mayor porcentaje de inhibición frente a *Fusarium* fueron identificadas a nivel de especie mediante técnicas moleculares. Como resultado se obtuvieron siete bacterias, que se identificaron como: *Bacillus cereus*, dos cepas de *Serratia marcescens*, *Variovorax paradoxus*, *Cupriavidus necator*, *Nocardioides nitrophenolicus* y la séptima bacteria no pudo ser secuenciada debido a falta de tiempo. Se obtuvieron cuatro hongos con alto porcentaje de inhibición que se identificaron como: *Thielaviopsis musarum*, dos cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma lentiforme*. Los resultados presentaron once microorganismos con capacidad biocontroladora potencial frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* en estudios *in vitro*. Se recomienda llevar el experimento a campo para validar esta información *in situ*.

**PALABRAS CLAVE.** – Antagonismo, bacterias, hongos, *Fusarium oxysporum*, rizosfera

## 2. ABSTRACT

Worldwide, banana is one of the most consumed foods and in tropical area the production can reach 80%. This plant is affected by the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana wilt or Panama disease, due to this the present study evaluated the antagonistic capacity of bacteria and endophytic fungi isolated from the rhizosphere of banana cultivation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. Bacteria and fungi from the banana rhizosphere were isolated and confronted with the phytopathogenic fungus through dual tests. The bacteria and fungi with the highest percentage of inhibition against *Fusarium* were identified at the species level using molecular techniques. As a result, seven bacteria were obtained, which were identified as: *Bacillus cereus*, two strains of *Serratia marcescens*, *Variovorax paradoxus*, *Cupriavidus necator*, *Nocardioides nitrophenolicus* and the seventh bacterium could not be sequenced due to lack of time. Four fungi with a high percentage of inhibition were

obtained and identified as *Thielaviopsis musarum*, two strains of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma lentiforme*. The results presented eleven microorganisms with potential biocontrol capacity against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* in *in vitro* studies. It is recommended to take the experiment to the field to validate this information *in situ*.

**KEY WORDS.** - Antagonism, bacteria, fungi, *Fusarium oxysporum*, rhizosphere

### 3. INTRODUCCIÓN

El banano es uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial. En áreas tropicales la producción para el consumo local llega al 80%. Esta actividad agrícola representa un aporte a la economía de aproximadamente 35.200 millones de dólares cada año, de manera que esta fruta figura como uno de los productos alimentarios y económicos más importantes (García et al., 2020). La marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 en cultivos de banano ha afectado a 20 países y 135 productores, lo que significa una gran preocupación para Latinoamérica y el mundo (Martínez, Rey, Pargas y Manzanilla, 2020).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* es un hongo ampliamente distribuido en el suelo y causa una de las enfermedades más devastadoras en cultivos de banano. Invade las raíces y obstruye el paso de agua y nutrientes a través de la colonización vascular. Los primeros síntomas de la enfermedad que se observan son la decoloración y la marchitez de las hojas, que, posteriormente, se tornan amarillas brillantes con bordes muertos y, en estados avanzados, puede provocar necrosis en el pseudotallo (Chandra y Pious, 2015; Kaushal, Mahuku y Swennen, 2020).

La enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* provoca grandes pérdidas en la producción de banano en Ecuador y todo el mundo, al punto que provocó en Centroamérica la desaparición de un tipo de banano de exportación “Gros Michel” en 1950, con una pérdida de 2 000 millones de dólares (Magdama, Moserrate, Serrano, García y del Mar, 2020; Pegg, Coates, Neill y Turner, 2019). Este patógeno se clasifica en cuatro razas, de las cuales tres son capaces de perjudicar al banano, la marchitez por *Fusarium* raza 1 es una de las más destructivas, al ser considerada la primera epidemia en atacar gran cantidad de cultivos de “Gros Michel” que obligó a la industria a cambiar por bananas “Cavendish” que es resistente a la raza 1 (Martínez, Rey, Pargas y Manzanilla, 2020; Zapata, Henao, Patiño, Sánchez y Hoyos, 2019).

Actualmente, el cultivar “Cavendish” conforma el 99% de exportaciones. Sin embargo, esta no es una solución permanente, ya que este cultivar de banano es susceptible a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 (Dita, Barquero, Heck, Mizubuti y Staver, 2018). Por tanto, es importante realizar nuevas investigaciones sobre diferentes métodos de control de esta enfermedad en el cultivo.

De acuerdo con Magdama, Moserrate, Serrano, García y Jiménez (2020) la producción de banano influye notablemente en la economía de Ecuador, donde es el segundo producto de exportación después del petróleo. Las enfermedades que afectan a los cultivos de banano representan importantes limitaciones en la producción y en la exportación. Tradicionalmente estas enfermedades se controlan con productos químicos, los cuales generan efectos negativos en el ambiente. Por ello, el uso de bacterias y hongos endófitos y de la rizosfera es una de las mejores opciones para el control de esta enfermedad, porque no solo se enfoca en detener la infección del hongo en plantas de banano, sino que también beneficia al medio ambiente. Así, se genera una alternativa efectiva para el control de la marchitez en el país y se beneficia a los grandes y pequeños productores de banano que se ven afectados por la enfermedad (Kumar, Bhattacharyya, Chandra, Dinesh y Swamy, 2021). Aunque se ha analizado a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y los efectos que causa la marchitez en cultivos de banano en Ecuador, no existen suficientes estudios reportados sobre el uso de bacterias y hongos endófitos y de la rizosfera de plantas de banano como controladores biológicos de este hongo fitopatógeno.

Grupos microbianos encontrados en la rizosfera, como bacterias y hongos, mejoran la respuesta inmune de la planta frente a diferentes plagas. Por esto, se han estudiado para la formulación de bioproductos como biocontroladores y biofertilizantes (Sekar, Raj y Prabavathy, 2016). La aplicación de bacterias y hongos endófitos en el suelo de cultivos afectados por cepas patógenas del género *Fusarium* puede reducir significativamente el daño que provoca el hongo en la planta (Thangavelu y Gopi, 2015). Esto ayudaría a limitar el uso de fungicidas químicos, cuya eficiencia puede verse comprometida por factores como el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte del patógeno o la interferencia de distintos factores ambientales. Adicionalmente, estos agroquímicos tienen un efecto nocivo en el medio ambiente y en la salud del consumidor.

Se ha reportado que, las bacterias endófitas, además de ser controladoras biológicas, también promueven el crecimiento de la planta (Argón y Beltrán, 2019; Chandra y Pious, 2015). Los hongos endófitos, por su parte, son buenos controladores en enfermedades vasculares como la causada por *Fusarium* (Zapata, Henao, Patiño, Sánchez y Hoyos, 2019).

Según Magdama (2019), el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 Tropical es el causante de una de las enfermedades más destructivas en el banano denominada “el mal de Panamá”. El término *forma specialis* se utiliza para diferenciar a los aislados que afectan a diferentes hospederos. En este caso, el uso de “f.sp.” *cubense* refiere a las cepas de *Fusarium oxysporum* que producen la enfermedad exclusivamente en cultivos de banano. En la actualidad, se conocen tres razas, donde, raza aplica para diferenciar el tipo de cepa de *Fusarium* que ataca al banano. Específicamente, la raza 4 Tropical es conocida por causar la enfermedad en estas plantas en zonas tropicales, sin estrés aparente.

El microbioma endófito de plantas de banano hace referencia a los microorganismos que colonizan y habitan los tejidos vegetales, se puede caracterizar el microbioma mediante el uso de herramientas metagenómicas basadas en secuenciación. Estas herramientas biotecnológicas permiten identificar y diferenciar la estructura de la microbiota de plantas sintomáticas y asintomáticas. Las últimas se caracterizan por una predominancia del orden de bacterias Pseudomonadales y de la familia de actinobacterias Streptomycetaceae, ambos conocidos por su capacidad biocontroladora contra fitopatógenos. En contraste, el microbioma de las plantas que presentaron síntomas está compuesto principalmente por el orden de bacterias Flavobacteriales (Kaushal, Mahuku y Swennen, 2020). En este contexto, bacterias endófitas en cultivos de banano se han analizado como posibles controladores biológicos de *Fusarium oxysporum*. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* (GNS.13. 2a) puede resultar efectiva al inhibir el crecimiento de *Fusarium* en ensayos de tamizaje realizados en agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) y agar nutritivo (Chandra y Thomas, 2015; Ragavi, Muthamilan, Nakkeeran, Kumaravadivel y Suganthi, 2019).

Los hongos endófitos se desarrollan dentro de todos los tejidos vegetales y mantienen asociaciones con la planta. En banano se investigan estos microorganismos para determinar su capacidad biocontroladora de fitopatógenos como *Fusarium* spp. Se

reporta que las plantas saludables poseen una mayor diversidad de hongos endófitos en comparación a las plantas infectadas (Argón y Beltrán, 2019; Zapata, Henao, Patiño, Sánchez y Hoyos, 2019). A nivel nacional, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1, se estudió principalmente por su impacto negativo en cultivos de banano Gros Michel, utilizado principalmente en la década de 1950 para la exportación. Por ello, su estudio en el cultivo actual de banano cultivar Cavendish resulta crucial para fortalecer el plan de contingencia contra FocR4T en el Ecuador a través de estudios filogenéticos y pruebas de patogenicidad. (Magdama, Moserrate, Serrano, García y Jiménez, 2020).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1.OBJETIVO GENERAL**

Determinar la capacidad antagónica de bacterias y hongos endófitos aislados de rizosfera de cultivo banano contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).

### **4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar fenotípicamente diferentes aislamientos de bacterias y hongos de cultivos de banano por medio de técnicas tradicionales.

Evaluar la capacidad antagónica de cada bacteria y hongo aislado contra *Fusarium oxysporum* mediante la técnica de cultivo dual.

Identificar molecularmente las bacterias y hongos con potencial antagonista.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1.AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y HONGOS ENDÓFITOS Y RIZOSFÉRICOS**

Se preparó una suspensión madre con un gramo de rizosfera y 9 mL de agua peptonada para luego obtener diluciones seriadas en base 10. Las bacterias fueron sembradas en superficie siguiendo el protocolo establecido por Moya, García, Avilés, Andújar y Núñez (2014) con modificaciones. Se colocó 1 mL de diluciones entre  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  en platos Petri individuales con agar nutritivo, agar 523 y agar 523 diluido al 10% de la concentración indicada. Los tres medios fueron suplementados con nistatina (20mg/L) para evitar el crecimiento de hongos y las placas resultantes se incubaron por 24 horas a 30°C, para el aislamiento de posibles bacterias oligotróficas se incubó durante 48 horas. La metodología de Adebayo et al. (2019) con modificaciones se utilizó para el aislamiento

de hongos: el inóculo se sembró por profundidad mediante la adición de 1 mL de las diluciones  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  en platos Petri con agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) y con agar extracto de malta (MEA por sus siglas en inglés), ambos sin antibiótico con el objetivo de evidenciar, preliminarmente, el crecimiento de bacterias antagonistas y, se incubó a 25°C durante 24 a 72 horas.

La purificación de las bacterias y los hongos se realizó según el protocolo establecido por Adebayo et al. (2019), las colonias fúngicas y bacterianas se purificaron en los medios de cultivo originales.

Características macroscópicas como tamaño, color, tipo de micelio y forma de la colonia se registraron para describir a los hongos; mientras que tamaño, color, forma y tipo de crecimiento se anotaron para bacterias (Maldonado, López, Lores y Osorio, 2017).

## **5.2.PRESERVACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS**

Los aislamientos bacterianos se preservaron mediante el protocolo mencionado por Belmonte, Noguera, Contigiani, Gandini y Sutich (2008) con modificaciones. Colonias bacterianas se sembraron en caldo cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés) para realizar una suspensión bacteriana, se incubó a 27°C durante 24 horas. Posteriormente, se colocó 500 µl de esta suspensión en un microtubo de 1.5 mL con 500 µl glicerol llegando a una concentración final de 20% (v/v) del agente crioprotector y se almacenó a una temperatura entre -20°C. La conservación de hongos se realizó siguiendo el protocolo indicado por Ladino, Rubio y Chacin (2016) con modificaciones. Fragmentos de agar con micelio de cada hongo se colocaron en microtubos de 1.5ml, se colocó agua destilada estéril hasta cubrirlos y se almacenaron a temperatura ambiente.

## **5.3.ENSAYOS PRELIMINARES: TAMIZAJE Y ANTAGONISMO**

Las bacterias antagonistas fueron evaluadas mediante el protocolo de Ben et al. (2019) con modificaciones. En el centro de la caja Petri con agar PDA se colocó, un disco de 5 mm de agar con micelio del fitopatógeno de una semana de incubación. Se realizaron dos estrías paralelas de un cultivo bacteriano a tres centímetros de distancia del hongo, en los lados sobrantes se repitió el procedimiento con otras bacterias. Como control se colocó en otra caja Petri con agar PDA únicamente un disco con micelio del fitopatógeno en el centro, se incubó durante 7 días a 30°C y se registraron las medidas del crecimiento radial del fitopatógeno en milímetros a los 7 días.

Una vez seleccionadas las potenciales bacterias biocontroladoras, por medio del porcentaje de inhibición, se repitió la misma metodología establecida por Ben et al. (2019) para los antagonismos, con exclusivamente un cultivo bacteriano por plato Petri.

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) se calculó con la siguiente fórmula:  $I = (C-T) / C \times 100$ , indicada en el protocolo de Li, Sun, Saravanakumar y Chen (2015), donde I es el porcentaje de inhibición, C es el crecimiento radial del fitopatógeno sin enfrentamiento (control) y T es el crecimiento radial del fitopatógeno en presencia del posible biocontrolador.

Los antagonismos de los hongos siguieron el protocolo establecido por Li, Sun, Saravanakumar y Chen (2015). Se colocó un disco de 5 mm del fitopatógeno de una semana de incubación a 2 cm del borde de la caja Petri con agar PDA y otro disco del posible biocontrolador al lado opuesto, igualmente a 2 cm del borde de la caja Petri. Como control, se puso un disco del fitopatógeno y en el lado opuesto se colocó un disco de agar estéril y se incubó a 25°C durante 5 días. Pasado este tiempo se calculó el PICR con la misma fórmula indicada en el protocolo.

#### **5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

El presente estudio se ajusta a un diseño completamente al azar (DCA), donde los valores obtenidos del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de bacterias y hongos se compararon mediante diferentes pruebas estadísticas. En el caso de los hongos se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Los valores obtenidos de las bacterias no cumplieron los supuestos del ANOVA y se realizó la prueba no paramétrica Chi cuadrado, en ambos casos se utilizó el programa estadístico SPSS (Sánchez, Reyes y Mejía, 2018).

#### **5.5. ANÁLISIS MOLECULAR DE BACTERIAS Y HONGOS**

Para la extracción de ADN de las bacterias se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.). Se adicionó 1 mL del cultivo bacteriano en un microtubo de 1.5 mL, se centrifugó 13000 - 16000 rpm durante dos minutos para sedimentar células y se eliminó el sobrenadante. Para bacterias Gram positivas, se añadió lisozima al sedimento celular re suspendido en un volumen total de 120 µl, se incubaron las muestras a 37°C durante 30-60 minutos, se centrifugó por dos minutos a 13000- 16000 rpm y se removió el sobrenadante. Se añadieron 600 µl de la solución de lisis nuclear, se incubó a 37°C durante 15-60 minutos, se enfriaron las

muestras a temperatura ambiente, se les adicionó 200 µl de la solución de precipitación de proteínas, se agitaron las nuevas soluciones obtenidas en el vortex durante 20 segundos, se incubaron las muestras en hielo durante cinco minutos, se centrifugó entre 13000 - 16000 rpm durante tres minutos, se transfirieron independientemente los sobrenadantes a un microtubo de 1.5mL con 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló cada microtubo por inversión y, se centrifugó entre 13000- 16000 rpm durante dos minutos. El isopropanol de cada tubo se descartó sobre un papel absorbente limpio, teniendo cuidado de no eliminar el sobrenadante, se le agregó 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y se mezcló por inversión. Se centrifugó entre 13000- 16000 rpm durante dos minutos, se aspiró el etanol, se drenó el tubo sobre un papel absorbente limpio y se secó al aire durante 10-15 minutos. Se añadió 100 µl de la solución de rehidratación de ADN al tubo, se incubó a 65°C durante 1 hora y finalmente se almacenó el ADN a 2-8°C.

El ADN de los hongos se extrajo siguiendo el protocolo para plantas establecido en el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.). La calidad y concentración del ADN extraído de bacterias y hongos se midió por espectrofotometría con el equipo *Nanodrop 2000* (ThermoScientific, 2015).

## **5.6.AMPLIFICACIÓN DEL ADN**

Para la amplificación por PCR de la región 16S del ADN ribosomal se utilizó el protocolo establecido por Chen et al. (2015) en el que empleó los cebadores universales 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). Se añadió 1,25 mL de cada cebador, 20.5 µl de Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.) y 2 µl de ADN para alcanzar un volumen de 25 µl. Los parámetros aplicados fueron: desnaturalización a 95°C durante cinco minutos, alineamiento a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 40 segundos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos y se almacenó a 4°C.

La amplificación por PCR de la región ITS del ADN ribosomal se realizó con las pautas proporcionadas por White, Bruns, Lee y Taylor (1990) con modificaciones. Se utilizó los cebadores ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS 4 (5' GGTCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). A 20.5 µl de Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.) se añadió 1.25 µl de cada cebador y 2 µl de ADN hasta llegar a un

volumen de 25 µl en cada tubo y se llevó a cabo 25 ciclos con los siguientes parámetros: desnaturalización a 95°C por un minuto, alineamiento a 95°C durante un minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C durante un minuto, extensión final a 72°C durante cinco minutos y se almacenó a 4°C.

### **5.7.ELECTROFORESIS Y SECUENCIACIÓN**

Los productos de la PCR de bacterias y hongos fueron confirmados mediante electroforesis de acuerdo con Barghouthi (2011). Los geles de agarosa al 1.5% con una escalera de peso molecular de 100 pb, recibieron una carga eléctrica de 95 voltios por 60 minutos (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.). El buffer de corrida fue una solución de TAE a 1X. La secuenciación se realizó por el método de Sanger en la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

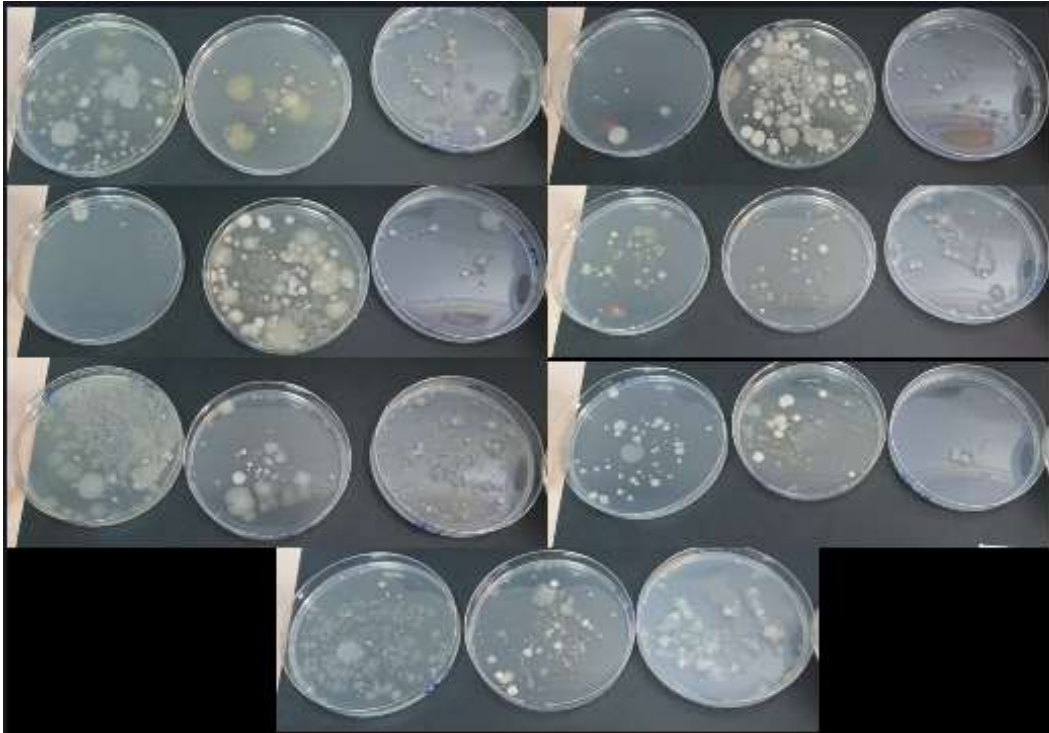
### **5.8.ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS**

Las secuencias recibidas se editaron y analizaron a través del programa MEGA versión X (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Posteriormente se comparó con las bases de datos disponibles en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) y se escogió las secuencias que obtuvieron mayor porcentaje de identidad (Altschul, Gish, Miller, Myers y Lipman. 1990).

## **6. RESULTADOS**

### **6.1.AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS Y HONGOS**

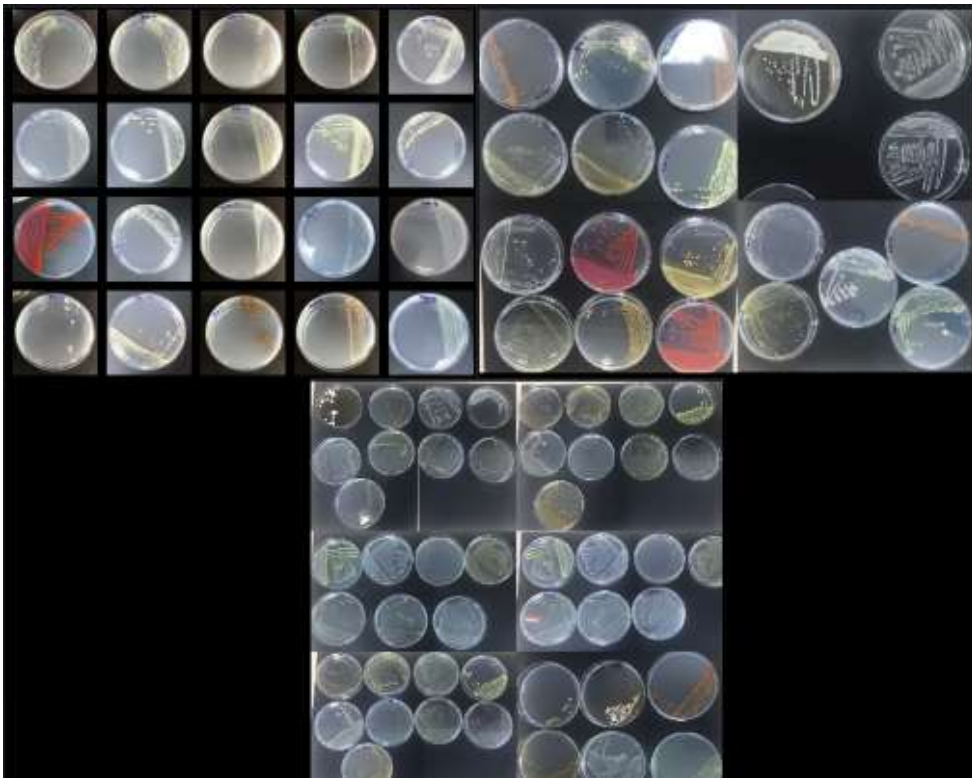
Una gran variedad de colonias bacterianas (Figura 1) y colonias fúngicas (Figura 2) con diferentes características macroscópicas se obtuvieron purificándose un total de 54 bacterias en agar nutritivo (Figura 3) y 46 hongos en agar PDA (Figura 4).



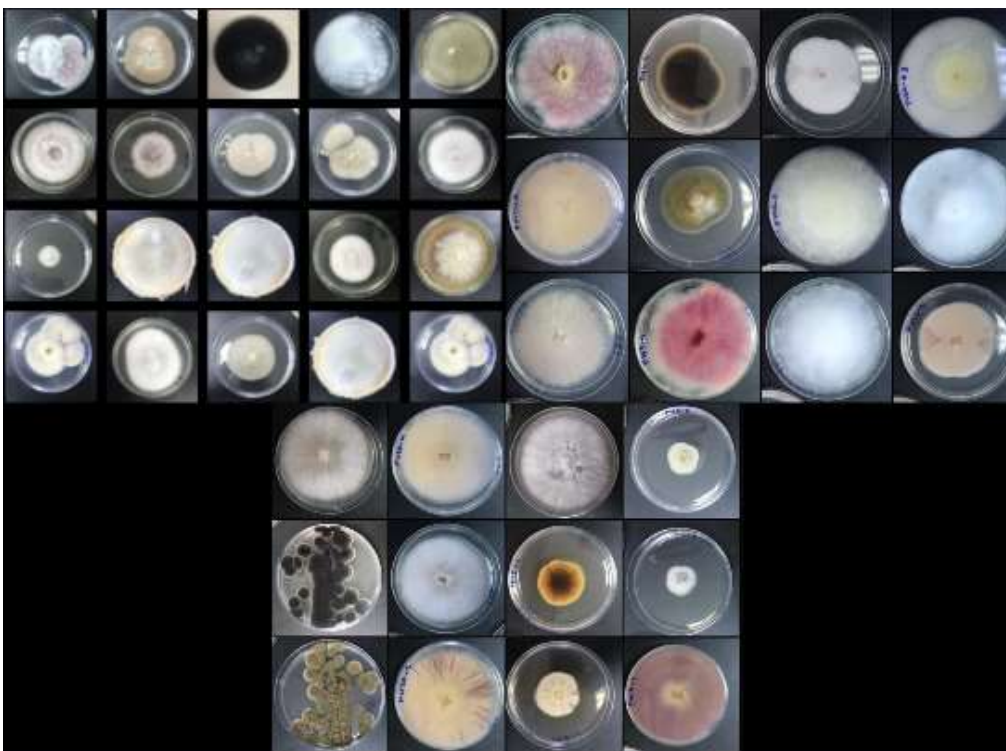
**Figura 1. Aislamiento de bacterias endófitas y rizosféricas.** Colonias bacterianas en cajas Petri con agar nutritivo, agar 523 y agar 523 diluido sembradas con las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ .



**Figura 2. Aislamiento de hongos endófitos y rizosféricos.** Colonias fúngicas en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) y agar extracto de malta (MEA por sus siglas en inglés) sembradas con las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$ .



**Figura 3. Purificación de bacterias endófitas y rizosféricas.** Cajas Petri con cultivos bacterianos puros en agar nutritivo.



**Figura 4. Purificación de hongos endófitos y rizosféricos.** Cajas Petri con cultivos fúngicos puros en agar PDA.

Los cultivos bacterianos puros presentaron gran variedad de colores y formas, desde el blanco o crema, con forma puntiforme y elevación convexa hasta un número pequeño de bacterias con colores y formas diferentes al resto (Tabla 1). La mayoría de los hongos puros presentaron características macroscópicas similares como: micelio algodonoso y color blanco o crema en anverso y reverso (Tabla 2).

**Tabla 1. Descripción macroscópica de colonias bacterianas endófitas y rizosféricas**

<b>Codificación</b>	<b>Tamaño mm</b>	<b>Color</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevación</b>
P8-7	0.5	Blanco	Puntiforme	Plana
P6-10	0.7	Crema	Circular	Convexa
P8-5	0.6	Crema	Fusiforme	Plana
P8-6	0.6	Blanco	Circular	Convexa
P6-3	0.3	Blanco	Puntiforme	Plana
P6-5	0.4	Naranja	Circular	Convexa
P6-9	0.9	Crema	Circular	Convexa
P6-7	0.9	Crema	Circular	Plana
P10-8	0.3	Blanco	Puntiforme	Plana
PH6-1	0.3	Rojo	Puntiforme	Convexa
P6-2	0.2	Verde claro	Puntiforme	Convexa
P10-1	0.2	Blanco	Puntiforme	Plana
P14-5	0.2	Naranja	Puntiforme	Plana
P10-6	0.2	Blanco	Puntiforme	Convexa
P14-4	0.2	Blanco	Puntiforme	Plana
P9-1	0.3	Crema rodeado de pigmento café	Circular	Plana
P19-7	0.3	Crema	Puntiforme	Plana
P19-2	1	Blanco	Circular	Plana
P19-4	0.2	Blanco	Puntiforme	Convexa
P6-1	0.2	Verde claro	Puntiforme	Plana
P10-5	1	Blanco	Circular	Convexa
P10-9	1	Amarillo	Irregular	Convexa
P10-4	1	Amarillo	Circular	Convexa
P6-6	1	Crema	Irregular	Plana
P6-8	0.4	Crema	Puntiforme	Convexa
P25	1	Rojo	Circular	Convexa
P9-10	1	Blanco	Irregular	Convexa
P9-11	0.8	Blanco	Circular	Plana
P9-8	1	Amarillo	Irregular	Plana
P14-6	0.2	Verde	Puntiforme	Convexa
P10-3	0.4	Blanco	Circular	Convexa
P19-3	2	Blanco	Irregular	Plana
P14-1	1	Amarillo	Irregular	Convexa
P14-2	1	Blanco	Circular	Convexa
P10-7	0.3	Blanco	Puntiforme	Convexa
P19-1	0.2	Amarillo	Puntiforme	Convexa

P13-4	0.3	Blanco rodeado de pigmento café	Puntiforme	Convexa
P10-2	0.4	Amarillo	Irregular	Plana
P13-2	0.2	Blanco	Puntiforme	Plana
P13-3	0.3	Blanco	Circular	Convexa
P9-4	0.3	Amarillo	Puntiforme	Plana
P9-5	0.2	Blanco	Puntiforme	Convexa
P13-1	2	Crema	Irregular	Plana
P14-3	0.3	Crema	Puntiforme	Convexa
PB14-2	1	Blanco	Circular	Plana
P9-7	0.3	Blanco	Puntiforme	Plana
P6-4	0.3	Blanco	Irregular	Convexa
P9-6	0.2	Blanco	Puntiforme	Plana
P8-1	0.2	Amarillo	Puntiforme	Convexa
P8-2	0.3	Blanco	Puntiforme	Convexa
P8-3	0.2	Crema	Puntiforme	Convexa
P8-4	0.3	Amarillo	Puntiforme	Convexa
P9-9	0.3	Amarillo	Puntiforme	Convexa
P9-3	0.4	Blanco	Circular	Convexa

**Tabla 2. Descripción macroscópica de colonias fúngicas endófitas y rizosféricas**

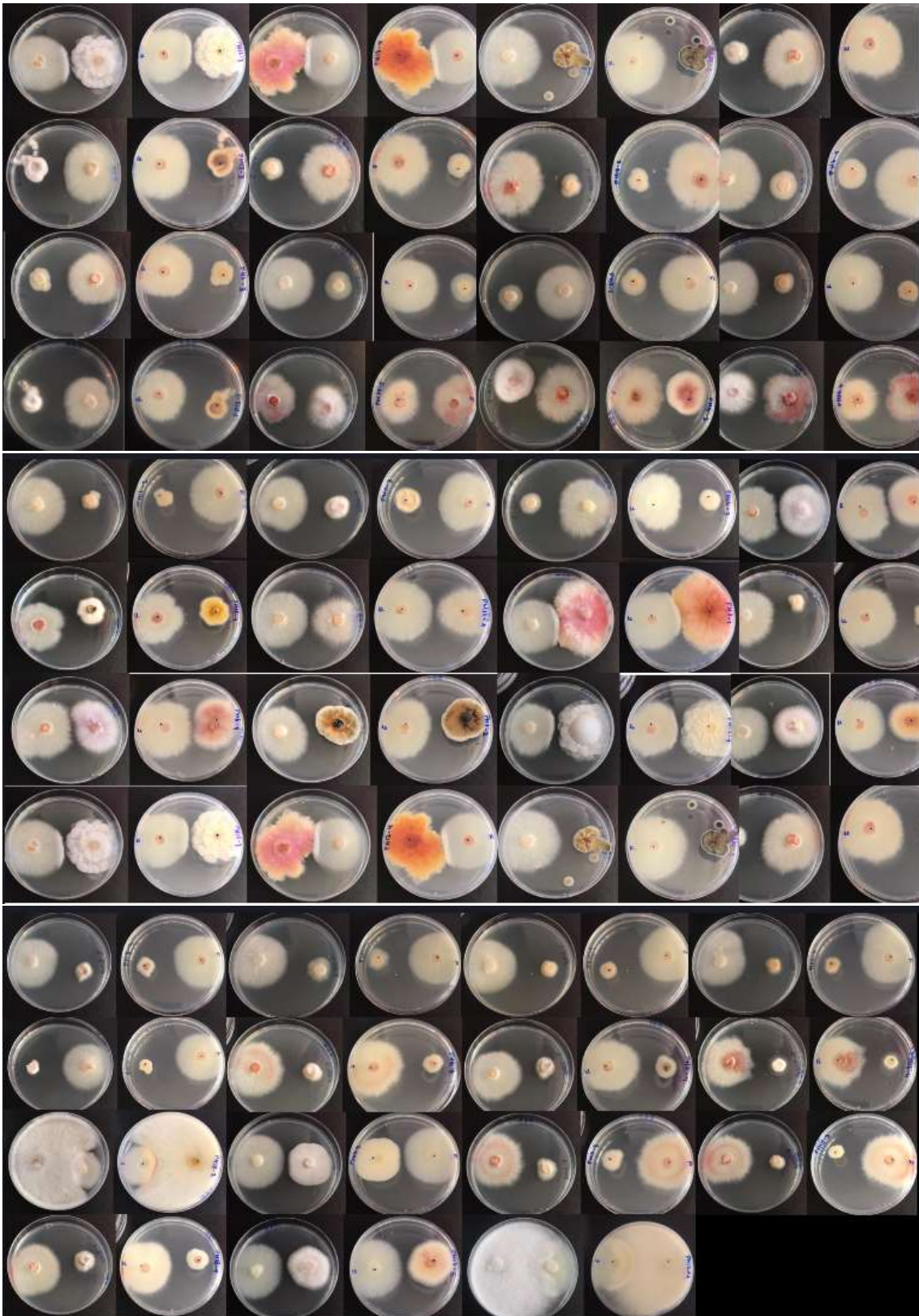
<b>Codificación</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Color anverso</b>	<b>Color reverso</b>	<b>Tipo de micelio</b>	<b>Forma de colonia</b>
PH13-2	Crecimiento invasivo	Blanco	Blanco	Algodonoso	Irregular
PH14-1	Crecimiento invasivo	Negro	Negro	Velloso	Circular
PH14-3	Crecimiento invasivo	Blanco	Naranja claro	Algodonoso	Circular
PH14-2	Crecimiento invasivo	Blanco	Naranja claro	Algodonoso	Circular
PH14-6	Crecimiento limitado	Blanco	Crema	Algodonoso	Irregular
PH10-3	Crecimiento limitado	Blanco	Rosado claro	Algodonoso	Circular
PH14-5	Crecimiento limitado	Blanco	Blanco	Aterciopelada	Irregular
PH13-1	Crecimiento limitado	Blanco con morado	Blanco	Algodonosa	Circular
PH6-2	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Irregular
PH9-1	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Irregular
PH6-3	Crecimiento limitado	Naranja	Naranja claro	Aterciopelada	Irregular

PH6-1	Crecimiento limitado	Blanco	Blanco	Aterciopelada	Circular
PH10-2	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Irregular
PH9-3	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Irregular
PH13-3	Crecimiento limitado	Morado	Crema	Algodonoso	Circular
PH20-1	Crecimiento invasivo	Verde	Verde oscuro	Algodonoso	Circular
PH12-4	Crecimiento invasivo	Rosado	Rosado	Aterciopelada	Circular
PH12-3	Crecimiento invasivo	Blanco	Blanco	Algodonoso	Circular
PH12-2	Crecimiento limitado	Blanco	Rosado claro	Algodonoso	Irregular
PH12-1	Crecimiento invasivo	Blanco	Blanco	Algodonoso	Irregular
PH7-2	Crecimiento limitado	Café	Café	Algodonoso	Irregular
PH16-1	Crecimiento invasivo	Blanco	Morado	Aterciopelada	Circular
PH11-2	Crecimiento limitado	Blanco	Blanco	Algodonoso	Irregular
PH7-1	Crecimiento invasivo	Rosado	Rosado con blanco	Algodonoso	Irregular
PH11-1	Crecimiento invasivo	Crema	Naranja	Aterciopelada	Irregular
PH15-1	Crecimiento limitado	Crema	Café	Algodonoso	Circular
PH20-4	Crecimiento invasivo	Blanco	Crema	Algodonoso	Circular
PH20-2	Crecimiento invasivo	Blanco	Crema con morado	Algodonoso	Circular
PH16-3	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Circular
PH11-3	Crecimiento limitado	Morado	Blanco	Algodonoso	Irregular
PH16-2	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Irregular
PH17-1	Crecimiento invasivo	Blanco	Blanco	Aterciopelada	Circular
PH12-5	Crecimiento limitado	Blanco	Morado	Algodonoso	Irregular
PH18-1	Crecimiento limitado	Blanco	Negro con blanco	Aterciopelada	Irregular
PH15-3	Crecimiento limitado	Naranja	Naranja	Aterciopelada	Irregular

PH7-3	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Circular
PH17-2	Crecimiento limitado	Blanco	Plomo	Algodonoso	Circular
PH15-2	Crecimiento invasivo	Blanco	Blanco	Algodonoso	Circular
PH16-4	Crecimiento invasivo	Blanco	Crema	Aterciopelada	Circular
PH7-4	Crecimiento limitado	Plomo	Plomo con crema	Aterciopelada	Circular
PH16-5	Crecimiento limitado	Plomo	Negro con blanco	Aterciopelada	Irregular
PH20-5	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Circular
PH16-6	Crecimiento limitado	Naranja	Amarillo	Aterciopelada	Circular
PH15-4	Crecimiento limitado	Crema	Blanco	Aterciopelada	Irregular
PH9-2	Crecimiento limitado	Crema	Blanco	Aterciopelada	Irregular
PH17-3	Crecimiento limitado	Crema	Crema	Aterciopelada	Irregular

## 6.2.ANTAGONISMO DE BACTERIAS Y HONGOS AISLADOS

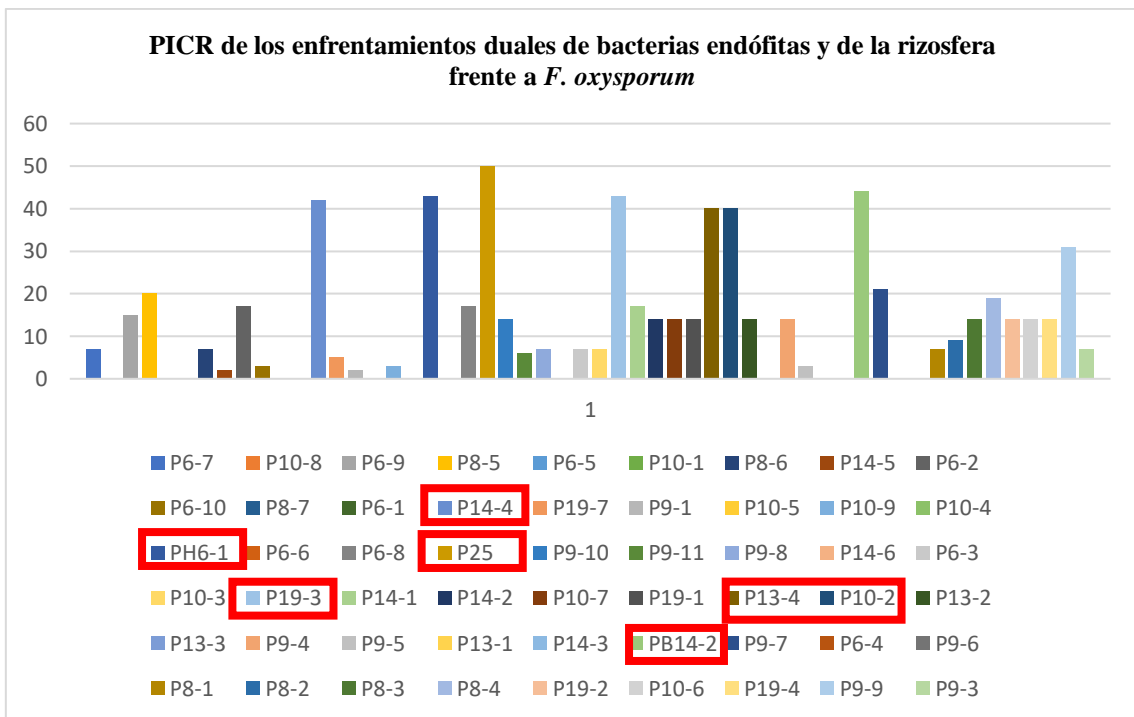
Con las bacterias y hongos aislados de la rizosfera de banano se procedió a realizar un primer tamizaje al enfrentar a cada hongo (Figura 5) y a cada bacteria (Figura 6) frente al hongo fitopatógeno Foc R1. Diferentes porcentajes de inhibición en cada enfrentamiento dual se reportaron, en el tamizaje de bacterias se observaron siete aislados con un porcentaje de inhibición igual o mayor al 40% (Figura 7) y cuatro aislados fúngicos con un porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) igual o mayor al 40% (Figura 8). Con estas bacterias y hongos promisorios se realizó nuevamente pruebas de enfrentamiento dual en las que se obtuvo porcentajes de inhibición similares a los obtenidos en los ensayos de tamizaje (Figuras 9 y 10).



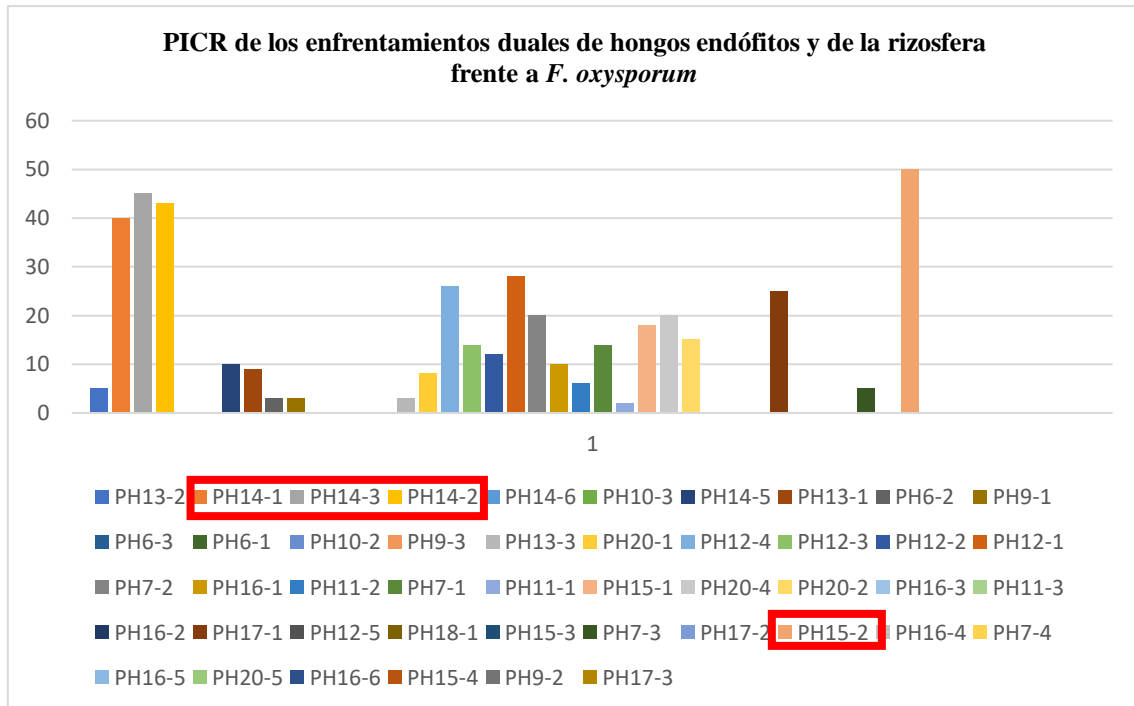
**Figura 5.** Fase de tamizaje para evaluar el antagonismo de aislamientos fúngicos frente a *Fusarium oxysporum*. Cajas Petri con agar PDA durante el enfrentamiento dual de hongos endófitos y de la rizosfera frente a *F. oxysporum*.



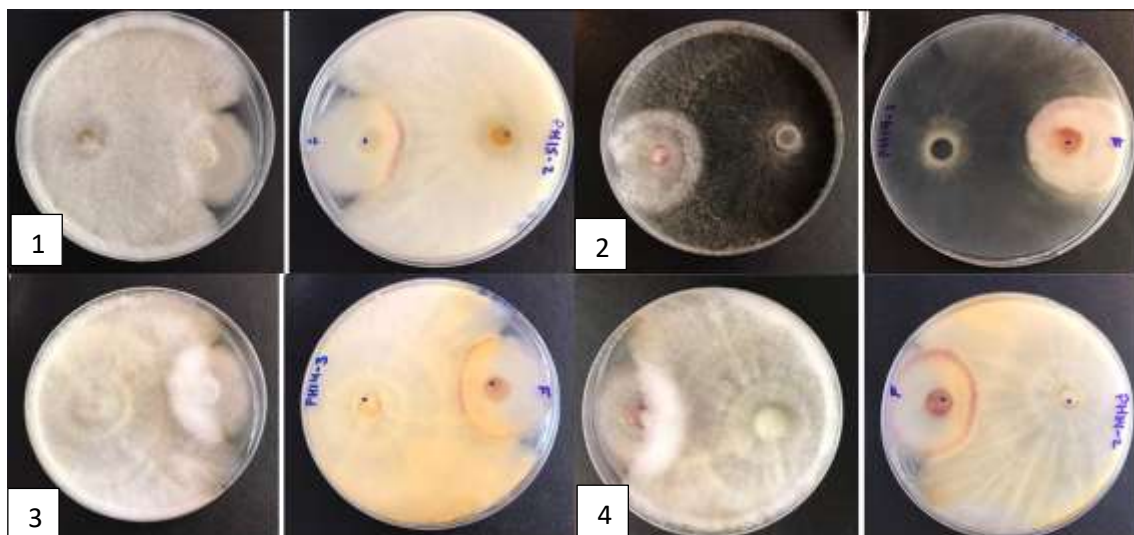
**Figura 6. Fase de tamizaje para evaluar el antagonismo de aislamientos bacterianos frente a *Fusarium oxysporum*.** Cajas Petri con agar nutritivo durante el enfrentamiento dual de bacterias endófitas y de la rizosfera frente a *F. oxysporum*.



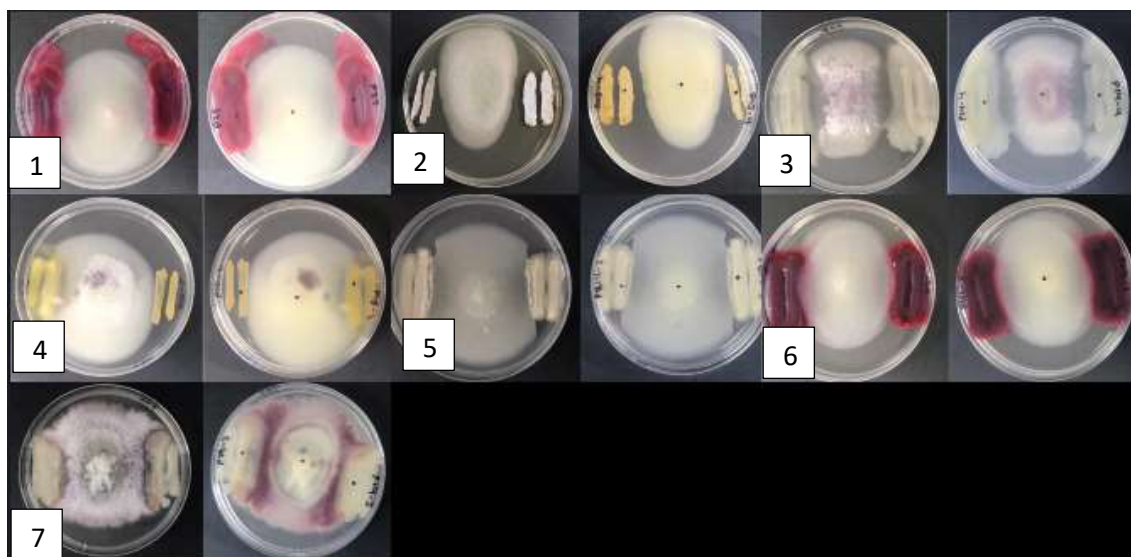
**Figura 7. Comparación de PICR de los enfrentamientos duales de bacterias endófitas y rizosféricas.** Los valores representados en el gráfico indican los porcentajes de inhibición de las bacterias endófitas y rizosféricas frente a *F. oxysporum*. Los códigos alfanuméricos indican la codificación interna que se le asignó a cada aislamiento. Los códigos enmarcados en rojo señalan a las bacterias con mayor porcentaje de inhibición.



**Figura 8. Comparación de PICR de los enfrentamientos duales de hongos endófitos y rizosféricos.** Los valores representados en el gráfico indican los porcentajes de inhibición de los hongos endófitos y rizosféricos frente a *F. oxysporum*. Los códigos alfanuméricos indican la codificación interna que se le asignó a cada aislamiento. Los códigos enmarcados en rojo señalan a los hongos con mayor porcentaje de inhibición.

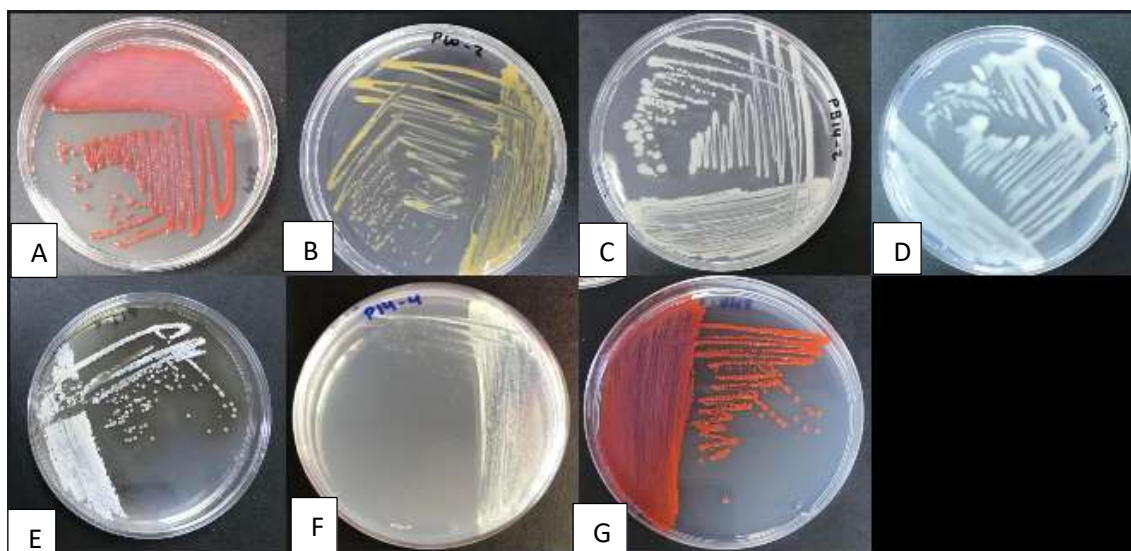


**Figura 9. Antagonismo de hongos promisorios.** Enfrentamiento dual de los cuatro hongos seleccionados en el screening frente a *Fusarium oxysporum*.

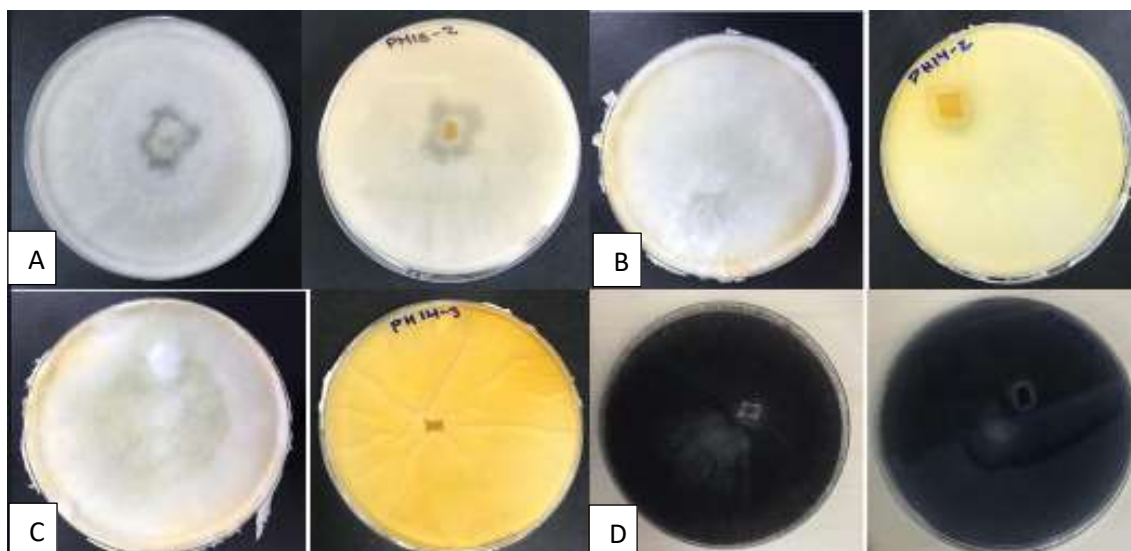


**Figura 10. Antagonismo de bacterias promisorias.** Enfrentamiento dual de las siete bacterias seleccionadas en el screening frente a *Fusarium oxysporum*.

Como consecuencia se obtuvieron siete aislamientos bacterianos con características macroscópicas diferentes (Figura 11) y cuatro hongos con diferentes características macroscópicas (Figura 12). Se diferenciaron tres bacterias Gram positivas y cuatro bacterias Gram negativas, y en los hongos se observó principalmente la presencia de hifas, clamidosporas y conidios (Tablas 3 y 4).

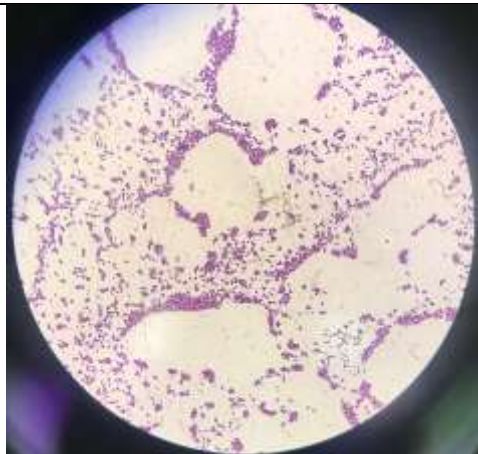


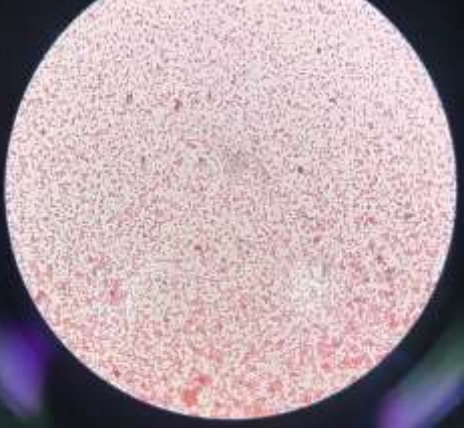
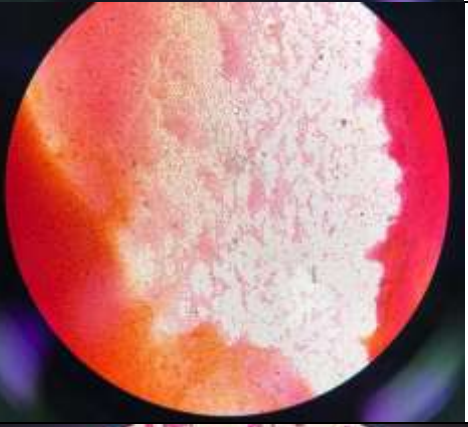
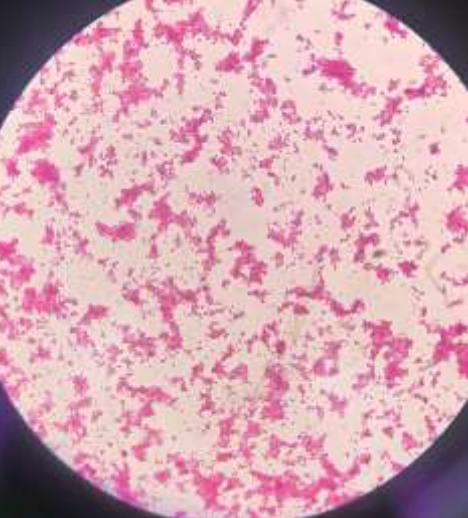
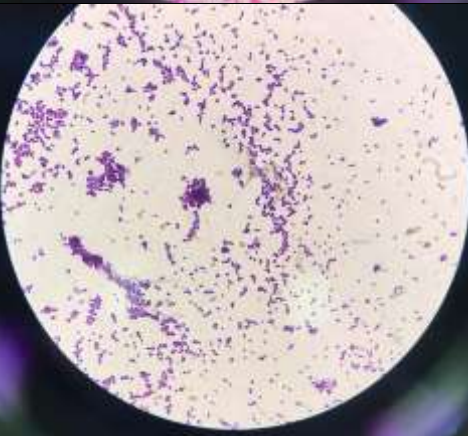
**Figura 11. Bacterias con mayor porcentaje de inhibición.** Cajas Petri con agar nutritivo y cultivos bacterianos puros de las bacterias con mayor porcentaje de inhibición frente a *F. oxysporum*. (A) *Serratia marcescens*. (B) *Variovorax paradoxus*. (C) *Bacillus cereus*. (D) *Cupriavidus necator*. (E) Sin identificar. (F) *Nocardioidea nitrophenolicus*. (G) *Serratia marcescens*.

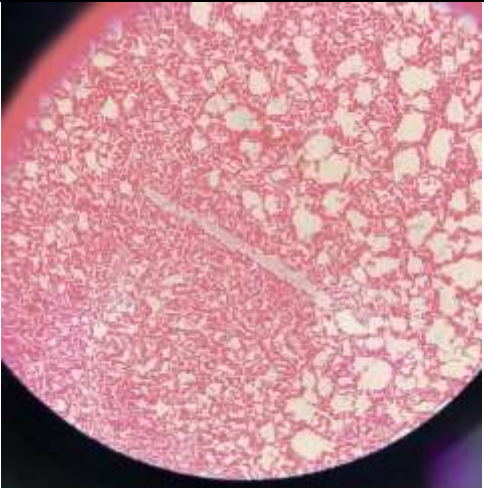



**Figura 12. Hongos con mayor porcentaje de inhibición.** Cajas Petri con agar PDA y cultivos fúngicos puros de los hongos con mayor porcentaje de inhibición frente a *F. oxysporum*. (A) *Trichoderma harzianum*. (B) *Trichoderma harzianum*. (C) *Trichoderma lentiforme*. (D) *Thielaviopsis musarum*.

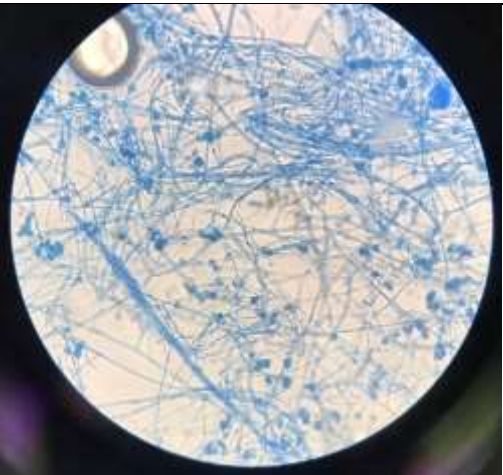
**Tabla 3. Descripción microscópica de los aislados bacterianos promisorios seleccionados.**

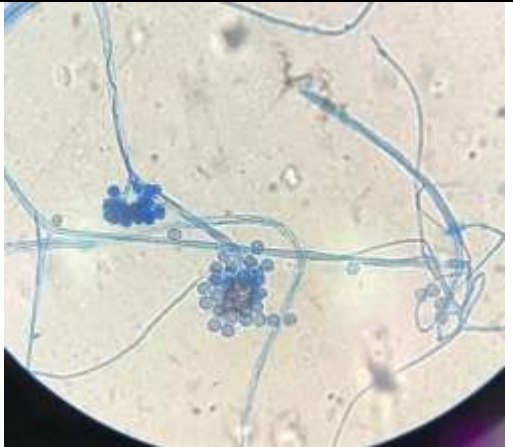
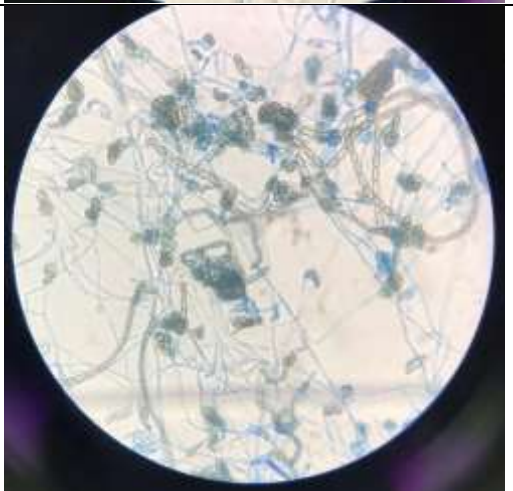
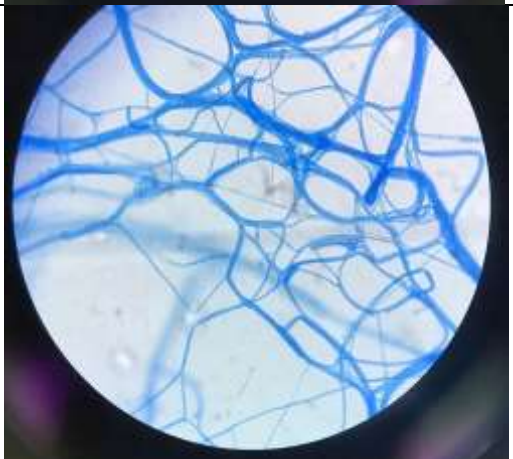
No	Codificación	Descripción microscópica	Fotografía
1	P14-4	Coco bacilos cortos no esporulados Gram positivos en racimo.	

2	PH6-1	Bacilos cortos Gram negativos no esporulados en racimo o cadena.	
3	P25	Bacilos cortos Gram negativos no esporulados en racimo o cadena.	
4	P19-3	Coco bacilos pequeños Gram negativos en cadenas no esporulados.	
5	P13-4	Cocobacilos Gram positivos no esporulados en cadena.	

6	P10-2	Bacilos largos y finos Gram negativos en racimo, no esporulados.	
7	PB14-2	Bacilos grandes Gram positivos con presencia de endospora, en cadena.	

**Tabla 4. Descripción microscópica de los aislados fúngicos promisorios seleccionados.**

No	Codificación	Descripción microscópica	Fotografía
1	PH14-3	Presencia de una gran cantidad de hifas y conidios.	

2	PH14-2	Presencia de conidios e hifas	
3	PH14-1	Presencia de una gran cantidad de hifas con clamidosporas oscuras conectadas entre ellas.	
4	PH15-2	Únicamente la presencia de hifas conectadas entre ellas.	

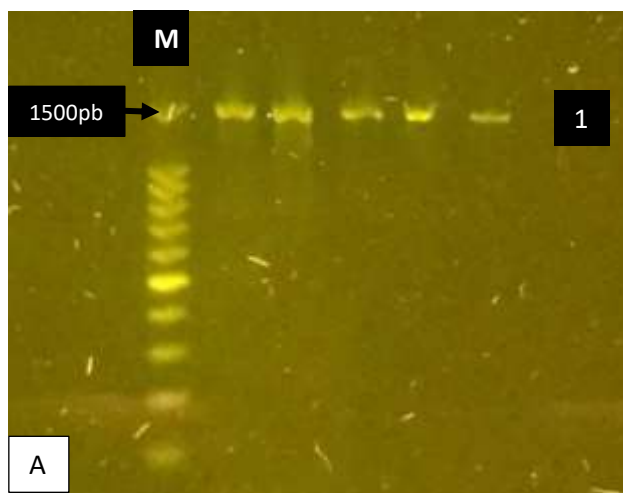
### 6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los valores de los hongos cumplieron con los supuestos del ANOVA con un nivel de significancia del 95%. Las medias y los resultados del ANOVA indican que cualquiera de los cuatro tratamientos puede utilizarse en igual medida como posibles controladores biológicos.

Los valores de las bacterias no cumplieron con los supuestos del ANOVA por lo que se realizó la prueba no paramétrica Chi cuadrado, en la que se indica que existe una diferencia significativa entre los tratamientos de las bacterias. La prueba Post hoc de Tukey (0.05) indicó que hay una diferencia en el promedio de las medias entre las bacterias *Bacillus cereus* (PB14-2) y *Serratia marcescens* (PH6-1), las bacterias *Serratia marcescens* (P25), *Nocardioides nitrophenolicus* (P14-4) y *Cupriavidus necator* (P19-3), y también la bacteria codificada como P13-4 y *Variovorax paradoxus* (P10-2).

#### 6.4.IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Las potenciales bacterias biocontroladoras se identificaron como: *Bacillus cereus* (PB14-2) con un porcentaje de identidad de 100%, *Serratia marcescens* (P25) con un porcentaje de identidad de 97%, *Serratia marcescens* (PH6-1) con un porcentaje de identidad de 98%, *Variovorax paradoxus* (P10-2) con un porcentaje de identidad de 100%, *Cupriavidus necator* (P19-3) con un porcentaje de identidad de 100% y *Nocardioides nitrophenolicus* (P14-4) con un porcentaje de identidad de 99%, la séptima bacteria codificada como P13-4 no fue secuenciada (Figura 13).



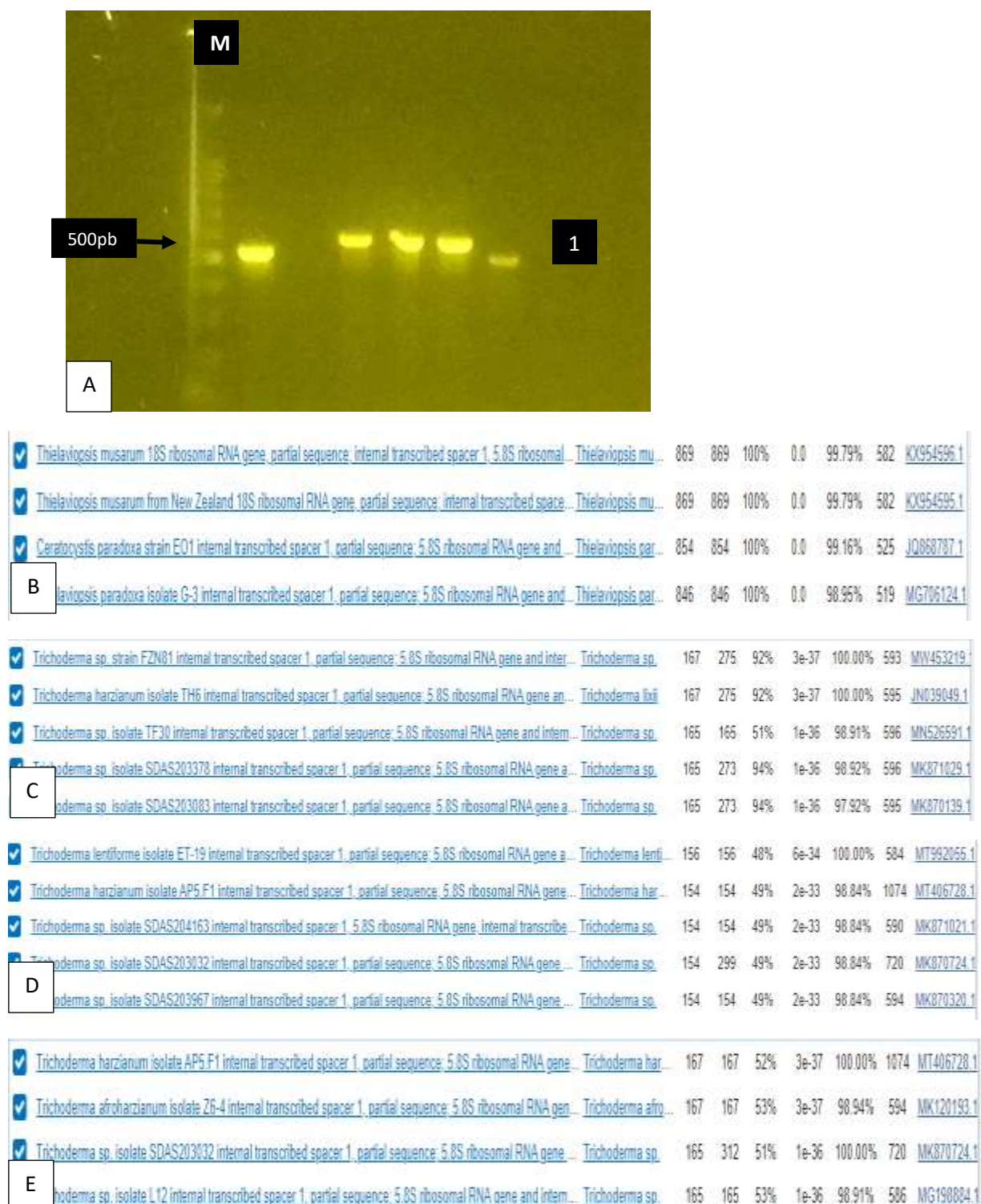
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain DE022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria)</a>	152	262	94%	7e-33	100.00%	1483	<a href="#">KY860717.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sp. YXA2-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sp. YXA2-17</a>	152	258	96%	7e-33	100.00%	1454	<a href="#">JF701934.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus cereus strain BXC19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus cereus</a>	150	150	50%	3e-32	100.00%	1466	<a href="#">MN227494.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacterium strain N5.20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">bacterium</a>	150	150	54%	3e-32	97.70%	1400	<a href="#">MH571509.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus cereus strain B19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus cereus</a>	150	247	88%	3e-32	100.00%	1453	<a href="#">KY115189.1</a>

<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Serratia marcescens strain NPKC3_2_21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	305	305	15%	7e-81	97.22%	802	<a href="#">MN691934.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Serratia marcescens strain NPKC3_2_14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	305	305	15%	7e-81	97.22%	1065	<a href="#">MN691928.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Serratia marcescens strain NPKC3_2_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	305	305	15%	7e-81	97.22%	1065	<a href="#">MN691926.1</a>
<b>C</b>	<a href="#">Serratia marcescens strain NPKC3_2_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	305	305	15%	7e-81	97.22%	1177	<a href="#">MN691920.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Serratia marcescens strain JIV-CZ2 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	440	3062	100%	3e-122	98.79%	4925622	<a href="#">CP055161.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Serratia marcescens strain S7.1 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	440	3084	100%	3e-122	98.79%	5008187	<a href="#">CP053572.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Serratia marcescens strain 3650 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	440	440	100%	3e-122	98.79%	1432	<a href="#">MT538443.1</a>
<b>D</b>	<a href="#">Serratia marcescens strain LY1 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	440	3084	100%	3e-122	98.79%	5171649	<a href="#">CP053918.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Variovorax paradoxus strain JZY4-58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Variovorax paradoxus</a>	213	380	89%	5e-51	100.00%	1430	<a href="#">MT102304.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Variovorax ginsengisoli strain QT-151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Variovorax ginsengisoli</a>	213	367	92%	5e-51	100.00%	1442	<a href="#">MT061093.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Variovorax boronicumulans strain BF2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Variovorax boronicumulans</a>	213	391	92%	5e-51	100.00%	1444	<a href="#">MT078666.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Variovorax paradoxus strain LrRB40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Variovorax paradoxus</a>	213	366	85%	5e-51	100.00%	1418	<a href="#">MN589611.1</a>
<b>E</b>	<a href="#">Variovorax sp. strain 679 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Variovorax sp.</a>	213	386	90%	5e-51	100.00%	1428	<a href="#">MG820623.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Cupriavidus necator JCM 11282 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Cupriavidus necator</a>	1866	1866	100%	0.0	100.00%	1454	<a href="#">LC507442.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Cupriavidus sp. strain ASb1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Cupriavidus sp.</a>	1866	1866	100%	0.0	100.00%	1455	<a href="#">MN589690.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Cupriavidus necator strain GX_5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Cupriavidus necator</a>	1866	1866	100%	0.0	100.00%	1452	<a href="#">MF959436.1</a>
<b>F</b>	<a href="#">Cupriavidus sp. strain WS2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Cupriavidus sp.</a>	1866	1866	100%	0.0	100.00%	1403	<a href="#">MG807349.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Nocardioides nitrophenolicus strain SP2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Nocardioides nitrophenolicus</a>	728	1309	96%	0.0	99.50%	1451	<a href="#">KX518603.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Nocardioides nitrophenolicus strain SP1b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Nocardioides nitrophenolicus</a>	728	1309	96%	0.0	99.50%	1457	<a href="#">KX518601.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pimeibacter sp. strain A1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Pimeibacter sp.</a>	728	1307	96%	0.0	99.50%	1404	<a href="#">KX086395.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pimeibacter simplex strain VKM Ac-20330 complete genome</a>	<a href="#">Pimeibacter simplex</a>	728	2599	96%	0.0	99.50%	5637360	<a href="#">CP009896.1</a>
<b>G</b>	<a href="#">Nocardioides aromaticovorans strain IC177 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Nocardioides aromaticovorans</a>	728	2748	96%	0.0	99.50%	5247736	<a href="#">CP022295.1</a>

**Figura 13. Identificación molecular de bacterias antagonistas.** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 95 voltios; M, marcador de peso molecular de 100pb; 1, cinco bandas amplificadas de la región 16S, con un peso similar a 1500pb. (B) Porcentaje de identidad del 100% para *Bacillus cereus*. (C) Porcentaje de identidad del 97% para *Serratia marcescens*. (D) Porcentaje de identidad del 98% para *Serratia marcescens*. (E) Porcentaje de identidad del 100% para *Variovorax paradoxus*. (F) Porcentaje de identidad del 100% para *Cupriavidus necator*. (G) Porcentaje de identidad del 99% para *Nocardioides nitrophenolicus*.

Los potenciales hongos biocontroladores se identificaron como: *Thielaviopsis musarum* (PH14-1) con un porcentaje de identidad de 99%, *Trichoderma harzianum* (PH14-2) con un porcentaje de identidad de 100%, *Trichoderma lentiforme* (PH14-3) con

un porcentaje de identidad de 100% y finalmente *Trichoderma harzianum* (PH15-2) con un porcentaje de identidad de 100% (Figura 14).



**Figura 14. Identificación molecular de hongos antagonistas.** (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 95 voltios; M, marcador de peso molecular de 100pb; 1, control positivo, control negativo y cuatro bandas amplificadas de la región ITS, con un peso

similar a 500pb. (B) Porcentaje de identidad del 99% para *Thielaviopsis musarum*. (C) Porcentaje de identidad del 100% para *Trichoderma harzianum*. (D) Porcentaje de identidad del 100% para *Trichoderma lentiforme*. (E) Porcentaje de identidad del 100% para *Trichoderma harzianum*.

## 7. DISCUSIÓN

La marchitez de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en el banano produce una enfermedad vascular que culmina con la necrosis de la planta, aunque ocurren diferentes ciclos de infección la mayoría de las infecciones se originan a partir de raíces secundarias y terciarias. Las clamidosporas son estimuladas para germinar por los nutrientes presentes en los exudados del suelo. Es por esto que, los microorganismos en el suelo juegan un papel importante en la supresión de enfermedades transmitidas por este medio, debido a que muchos de ellos tienen propiedades antagonistas (Pegg, Coates, Neill y Turner, 2019).

Según Bubici, Kausahl, Prodigallo, Gómez y Blanco (2019), la introducción de microorganismos biocontroladores en la rizosfera se asocia con resultados prometedores en estudios realizados en China. Los microorganismos endófitos generan diferentes soluciones al encontrarse dentro de la planta como, por ejemplo, mejorar la disponibilidad de nutrientes y modular la respuesta del hospedero frente a patógenos. En el mismo estudio se indica que el uso de estos microorganismos puede generar diferentes modos de acción frente al hongo fitopatógeno, principalmente puede provocar varios tipos de antagonismo directo al producir competencia de nutrientes y espacio, antibiosis, parasitismo y de esta manera producir también un antagonismo indirecto al aumentar la microbiota beneficiosa de la planta, promover su crecimiento e inducir la resistencia frente al patógeno.

Aislados bacterianos endofíticos y rizosféricos controlan esta enfermedad, al reducir el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *Fusarium*. Esto se consigue al aislar bacterias y otros microorganismos de la rizosfera, un microhábitat formado por raíces y suelo. También se evaluó los efectos combinados de consorcios microbianos, pues se reporta que en conjunto estos microorganismos pueden ser inhibidores efectivos contra *Fusarium* en estudios *in vitro* (Sekar, Raj y Prabavathy, 2016; Thangavelu y Muthukathan, 2015).

El antagonismo que generan bacterias y hongos endófitos de banano contra *Fusarium* se ha estudiado mediante la técnica de cultivo dual, para luego calcular el

Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR). En estos estudios se concluye que, tanto *in vitro* como *in vivo*, los endófitos pueden utilizarse como medida de control biológico contra *Fusarium* (Araya, Varela y Torres, 2019; Kumar, Bhattacharyya, Chandra, Dinesh y Swamy, 2021)

El aislamiento de hongos se realizó con el uso de agar PDA y agar MEA y esto permitió observar hongos con diferentes características macroscópicas. Según Pingolia, Maheshwari, Vaishnav, Sharma y Mehta (2013), el uso de estos dos agares permite identificar diferencias en el crecimiento del micelio de hongos y así aislar una mayor cantidad de hongos esto debido a los nutrientes que posee cada medio de cultivo. El uso de PDA es bastante común en el aislamiento de hongos debido a que su formulación simple facilita el crecimiento de una gran variedad de hongos (Zhiqiang, 2005). Por otro lado, en MEA según McClenny (2005), el uso del extracto de malta puede aumentar la tasa de crecimiento y la producción de conidios en ciertos hongos.

Para el aislamiento de bacterias se utilizó el agar nutritivo, el agar 523 y agar 523 diluido para proporcionar diferentes nutrientes y aislar varios tipos de bacterias. La dilución del medio 523 permitió aislar colonias con características macroscópicas de actinobacterias conocidos por ser controladores biológicos. Según Wang, Xue, Ma, Wei y Chen (2014), al diluir el medio de cultivo una décima parte de su concentración inicial se puede aislar más fácilmente actinomicetos de muestras de suelo.

Se seleccionó a las potenciales bacterias y hongos biocontroladores según el estudio realizado por Comby, Gacoin, Robineau, Rabenoelina, Ptas, Dupont, Profizi y Baillieul (2017), en el que obtuvieron el PICR con un intervalo de 51-30% en estudios *in vitro* y observaron que estos porcentajes presentan resultados eficaces de inhibición frente a *Fusarium* spp.

La amplificación de la región ITS del ADN ribosomal en los hongos se realizó debido a que esta región de ADN se encuentra en una de las regiones altamente conservadas de los genes (Bellemain, Carlsen, Brochmann, Coissac, Taberlet y Kauserud, 2010). Los resultados obtenidos en el NCBI mostraron 100% de identidad en todos los aislados del hongo *Trichoderma*, en el hongo identificado como *Thielaviopsis musarum* se obtuvo un porcentaje de identidad de 99%.

En las bacterias se realizó la amplificación de la región 16S del ADN ribosomal debido a que es una región altamente conservada de los genes (Shen y Fulthorpe, 2015). Los resultados obtenidos en el NCBI mostraron diferentes porcentajes de identidad en las siete bacterias, desde 97% hasta 100%. De acuerdo con Edgar (2018), se considera que el umbral de 97% de identidad es un parámetro convencional que corresponde a la identificación de especies en secuencias genéticas.

En el tamizaje de hongos se obtuvieron tres aislados del género *Trichoderma* con PICR entre 40% y 50%. En el estudio realizado por Taribuka, Wibowo, Widyastuti y Sumardiyo (2017) generaron porcentajes de inhibición entre 49.67 y 60.61% con diferentes cepas endófitas de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum*, concluyendo que no todas las cepas de *Trichoderma* son capaces de inhibir de la misma manera a *F. oxysporum* y por eso se obtienen diferentes porcentajes de inhibición según la cepa de *Trichoderma* que se esté utilizando. En el estudio publicado por Bubici, Kausahl, Prodigallo, Gómez y Blanco (2019) se menciona que el género *Trichoderma* puede generar una gran cantidad de proteínas extracelulares, enzimas como celulasa y quitinasa y metabolitos con propiedades antibióticas. También generan micoparasitismo frente a diferentes hongos fitopatógenos e inducen la resistencia de la planta.

Otro hongo obtenido en el tamizaje fue *Thielaviopsis musarum* con 40% de inhibición frente a *F. oxysporum*. Este hongo es conocido por producir la pudrición de la corona, una enfermedad postcosecha en el banano (Pereira, Da Silva, Aguiar, Intra, Franca, Alcantara, Alves y Liparini, 2016), por lo que no sería recomendable utilizar este hongo vivo como biocontrolador. En vista de que este hongo proviene de la rizosfera como *Trichoderma*, un hongo del cual se han caracterizado sus metabolitos con actividad antimicrobiana, lo recomendable sería identificar y caracterizar los metabolitos secundarios de *Thielaviopsis musarum* encargados de inhibir a *F. oxysporum* para así poder utilizarlo como biocontrolador en estudios *in vivo* (Vanegas, Marín y Calle, 2019).

Las dos cepas de *Serratia marcescens*, presentaron 50% y 43% de inhibición frente a *F. oxysporum*. De acuerdo con Jimtha, Jishma, Sreelekha, Chithra y Radhakrishnan (2017) el género *Serratia* se reporta por sus propiedades biocontroladoras frente a diferentes fitopatógenos, entre esos *Fusarium oxysporum*, debido a que esta bacteria se encuentra en la rizosfera, y, por lo tanto, se considera que es capaz de colonizar las raíces de la planta y de esta manera su supervivencia en el suelo como agente

biocontrolador es mayor. Dhar, Mangar, Saha y Saha (2018) indican que este género bacteriano puede producir varias enzimas hidrolíticas como quitinasa, proteasa, lipasa y celulasa contra diferentes hongos fitopatógenos.

La bacteria *Bacillus cereus* generó 44% de inhibición frente a *F. oxysporum*. Varias especies de *Bacillus* han demostrado ser agentes biocontroladores contra fitopatógenos y a su vez se los ha identificado como bacterias promotoras del crecimiento en las plantas (PGPR por sus siglas en inglés). De igual manera se analiza consorcios entre *Bacillus cereus* con otras bacterias antagonistas y se reporta que disminuyen el porcentaje de plantas infectadas de banano por *Fusarium* y a su vez aumentan la cantidad de producción (Ramírez, Martínez, Bustillos, Catañeda, Munive y Baez, 2021; Thangavelu y Muthukathan, 2015). El género bacteriano *Bacillus* presenta una ventaja frente a otros microorganismos biocontroladores y es la producción de esporas, esto le confiere la capacidad de tolerar las diversas condiciones medioambientales y en el momento de producir un biocontrolador comercial es más estable durante más tiempo, también presenta la habilidad de sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios que influyen en la antibiosis contra fitopatógenos (Bubici, Kausahl, Prodigallo, Gómez y Blanco, 2019)

La bacteria *Variovorax paradoxus* provocó 40% de inhibición frente al hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. Según Hong, Hee, Hyun, Jeong y Mee (2017) esta es una bacteria endófito promotora del crecimiento que tiene la capacidad de degradar diferentes contaminantes medioambientales, también se observa que posee mecanismos antimicrobianos frente a fitopatógenos bacterianos. Sin embargo, un estudio realizado por Besset, Joly, Brutel, Gerin, Soudierey y Langing (2019) indica, que, aunque en la literatura actual no se conoce la capacidad antagonista del género bacteriano *Variovorax* frente a hongos fitopatógenos de igual manera se podría utilizar esta bacteria en biocontrol por su capacidad protectora hacia la planta.

La bacteria *Cupriavidus necator* produjo 43% de inhibición frente a *F. oxysporum*. Es un bacilo corto Gram negativo que se lo puede encontrar en suelos y aguas, posee metabolitos heterótrofos y litoautotróficos dependiendo de las condiciones medioambientales en las que se encuentre. Además, se reporta su capacidad de transformar biológicamente sustancias químicas como el etanol (Jung, Son, Young, In, Baritugo, Geol, Choi, Taek, Chan y Jae, 2017). Aunque no existe mucha información en

cuanto a la capacidad antagonista de la bacteria *Cupriavidus necator*, un estudio realizado por Khaskheli, Wu, Chen, Chen, Hussain, Song, Liu y Feg (2020), indica que especies del género *Cupriavidus* han presentado potencial antagonista frente a fitopatógenos fúngicos que atacan al arroz al inhibir el crecimiento del micelio.

La última bacteria identificada molecularmente fue *Nocardioides nitrophenolicus* que presentó 42% de inhibición frente a *F. oxysporum*. Es una actinobacteria Gram positiva conocida en la biotecnología por su capacidad de degradar fenoles, principalmente se la aísla de aguas residuales, pero también de suelos y sedimentos marinos (Singh, Du, Trinh, Won, Yang, Ying, Kook y Yi, 2016; Yoon, Cho, Lee, Suzuki, Nakase y Park, 1999). Según Wassermann, Korsten y Berg (2021) el género *Nocardioides* puede tener actividad antagonista frente a hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*. En el estudio publicado por Lazcano, Boyd, Holmes, Hewavitharana, Pasulka e Ivors (2021) se identifica que existe una mayor abundancia del género *Nocardioides* en cultivares de fresa resistentes a *Fusarium oxysporum*, también indican que la presencia de esta actinobacteria en cultivos de banano está relacionada con la disminución del hongo fitopatógeno y el aumento del crecimiento de la planta.

Los análisis estadísticos realizados indicaron que cualquiera de los tratamientos de los hongos puede utilizarse en igual medida como posibles controladores biológicos. En las bacterias se evidenció que los tratamientos con mejores medias son los de las bacterias *Bacillus cereus* (PB14-2) y *Serratia marcescens* (PH6-1)

La última bacteria con características morfológicas de actinobacteria presentó 40% de inhibición frente a *Fusarium oxysporum*, lamentablemente no fue posible obtener su identificación molecular.

## 8. CONCLUSIONES

Los hongos *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma harzianum* y *Thielaviopsis musarum* presentaron porcentajes de inhibición similar, igual o superior a 40% lo que indica que pueden utilizarse en futuros estudios *in vivo* tanto en forma individual como en consorcio como posibles controladores biológicos frente al hongo fitopatógeno *F. oxysporum*.

Las cepas de *Serratia marcescens*, y *Bacillus cereus* presentaron mayor porcentaje de inhibición. Se recomienda identificar molecularmente a la séptima bacteria (actinobacteria) debido a su potencial inhibición frente a *Fusarium oxysporum*.

El presente estudio evidenció la capacidad biocontroladora de cuatro hongos y siete bacterias aislados de la rizosfera de cultivos de banano, los resultados obtenidos al enfrentar estos microorganismos *in vitro* frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. raza 1 fueron favorables por lo que podrían ser utilizados en futuros estudios frente a otras razas de *Fusarium oxysporum*.

## 9. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es producto de la colaboración y apoyo del proyecto “Iniciativa *Fusarium*, una plataforma multipropósito para la prevención y manejo de la fusariosis Raza 4 tropical en Ecuador- Fase I: Efectividad de productos desinfectantes y análisis de microbiomas asociados a banano” con código CEPRA XIV-2020-06 Iniciativa *Fusarium*; ganador de la XIV Convocatoria CEPRA 2019.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebayo, O., Suanu, S., Olalekan, E., Onyeneoyiza, R., Eguye, E. y Makun, A. (2019). Biosorción de suelos contaminados con metales pesados utilizando bacterias y hongos aislados del suelo. *Springer Nature Ciencias Aplicadas*, 1 (857). DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0879-4>
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D. (1990). Herramienta básica de búsqueda de alineación local. *Elsevier*, 215 (3), 403-410. DOI: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Aragón, S. y Beltrán, C. (2019). Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga. En A.M. Cotes (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros* (852-877). Mosquera, Colombia: Agrosavia. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Sandra-Aragon/publication/335635615\\_Endophytic\\_fungi\\_in\\_biological\\_control\\_of\\_phytopathogens\\_and\\_insect\\_pests/links/5d712b8d92851cacdb2248c7/Endophytic-fungi-in-biological-control-of-phytopathogens-and-insect-pests.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sandra-Aragon/publication/335635615_Endophytic_fungi_in_biological_control_of_phytopathogens_and_insect_pests/links/5d712b8d92851cacdb2248c7/Endophytic-fungi-in-biological-control-of-phytopathogens-and-insect-pests.pdf)
- Araya, C., Varela, I. y Torres, S. (2019). Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*). *Agromonía Mesoamericana*, 30 (2), 381-393. DOI:10.15517/am.v30i2.32653
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P. y Kausserud, H. (2010). ITS como código de barras ambiental de ADN para hongos: un enfoque *in silico* revela posibles sesgos de PCR. *BMC Microbiología*, 10 (189). DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>

- Belmonte, A., Nogueras, M., Contigiani, M., Gandini, V. y Sutich, E. (2008). Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Revista Bioquímica y Patológica Clínica*, 72 (2). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/651/65112134003.pdf>
- Ben, H., Cherif, H., Chenari, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F., Luptakova, L., Ali, M., Vallat, A., Oszako, T., Rateb, M. y Belbahri. (2019). Screening de bacterias antagonistas de *Fusarium* en nichos contrastantes al endófito *Bacillus halotolerans* como guardián de la planta contra *Fusarium*. *Fronteras en Microbiología*, 9, 1-24. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03236
- Besset, Y., Joly, P., Brutel, A., Gerin, A., Soudierey, O. y Langing, T. (2019). ¿La selección *in vitro* de agentes de biocontrol garantiza el éxito de la planta? Un caso de estudio de protección del trigo contra el tizón de las plántulas por *Fusarium* por bacterias del suelo. *Más uno*, 14 (2). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225655>
- Bubici, G., Kausahl, M., Prodigallo, M., Gómez, C. y Blanco J. (2019). Agentes de control biológico contra la marchitez por *Fusarium* del banano. *Fronteras en Microbiología*, 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00616
- Chandra, A. y Thomas, P. (2015). Aislamiento e identificación de bacterias endófitas asociadas a la punta de los brotes de plátano cv. Grand Naine y pruebas de actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Revista estadounidense de ciencias vegetales*, 6, 943-954. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.67101>
- Chen, Y., Lee, C., Lin, Y., Min, K., Ho, C. y Liu, T. (2015). Diseño y evaluación de cebadores de PCR para amplificar fragmentos de ADN ribosómico 16S bacterianos utilizados para la toma de huellas dactilares de la comunidad. *Métodos microbiológicos*, 44 (3), 253-262. DOI: [doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00220-2](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00220-2)
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, M., Ptas, S., Dupont, J., Profizi, C. y Baillieul, F. (2017). Detección de endófitos de trigo como agentes de control biológico contra el tizón de la espiga por *Fusarium* utilizando dos pruebas *in vitro* diferentes. *Investigación microbiológica*, 22, 11-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.014>
- Dhar, G., Mangar, P., Saha, A. y Saha, D. (2018). Evaluación de la eficiencia del biocontrol de una cepa de *Serratia marcescens* autóctona de la rizosfera del té para el tratamiento de la pudrición de la raíz en el té. *Plos One*, 13 (2). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191761>
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. y Staver, C. (2018). Marchitez por *Fusarium* en banano: conocimientos actuales sobre epidemiología y necesidades de investigación para el manejo sostenible de enfermedades. *Fronteras en la ciencia de las plantas*, 9, 1-21. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- Edgar, R. (2018). Actualización del umbral de identidad del 97% para las OTU de ARN ribosomal 16S, *Bioinformática*, 34 (14), 2371-2375. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty113>
- García, F., Pachacama, S., Jarrín, D., Iza, M., Ayala, M., Emiro, H., Dix, O., Echegaray, J., Farfán, D., Bartolini, I., Beltran, C. y Zeballos, G. (2020). *Guía Andina para el Diagnostico de Fusarium Raza 4 Tropical (R4T) Fusarium oxysporum f.sp. cubense (syn. Fusarium odoratissimum) agente causal de la marchitez por Fusarium en musáceas (plátanos y bananos)*. Lima, Perú: Secretaria General de la Comunidad Andina.

Recuperado de:  
<http://www.comunidadandina.org/StaticFiles/202072181721Guia%20Andina%20Final.pdf>

- Hong, C., Hee, S., Hyun, I., Jeong, H. y Mee, J. (2017). Proyecto de secuencia del genoma de la bacteria endófito *Variovorax paradoxus* KB5, que tiene actividad antagonista contra un fitopatógeno, *Pseudomonas syringae* pv. Tomate DC3000. *Prokaryotes*, 5 (36). DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00950-17>
- Jimtha, C., Jishma, P., Sreelekha, S., Chithra, S. y Radhakrishnan, E. (2017). Propiedades antifúngicas de *Serratia* sp. rizosférica productora de prodigiosina. *Rizosfera*, 3 (1). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.02.003>
- Jung, Y., Son, J., Young, S., In, J., Baritugo, K., Geol, J., Choi, J., Taek, H., Chan, J. y Jae, S. (2017). El quimioautótrofo *Cupriavidus necator* como un factor de cambio potencial para el calentamiento global y el problema de los desechos plásticos: una revisión. *Tecnología bioambiental*, 340. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125693>
- Kaushal, M., Mahuku, G. y Swennen, R. (2020). Perspectivas metagenómicas del microbioma colonizador de raíces asociado con banano sintomáticos y no sintomáticos en campos infectados con marchitez por *Fusarium*. *Plantas*, 9 (263), 1-18. DOI:10.3390/plants9020263
- Khaskheli, M., Wu, L., Chen, G., Chen, L., Hussain, S., Song, D., Liu, S. y Feg, G. (2020). Aislamiento y caracterización de endófitos bacterianos asociados a raíces y su potencial control biológico contra los principales fitopatógenos fúngicos del arroz. *Patógenos*, 9 (172). DOI:10.3390/pathogens9030172
- Kumar, A., Bhattacharyya, A., Chandra, R., Dinesh, K. y Swamy, N. (2021). Ejemplificando endófitos de banano (*Musa paradisiaca*) por su papel potencial en la estimulación del crecimiento y el manejo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* que causa la enfermedad de Panamá. *Folia Microbiología*. DOI: [org/10.1007/s12223-021-00853-5](https://doi.org/10.1007/s12223-021-00853-5)
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016). MEGA 7: Análisis de la genética evolutiva molecular versión 7.0 para conjuntos de datos más grandes. *Biología molecular y evolución*, 33 (7), 1870-1874. DOI:10.1093/molbev/msw054
- Ladino, O., Rubio, J. y Chacin, A. (2016). Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite. *Centro agrícola*, 43 (2). Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v43n2/cag05216.pdf>
- Lazcano, C., Boyd, E., Holmes, G., Hewavitharana, S., Pasulka, A. e Ivors, K. (2021). El microbioma de la rizosfera juega un papel en la resistencia a los patógenos del suelo y la absorción de nutrientes de los cultivares de fresa en condiciones de campo. *Informes científicos*, 11 (3188). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82768-2>
- Li, Y., Sun, R., Saravanakumar, K. y Chen, J. (2015). Potencial antagonista y de biocontrol de *Trichoderma asperellum* ZKSX5003 contra el patógeno de la pudrición del tallo de maíz *Fusarium graminearum*. *Revista India de Microbiología*, 56 (3), 318-327. DOI 10.1007/s12088-016-0581-9
- Magdama, F. (2019). *Fusarium oxysporum*- el hongo más temido en la industria del banano. *Ecuador es calidad*, 6, 19-22. Recuperado de:

<https://revistaecuadoreaescalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadoreaescalidad/index.php/revista/article/view/61/137>

- Magdama, F., Moserrate, L., Serrano, L., García, J. y del Mar, M. (2020). Diversidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, el patógenos de la marchitez por *Fusarium* del banano en Ecuador. *Plantas*, 9, 1-18. DOI:10.3390/plants9091133
- Maldonado, A., López, L., Lores, S. y Osorio, E. (2017). Identificación morfológica de hongos y bacterias en lodos de extracción de gas natural y de tratamiento de aguas residuales. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 21 (62), 3-12. Recuperado de: [http://www.utm.mx/edi\\_anteriores/temas62/T62\\_1E1\\_Identificacion%20morfologica%20de%20hongos%20y%20bacterias.pdf](http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas62/T62_1E1_Identificacion%20morfologica%20de%20hongos%20y%20bacterias.pdf)
- Martínez, G., Rey, J., Pargas, R. y Manzanilla, E. (2020). Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana*, 31 (1), 259-276. DOI: org/10.15517/am.v31i1.37925
- McClenny, N. (2005). Detección e identificación de laboratorio de especies de *Aspergillus* mediante observación microscópica y cultivo: el enfoque tradicional. *Micología médica*, 43 (1). DOI: <https://doi.org/10.1080/13693780500052222>
- Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F. y Núñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *Agropecuaria y forestal*, 3 (2), 11-16. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/276355354\\_Aislamiento\\_de\\_cepas\\_de\\_Trichoderma\\_de\\_suelos\\_sustratos\\_y\\_raices\\_de plantas\\_en\\_invernaderos\\_en\\_la\\_Republica\\_Dominicana](https://www.researchgate.net/publication/276355354_Aislamiento_de_cepas_de_Trichoderma_de_suelos_sustratos_y_raices_de plantas_en_invernaderos_en_la_Republica_Dominicana)
- Pegg, K., Coates, L., Neill, W. y Turner, D. (2019). La epidemiología de la marchitez por *Fusarium* en el banano. *Fronteras en la ciencia de las plantas*, 10, 1-19. DOI: 10.3389/fpls.2019.01395
- Pereira, M., Da Silva, K., Aguiar, J., Intra, S., Franca, F., Alcantara, F., Alves, E. y Liparini, O. (2016). *Thielaviopsis musarum* causa la pudrición de la corona y la fruta postcosecha del banano en el noreste de Brasil. *Patología de plantas tropicales*, 4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0094-4>
- Pingolia, P., Maheshwari, R., Vaishnav, N., Sharma, P. y Mehta, J. (2013). Crecimiento de micelio de *Trichoderma viride* (agente de control biológico) en diferentes medios de cultivo. *Revista internacional de biotecnología reciente*, 1 (1). Recuperado de: <http://www.ijrbp.net/form/2013%20Volume%201,%20issue%201/IJRB-2013-1-1-43-47.pdf>
- Promega. (2017). *Escalera de ADN 100pb*. Recuperado de: <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight%20markers/100bp-dna-ladder/?catNum=G2101>
- Promega. (2019). *Manual técnico del kit de purificación de ADN genómico*. Recuperado de: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>
- Promega. (2021). *PCR Master Mix*. Recuperado de: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/taq-polymerase/master-mix-pcr/?catNum=M7502>

- Ragavi, G., Muthamilan, M., Nakkeeran, S., Kumaravadivel, U. y Suganthi, A. (2019). Caracterización fenotípica y molecular de bacterias endófitas aisladas de banano. *Revista actual de ciencia y tecnología aplicadas*, 38 (6), 1-10. DOI: 10.9734/CJAST/2019/v38i630402
- Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos, M., Catañeda, D., Munive, J. y Baez, A. (2021). *Bacillus cereus* MH778713 provoca la protección de la planta de tomate contra *Fusarium oxysporum*. *Microbiología aplicada*, 1. DOI: 10.1111/jam.15179.
- Sánchez, H., Reyes, C. y Mejía, K. (2018). *Manual de términos en investigación científica, tecnológica y humanística*. Lima, Perú: Universidad Ricardo Palma. Recuperado de: <https://www.urp.edu.pe/pdf/id/13350/n/libro-manual-de-terminos-en-investigacion.pdf>
- Sekar, J., Raj, R. y Prabavathy, V. (2016). Consorcio microbiano para la agricultura sostenible: comercialización y regulaciones en la India. *Ciencia Springer + Medios comerciales*, 113, 107-131. DOI: 10.1007/978-981-10-2576-1\_7
- Shen, S. y Fulthorpe, R. (2015). Variación estacional de endófitos bacterianos en árboles urbanos. *Fronteras en microbiología*, 6 (427). DOI: 10.3389/fmicb.2015.00427
- Singh, H., Du, J., Trinh, H., Won, K., Yang, J., Ying, C., Kook, M. y Yi, T. (2016). *Nocardioides albidus* sp. nov., una actinobacteria aislada del suelo del jardín. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*, 66. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000730>
- Taribuka, J., Wibowo, A., Widyastuti, S. y Sumardiyono, C. (2017). Potencial de seis aislados endófitos de *Trichoderma* como agentes de biocontrol contra el marchitamiento por *Fusarium* en el banano. *Revista de gestión de terrenos degradados y mineros*, 4 (2). DOI:10.15243/jdmlm.2017.042.723
- Thangavelu, R. y Muthukathan, G. (2015). Supresión de campo de la enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* en banano mediante la aplicación combinada de aislados bacterianos endofíticos y rizosféricos nativos que poseen múltiples funciones. *Phytopathologia Mediterranea*, 54 (2), 241-252. DOI: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-15160
- ThermoScientific. (2015). *NanoDrop 2000/ 2000c espectrofotómetros*. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/brands/thermo-scientific.html>
- Vanegas, A., Marín, A. y Calle, J. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades biológicas*, 41 (111). DOI: 10.17533/udea.acbi.v41n111a02
- Wang, D., Xue, Q., Ma, Y., Wei, X. y Chen, J. (2014). La oligotrofia es útil para el aislamiento de Actinomicetos bioactivos. *Asociación de microbiología de India*, 54 (2). DOI 10.1007/s12088-014-0444-1
- Wassermann, B., Korsten, L. y Berg, G. (2021). Sanidad vegetal y vibración Sonora: análisis de las implicaciones del microbioma en las hojas de vino de uva. *Patógenos*, 10 (63). DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens 10010063>
- White, T., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). *Amplificación y secuenciación directa de genes de ARN ribosómico fúngico para filogenia*. Estados Unidos: Prensa Académica. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/223397588\\_White\\_T\\_J\\_T\\_D\\_Bruns\\_S\\_B\\_Le](https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Le)

[e and J W Taylor Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics](#)

- Yoon, J., Cho, Y., Lee, S., Suzuki, K., Nakase, T. y Park, Y. (1999). *Nocardioides nitrophenolicus* sp. nov., una bacteria que degrada el *p*-nitrofenol. *Revista Internacional de Bacteriología Sistémica*, 49. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-675>
- Zapata, S., Henao, M., Patiño, L., Sánchez, J. y Hoyos, M. (2019). Hongos endófitos en banano manzano afectados por *Fusarium*. *Publicaciones académicas*, 14 (7), 430-438. DOI: 10.5897/AJAR2018.13736
- Zhiqiang, A. (2005). *Manual de micología industrial*. Nueva York, Estados Unidos: Micología. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=GXumDwAAQBAJ&pg=PT236&dq=mycology+pda+agar&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiwir2hzL70AhUbnWoFHdUPCq4Q6AF6BAgLEAI#v=onepage&q=mycology%20pda%20agar&f=false>
- Zurita, J., Márquez, H., Novales, H. y Villacís, M. (2018). Estudios experimentales: diseños de investigación para la evaluación de intervenciones en la clínica. *Alergia México*, 65 (2), 178-186. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ram/v65n2/2448-9190-ram-65-02-178.pdf>