
**Efecto de la inoculación bacteriana a nivel
radicular sobre el crecimiento y la sanidad
de plantas de banano**

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme nacer bajo el calor de una familia unida que cada día me ha impulsado a vivir de manera única y me ha apoyado en todas las dificultades que en la vida se me han presentado. A mi madre, por ser el motor de mi vida y el punto de partida para todo lo que me he propuesto realizar, sus consejos, sabiduría y calma me han guiado para desarrollarme como la mujer que soy. A mi padre que me ha acompañado desde el cielo, pero su presencia se siente inmensamente en mi corazón siempre. Mis hermanos Luis Fernando, Jorge Andrés y Sergio por ser los cómplices de mi vida, el apoyo incondicional, la palabra adecuada en cada momento y el ejemplo más puro a seguir como personas. Agradecimientos muy especiales para mi asesora Gisell, quien ha sido la persona más indicada que Dios pudo haberme asignado para este reto pues su paciencia, inteligencia, constancia, empatía y perseverancia han sido indispensables para culminar este proceso. Así mismo, me siento agradecida por mis amigos Javier Espitia, Luisa Velásquez, Luisa Valencia, Valentina Grisales, Alejandra Serna, Jeiko Londoño y Andrés Gómez, quienes me han acompañado en diferentes momentos de la carrera universitaria, siendo todos un apoyo inmenso para finalizar esta etapa de mi vida. Por último, agradecimientos a la Universidad EAFIT, especialmente a Valeska Villegas, Luisa Posada, Javier Correa, Sigifredo Cárdenas, Jhon Jairo Estrada, Mauricio Londoño y Edgar Arbelaez por el apoyo constante y desinteresado en los momentos requeridos.

Efecto de la inoculación bacteriana a nivel radicular sobre el crecimiento y la sanidad de plantas de banano

Susana Restrepo Gutiérrez ^a, Valeska Villegas-Escobar ^b, Gisell Adriana García Giraldo ^c

^a Estudiante de Biología. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia, Colombia

^b Asesor. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia, Colombia

^c Asesor principal. Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia, Colombia. e-mail: ggarciag@eafit.edu.co

Resumen

Objetivo La inoculación bacteriana de plántulas de banano micropropagadas se ha planteado como una estrategia para mejorar su crecimiento y desarrollo, así como para la reducción del impacto de enfermedades causadas por fitopatógenos. Esta investigación consistió en evaluar el efecto de la inoculación *in vitro* de raíces de plantas de banano en la promoción de crecimiento y la severidad de la enfermedad de alto impacto Sigatoka Negra causada por *Pseudocercospora fijiensis* en la etapa vegetativa juvenil de las plantas bajo condiciones de invernadero.

Métodos Plántulas de banano variedad Williams micropropagadas fueron inoculadas en raíces con bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Las variables de promoción de crecimiento se midieron en dos ensayos, en el primero se determinó la velocidad de crecimiento 149 ddi y en el segundo se midió la velocidad de crecimiento, peso húmedo y peso seco 185 ddi. Para determinar el efecto en la sanidad vegetal, las plantas fueron infectadas en la hoja No. 1 con *P. fijiensis* y se determinó el porcentaje de área necrosada 179 ddi bacteriana.

Resultados Las cepas *Bacillus subtilis* EA-CB0575 y *Pseudomonas fluorescens* EA-ED0588 revelaron un efecto significativo en la promoción de crecimiento donde las plantas tratadas presentaron un aumento del 99 % (*B. subtilis* EA-CB0575) y 120 % (*P. fluorescens* EA-ED0588) en peso húmedo total y, 87 % (*B. subtilis* EA-CB0575) y 116 % (*P. fluorescens* EA-ED0588) en peso seco total, respecto al control. Así mismo, estas cepas demostraron su capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y la posibilidad de producir lipopéptidos. Los tratamientos *Bacillus pumilus* EA-CB0177, *Bacillus subtilis* EA-CB0575, *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 y *Pseudomonas fluorescens* EA-ED0588 redujeron significativamente la severidad de la Sigatoka Negra.

Conclusión La inoculación de plantas de banano a nivel *in vitro* con cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* tuvo un efecto significativo sobre la velocidad de crecimiento y reducción de la severidad de la enfermedad foliar causada por el hongo *P. fijiensis*, sugiriendo una inducción de resistencia sistémica por tratarse de un efecto sobre un tejido distante.

Palabras claves Promoción de crecimiento vegetal, Sigatoka Negra, ISR, lipopéptidos, rizosfera

Introducción

Los cultivos agrícolas constantemente afrontan grandes desafíos asociados a la disminución de su productividad. Entre las principales causas se encuentran las enfermedades originadas por agentes biológicos como los hongos, oomicetos, virus y bacterias, las cuales pueden generar una disminución de su productividad entre el 20 y el 40%, y con ello generar pérdidas económicas que a nivel mundial se estiman en 220 billones de dólares ([Rahman, Singh, Pieterse, & Schenk, 2018](#)).

Entre los cultivos afectados por los fitopatógenos se encuentra el cultivo de banano, considerado fundamental para la economía de muchos países en desarrollo así como un alimento básico para millones de personas alrededor del mundo, además de ser la fruta fresca más exportada en cuanto a volumen y valor ([Vázquez-Euán et al., 2019](#)). Uno de los patógenos que más impacta su cultivo es el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, causante de la enfermedad Sigatoka Negra considerada la enfermedad foliar más limitante y destructiva en la producción de musáceas a nivel mundial ([Friesen, 2016](#)). Dicha enfermedad ha sido controlada, además de prácticas culturales, mediante tratamientos químicos aumentando en la actualidad el consumo de fungicidas que, para este cultivo, se ubican entre los insumos agrícolas más utilizados a nivel mundial, alcanzando un gasto aproximado de \$1.000 USD/ha al año para grandes plantaciones ([Friesen, 2016](#)). Aunque el empleo de productos químicos mejora la calidad de los cultivos y aumenta la producción agrícola, generan una afectación del medio ambiente y un aumento inevitable de la resistencia de los microorganismos patógenos frente a los fungicidas ([Rahman et al., 2018](#)).

En los últimos años se han planteado diversas alternativas para minimizar los impactos negativos asociados a la aplicación de agentes químicos en la agricultura. Una opción que ha presentado un interesante potencial para ser implementada en el control es el empleo de microorganismos ([Berg et al., 2017](#)), los cuales pueden mitigar las afectaciones de los fitopatógenos a través de mecanismos como la competencia por espacio, producción de compuestos antimicrobianos, enzimas líticas, degradación de factores de virulencia, inducción de resistencia, entre otros ([Van Loon, 2007](#)). Sin embargo, la efectividad de estos tratamientos aun no es comparable con el tratamiento químico, debido a que el éxito en los sistemas con agentes biológicos depende de múltiples factores que involucran el estrés biótico o abiótico del área de cultivo entre los que se pueden mencionar suelos pobres en nutrientes, alta salinidad, altas temperaturas, presencia de pesticidas, enfermedades, entre otros ([Bach-Pages, Castello, & Preston, 2017](#)).

La aplicación de inóculos bacterianos en el compartimiento de la rizosfera ha sido una de las estrategias ampliamente estudiadas. Principalmente las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), han demostrado sus efectos como biofertilizantes y bioestimulantes, que promueven y mejoran el crecimiento de la planta, además de controlar fitopatógenos ([Parray et al., 2016](#)). Este grupo de bacterias abarca algunas especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas* de las cuales se han determinado mecanismos de acción directos e indirectos que involucran la captación de nutrientes, modulación de los niveles de hormonas vegetales, producción de lipopéptidos, competencia de espacio y nutrientes en la rizosfera e inducción de resistencia sistémica (ISR) ([Harish et al., 2008](#); [Parray et al., 2016](#); [Posada-Uribe, Correa-Álvarez, Romero-Tabarez, De-Bashan, & Villegas-Escobar, 2018](#)). Las plantas pueden beneficiarse de una variedad de procesos únicos o incluso de la combinación de estos ([Bhattacharyya & Jha, 2012](#)); por esta razón, el conocimiento de la interacción planta-microorganismo es de alta importancia para la aplicación efectiva de productos biológicos en la práctica agrícola ([Veselova, Maksimov, & Nuzhnaya, 2015](#)).

La introducción artificial de microorganismos beneficiosos en los sistemas masivos de producción de plantas puede ofrecer protección desde las primeras etapas de crecimiento y extender la vida útil del material de siembra ([Nowak & Shulaev, 2003](#)). En la micropropagación del banano, por ejemplo, la implementación de esta estrategia representa una alternativa para reducir la aplicación de agentes químicos en la producción vegetal, además de aumentar la productividad y resistencia al estrés biótico y abiótico al que se someten las plantas en las diferentes etapas y sustratos de crecimiento ([Kavino & Manoranjitham, 2018](#)).

Bajo este contexto, la siguiente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de la inoculación bacteriana *in vitro* de raíces de plantas de banano sobre el crecimiento vegetal, y el desarrollo de la enfermedad foliar de la Sigatoka Negra en una etapa avanzada de desarrollo bajo condiciones de invernadero. Así mismo, se evaluaron algunas capacidades bioquímicas de las bacterias potenciales para la promoción del crecimiento vegetal y la posibilidad de que la bacteria inoculada en raíces se movilizara a un tejido distante para ejercer un efecto de control biológico.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se emplearon plantas de banano variedad Williams provenientes de micropropagación en medio MS ([Murashige & Skoog, 1962](#)) con aproximadamente 9 meses de desarrollo.

Preparación de inóculos de microorganismos

Para la selección de las bacterias que se inocularon en las plantas de banano, se emplearon las colecciones No. 191 y 226 de la Universidad EAFIT registrado bajo el No. 226 en el Registro Único Nacional de Colección Biológica (RNC), que consiste en aislados de diferentes órganos y compartimientos de plantas de banano provenientes de micropropagación y cultivo en campo. Las cepas utilizadas fueron *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959, *Bacillus subtilis* EA-CB0575, *Bacillus pumilus* EA-CB0177, *Pseudomonas putida* EA-ED0409 y *Pseudomonas fluorescens* EA-ED0588. Las bacterias se activaron en medio TSA al 50 % y se incubaron a 30 °C por 24 h. Luego se inoculó una colonia de cada cultivo en Erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de TSB, y fueron llevadas a agitación a 150 rpm y 30 °C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó cada cultivo a 4500 rpm por 20 min. Cada pellet resultante se resuspendió en agua destilada estéril (ADE) a una $DO_{600} = 1$ ó $DO_{600} = 0,1$, para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas respectivamente, lo cual equivale a una población de 1×10^8 UFC/mL ([Luisa Fernanda Posada-Urbe, Romero-Tabarez, & Villegas-Escobar, 2015](#)).

P. fijiensis fue aislado de hojas de plantas de banano afectadas por la Sigatoka Negra en estadio 6 de la enfermedad ([Fouré & Ganry, 2008](#)), colectadas en fincas sin aplicación de fungicidas en el Urabá Antioqueño. Se realizó la descarga de ascosporas siguiendo la metodología utilizada por Cenibanano ([Dupont, 1982](#)), que consiste en incubar discos foliares grapados en papel kraft en una cámara húmeda por 48 h, y ubicar posteriormente los discos humedecidos en la tapa de una caja Petri para descargar las ascosporas en 2% de agar por 24 h. Las ascosporas descargadas fueron colectadas con una aguja estéril e incubadas en PDA a 30 °C por 10 d. Los cultivos monospóricos resultantes se llevaron a tubos falcon con esferas de vidrio para ser macerados en ADE empleando un vórtex. De la suspensión resultante se tomaron 3 mL que fueron inoculados en 50 mL de caldo Sabouraud al 2% (v/v) suplementado con 200 ppm de cloranfenicol y se incubó a 30 °C por 10 d a 150 rpm. El micelio obtenido fue fragmentado empleando un Ultraturax IKA 20 W a 4000 rpm y se ajustó la concentración a 10^5 fragmentos de

Efecto de la inoculación bacteriana a nivel radicular sobre el crecimiento y la sanidad de plantas de banano

micelio/mL. Esta suspensión se mezcló con Tween 20 al 0,05 % (v/v), CMC al 0,05 % (p/v) y caldo Sabouraud al 2 % (v/v) conformándose así el inóculo para la infección de las plantas.

Inoculación de plantas *in vitro* y cultivo en el invernadero

Las plantas fueron inoculadas por inmersión de las raíces en cada suspensión bacteriana por un periodo de 1 h. Posteriormente se sembraron en frascos de 400 mL con 60 mL de medio MS ([Murashige & Skoog, 1962](#)) al 0,5 % de agar. El control fue sumergido en ADE por el mismo periodo de tiempo. En todos los casos las plantas se incubaron a 30 °C por 15 d, con una exposición de 12h luz/12h oscuridad. Transcurrido este tiempo las plantas se re-inoculaban siguiendo el procedimiento previamente descrito, para luego ser sembradas en bandejas con una mezcla 1:1 de turba y suelo estéril para la etapa de endurecimiento, donde permanecieron en condiciones de invernadero (22-30°C) durante 30 d. Posteriormente las plantas se trasplantaron a bolsas de plástico con capacidad para 3 kg con un sustrato compuesto por una mezcla 3:1 de suelo comercial y cascarilla de arroz respectivamente, y permanecieron en condiciones de invernadero a una temperatura entre 22-30°C y fotoperiodo 12 /12 h hasta la infección con el fitopatógeno.

Evaluación de la promoción de crecimiento vegetal

Para determinar el potencial de promoción de crecimiento vegetal de las bacterias inoculadas, se llevó a cabo la medición de la longitud aérea (LA) que corresponde a la distancia entre la base del pseudotallo y el vértice formado por las dos últimas hojas abiertas. Las mediciones se realizaron en 4 tiempos diferentes: siembra *in vitro*, siembra en bandejas, siembra en suelo y 24 h antes de la infección con el patógeno. Con estos valores se calculó la velocidad de crecimiento (cm/d) de cada unidad experimental. Se realizaron dos ensayos en tiempos diferentes. En el primero se emplearon 19 réplicas por tratamiento y en el segundo ensayo 20 réplicas por tratamiento. Para este último, se determinó además de la velocidad de crecimiento, el peso húmedo aéreo (PHA), peso húmedo radicular (PHR), peso húmedo total (PHT), peso seco aéreo (PSA), peso seco radicular (PSR) y peso seco total (PST).

Infección de plantas de banano con *P. fijiensis* bajo condiciones de invernadero

Las plantas en invernadero fueron inoculadas artificialmente con *P. fijiensis* aplicando la suspensión con un pincel sobre la hoja No. 1, y permanecieron bajo condiciones de invernadero con una humedad relativa de 80 ± 10 %, temperatura de 28 ± 4 °C y fotoperiodo 12/12 h. Como control se evaluó la inoculación de *P. fijiensis* en la hoja No. 1 de plantas de banano sin previa inoculación de bacterias. Transcurridos 30 d después de la infección, las hojas fueron cosechadas para evaluar la severidad de la enfermedad a través de la estimación del área necrosada empleando el software Leaf Doctor ([Pethybridge & Nelson, 2015](#)). Se realizaron dos ensayos en tiempos diferentes. En el primero se emplearon 19 réplicas por tratamiento y la infección con el patógeno se realizó 149 ddi bacteriana en raíces. En el segundo ensayo se emplearon 20 réplicas por tratamiento y la infección se realizó 185 ddi bacteriana en raíces.

Caracterización fenotípica de bacterias con potencial para la promoción del crecimiento vegetal

Fijación de Nitrógeno

La fijación de nitrógeno se evaluó por medio del crecimiento bacteriano de las cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 en medio NFb semisólido ([Pérez, 2015](#)), compuesto por 5 g/L

Efecto de la inoculación bacteriana a nivel radicular sobre el crecimiento y la sanidad de plantas de banano

ácido málico; 4 g/L KOH; 0,5 g/L K₂HPO₄; 0,2 g/L MgSO₄·7H₂O; , 0,02 g/L CaCl₂; 0,1 g/L NaCl; 0,5 g/L FeSO₄·7H₂O; 2 mg/l Na₂MoO₄·2H₂O; 10 mg/l MnSO₄·H₂O; solución al 0,5% de azul de bromotimol en 0,2 M KOH, 2 mL; 2 g/L agar; pH 6,8. Las bacterias fueron activadas y cultivadas para ajustar su concentración a 1x10⁸ UFC/mL como se expuso previamente. Por último, se sembraron 10 µL de la suspensión de cada cepa por inmersión en 10 mL del medio NFb semisólido presente en frascos de 26 mL cerrados herméticamente. Los cultivos se incubaron durante 10 d a 30°C.

Solubilización de Fosfato

Para la determinación del potencial solubilizador de fosfato de las cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588; se preparó el medio NBRIP sólido adicionado con roca fosfórica ([Kim, McDonald, & Jordan, 1997](#)). De esta manera el medio se compuso de 1g/L NaCl; 0,2 g/L CaCl₂·2H₂O; 0,4 g/L MgSO₄·7H₂O; 1 g/L NH₄NO₃; 10 g/L glucosa; 7 g/L Agar; 3,5 g/L roca fosfórica; 300 ppm benomyl; 1 L H₂O destilada. Las bacterias fueron activadas y cultivadas para ajustar su concentración a 1x10⁸ UFC/mL como se expuso previamente. Por último, las bacterias fueron sembradas por agotamiento en el medio NBRIP y permanecieron en incubación por 10 d a 30 °C. La capacidad de los microorganismos para solubilizar la roca fosfórica se evaluó mediante el crecimiento de las bacterias en el medio, a partir de la aparición de colonias en el mismo.

Producción de Lipopéptidos (LPs)

Con el fin de evaluar la capacidad de producción de lipopéptidos de *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588, se llevó a cabo el protocolo de purificación de lipopéptidos descrito por [Villegas-Escobar, 2012](#). Para ello se transfirieron 20 mL de un preinóculo de los microorganismos de 12 h de crecimiento a Erlenmeyers de 500 mL con 180 mL de medio TSB y se incubaron por 12 h a 30°C y 150 rpm. Transcurrido este tiempo, se adicionó 4 % (p/v) de resina amberlita XAD-16 (Alfa Aesar) resuspendida en ADE a cada fermentación y se continuó la incubación por tres días más bajo las mismas condiciones. Posteriormente, los cultivos bacterianos fueron lavados tres veces con ADE y dos veces con 100 mL de metanol con el fin de remover el medio de cultivo y eluir los metabolitos adsorbidos por la amberlita. Las soluciones resultantes se llevaron a un rotoevaporador (50 °C, -50 psig) hasta obtener un residuo sólido que se resuspendió en ADE y se fraccionó en una columna SPE C18 (“Solid Phase Extraction”) siguiendo las siguientes eluciones: metanol 100%, agua, muestra del cultivo, agua, metanol 50% y metanol 100%. Las dos últimas fracciones fueron recolectadas en Erlenmeyers de 20 mL y llevadas al rotoevaporador a 50 °C y -50 psig. Luego, estas muestras fueron ajustadas a una concentración de 50 mg/mL con metanol 100 % y se purificaron mediante la técnica cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC, Agilent 1200), empleando una columna Eclipse XDB C18 (250 x 4.6 mm, 5µm) como fase estacionaria, una fase móvil A (agua grado HPLC + 0,1% TFA) y B (acetronitrilo + 0,1% TFA). El gradiente de elución fue de 30/100/100 % de B en 0/25/35 min inyectando 40 µL de la solución, con un flujo de 1 mL/min, 30 °C y un detector UV a 214 nm.

Cultivo de bacterias totales asociadas a diferentes órganos de plantas de banano

Para evaluar las poblaciones cultivables presentes en diferentes órganos de plantas en invernadero antes de la infección con *P. fijiensis*, se colectaron 2 g de raíces y 2 g de la hoja No. 1 por tratamiento y control, y se sometieron a un proceso de lavado superficial con ADE. Posteriormente, cada órgano se llevó a buffer fosfato pH 7,4 y se maceró en un Ultraturrax IKA 20 W a 6000 rpm durante 10 min. Con las suspensiones resultantes se realizaron diluciones seriadas de 10⁰ a 10⁻⁸ para raíces y de 10⁰ a 10⁻⁶ para hojas, de las cuales se sembraron por superficie 100 µL en medio TSA al 50 %. Las cajas se incubaron

a 30 °C durante 48 h. Luego, se realizó una verificación cualitativa a través de la revisión de las morfologías presentes en los órganos evaluados, para determinar si la morfología de las bacterias inoculadas hacía parte de la comunidad aislada en cada tejido vegetal. La abundancia se determinó a través de un conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) en cajas con conteos entre 30-300 colonias. Para cada órgano se realizaron cuatro réplicas y se emplearon dos cajas de Petri por dilución.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos de promoción de crecimiento, sanidad vegetal y cultivo de la comunidad bacteriana total se realizó la comparación de los tratamientos con el control empleando la función *DunnnettTest* del paquete DescTools ([Andri Signorell et al., 2019](#)) en R Studio versión 3.6.1. Para todos los casos el nivel de confianza fue del 90%.

Resultados

Efecto de la inoculación bacteriana *in vitro* sobre el crecimiento de plantas de banano – Ensayo I

Para determinar el efecto de la inoculación con bacterias desde etapas tempranas de desarrollo sobre el crecimiento de plantas de banano, se llevó a cabo la medición de la longitud aérea en 4 tiempos durante los ensayos para calcular la velocidad de crecimiento (cm/d). La última medición se realizó 149 ddi. Los resultados indicaron que los tratamientos no presentaron diferencias significativas respecto al control cuyo valor promedio fue 0,11 cm/d. Las velocidades de crecimiento por tratamiento fueron 0,13 cm/d para *B. pumilus* EA-CB0177; 0,12 cm/d para *B. subtilis* EA-CB0575; 0,10 cm/d para *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959; 0,11 cm/d para *P. fluorescens* EA-ED0588 y 0,11 cm/d para *P. putida* EA-ED0409 ([Fig. 1](#)).

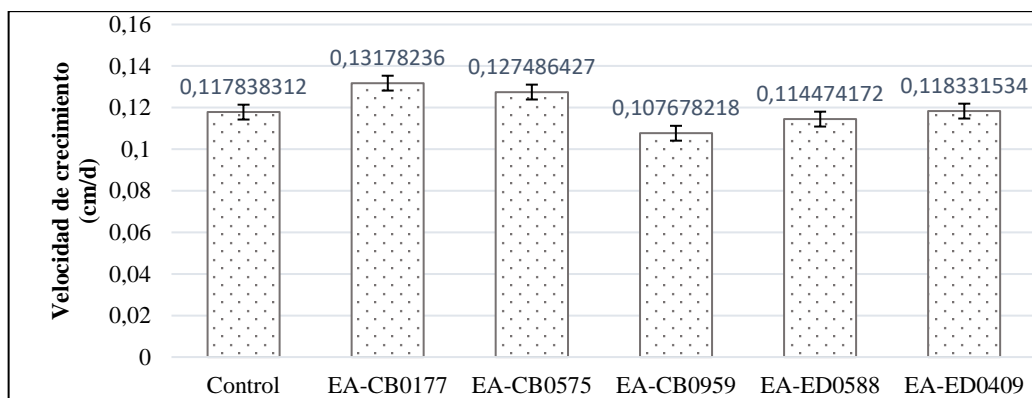


Fig. 1 Velocidad de crecimiento de plantas de banano inoculadas en raíces con *B. pumilus* EA-CB0177, *B. subtilis* EA-CB0575, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959, *P. fluorescens* EA-ED0588 y *P. putida* EA-ED0409. Comparación de los tratamientos con el control por la prueba de Dunnett con diseño balanceado $n = 7$ y nivel de confianza del 90%

Efecto de la inoculación bacteriana *in vitro* en el desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra – Ensayo I

El desarrollo de los síntomas de la enfermedad Sigatoka negra causada por *P. fijiensis* se visualizó en todas las plantas infectadas con el patógeno. Sin embargo, cuatro tratamientos presentaron los valores más bajos de área necrosada respecto al control (promedio de área necrosada: 36,40 %), con valores de 30,90 % para *B. pumilus* EA-CB0177; 26,10 % para *B. subtilis* EA-CB0575; 30,40 % para *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y 23,60 % para *P. fluorescens* EA-ED0588. El tratamiento *P. putida* EA-ED0409 no presentó diferencia significativa arrojando un valor promedio de 34,10 % de área necrosada (Fig. 2).

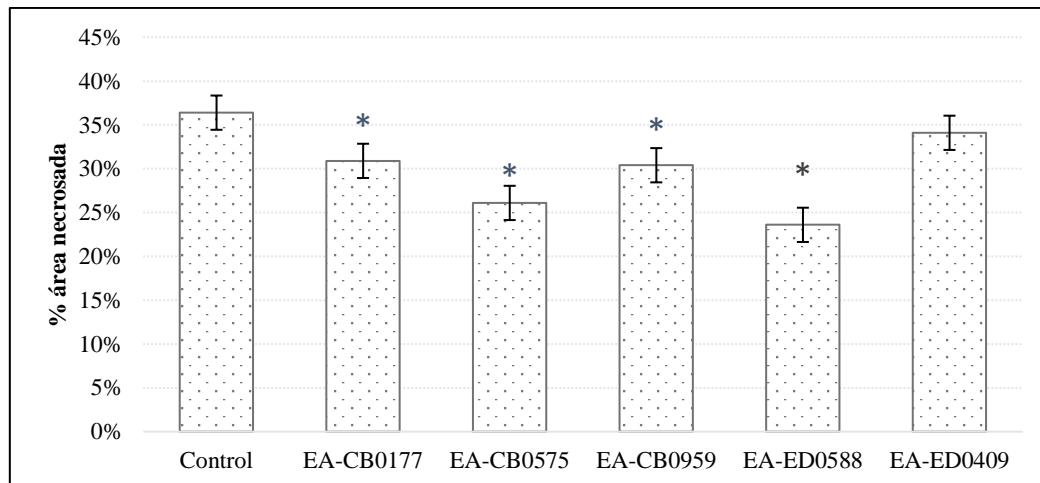


Fig. 2 Porcentaje de área necrosada de hojas infectadas con *P. fijiensis* en plantas de banano 179 ddi bacteriana en raíces. Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control por la prueba de Dunnett con diseño balanceado $n = 7$ y nivel de confianza del 90% (*B. pumilus* EA-CB0177 valor-p: 0,07; *B. subtilis* EA-CB0575 valor-p: 0,03; *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 valor-p: 0,04; *P. fluorescens* EA-ED0588 valor-p: 0,01).

Estos resultados sugirieron que el efecto de las bacterias inoculadas podría corresponder a una desaceleración en el desarrollo de la enfermedad en las plantas tratadas. Por tal razón, se seleccionaron las cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 que presentaron los valores promedios de área necrosada más bajos para el montaje de un segundo ensayo y así evaluar esta hipótesis.

Efecto de la inoculación bacteriana *in vitro* en el desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra – Ensayo II

Con el fin de evaluar si el efecto de la disminución del área necrosada de las plantas inoculadas con las cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 correspondía a una desaceleración en el desarrollo de la enfermedad causada por el patógeno *P. fijiensis*, se planteó hacer el seguimiento en el tiempo de la infección de la hoja No. 1 a través de la toma de fotografías cada 7 d durante 30 d. Sin embargo, en el transcurso del ensayo no se visualizaron síntomas de la enfermedad en las plantas control (Fig. S1) ni en las plantas tratadas. Factores externos asociados al mantenimiento del PLC que afectaron los niveles de humedad relativa y temperatura del invernadero, impidieron el desarrollo del ensayo bajo las condiciones requeridas para lograr la infección.

Efecto de la inoculación bacteriana *in vitro* sobre el crecimiento de plantas de banano – Ensayo II

Considerando la posibilidad de un efecto en la promoción de crecimiento cuantificada en diferentes órganos de la planta, se realizó la medición de la velocidad de crecimiento, peso húmedo y peso seco de plantas tratadas con *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 en un periodo de tiempo más largo después de la primera inoculación correspondiente a 185 ddi. En cuanto a velocidad de crecimiento, el control presentó un valor de 0,14 cm/d, *B. subtilis* EA-CB0575 0,17 cm/d y *P. fluorescens* EA-ED0588 0,19 cm/d, siendo esta última cepa la que obtuvo diferencia estadísticamente significativa (Fig. 3). En cuanto a las mediciones de peso húmedo y peso seco que consideran otros órganos de la planta como raíces y hojas, se obtuvo un peso húmedo total (PHT) de 164,04 g para el Control; 326,42 g para *B. subtilis* EA-CB0575 y 360,95 g para *P. fluorescens* EA-ED0588 (Fig. 4); y en peso seco total (PST) 13,49 g para el Control; 25,27 g para *B. subtilis* EA-CB0575 y 29,14 g para *P. fluorescens* EA-ED0588 (Fig. 5). Ambas cepas mostraron diferencia estadísticamente significativa en la medición de estas variables de crecimiento.

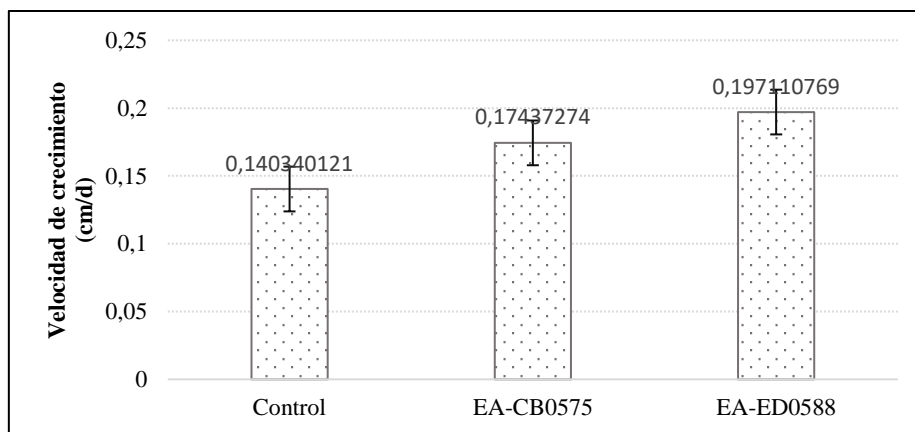


Fig. 3 Velocidad de crecimiento de plantas de banano inoculadas en raíces con *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588. El asterisco corresponde al tratamiento con diferencia significativa con el control por la prueba de Dunnett con diseño balanceado $n = 12$ y nivel de confianza del 90% (*P. fluorescens* EA-ED0588 valor-p: 0,09).

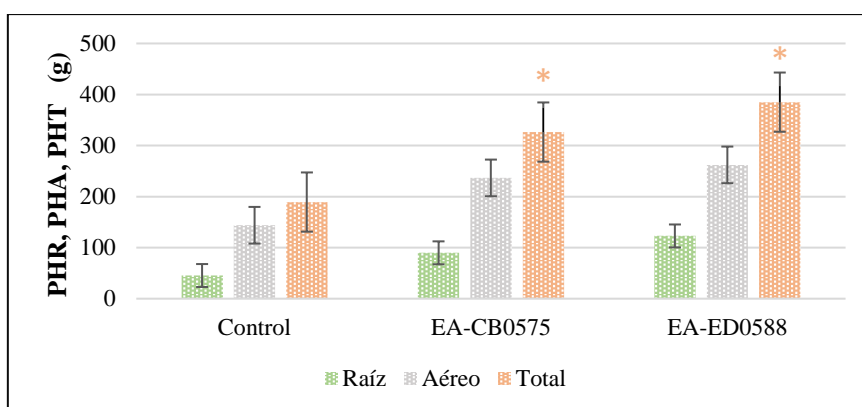


Fig. 4 Peso húmedo raíz (PHR), aéreo (PHA) y total (PHT) de plantas de banano 185 ddi en raíces con *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588. Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control por la prueba

de Dunnett con diseño balanceado $n = 12$ y nivel de confianza del 90% (*B. subtilis* EA-CB0575 valor- $p < 0,001$; *P. fluorescens* EA-ED0588 valor- $p < 0,001$)

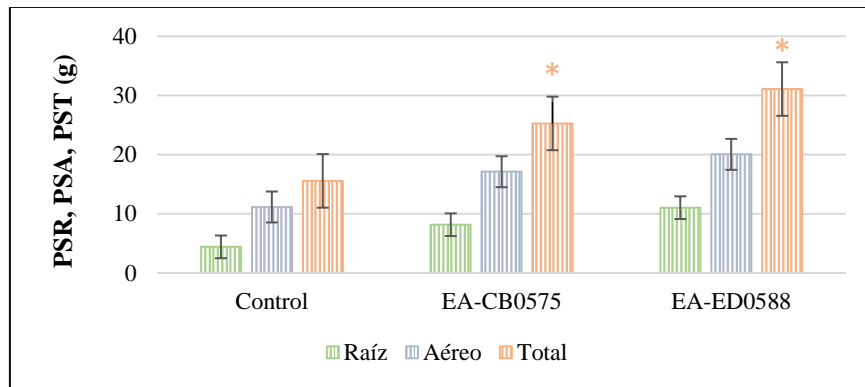


Fig. 5 Peso seco raíz (PSR), aéreo (PSA) y total (PST) de plantas de banano 185 ddi en raíces con *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588. Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control por la prueba de Dunnett con diseño balanceado $n = 12$ y nivel de confianza del 90% (*B. subtilis* EA-CB0575 valor- $p: 0,01$; *P. fluorescens* EA-ED0588 valor- $p < 0,001$)

Caracterización *in vitro* del potencial bioquímico de las cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588

Con el fin de conocer los posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal de las cepas de estudio, se realizaron evaluaciones bioquímicas para determinar el potencial para fijar nitrógeno atmosférico, capacidad para solubilizar fosfato y producción de lipopéptidos (LPs).

Fijación de Nitrógeno

La valoración cualitativa del potencial para fijar nitrógeno arrojó un resultado positivo para ambas cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588, es decir que en ambos casos se visualizó el crecimiento de un manto microbiano y cambio en el color del medio de cultivo NFB, el cual se pudo percibir a partir del día cuatro para *P. fluorescens* EA-ED0588 y para *B. subtilis* EA-CB0575 a partir del día seis después de la siembra ([Fig. 6](#)).

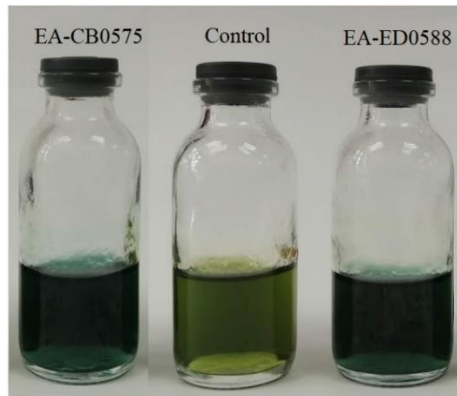


Fig. 6 Fijación de nitrógeno en medio NFb *B. subtilis* EA- CB0575, Control y *P. fluorescens* EA-ED0588.

Solubilización de Fosfato

La capacidad para solubilizar fosfato se evaluó en el medio sólido NBRIP con adición de roca fosfórica como única fuente de fosfato. Las cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 presentaron crecimiento en el medio de cultivo, a los cuatro y seis días después de la siembra, respectivamente. De manera cualitativa, se observó mayor crecimiento celular para la cepa *P. fluorescens* EA-ED0588 con respecto a *B. subtilis* EA-CB0575 (Fig. 7).

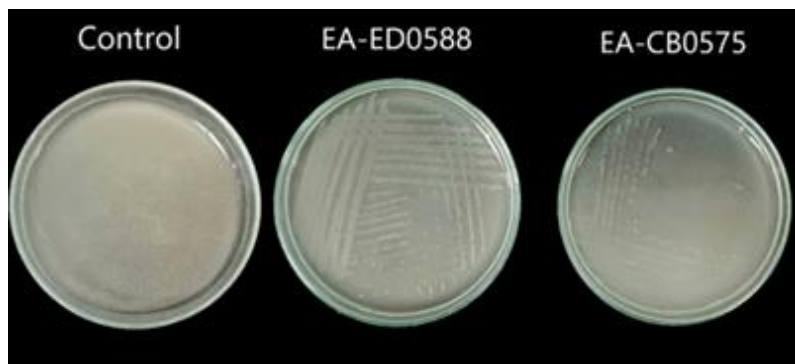


Fig. 7 Solubilización de fosfato en medio NBRIP con roca fosfórica Control - Tratamiento *P. fluorescens* EA- ED0588 – *B. subtilis* EA-CB0575.

Producción de Lipopéptidos (LPs)

En la evaluación de la capacidad de producción de LPs de *B. subtilis* EA-CB0575, el perfil cromatográfico obtenido para el extracto SPE 100% metanol en medio TSB indicó los picos característicos de fengicinas con tiempos de retención entre 12,23 min y 18,307 min, y de surfactinas con tiempos de 24,46 min hasta 31,93 min (Fig. 8a). En el caso de *P. fluorescens* EA-ED0588 los picos se presentaron en los tiempos de retención 1,95 min - 5,84 min; 8,90 min - 20,44 min y 23,51 min - 29,79 min (Fig. 8b).

a

Efecto de la inoculación bacteriana a nivel radicular sobre el crecimiento y la sanidad de plantas de banano

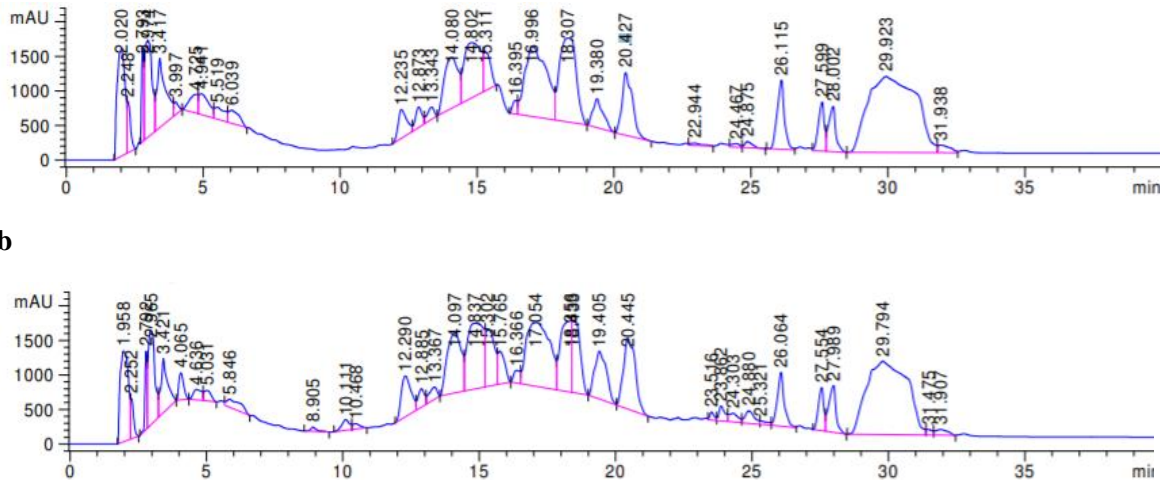


Fig. 8 Cromatograma de HPLC para extracto SPE – 100 % metanol del cultivo de (a) *B. subtilis* EA-CB0575 y (b). *P. fluorescens* EA-ED0588, en medio TSB

Cultivo de bacterias totales asociadas a diferentes órganos de plantas de banano con inoculación en etapas tempranas de desarrollo

La cuantificación de la comunidad bacteriana cultivable en medio TSA al 50% de raíces de plantas de banano, en ausencia del patógeno *P. fijiensis*, indicó que las poblaciones fueron significativamente superiores en raíces con inoculación temprana de *B. subtilis* EA-CB0575 (valor-p: 0,01) y *P. fluorescens* EA-ED0588 (valor-p: 0,03) respecto al control. Por el contrario, el conteo en hojas arrojó valores cercanos para los tratamientos evaluados y el control (Fig. 9).

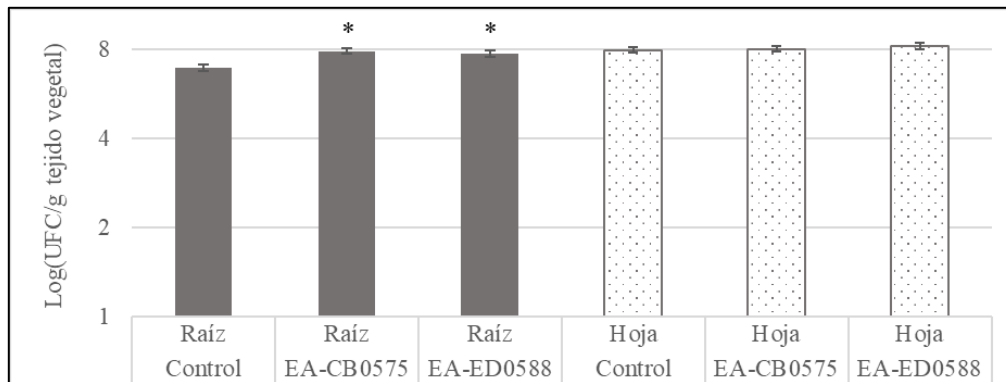


Fig. 9 Cuantificación de la comunidad bacteriana cultivable de raíces y hojas de plantas de banano 185 ddi en raíces con *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 y antes de la infección con *P. fijiensis*. Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control por la prueba de Dunnett, con un nivel de confianza del 90% (*B. subtilis* EA-CB0575 valor-p: 0,01; *P. fluorescens* EA-ED0588 valor-p: 0,03).

En total se visualizaron 29 morfologías, de las cuales diez se encontraron en hojas (5 Gram-positivas y 5 Gram-negativas), 12 morfologías en raíces (5 Gram-positivas y 7 Gram-negativas), y 7 morfologías en ambos tejidos vegetales (3 Gram-positivas y 4 Gram-negativas) (Tabla S1). Por último, es importante resaltar que las morfologías de *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 no fueron visualizadas en la fracción cultivable de los órganos de estudio.

Discusión

La inoculación bacteriana de plantas de banano micropropagadas sugiere ser una estrategia potencialmente eficiente para inducir cambios fisiológicos en las plantas que aumenten su resistencia al estrés biótico y abiótico antes de ser trasplantadas en campo ([Kavino & Manoranjitham, 2018](#)). En esta investigación, evaluamos el efecto de bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* sobre la velocidad de crecimiento medida en la longitud aérea de las plantas en cuatro tiempos diferentes. Los resultados de esta variable no fueron significativos, lo que podría atribuirse a uno de los factores que ha sido descrito como el primer paso para desencadenar la promoción de crecimiento que corresponde a la colonización de las bacterias sobre las raíces, cuyo efecto potencial se puede ver regulado por la concentración del microorganismo ([Lugtenberg & Kamilova, 2009](#)). Aspectos como la competencia por nicho en un ambiente altamente dinámico como la rizosfera o las características fisicoquímicas de su entorno, pueden desfavorecer la multiplicación bacteriana y con ello provocar la pérdida de viabilidad del microorganismo. Estos resultados también podrían explicarse desde el punto de vista de la incapacidad de los microorganismos para ejercer mecanismos de acción directos e indirectos que promuevan el crecimiento vegetal, siendo necesario ampliar el estudio a la caracterización de estos potenciales en las bacterias inoculadas. Otro de los aspectos a considerar es la variable de respuesta evaluada en nuestra investigación. La medida de la longitud aérea excluye los efectos sobre otros órganos de la planta como las raíces, y se ha encontrado que cepas de *B. subtilis* no estimularon el incremento de biomasa en órganos aéreos de plantas de maíz, pero si aumentaron la producción de biomasa radicular entre 38 – 65% comparado con las plantas no inoculadas ([Myresiotis, Vryzas, & Papadopoulou-Mourkidou, 2015](#)). No se descarta la posibilidad de que la ausencia de resultados significativos esté relacionada con un efecto tardío del inóculo sobre la planta, tal como lo plantean investigaciones previas con *B. subtilis* EA-CB0575 ([Cuéllar-Gaviria, 2014](#); [Luisa Fernanda Posada-Urbe, 2017](#)).

Además de la promoción de crecimiento, la sanidad de las plantas tratadas también fue analizada en esta investigación. Encontramos que *B. pumilus* EA-CB0177, *B. subtilis* EA-CB0575, *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 y *P. fluorescens* EA-ED0588 redujeron significativamente el área necrosada de hojas infectadas con *P. fijiensis*. Diversos mecanismos podrían explicar esta acción de control biológico; sin embargo, al tratarse de un efecto espacialmente distante entre el punto de inoculación bacteriana y el tejido infectado, la inducción de resistencia en el huésped podría ser la razón de la reducción de severidad de la enfermedad, sugiriendo que la inoculación de plantas de banano en etapas tempranas de desarrollo puede estimular cambios en la expresión génica y metabolismo de la planta que la preparan para una rápida respuesta de defensa en presencia de un patógeno ([Van Loon, 2007](#)). Estos resultados podrían explicarse también como un efecto del inóculo sobre la comunidad microbiana nativa presente en la raíz de la planta generando cambios en su estructura y favoreciendo la respuesta de la planta frente a la enfermedad. Así mismo, no se descarta la posibilidad de un efecto directo sobre el patógeno de ser el caso que las bacterias inoculadas logran convertirse en microorganismos endófitos para movilizarse hacia los órganos aéreos de la planta.

Considerando que las plantas tratadas desarrollaron síntomas asociados a la enfermedad en una menor proporción respecto al control, se sugirió que el efecto podría corresponder a una desaceleración de la infección en las plantas inoculadas. Para comprobarlo, se seleccionaron las cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 que, además de presentar los valores más bajos de área necrosada, en el caso de *B. subtilis* EA-CB0575 se trata de un microorganismo que ha despertado gran interés frente a la enfermedad de la Sigatoka negra, dado que su efecto ha sido reportado en otras investigaciones ([García-Giraldo, 2019](#); [Ochoa-Gómez, 2014](#)). Se realizó un segundo ensayo con estos

tratamientos seleccionados; sin embargo, factores ajenos a la investigación afectaron el desarrollo de la etapa de infección, imposibilitando la obtención de resultados confiables. No obstante, en este ensayo se destinaron unidades experimentales para evaluar nuevamente la capacidad de promoción de crecimiento vegetal a través de la medición de variables que involucraran diversos órganos de la planta y no sólo órganos aéreos como ocurrió en el primer ensayo.

Los resultados de peso húmedo total y peso seco total fueron significativamente superiores 185 ddi con *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588, sugiriendo que la contribución de estos microorganismos puede ser explicada por mecanismos de acción directos como la fijación de nitrógeno, solubilización y captación de nutrientes, producción de sideróforos, además de la secreción de sustancias que promueven el crecimiento de las plantas, como las auxinas, citoquininas, giberelinas, o por mecanismos indirectos que limitan el crecimiento de fitopatógenos (Parray et al., 2016). Para comprobar algunos mecanismos, se llevaron a cabo evaluaciones *in vitro* del potencial para fijar nitrógeno atmosférico y solubilizar fosfatos, encontrando un resultado positivo para estos rasgos evaluados a través del crecimiento bacteriano. Complementando estas evaluaciones, se determinó la capacidad de producción de LPs de *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 donde se observaron los picos característicos de fengicinas (12 – 19 min) y surfactinas (24 – 33 min) (Villegas-Escobar, 2012) para *B. subtilis* EA-CB0575, y para *P. fluorescens* EA-ED0588 se detectaron picos en tiempos de retención que otras investigaciones han reportado como pseudofactinas (2 – 4 min) (Biniarz, Coutte, Gancel, & Łukaszewicz, 2018), viscosina (27 – 28 min), derivados de viscosina (16 – 24 min) (de Bruijn & Raaijmakers, 2009), massetolide A (23 – 25 min) y derivados de massetolide A (12 – 18 min) (Song et al., 2015); sin embargo, los parámetros metodológicos pueden presentar algunas divergencias que dificultan la suposición de que se trate de los mismos compuestos, sugiriendo así un análisis por espectrometría de masas que permita un acercamiento a la identificación de los mismos.

Diversas investigaciones han demostrado que la producción de lipopéptidos cumple un rol importante en la colonización de bacterias en la rizosfera, involucrando la formación de biopelícula y facilitando la motilidad de las células a través de la reducción de la tensión superficial (Alsohim et al., 2014; Raaijmakers, De Bruijn, Nybroe, & Ongena, 2010), sugiriendo estos mecanismos para las cepas *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 en la promoción de crecimiento. Por otro lado, los lipopéptidos podrían estar involucrados también en la inducción de resistencia sistémica para reducir la severidad de la enfermedad causada por *P. fijiensis*. Se ha demostrado que actúan como determinantes microbianos que al ser percibidos por las células vegetales se desencadenan cambios en la expresión de los genes de defensa de la planta (Ongena et al., 2007).

Por último, precisar la presencia o ausencia de *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 en el cultivo de bacterias totales, no fue posible con los resultados de este estudio. Frente a la posible ausencia, algunos autores han sugerido falta de competitividad de la cepa inoculada respecto a otros miembros que se encuentran en la comunidad microbiana nativa, que con el tiempo logra compensar el disturbio externo para regresar a su estado inicial (Kröber et al., 2014; Qiao et al., 2017), llevando así a la pérdida de viabilidad del microorganismo. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las células muertas de *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588, o los productos de su metabolismo, tengan alguna actividad biológica sobre el huésped, caso que ha sido estudiado con microorganismos probióticos donde su inactivación ha demostrado cambios en la respuesta de su hospedero con beneficios que se han vinculado a la secreción de sus metabolitos (de Almada, Almada, Martínez, & Sant'Ana, 2016). También resulta importante resaltar que el número de morfotipos encontrados resulta ser muy bajo para una comunidad que abarca la totalidad de células bacterianas presentes en las raíces y hojas de plantas en suelo, resultado que puede estar influenciado por aspectos

metodológicos de la investigación como el uso de un único medio de cultivo, además de otras condiciones como temperatura y tiempos de incubación, que podrían poner al descubierto microorganismos de lento crecimiento dentro de la comunidad estudiada.

Conclusión

Tanto *B. subtilis* EA-CB0575 como *P. fluorescens* EA-ED0588 tienen potencial como agentes de control biológico contra el patógeno foliar *P. fijiensis*, posiblemente mediante la inducción de resistencia sistémica (ISR) por tratarse de una inoculación en un tejido distante al punto de infección. Adicionalmente, los resultados en promoción de crecimiento y las pruebas bioquímicas sugieren que *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588 tienen la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, y logran la colonización gracias a la producción de LPs. Se recomienda realizar pruebas cuantitativas para el potencial bioquímico, y profundizar el estudio de la cepa *P. fluorescens* EA-ED0588 debido a que se perfila como una posible bacteria promotora de crecimiento vegetal.

Referencias

- Alsohim, A. S., Taylor, T. B., Barrett, G. A., Gallie, J., Zhang, X.-X., Altamirano-Junqueira, A. E., Jackson, R. W. (2014). The biosurfactant viscocin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2267–2281. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12469>
- Andri Signorell et al. (2019). DescTools: Tools for descriptive statistics.
- Bach-Pages, M., Castello, A., & Preston, G. M. (2017). Plant RNA Interactome Capture: Revealing the Plant RBPome. *Trends in Plant Science*, 22(6), 449–451. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2017.04.006>
- Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiol Ecol*, 93, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/ fx050>
- Bhattacharyya, P. ., & Jha, D. . (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(7), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Biniarz, P., Coutte, F., Gancel, F., & Łukaszewicz, M. (2018). High-throughput optimization of medium components and culture conditions for the efficient production of a lipopeptide pseudofactin by *Pseudomonas fluorescens* BD5. *Microbial Cell Factories*, 17(8), 121. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0968-x>
- Cuéllar-Gaviria, T. Z. (2014). Evaluación de la promoción de crecimiento de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en cultivos de banano, crisantemo y café. Universidad EAFIT.
- de Almada, C. N., Almada, C. N., Martínez, R. C. R., & Sant'Ana, A. S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 96–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.011>
- de Bruijn, I., & Raaijmakers, J. M. (2009). Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4753–4761. <https://doi.org/10.1128/AEM.00575-09>
- Dupont. (1982). Sigatoka negra y amarilla. Técnicas mejoradas para manejo e identificación. Du Pont Latin America, 17.
- Fouré, E., Ganry, E. (2008). A biological forecasting system to control Black Leaf Streak disease of

- bananas and plantains. *Fruits*, 63(05), 311-317. <https://doi.org/10.1051/fruits:2008029>
- Friesen, T. (2016). Combating the Sigatoka Disease Complex on Banana. *PLoS Genet*, 12(8), e1006234. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006234>
- García-Giraldo, G. (2019). Efecto de la aplicación de microorganismos en la microbiota, desarrollo y salud vegetal de plantas de banano. Universidad Nacional de Colombia.
- Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Saravanakumar, D., Soorianathasundaram, K., & Samiyappan, R. (2008). Biohardening with Plant Growth Promoting Rhizosphere and Endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana bunchy top virus. *Applied Soil Ecology*, 39(2), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.006>
- Kavino, M., & Manoranjitham, S. K. (2018). In vitro bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates: Novel ways to combat *Fusarium wilt*. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 371–387. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1379-2>
- Kim, K. Y., McDonald, G. A., & Jordan, D. (1997). Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biol Fertil Soils*, 24.
- Kröber, M., Wibberg, D., Grosch, R., Eikmeyer, F., Verwaaijen, B., Chowdhury, S. P., Schlüter, A. (2014). Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 5(252), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00252>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Myresiotis, C. K., Vryzas, Z., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015). Effect of specific plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Pest Management Science*, 71(9), 1258–1266. <https://doi.org/10.1002/ps.3919>
- Nowak, J., & Shulaev, V. (2003). Priming for Transplant Stress Resistance in In vitro Propagation. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. *Plant*, 39(2), 107–124. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4293579>
- Ochoa-Gómez, N. (2014). Efecto del *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento y control de Sigatoka negra en *Musa* AAA cv . Williams.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Parray, J. A., Jan, S., Kamili, A. N., Qadri, R. A., Egamberdieva, D., & Ahmad, P. (2016). Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(3), 877–902. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9583-4>
- Pérez, D. (2015). Evaluación del efecto de la inoculación de *Bacillus spp.* con potencial fijador de nitrógeno en cultivos de *Chlorella sorokiniana*. Repositorio Institucional Universidad EAFIT, 88.
- Pethybridge, S., Scot, B. (2015). Leaf Doctor: A New Portable Application for Quantifying Plant Disease Severity. *The American Phytopathological Society*, 99(10), <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0319-RE>
- Posada-Uribe, L., Correa-Álvarez, J., Romero-Tabarez, M., De-Bashan, L., & Villegas-Escobar, V.

- (2018). Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth systems. *Microbiological Research*, 217(12), 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.017>
- Posada-Uribe, L. (2017). Promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico.
- Posada-Uribe, L., Romero-Tabarez, M., & Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 38(10), 1879–1888. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1428-1>
- Qiao, J., Yu, X., Liang, X., Liu, Y., Borriss, R., & Liu, Y. (2017). Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1039-x>
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Rahman, S. F. S. A., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Song, C., Sundqvist, G., Malm, E., de Bruijn, I., Kumar, A., van de Mortel, J., Raaijmakers, J. M. (2015). Lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* is regulated by the protease complex ClpAP. *BMC Microbiology*, 15, 29. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0367-y>
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 119, pp. 243–254. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>
- Vázquez-Euán, R., Chi-Manzanero, B., Hernández-Velázquez, I., Tzec-Simá, M., Islas-Flores, I., Martínez-Bolaños, L., Canto-Canché, B. (2019). Identification of New Hosts of *Pseudocercospora fijiensis* Suggests Innovative Pest Management Programs for Black Sigatoka Disease in Banana Plantations. *Agronomy*, 9(10), 666. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100666>
- Veselova, S., Maksimov, I. V., & Nuzhnaya, T. (2015). Role of jasmonic acid in interaction of plants with Plant Growth Promoting Rhizobacteria during fungal pathogenesis. *Nova Science Publishers*, (October), 33–66.
- Villegas-Escobar, V. (2012). Identificación y caracterización de extractos biológicamente activos contra patógenos de *Musa* sp. Universidad Nacional de Colombia.
- Xiang, N., Lawrence, K., Kloepper, J., Donald, P., & Mcinroy, J. (2017). Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. *PLoS ONE*, 12, 181–201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181201>

Material Suplementario



Fig S1 Hoja No. 1 de una planta control 30 ddi con el patógeno *P. fijiensis* sin síntomas de enfermedad

Efecto de la inoculación bacteriana a nivel radicular sobre el crecimiento y la sanidad de plantas de banano

Morfotipo	Órgano	Forma	Elevación	Margen	Color	Superficie	Tinción de Gram	Fotografía
M1	Hoja	Irregular	Plana	Ondulado	Blanco	Rugosa/brillante	Gram -	
M2	Hoja	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Lisa/brillante	Gram +	
M3	Hoja	Irregular	Convexo	Entero	Crema	Lisa/opaca	Gram +	
M4	Hoja	Irregular	Plano	Ondulado	Rojo	Lisa/brillante	Gram -	
M5	Hoja	Irregular	Crateriforme	Lobulado	Crema	Rugosa/opaca	Gram -	
M6	Hoja	Irregular	Crateriforme	Lobulado	Crema	Rugosa/opaca	Gram +	
M7	Hoja	Circular	Plano	Entero	Blanco	Lisa/opaca	Gram +	
M8	Hoja	Irregular	Crateriforme	Ondulado	Blanco	Rugosa/opaca	Gram -	
M9	Hoja	Irregular	Plano	Lobulado	Crema	Rugosa/opaca	Gram +	
M10	Hoja	Irregular	Umbonada	Ondulado	Rojo	Rugosa/brillante	Gram -	
M11	Raíz	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Lisa/opaca	Gram +	
M12	Raíz	Circular	Plano	Entero	Crema	Lisa/brillante	Gram +	
M13	Raíz	Irregular	Crateriforme	Ondulado	Crema	Rugosa/opaca	Gram -	
M14	Raíz	Irregular	Crateriforme	Ondulado	Crema	Rugosa/opaca	Gram +	
M15	Raíz	Filamentosa	Crateriforme	Filamentoso	Blanco	Rugosa/opaca	Gram -	
M16	Raíz	Irregular	Crateriforme	Lobulada	Rosado claro	Rugosa/opaca	Gram -	
M17	Raíz	Irregular	Crateriforme	Ondulado	Crema	Rugosa/opaca	Gram -	
M18	Raíz	Circular	Plano	Ondulado	Crema	Lisa/opaca	Gram +	
M19	Raíz	Circular	Plano	Entero	Blanco/crema	Lisa/opaca	Gram -	

Efecto de la inoculación bacteriana a nivel radicular sobre el crecimiento y la sanidad de plantas de banano

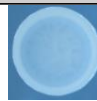
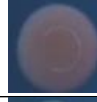
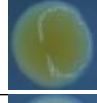
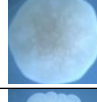
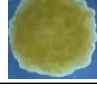
Morfotipo	Órgano	Forma	Elevación	Margen	Color	Superficie	Tinción de Gram	Fotografía
M20	Raíz	Circular	Plano	Entero	Blanco	Lisa/opaca	Gram -	
M21	Raíz	Filamentosa	Crateriforme	Filamentoso	Crema	Rugosa/opaca	Gram +	
M22	Raíz	Filamentosa	Plana	Filamentoso	Crema	Rugosa/opaca	Gram +	
M23	Raíz/Hoja	Circular	Convexa	Entero	Rojo	Lisa/brillante	Gram -	
M24	Raíz/Hoja	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Lisa/brillante	Gram +	
M25	Raíz/Hoja	Circular	Plano	Entero	Amarillo claro	Lisa/brillante	Gram -	
M26	Raíz/Hoja	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Lisa/brillante	Gram +	
M27	Raíz/Hoja	Irregular	Plano	Ondulado	Crema	Rugosa/brillante	Gram -	
M28	Raíz/Hoja	Irregular	Crateriforme	Lobulado	Blanco/crema	Rugosa/brillante	Gram +	
M29	Raíz/Hoja	Irregular	Convexa	Ondulado	Amarillo	Rugosa/brillante	Gram -	

Tabla S1 Morfología de las colonias presentes en la comunidad bacteriana cultivable en TSA al 50% de órganos de plantas de banano inoculadas en raíz con *B. subtilis* EA-CB0575 y *P. fluorescens* EA-ED0588