



Scientia Agropecuaria

Web page: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>

Facultad de Ciencias
Agropecuarias

Universidad Nacional de
Trujillo

RESEARCH ARTICLE



Genetic diversity of antagonistic bacterial isolates obtained from *Theobroma cacao* L. to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 1

Diversidad genética de aislados bacterianos antagónicos obtenidos de *Theobroma cacao* L. para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1

Hayron Fabricio Canchignia-Martínez¹ ; Cristhian John Macías Holguín^{1, 2 *}
Silvia Gicela Saucedo Aguiar¹ ; Hugo Gabriel Ortiz Almea¹ ; Leandro Cansing Arichabala²
Braulio José Lahuathe Mendoza²

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología, Carrera de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, km 1.5 a Santo Domingo de los Tsáchilas, EC. 120501, Quevedo, Ecuador.

² Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Mocache, Los Ríos, EC 170518, Ecuador.

* Corresponding author: cristhian.macias2016@uteq.edu.ec (C. J. Macías-Holguín).

Received: 20 March 2025. Accepted: 17 August 2025. Published: 1 September 2025.

Abstract

The banana (*Musa AAA*) is affected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, which causes discoloration in the xylem duct, leading to terminal wilting. The use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a biological control produces different antagonistic compounds and inhibits the growth of various phytopathogens. The objective of the study was based on the molecular identification of rhizobacteria that produce phytohormones with biocontrol activity against Foc-R1. The presence of the 225 bp *ChiA* gene was observed in PGPR. Phylogenetic analysis of 16S rRNA by sequencing and ERIC-PCR showed genetic variability with the formation of four subgroups. Molecular identification by sequencing the 16S rRNA gene defined the genera as *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas*. There is variation in the biosynthesis of the phytohormones AIA, AG, and AS in strains MH-18, W-417, and FZ 9-7 at 72 h. The identification of Foc-R1 by PCR shows an amplicon of 350 bp. Antagonistic assays of bacterial supernatants from strain FZ 9-7 show 71% mycelial inhibition of Foc-R1 and a decrease in spore production of 2.5×10^6 spores mL⁻¹. The results provide information on the genetic relationships of PGPRs through the production of secondary metabolites such as proteases, catalases, chitinases, and siderophores, as well as morphological and molecular analysis for the identification of Foc-R1 and its interaction with antagonistic extracts in inhibiting the growth of diseases in bananas and cocoa.

Keywords: Indole-3-acetic acid; gibberellic acid; salicylic acid; cell extracts; *ChiA* gene; *Musa acuminata*.

Resumen

El banano (*Musa AAA*) se ve afectado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, provoca decoloración en el conducto xilemático para causar un marchitamiento terminal. La utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) como control biológico producen diferentes compuestos antagonistas e inhiben el crecimiento de diversos fitopatógenos. El Objetivo del estudio se basó en la Identificación molecular de rizobacterias productoras de fitohormonas con actividad biocontroladora a Foc-R1. Se observó la presencia del gen *ChiA* de 225 pb en las PGPR. El análisis filogenético al ARNr 16s por secuenciación y ERIC-PCR mostró variabilidad genética con la formación de cuatro Sub-grupos. La identificación molecular por secuencia al gen ARNr 16S definió lo géneros a *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. Existe variación en las biosíntesis de las fitohormonas AIA, AG y AS en las cepas MH-18, W-417 y FZ 9-7 a las 72 h. La identificación de Foc-R1 por PCR muestran un amplicón de 350 pb. Los ensayos antagonistas de los sobrenadantes bacterianos la cepa FZ 9-7 muestra inhibición micelial a Foc-R1 del 71% y disminuye la producción de esporas 2.5×10^6 esporas mL⁻¹. Los resultados proporcionan información sobre las relaciones genéticas de las PGPR por la producción metabolitos secundarios como proteasas, catalasa, quitinasas y sideróforos, así como el análisis morfológico y molecular a la identificación Foc-R1 y su interacción con los extractos antagónicos al inhibir el crecimiento de enfermedades en banano y cacao.

Palabras clave: ácido indol-3-acético; ácido giberélico; ácido salicílico; extractos celulares; gen *ChiA*; *Musa acuminata*.

DOI: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2025.047>

Cite this article:

Canchignia-Martínez, H. F., Macías Holguín, C. J., Saucedo Aguiar, S. G., Ortiz Almea, H. G., Cansing Arichabala, L., & Lahuathe Mendoza, B. J. (2025). Diversidad genética de aislados bacterianos antagónicos obtenidos de *Theobroma cacao* L. para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1. *Scientia Agropecuaria*, 16(4), 617-631.

1. Introducción

El banano (*Musa* spp.) en las últimas décadas está amenazado por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), conocido como mal de Panamá (Siamak & Zheng, 2018). Esta enfermedad que ocasionó grandes pérdidas al cultivar Gros Michel *Musa acuminata* (AAA) a fines del siglo XIX (Gurdaswani et al., 2020). Las esporas ingresan a la planta a través de sus raíces y desarrollan hifas largas septadas, que se extienden hasta el xilema y bloquean el suministro de agua alrededor de la planta y provoca el marchitamiento (Niwas et al., 2022).

Los síntomas internos incluyen decoloración de amarillo a marrón rojizo de los tejidos vasculares (Dita et al., 2010). Los síntomas externos por *Fusarium* comienzan con el amarillamiento y el marchitamiento de las hojas más viejas y progresan hacia las hojas más jóvenes hasta que la planta muere (Izquierdo-García et al., 2021). El patógeno se puede diseminar a través de estructuras propagativas como microconidios, macroconidios y clamidosporas (Meldrum et al., 2013). Las clamidosporas tienen una pared celular engrosada que permanecen inactivas en suelos infestados durante décadas y permite hacer frente a condiciones ambientales extremas (Were et al., 2023).

Se consideran fuentes de diseminación de *Fusarium* sp. al material de siembra, afluentes de agua, partículas del suelo, herramientas, calzado y maquinaria (Magdama et al., 2019a). Existen tres razas que afectan al banano como son: Foc raza 1, que causa enfermedades en el cultivar 'Gros Michel' (AAA), también ataca a las variedades 'Lady Finger' (AAB) y 'Silk' (AAB). La raza 2 afecta a los bananos de cocción como 'Bluggoe' (ABB) y la raza 4 es capaz de atacar a 'Cavendish' (AAA) así como a las otras variedades de banano afectadas por las razas 1 y 2 (Martín et al., 2021).

Las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (por sus siglas en inglés, PGPR) que habitan en el suelo, donde su funcionalidad es colonizar las raíces para mejorar el incremento de biomasa vegetal, crecimiento del sistema radicular, floración, contenido de clorofila y nutrientes del tejido foliar y el peso de brotes por la producción de Ácido Indol-3-Acético (AIA), Ácido Giberélico (AG) y Ácido Salicílico (AS) (Keswani et al., 2022; Macías Holguín et al., 2023a; Prisa et al., 2023; Cancchignia-Martínez et al., 2025a). El mecanismo de biocontrol de las PGPR implica la producción de enzimas como la quitinasas y proteasa, que degradan la pared celular fúngica a N-acetil D-glucosamina (Verma et al., 2023). Inducción de resistencia sistémica adquirida (SAR), inducción de resistencia sistémica (ISR) y

producción de metabolitos antifúngicos como: Cianuro de Hidrógeno (HCN), Ácido Fenazina-1-Carboxílico (PCA), Pioluteorina (Plt), Pirrolnitrina (Prn) y 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4 DAPG) que suprimen la germinación de conidias a enfermedades fitopatógenas (Crespo-Clas et al., 2024; Crespo Ávila et al., 2024; Cancchignia-Martínez et al., 2025b).

Las herramientas moleculares, como la secuenciación, la reacción en cadena de la polimerasa, la caracterización molecular y la diversidad genética de las poblaciones de bacterianas son fundamentales para la identificación de especies y para comprender la dinámica de la microbiota del suelo (Rouhrazzi & Khodakaramian, 2015; Getahun et al., 2020). Un método conocido a la variabilidad genética del microbioma es la técnica de PCR de consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (ERIC-PCR) específica que es confiable, reproducible, rápida y altamente discriminatoria para la diferenciación de especies y subespecies (Odori et al., 2020; Auhing Arcos et al., 2021). El fraccionamiento de los productos de la PCR produce un patrón de huellas dactilares complejo con el que se pueden diferenciar las cepas bacterianas (Singh, 2014). Las secuencias ERIC reconocen en una gran cantidad de genomas bacterianos, incluidos miembros de la familia Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Moraxellaceae etc (Chen et al., 2011). Esta diversidad evoca los procesos de evolución entre cepas bacterianas dentro de una especie (Ranjbar et al., 2017). El análisis de identificación molecular de bacterias comienza por secuenciación del gen ARNr 16S. El gen codifica el componente de ARN de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano que está presente en todas las bacterias se puede obtener información de distintos grupos filogenéticos, taxonómico e identificación a nivel de género y especie de las procariotas del 97% (Drancourt et al., 2000; da Silva et al., 2019; Satilmis et al., 2019).

El marchitamiento causado por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* genera tres tipos de esporas, que incluyen: macroconidios, microconidios y clamidosporas siendo este último resistente a varios fungicidas sintéticos y generan un nuevo ciclo de infección. Al no existir un método de control químico eficaz para controlar la incidencia del mal de Panamá. Entre las alternativas se encuentra el uso de los agentes de control biológico de origen microbiano las cuales poseen características benéficas como la producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos antagónicos con distintos efectos antibacteriano, nematocida y antifúngicos. Donde el objetivo de este estudio se basa en el análisis filogenético al gen

ARNr 16S y ERIC-PCR e identificación del gen *ChiA* de las PGPR como potencial empleo a la biosíntesis de fitohormonas (AIA, AG y AS) y actividad antagonista en desarrollo micelial y generación de esporas de FOC-R1.

2. Metodología

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Molecular, ubicados en el Campus Experimental "La María" propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicada en el km 7,5 de la vía Quevedo- Mocache, provincia de Los Ríos, Ecuador. Ubicada a 01° 04' 48.6" de latitud sur y 79° 30'04.2" de longitud oeste y, a una altitud de 85 msnm.

Caracterización por PCR al gen *ChiA*

A la identificación de gen *ChiA* se seleccionaron 10 rizobacterias PGPR que mostraron antagonismo hacia *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*. Estas bacterias se encuentran crioconservadas en glicerol al 10% a -40 °C del banco de germoplasma del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la UTEQ (Tabla 1). El ADN_g se obtuvo al emplear PureLink™ Genomic DNA Mini Kit - Thermo Fisher Scientific, según el protocolo descrito por el fabricante. Para la amplificación molecular se empleó los primers específicos *chiA*F (5'-GATATCGACTGGGAGTCCCC3') y *chiA*R (5'-CATAGAAGTCGTAGGTCATC3'), con producto de amplificación 225 pb (Ramaiah et al., 2000).

Tabla 1

Mecanismo de acción de las rizobacterias

Cepa	Tejido Vegetal	Mecanismo de acción					
		Solubilización			Antagonismo		
		N	P	K	PR	FLT	SFR
BF 567	R	++	+++	++	+++	++	+
FZ 9-7	R	++	++	++	+++	+++	+
LH 5-10	R	+	+	++	++	+++	+
MH 18	F	+	+	+	++	+	+
W-417	F	+	+	+	+	+	+
MN 5-20	F	+	+	++	+++	++	+
MN 5-19	F	+	+	+	++	+	+
AC3	F	+	+	++	++	+	+
PV-25	F	+	+	+	+	+	+

Tejido: R-radicular y F-foliar. Mecanismo de acción. Solubilización: N- nitrógeno, P- fósforo, K- potasio, Antagonismos: PR-actividad proteolítica, FLT-fluorescencia, SFR- producción de sideróforo (Canchignia-Martínez et al., 2024c).

La PCR se la realizó en un volumen de 20 µL con: 2 µL Dream taq Green buffer (1X), 1 µL dNTPs, 1,5 µL/cada primer, 0,2 µL Dream taq DNA polimerasa, 2 µL ADN, 13,3 µL H₂O. La reacción de PCR se desarrolló en el termociclador (TECHME®). Las condiciones de la reacción de PCR: a 94 °C por 4 min; 35 ciclos a 92 °C por 1 min; 58 °C por 1 min; 72 °C por

1 min, extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos en bromuro de etidio. Los fragmentos se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen®).

Identificación molecular por amplificación al ARNr 16S y generación de perfiles moleculares por ERIC-PCR

Se amplificó el gen para el ARN ribosomal 16S empleando partidores universales 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-ACG GCTACCTTGTTACGACTT-3') que amplifica una región la subunidad ribosomal 16S de 1500 pb (Hernández-García et al., 2008). La PCR se realizó en un volumen de 20 µL con: 2 µL Dream Taq Green buffer (1X), 1 µL dNTPs, 1,5 µL/cada primer, 0,2 µL Dream taq DNA polimerasa, 2 µL ADN, 13,3 µL H₂O. La reacción de PCR se desarrolló en el termociclador (TECHME®) con las condiciones térmicas: 94 °C por 4 min; 40 ciclos a 92 °C por 30 s; 58 °C por 60 s; 72 °C por 60 s; extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos en bromuro de etidio. Los fragmentos se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen®). Los productos amplificados se purificaron empleando el kit Invitrogen PureLink™ (GERMANY), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Los fragmentos de 1500 pb, al ARNr 16S se secuenció por MACROGEN empleando los partidores universales 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATAC-3') y 800R (3'-TACCAGGGTATCTAATCC-5'). por (Macrogen, Seúl, Korea). Las secuencias se compararon con la base de datos de GenBank de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), empleando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). El árbol filogenético al gen ARNr 16s, se construyó empleando el método Maximun Likelihood y alineados con múltiples secuencias bacterianas disponible en NCBI. El porcentaje de la réplica del árbol se obtuvo con 'bootstrap' de valores de 1000 (Felsenstein, 1985). Se eligió el mejor modelo de acuerdo al criterio de información Bayesian (BIC), Kimura-2-parámetros con el programa MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013).

El protocolo de ERIC-PCR se realizó a lo descrito por Louws et al. (1994) con algunas modificaciones. Con el empleo de los partidores ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC-2F (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3'). La PCR se realizó en un volumen de 20 µL con: 2 µL Dream

taq Green buffer (1X), 1 μ L dNTPs, 1,5 μ L/cada primer, 0,2 μ L Dream taq DNA polimerasa, 2 μ L ADN, 13,3 μ L H₂O. La reacción de PCR se desarrolló en el termociclador (TECHME®). Las condiciones de la reacción de PCR: 94 °C por 3 min; 40 ciclos a 94 °C por 1 min; 37 °C por 2 min; 72 °C por 2 min; extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos en bromuro de etidio. Los fragmentos se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen®). Los perfiles generados por ERIC-PCR, generó la información binaria de (0 y 1), reemplazando por las letras (A y T). La historia evolutiva se infirió empleando el método Maximun Likelihood, el árbol filogenético se construyó empleando la distancia evolutiva de Tamura 3-parametro con el programa MEGA 6.06. El porcentaje de la réplica del árbol se obtuvo con 'bootstrap' de valores de 1000 (Felsenstein, 1985). Se eligió el mejor modelo de acuerdo al criterio de información Bayesian (BIC), Kimura-2-parámetros con el programa MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013).

Producción de ácido indol-3-acético (AIA)

Para el análisis de síntesis de AIA las rizobacterias se inocularon en medio de cultivo líquido King B descrito por King et al. (1954), [(g L⁻¹): peptona, 20,0 g; glicerol, 15 mL; K₂HPO₄, 1,5 g; MgSO₄ x 7H₂O, 1,5 g;] suplementado con 5 mM de L-triptófano (Trp) (Thermo Fisher Scientific) se incubaron a 150 rpm por 24 y 72 h a 28 °C para su muestreo. Para la cuantificación a producción de AIA, del cultivo bacteriano se cosechó 750 μ L de sobrenadante centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos. Se añadió 250 μ L de la solución de Salkowski (3:1) y mantuvieron en oscuridad por 30 min (Gang et al., 2019). El cambio de coloración de rojo a rojo intenso muestra rasgo positivo de producción de AIA. La cantidad AIA (μ g mL⁻¹) fue cuantificada mediante espectrofotómetro "UNICO" modelo 1205 a 530 nm (Gordon & Weber, 1951). Se estableció una curva estándar con una hormona AIA comercial (Sigma-Aldrich) a 5, 10 15, 20, 25 y 30 μ g mL⁻¹ (Saker & Al-Rashid, 2013).

Producción de ácido giberélico (AG)

Las rizobacterias se cultivaron en caldo nutritivo [(g L⁻¹): peptona 5 g; cloruro de sodio 5 g, extracto de carne 1,5 g, extracto de levadura 1,5 g, pH 7,4] suplementado con 3 mM de L-metionina (Merck) incubadas a 150 rpm por 24 y 72 h a 28 °C para su muestreo (Jaroszuk-Ścisiel et al., 2019). Para la producción de giberelina se empleó el método estándar de Holbrook et al. (1961). Del cultivo

bacteriano, se recuperó 5 mL del sobrenadante acidificado pH 2 con HCl 1N centrifugado por 5 min a 8000 rpm. Se agregó 2 mL de Zn(C₄H₆O₄) y 2 mL C₆FeK₄N₆ e incubadas a 27 °C durante 75 minutos. La cuantificación de AG se determinó a 254 nm utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Genesys™ 10S y comparadas con una curva estándar de calibración a concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 100 μ g mL⁻¹ de ácido giberélico (Sigma-Aldrich) (Kesaulya et al., 2015).

Producción de ácido salicílico (AS)

Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo casaminoácidos tamponados con Tris-HCl [(g L⁻¹): Tris-HCl, 12 g; MgSO₄x7H₂O, 0,25 g; de K₂HPO₄, 0,9 g; casaminoácidos, 5 g; pH 7,5)] suplementado con 0.1 mM de FeCl₃ e incubadas a 150 rpm por 24 y 72 h a 28 °C para su muestreo Mishra & Baek (2021). Del cultivo de células se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y se recuperaron 2 mL de sobrenadante acidificado pH 2. Se agregó 2 mL CHCl₃ para la extracción de ácido salicílico en relación (1:1). A los extractos de cloroformo se le añadió 4 mL de H₂O y 5 mL de FeCl₃ a 2M (Meyer & Abdallah, 1978a). Las soluciones ácido salicílico-hierro púrpura se determinaron por espectrofotometría "UNICO" modelo 1205 a 527 nm y una curva estándar con ácido salicílico (Thermo Scientific Chemical) a 10, 20, 40, 60, 80 100 μ g mL⁻¹ (Cook, 1993).

Identificación de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Se recolectaron muestras de tejido necrótico vascular de Gros Michel (AAA) mismas que se llevaron al Laboratorio de Microbiología de la UTEQ. Las muestras se desinfectaron de forma superficial con etanol al 70% durante 30 s, NaClO al 5% por 1 min, lavadas con H₂O estéril y segmentada en 1 cm². Se colocaron 5 segmento de tejido vascular en placa Petri con PDA que contenían 120 mg mL⁻¹ de estreptomycin y 250 mg mL⁻¹ de cloranfenicol e incubadas a 28 °C durante cinco días para la obtención de cultivo monospórico de hongo del agente causal (Magdama et al., 2020b). Se observó la morfología de la colonia por su pigmentación y textura. Los caracteres morfológicos se visualizaron por microscopía óptica (ocular 8X y objetivo 100X) como la forma de las esporas microconidios, macroconidios y clamidosporas de *Fusarium* spp. descrito por Mostert et al. (2017).

Para la extracción de ADNg se tomaron fragmentos de micelio mismo que fueron pulverizados en N₂ líquido siguiendo el protocolo descrito por el fabricante DNeasy Plant Mini Kit de (QIAGEN-Start

EE.UU.). La identificación de Foc-R1 se realizó por PCR, se empleó los oligonucleótidos específicos W1805F (5'-GTTGAGTCTCGATAAACAGCAAT-3') y W1805R (5'-GACGAGGGGAGATATGGTC-3') (Li et al., 2012). Para la PCR preparó un volumen de 20 μ L con: 2 μ L Dream taq Green buffer (1X), 1 μ L dNTPs, 1,5 μ L/cada primer, 0,2 μ L Dream taq DNA polimerasa, 2 μ L ADN, 13,3 μ L H₂O. La reacción de PCR se desarrolló en el termociclador (TECHME®). Las condiciones térmicas: 94 °C por 1 min; 35 ciclos a 94 °C de 1 min; 94 °C por 30 s; 55 °C por 1 min, extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos en bromuro de etidio. Los fragmentos se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen®).

Obtención de los extractos celulares antagonísticos

La rizobacterias se incubaron en 50 mL de King B líquido a 150 rpm durante 28 °C por 72 h en un agitador. Se recuperaron 15 mL en tubos falcón del inóculo bacteriano centrifugado a 6000 rpm por 5 min, este proceso se realizó por triplicado para separar el sedimento bacteriano. Los extractos celulares se filtraron empleando Nalgene Syringe de 0,2 μ m y sometidas a choque térmico de 15 min a 90 °C a baño María y 15 min a -40 °C en el ultra congelador por triplicado y almacenados a 4 °C.

Inhibición de las estructuras miceliales y de proliferación de FOC-R1 por metabolitos antagonistas de PGPR

Se inocularon 0,2 mL de los extractos celulares y esparcidos en 11,8 mL de medio PDA y distribuidas en cajas Petri por triplicado. Se añadió un disco ($\varnothing$ 7 mm) de micelio en el centro de la placa y se adicionó una placa control sin inoculación de sobrenadantes. Se evaluó el porcentaje de inhibición de los enfrentamientos sobrenadante-patógeno desde el extremo del tarugo hasta el crecimiento fúngico a los 5, 10, 15 y 20 después de la inoculación (dpi), utilizando la formula % inhibición = (crecimiento del control - crecimiento del tratamiento / crecimiento del control) x 100.

Para la generación de esporas se esparcieron 10 mL de agua destilada estéril en placas Petri para la suspensión de esporas y filtradas con papel filtro para la separación de fragmentos de micelio. Se recuperó 1,48 mL de suspensión mezclada con 20 μ L de azul de tripán. Se colocó 10 μ L de la solución para su visualización en cámara Neubauer, para el conteo en cinco de los cuadrantes de 0,20 mm², para determinar la concentración de microconidios = (número de células x 10.000) / (número de cuadros).

En todos los experimentos los tratamientos contemplan 5 réplicas con 3 unidades experimentales cada una. Los valores a cada condición están representados con la desviación estándar promedio individual ($\pm$), los tratamientos fueron sujetos al análisis de varianza por ANOVA, y separados por procedimiento de comparación múltiple de Tukey SD, al nivel de significancia de ($p \leq 0,05$), empleando el programa estadístico Statgraphics CenturionTM V.18 (Statgraphics Technologies, 2019).

3. Resultados y discusión

Caracterización molecular del gen *chiA* por PCR

Se determinó la presencia del gen *chiA* que codifica el dominio catalítico de las quitinasas bacterianas con un producto de amplificación de 225 pb en las rizobacterias (PV-25, AC-3, BF-567, MH-18, MN 5-19, MN 5-20, CH-1, FZ 9-7, W-417, LH 5-10) (Figura 1). Donde los agentes de biocontrol de *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* Pf5 han recibido especial atención debido a que sintetiza metabolitos de actividad antifúngica y antibacteriana como 2,4 DAPG, Prn, Plt y HCN de amplio espectro que influyen a la actividad antagonista a problemas fitosanitarios y estimula la resistencia sistémica inducida en plantas al interaccionar con las raíces de la planta (Maurhofer et al., 2004). Al efecto inhibitorio en crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y antibiosis a *Rashtonia solanacearum* se debe a la producción de 2,4 DAPG, Plt y Prn por *P. protegens* RS-9 (Rai et al., 2017).

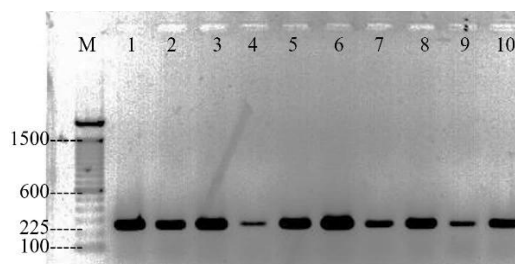


Figura 1. Amplificación del gen *ChiA* de 225 pb por cepas bacterianas productoras de quitinasas. M, marcador de masa molecular (Lader 100 pb Invitrogen). Carriles 1-10 (PV-25, AC-3, BF-567, MH-18, MN 5-19, MN 5-20, CH-1, FZ 9-7, W-417, LH 5-10).

Relación filogenética de las rizobacterias

La caracterización molecular al gen *ARNr* 16S exhibe que la cepa PV-25 mantiene una homología del 100% a *Klebsiella pneumoniae* NF21. La bacteria MN 5-20 identidad con *Enterobacter hormaechei* del 100%. Las cepas AC-3 y MN 5-19 con alta identidad con *Enterobacter cloacae* del 100%. Tres bacterias BF-567, MH-18 y LH 5-10 poseen alta

identidad con *Pseudomonas putida* del 91% y 100%. Las bacterias FZ 9-7 y W-417 muestra una alta identidad con *Pseudomonas chlororaphis* y *Pseudomonas simiae* del 99% y 100%. La bacteria CH-1 posee una alta identidad con *Klebsiella variicola* del 100%. Los datos genotípicos presentados aquí dan como resultado sustancialmente la identificación y selección de nuevas rizobacterias PGPR (Tabla 2). El análisis filogenético por gen ARNr 16S generó dos grandes grupos. El Grupo I reúne los sub-grupo (A-B) de mayor homología cinco bacterias *K. pneumoniae* (PV-25), *E. cloacae* (AC-3), *E. cloacae* (MN 5-20), *E. hormaechei* (MN 5-20) y *K. variicola* (CH-1) y la formación del Grupo II reúne al sub-grupo (C-D) las bacterias *P. putida* (BF-567), *P. putida* (MH-18), *P. putida* (W-417), *P. putida* (LH 5-10) y *P. chlororaphis* (FZ 9-7) (Figura 3). Estas bacterias

guardan una estrecha relación filogenética del gen ChiA que codifica a la producción de la enzima quitinasas al biocontrol de enfermedades fitopatógenas (Oktavioni et al., 2020). La quitinasa provoca la lisis de la pared celular de los hongos patógenos, al realizar cambios en las formas morfológicas de los hongos (esporulación, germinación de esporas y crecimiento de hifas) y la inhibición en eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita* (Lee & Kim, 2015; Asril & Supriyadi, 2024). Estas se agrupan en dos familias, donde cinco cepas bacterianas pertenecen a la familia Pseudomonadaceae al género *Pseudomonas* (MH-18, BF-567, W-417, LH 5-10, FZ 9-7) (Figura 2) con una secuencia de similitud del 99% a 100% a *P. putida* KT 2440 de capacidad de tolerar estrés salino y proceso de biorremediación (Fan et al., 2024).

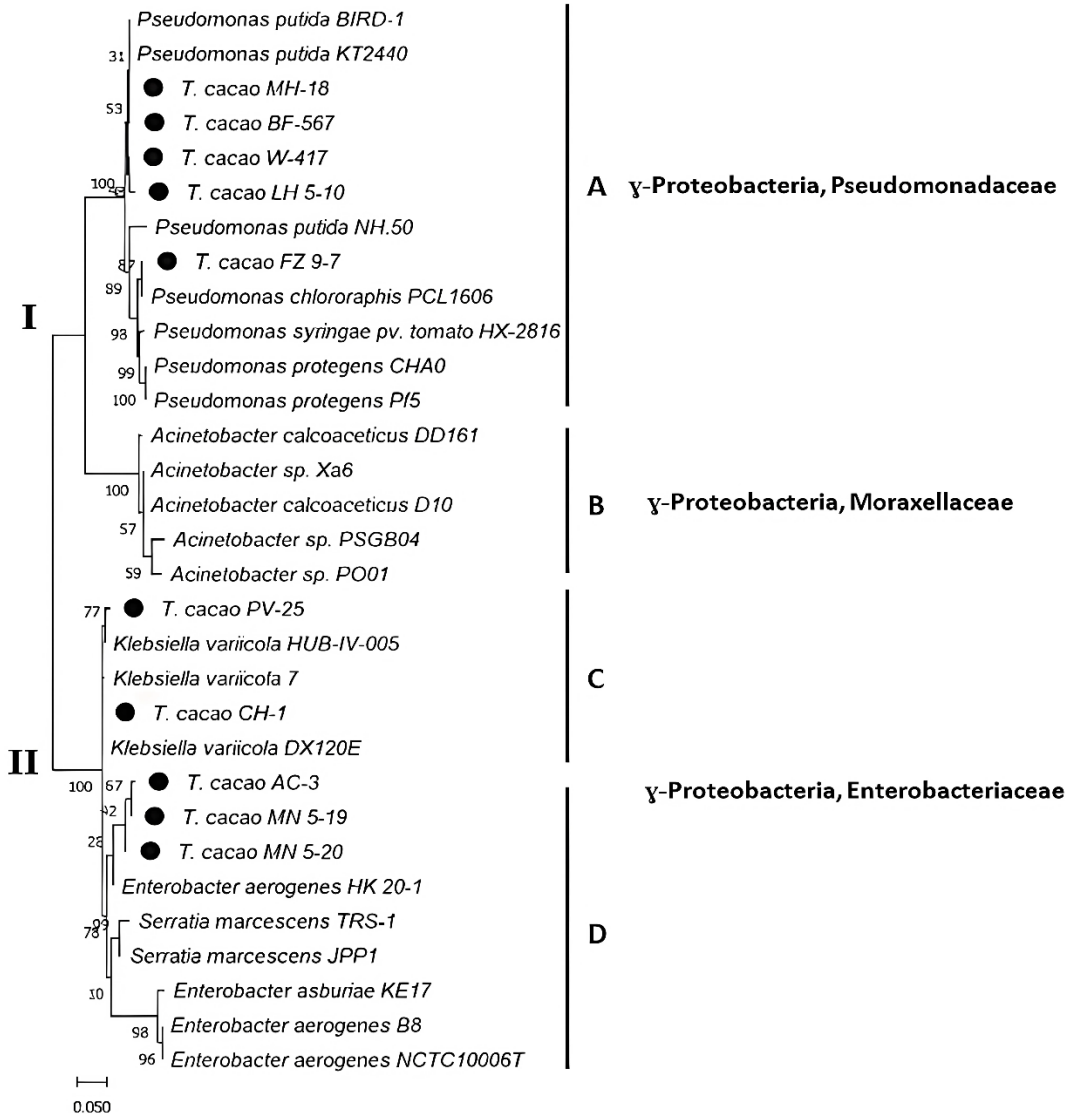


Figura 2. Árbol filogenético de las rizobacterias basados en la secuenciación del gen ARNr 16S. El árbol filogenético basado al método Maximun Likelihood, las distancias evolutivas se basaron a Kimura 2-parámetro. Distancias horizontales son proporcionales a las distancias filogenéticas están expresadas en sustituciones para un porcentaje de 1000 repeticiones.

Tabla 2
Caracterización molecular de las rizobacterias al compararse por GenBank de NCBI

Cepa	Identidad a la Base de datos de NCBI de GenBank			
	Organismo	Cepa	Identidad (%)	Número de accesoión
PV-25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NF21	100%	KP772066.1
AC-3	<i>Enterobacter cloacae</i>	NaHaAn	100%	QR732112.1
BF-567	<i>Pseudomonas putida</i>	A7	91%	KJ569368.1
MH-18	<i>Pseudomonas putida</i>	PB5	99%	MT367715.1
MN 5-19	<i>Enterobacter cloacae</i>	SN32	100%	MK182255.1
MN 5-20	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ZJTR20	100%	QM319808.1
CH-1	<i>Klebsiella variicola</i>	SB1	100%	HG933294.1
FZ 9-7	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	HAMBI1997	100%	LT899965.1
W-417	<i>Pseudomonas simiae</i>	WC7	99%	MN72712.1
LH 5-10	<i>Pseudomonas putida</i>	NA3	100%	AB109013.1

La cepa FZ 9-7 destaca su agrupamiento con *P. protegens* CHA0 y Pf-5 por sus rasgos de biocontrol a agentes patogénicos por producir metabolitos antagónicos como 2,4-diacetilfloroglucinol, cianuro de hidrógeno (HCN) y lipopéptidos cíclicos (Ramette et al., 2001; Flury et al., 2017). Reportes de *P. chlororaphis* PCL 1606 presentan actividad insectida y nematocida por la producción de compuesto volátiles como pirrolnitrina (PRN), fenazina-1-carboxamida (PCN) y 2-hexil-5-propil resorcinol (HPR) (Peng et al., 2018; Arrebola et al., 2022). El segundo grupo lo conforman a la familia Enterobacteriaceae constituida por los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* donde el agrupamiento CH-1, PV-25, AC-3, MN 5-19 y MN 5-20 carentes a producir enzimas como proteasa (Pr) y quitinasas (Qn) que inestabilizan el tejido celular al degradarlo. Reportes de *K. variicola* HUB-IV-005 tienen la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico (Qin et al., 2022), resistencia a los antibióticos (El-Sapagh et al., 2023). La amplificación de secuencias Repetitivas de Consenso Intergénico de Enterobacterias (ERIC-PCR) generó un perfil genético de una a siete bandas que varían en tamaño desde 100 a 2500 pb que muestra polimorfismo en el patrón de bandas mediante las diez rizobacterias (Figura 3).

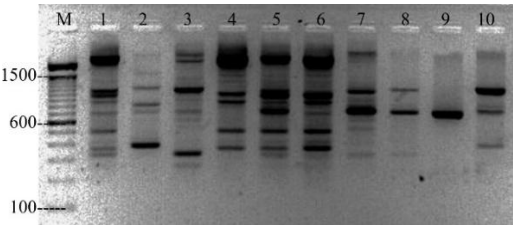


Figura 3. Patrón de huella dactilar de ADN de las rizobacterias generado por ERIC-PCR. M, marcador de masa molecular (Lader 100 pb Invitrogen). Carriles 1-10 (PV-25, AC-3, BF-567, MH-18, MN 5-19, MN 5-20, CH-1, FZ 9-7, W-417, LH 5-10).

Los rasgos característicos de la secuencia repetitiva por ERIC-PCR (124-127 pb) tiene una secuencia palindrómica central conservada que se amplifica por todo el genoma obteniendo patrones de bandas únicos que sirven como identificador, por lo tanto,

estas partes conservadas se utilizan como objetivo en biología molecular para la discriminación de especies bacterianas (Versalovic, 1994; Baldy-Chudzik & Stosik, 2005). Esta técnica es útil en la clasificación y diferenciación de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. Para determinar las relaciones genéticas de las rizobacterias, se construyó el análisis filogenético basado en huellas dactilares de ERIC-PCR donde se generó dos grandes grupos con una similitud del 86% a 100%. El Grupo I reúne cinco bacterias como MN 5-19, MN 5-20, AC-3 PV-25, CH-1. La formación del Grupo II lo conforma las cepas MH-18, FZ 9-7, BF- 567, W-417, LH 5-10 (Figura 4).

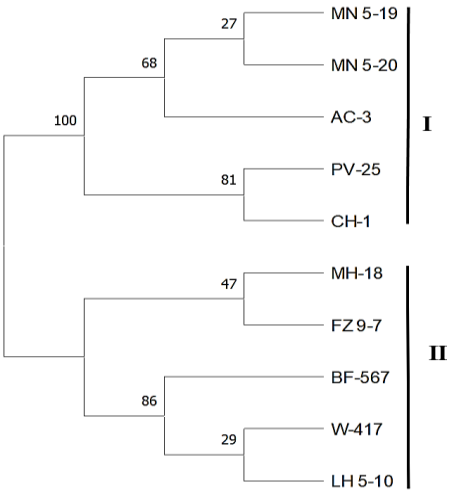


Figura 4. Árbol filogenético basado al método Maximun Likelihood de las rizobacterias antagónicas.

De manera similar, otros investigadores también han aplicado fingerprinting como ARDRA (Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) y REP (Repetitive Extragenic Palindromic) y BOX-PCR para estudiar la diversidad genética de bacterias diazotróficas y endofitas obtenidos de cultivares como arroz, maíz, cacao, banano, palma, etc. (Shrivastava, 2017; Chávez-Artega et al., 2018). Las huellas dactilares genómicas de BOX-PCR producen tres

grupos principales con 62 perfiles genéticos distintos utilizando BOX-PCR, que reflejaban un alto grado de diversidad entre especies de *Pseudomonas fluorescentes* en la rizosfera del banano (Naik et al., 2008).

Cuantificación de fitohormonas (AIA, AG y AS)

No se registró diferencia estadística a las 24 h en la síntesis de ácido indol acético (AIA) con adición de 5 mM de L-Trp. Se observó mayor incremento de *E. cloacae* MN 5-19 (70,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y *P. putida* MH-18 (68,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La producción de AIA se mantiene en aumento de *P. putida* MH-18 y *P. simiae* W-417 (95,96 y 62,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a las 72 h de muestreo, existiendo la disminución en la biosíntesis de AIA en *K. pneumoniae* PV-25 (4,85 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 5A). Estos resultados se alinean con Peñafiel-Jaramillo et al. (2016) que registró mayor incremento de producción auxínica por *Pseudomonas veronii* R4 en adición de 5 mM y 10 mM L-Trp a un intervalo de 72 h. A diferencia de *Pseudomonas protegens* CHA0 disminuye su biosíntesis. Estos resultados coinciden con Parvin et al. (2020) incrementa los niveles de producción en AIA de 30 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con 0,8 mM de Trp evaluados por 72 y 120 h en *Pseudomonas aeruginosa* UPMP3 y *Pseudomonas putida* UB1 (Bharucha et al., 2013). Donde al aumentar el Trp a 10 mM no genera incremento de síntesis de AIA por *Pseudomonas* sp. a 72 h de muestreo (Kalimuthu et al., 2019). Se ha demostrado que grupos bacterianos tanto rizosférico como filosférico son capaces de sintetizar AIA cuando el medio de cultivo es suplementado con 5 mM triptófano (L-Trp) como precursor para su biosíntesis (Figura 5B). Se han descrito al menos cinco rutas metabólicas como triptamina (TAM), indol-3-acetonitrilo (IAN), triptofol, ácido indol-3-pirúvico (IPyA), indol-3-acetamida (IAM) diferentes para la síntesis de AIA similares a las de las plantas (Patten & Glick, 1996a; Patten et al., 2013c). Dos vías comunes de biosíntesis de AIA de las comunidades bacterianas La vía del indol-3-piruvato (IPyA) puede ser realizada por plantas y rizobacterias (PGPR) (Vega-Celedón et al., 2016). La enzima indolpiruvato descarboxilasa es clave en la vía del ácido indol pirúvico (IPyA) (Patten & Glick, 2002b). La vía del indol-3-acetamida (IAM) solo puede ser utilizada por bacterias fitopatógenas como es el caso de *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* que aumentó niveles severos de síntesis de AIA donde existe sobreexpresión (Kochar et al., 2011).

En la biosíntesis de ácido giberélico se observaron diferencia significativa con variabilidad en la producción de ácido giberélico (AG) añadido con 3

mM L-metionina, a 24 h de muestreo se presenta biosíntesis significativa para LH 5-10 y FZ 9-7 (22,92 y 20,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La cantidad de AG es liberada a las 48 h de muestro con aumento a su biosíntesis por *P. chlororaphis* FZ 9-7, *P. putida* LH 5-10 y *K. variicola* CH-1 (31,04 a 25,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La bacteria *P. putida* AC-3 expreso niveles bajo de AG (12,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 5C). La búsqueda de nuevas bacterias capaces de sintetizar ácido giberélico comienza estudios *in vitro* donde Beale et al. (1982) observó que *Fusarium fujikuroi* posee la capacidad de inducir varios compuestos bioactivos de giberelinas por su asociación en el alargamiento de tejidos jóvenes en plantas vinculados en los procesos de división y elongación celular. El hongo *Trichoderma* DENTkZ3A0 es capaz de sintetizar AG suplementado con 3 mM L-Metionina y L-Triptófano a 120 h (Jaroszek-Ścisł et al., 2019). En *Bacillus* sp. (HB32) no incrementa la síntesis de AG a 168 h (Kesaulya et al., 2015). Al reducir los niveles de L-metionina se observa aumento de síntesis de AG en *Pseudomonas koreensis* (MU2) a 120 h respectivamente (Kang et al., 2019). La capacidad de cada bacteria para producir ácido giberélico está influenciada por varias características bioquímicas como, temperatura, nutrientes en los medios de cultivo, humedad, pH y tiempo de incubación (Figura 5D). Los niveles de esta fitohormona en los tejidos vegetales podrían ser modulados por reguladores microbianos a través de mecanismos que imitan los modos de aplicación exógenas, mitigación de estrés por sequía y metales pesados en los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas (Gusmiaty et al., 2019).

En el análisis comparativo a la producción de ácido salicílico (AS) suplementado con 0,1 mM de FeCl_3 presentaron diferencia significativa, con variabilidad en la producción de AS a su tiempo de muestro. A 24 h de muestreo, presenta una producción considerable de AS en *P. putida* LH 5-10 (18,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y *E. cloacae* AC-3 (14,65 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A 72 h de muestreo su biosíntesis de AS va en aumento por *P. chlororaphis* FZ 9-7 (18,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se reduce los niveles de producción de AS de 24 y 72 de muestreo por CH-1 (2,70 a 2,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 5E). En condición limitante de 0,01 mM FeCl_3 , *P. fluorescens* CHA401 sintetiza ácido salicílico asociado principalmente a sideróforos en forma de pioquelina, pioverdina, pseudobactin y derivados de salicilato durante el crecimiento limitado por hierro (Visca et al., 1993). La producción *in vitro* de AS por *Pseudomonas aeruginosa* KMPCH, presentó los niveles de producción más alto este comportamiento está ligado al tipo de sideróforos que produce

(Hernández et al., 2004). Existe variación a la producción de sideróforos salicilato o ácido salicílico en dependencia al medio de cultivo por *Azospirillum lipoferum* CRAS-2 s a su tiempo de muestreo (Lenin & Jayanthi, 2012). En condiciones limitante hierro, *P. fluorescens* CHA0 incrementan la síntesis de ácido salicílico en forma de pioverdina que cumple una función siderófora. Al incorporar 5 μ M inhibe el crecimiento celular de CHA0 (Meyer et al., 1992b). Las bacterias al incorporar condiciones limitantes FeCl_3

(0,1 mM) producen aumento en la biosíntesis de ácido salicílico o salicilatos, exhibe actividad siderófora vinculada al desarrollo de Resistencia sistémica adquirida (RSA) (Figura 5F). Esta producción bacteriana de salicilato a menudo está relacionada a la biosíntesis de pequeñas moléculas quelantes de iones férricos, sideróforos derivados del salicilo (conocidos como catecolato) en condiciones limitadas de hierro (Mishra et al., 2017).

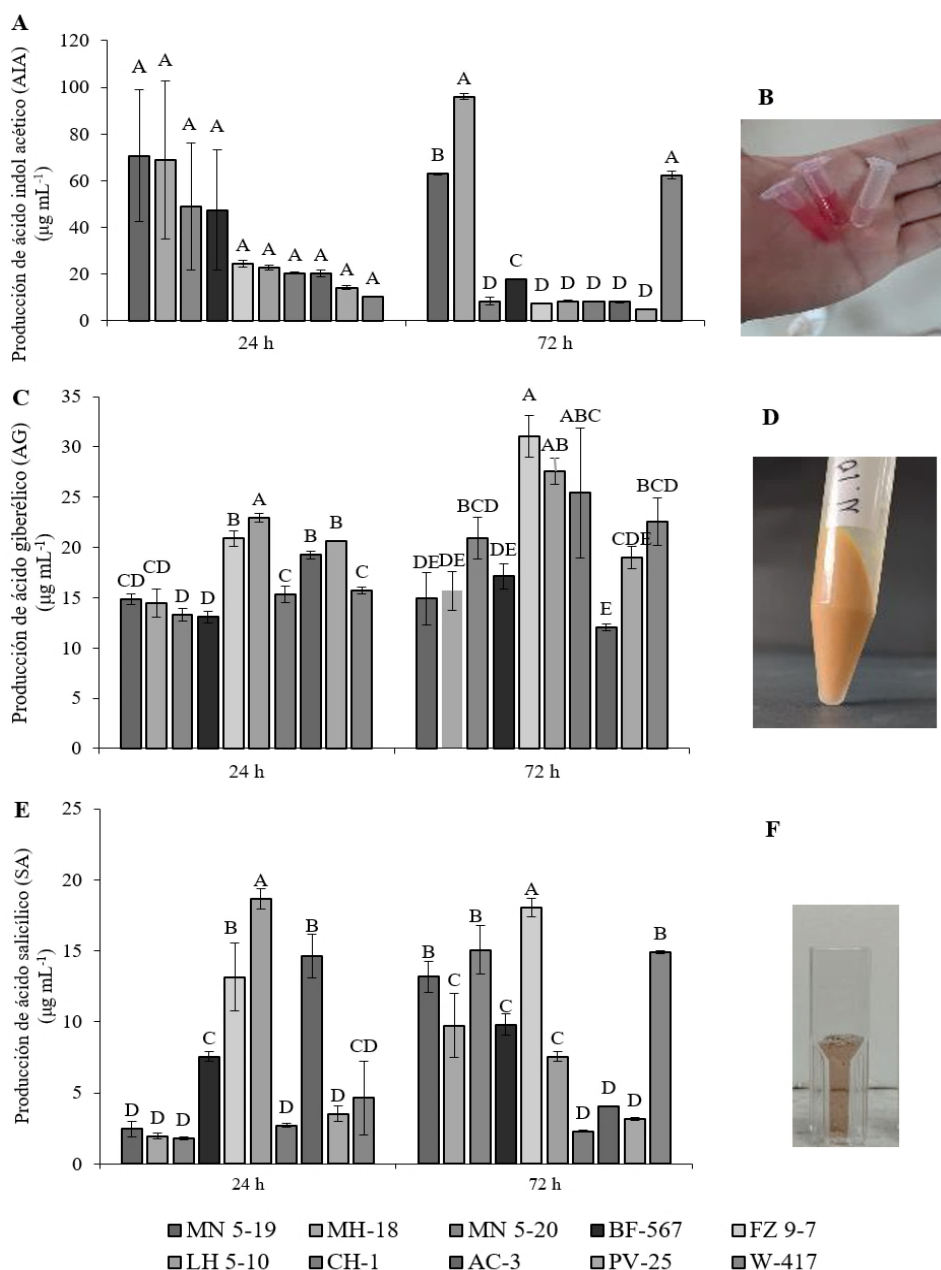


Figura 5. Cuantificación de biosíntesis de fitohormonas de las rizobacterias. A. Producción de ácido indol-3-acético (AIA). B. Cambio de coloración de rojo a rojo intenso. C. Producción de ácido giberélico (AG). D. Cambio de coloración a naranja. E. Producción de ácido salicílico (AS). F. Cambio de coloración a púrpura. Las barras indican el DE individual para tratamiento ($\pm$). Medias con letras iguales en la columna no difieren significativamente según Tukey ($p \leq 0,05$).

Identificación de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Del tejido vascular con síntomas de marchitamiento de la enfermedad se recuperaron fragmentos de micelio de *F. oxysporum* (Figura 6A). Una de las enfermedades limitantes del marchitamiento de plantaciones de *Musa Acuminata* es el mal de Panamá, ocasionado por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* es el agente causal (López-Zapata & Castaño-Zapata, 2019). La identificado por PCR con el producto de amplificación de 350 pb. La especificidad de la reacción fue determinada al no observar amplificación inespecífica en el control con *M. fijiensis* (Figura 6B). Los estudios realizados por Li et al. (2012) muestran un amplicón de 355 pb para *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 al realizar la reacción de PCR, con los partidores (Foc_1F/2R; FocTR_F/R; W2987_F/R) se generó los productos de amplificación de 240 a 460 pb para Foc-4 y FocRT-4 (Magdama et al., 2020b). Las características morfológicas presentaron un micelio algodonoso septado con pigmentación blanca a violeta, formas de microconidios ovaladas, macroconidios casi rectos, delgados y de paredes delgadas con tres o cuatro tabiques, una célula basal en forma de pie y una célula apical cónica curva y clamidosporas son globosas de paredes gruesas (Figura 6 C-D). Según Djeugap et al. (2023) muestra que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* de la localidad de Foubot presenta una coloración rosado y parduzco, de forma algodonoso y plano expuesto a 25 °C esto se ve influenciado a las características morfológica, variabilidad genética, el fenotipo y ciclo de infección del hongo que provoca cambio de coloración en plantaciones de banano Gros Michel (Aguilar-Hawod et al., 2020; Thangavelu et al., 2021).

Actividad antagonica del enfrentamiento extractos celulares-patógeno sobre el crecimiento micelial y número de esporas

Se observa diferencia significativa sobre la efectividad de los extractos celulares al inhibir el desarrollo micelial y generación de esporas de Foc-R1 a los 20 d.i.p. *P. chlororaphis* FZ 9-7, *P. putida* W-417 y *E. cloacae* AC-3 exhibieron el mayor porcentaje de inhibición micelial entre (71% a 61%), a diferencia del control con crecimiento micelial normal.

El extracto celular de *P. chlororaphis* FZ 9-7 reduce generación de esporas a $2,55 \times 10^6$ esporas mL⁻¹, a diferencia del hongo no tratadas genera con $3,40 \times 10^7$ esporas mL⁻¹ (Control) (Figura 7A). Esto se atribuye a la actividad enzimática hidrolítica como son producción de celulosa (Cel), proteasa (Pr) y quitinasas (Qn) al entrar en contacto degradan de la pared celular de algunas clases de hongo como Oomycetos, ascomicetos y basidiomicetos (Figura 7B). Los resultados de los extractos celulares obtenidos de *P. veronni* R4, *P. protegens* CHA0 y *S. marcescens* PM 3-8 reducen el desarrollo micelial del 80% a *P. palmivora* producen compuestos volátiles de (HCN; PR) y antifúngico como (2,4 DAPG; Prn) (Cedeño Moreira et al., 2020), donde el mecanismo de acción del cianuro de hidrogeno actúa en la inhibición de la respiración mitocondrial y fosforilación oxidativa (Gupta et al., 2010; Rijavec & Lapanje, 2016).

El 2,4-Diacetilfloroglucinol genera compuestos antifúngicos que causan desacoplamiento de la respiración y la síntesis de ATP en las células fúngicas al alterar la integridad de la membrana y varias metaloenzimas capaz de ser un agente de control biológico (Suresh et al., 2021).

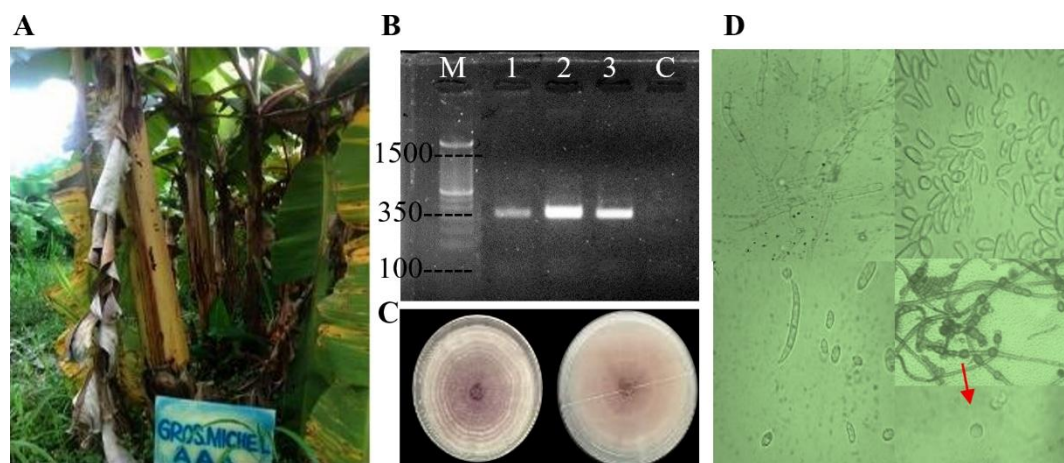


Figura 6. Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. **A.** Síntoma asociado con el marchitamiento del banano Gros Michel (AAA) por *Fusarium*. **B.** Marcador de peso molecular M (Lader 100 pb Invitrogen); amplificación de FOC-R1 en carriles 1, 2 y 3; C, *M. fijiensis*. **C.** Micelio algodonoso con formación blanca de pigmento violeta en la colonia. **D.** Estructuras morfológicas.

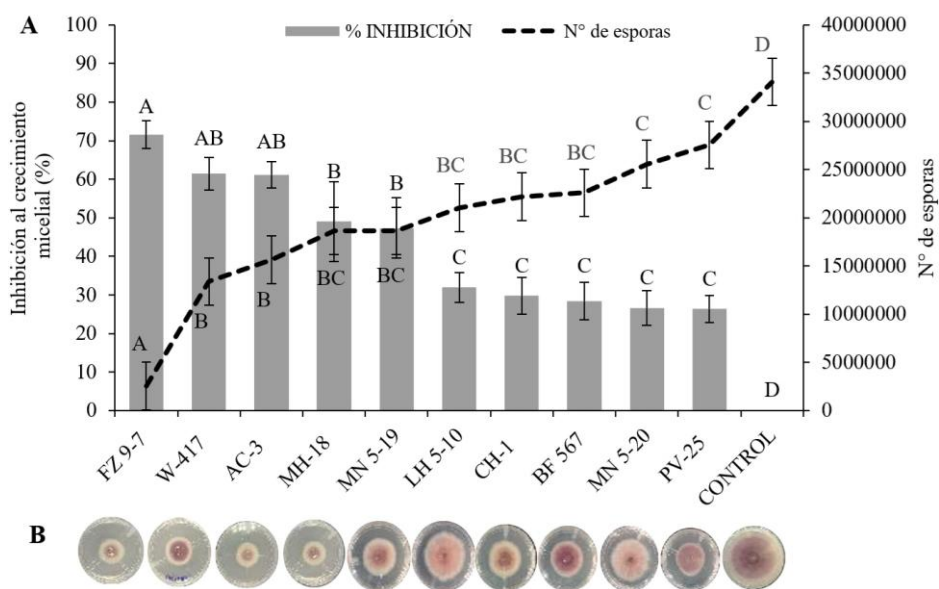


Figura 7. Ensayo antagónico de los extractos celulares PGPR a FOC-R1. A. inhibición al desarrollo micelial y números de esporas a los 20 dpi. B El rendimiento de actividad antifúngica producidas por los extractos celulares que impiden el desarrollo del crecimiento micelial. Las barras indican el DE individual para tratamiento ($\pm$). Medias con letras iguales en la columna no difieren significativamente según Tukey ($p \leq 0,05$).

Lo anterior se corrobora en el estudio de **Guato-Molina et al. (2019)** donde los metabolitos PR, HCN, Prn y 2,4-DAPG presentes en *B. subtilis* ATCC 55405, *P. protegens* CHA0, *K. variicola* BO 3-4 reduce significativamente al crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, *M. roseri* y *M. fijiensis* e interrumpe el desarrollo de tubo germinativo de las esporas presentando anomalías en los caracteres morfológicos en presencia de extractos celular de *E. asburiae* PM 3-14 que contiene un amplia gama de metabolitos antagónicos (**Chávez Arteaga et al., 2020; Macías Holguín et al., 2023**).

4. Conclusiones

Las bacterias provenientes de suelo rizosférico muestra mayor diversidad sobre la capacidad de biosíntesis de ácido indol acético, ácido giberélico y ácido salicílico hasta las 72 h de muestreo. Estas bacterias presentaron actividad quiniolítica al gen *ChiA*. La secuenciación al gen ARNr 16S presenta niveles de similitud del 91% a 100% para las bacterias de *K. pneumoniae* (PV-25), *P. chlororaphis* (FZ 9-7), *K. variicola* (CH-1) *E. hormaechei* (MN 5-20), *E. cloacae* (AC-3; MN 5-19), *P. simiae* (W-417), *P. putida* (BF-567; MH-18; LH 5-10). El proceso de inhibición antagónico de micelio a FOC-R1 *in vitro* por FZ 9-7 alcanzaron los promedios superiores al 70% y disminuye la generación de esporas destacándose la actividad antifúngica.

Las musáceas se encuentran amenazadas por enfermedades vasculares como *Fusarium oxysporum* f.

sp. cubense raza 4 tropical (FOC R4T) y *Ralstonia solanacearum* raza 2 que afectan a cultivares comerciales de banano (*Musa acuminata* AAA) y plátano (*Musa balbisiana* AAB) agentes capaces de provocar pérdidas devastadoras en la producción en su totalidad. En el Ecuador aún no se ha reportado la presencia de FOC R4T, la amenaza latente exige medidas de bioseguridad y desarrollo de estrategias agrobiotecnológicas para el manejo de enfermedades. El uso de FOC-R1 como modelo experimental se presenta como una herramienta estratégica para evaluar interacciones con sobrenadantes antagónicos por constituir un insumo valioso para la formulación de bio-inoculantes con aplicaciones en condiciones de invernadero y sistemas abiertos.

Las interacciones planta-patógeno-microbioma en el Ecuador siguen siendo una incógnita sobre su funcionalidad y mecanismos de defensa molecular que genera al entrar en contacto con enfermedades vasculares. Como línea de investigación se propone la validación de consorcios microbianos en cultivares de *Musa acuminata* AAA evaluando su eficacia en la supresión de FOC-R1 en plántulas de cv Gros Michel y extendiendo su aplicación hacia otros fitopatógenos de relevancia como *Ralstonia solanacearum* raza 2 en plántulas de cv Williams y adicionar un análisis metagenómica y transcritómica para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la inducción de resistencia sistémica y la producción de metabolitos antifúngicos y antibacterianos.

ORCID

- H. F. Canchignia-Martínez  <http://orcid.org/0000-0003-1195-5446>
 C. J. Macías Holguín  <https://orcid.org/0000-0003-2068-8503>
 S. G. Saucedo Aguiar  <https://orcid.org/0000-0002-8707-2175>
 H. G. Ortiz Almea  <https://orcid.org/0009-0005-4484-7128>
 L. Cansing Arichabala  <https://orcid.org/0009-0002-1944-9353>
 B. J. Lahuathe Mendoza  <https://orcid.org/0000-0001-7985-1999>

Referencias bibliográficas

- Aguilar-Hawod, K. G. I., de la Cueva, F. M., & Cumagun, C. J. R. (2019). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing Panama wilt of banana in the Philippines. *Pathogens*, 9(1), 32. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010032>
- Arrebola, E., Aprile, F. R., Calderón, C. E., De Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2022). Insecticidal features displayed by the beneficial rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. *International Microbiology*, 25(4), 679-689. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00253-w>
- Asril, M., & Supriyadi, D. (2024). Characterization of Extracellular Chitinase from *Bacillus cereus* SAHA 12.13 and Its Potency as a Biocontrol of *Curvularia affinis*. *Journal of Multidisciplinary Applied Natural Science*, 4(1), 165-175. <https://doi.org/10.47352/jmans.2774-3047.203>
- Auhing Arcos, J. A., Cedeño Moreira, Á. V., Saucedo Aguiar, S., Vera Benites, L. F., Macías Holguín, C. J., & Martínez, H. F. C. (2021). Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Monilophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L. nacional del Litoral Ecuatoriano. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 599-609. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.064>
- Baldy-Chudzik, K., & Stosik, M. (2005). Specific genomic fingerprints of *Escherichia coli* strains with repetitive sequences and PCR as an effective tool for monitoring freshwater environments. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(5).
- Beale, M. H., Bearder, J. R., Down, G. H., Hutchison, M., MacMillan, J., & Phinney, B. O. (1982). The biosynthesis of kaurenolide diterpenoids by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 21(6), 1279-1287. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)80126-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)80126-X)
- Bharucha, U., Patel, K., & Trivedi, U. B. (2013). Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural research*, 2, 215-221. <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0065-7>
- Canchignia-Martínez, H. F., Macías-Holguín, C. J., Tapia-Quintana, D. N., Manzo-Campos, T., Saltos-Avilés, J. D., & Vera-Benites, L. F. (2025a). Bacterias Productoras de Ácido Indol-3-acético y Solubilizadoras de Fósforo y Potasio como Promotoras de Crecimiento en *Oryza sativa* L. *Revista Terra Latinoamericana*, 43. <https://doi.org/10.28940/terralatinoamericana.v43i.1969>
- Canchignia-Martínez, H. F., Macías-Holguín, C. J., Zurita Segovia, R. D., Vera-Benites, L. F., Ortiz-Almea, H. G., & Tapia-Quintana, D. N. (2025b). Rhizobacteria and Cell Extracts with Antagonistic Potential on *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* CCN-51. *Revista Terra Latinoamericana*, 43. <https://doi.org/10.28940/terralatinoamericana.v43i.2009>
- Canchignia-Martínez, H. F., Vera-Benites, L. F., Tapia-Quintana, D. N., Cedeño-Moreira, Á. V., García-Intriago, E., & Macías-Holguín, C. J. (2024c). Caracterización Bioquímica de Rizobacterias Endófitas con Actividad Biocontroladora Contra *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*. *Revista Terra Latinoamericana*, 42. <https://doi.org/10.28940/terra.v42i.1807>
- Cedeño Moreira, Á. V., Romero Meza, R. F., Auhing Arcos, J. A., Mendoza León, A. F., Abasolo Pacheco, F., & Canchignia Martínez, H. F. (2020). Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51. *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 503-512. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.05>
- Chávez-Arteaga, K., Guato-Molina, J., Peñafiel-Jaramillo, M., Mestanza-Uquillas, C., & Canchignia-Martínez, H. F. (2018). Bacterias fluorescentes productoras de metabolitos antagónicos de cultivos nativos de *Musa* sp. y su diversidad filogenética al gen ARNr 16S. *Ciencia y Tecnología*, 11, 17-29.
- Chávez-Arteaga, K. T., Guato Molina, J. J., Rodríguez Acosta, J. L., Cedeño Moreira, Ángel V., Romero Meza, R. F., Canchignia Martínez, H. F. (2020). Rizobacterias con potencial antagonista *in vitro* a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Ciencia y Tecnología*, 13(2), 9-16. <https://doi.org/10.18779/cyt.v13i2.387>
- Chen, Q., Qi, P., Xu, R., Tambong, J. T., Djama, Z. R., & Li, W. (2011). Comparison of three typing methods for evaluating the diversity of *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. *Journal of Plant Sciences*, 6(2), 52. <https://dx.doi.org/10.3923/jps.2011.52.65>
- Cook, R. J. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 31(1), 53-80. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000413>
- Crespo Ávila, J. A., Carranza Cárdenas, C. C., Cedeño Moreira, A. V., Vera Benites, L. F., & Chevez Villanueva, M. S. (2024). Actividad antagonista de PGPR en nematodo fitoparásito *Pratylenchus* spp. en *Musa paradisíaca* (*Musa acuminata* × *M. balbisiana*) cv. cavendish. *Alfa Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinaria*, 8(24), 717-728. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v8i24.297>
- Crespo-Clas, Á. M., Cedeño-Moreira, Á. V., Canchignia-Martínez, H. F., & Garcés-Fiallos, F. R. (2024). Rhizobacterial consortium differently affects black leaf spot, physiological, morphological, and productive components in two generations of banana plants. *Rhizosphere*, 31, 100932. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100932>
- da Silva, C. B., Dos Santos, H. R. M., Marbach, P. A. S., de Souza, J. T., Cruz-Magalhães, V., Argôlo-Filho, R. C., & Loguerio, L. L. (2019). First-tier detection of intragenomic 16S rRNA gene variation in culturable endophytic bacteria from cacao seeds. *PeerJ*, 7, e7452. <https://doi.org/10.7717/peerj.7452>
- Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza Jr, M. T., & Kema, G. H. J. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant pathology*, 59(2), 348-357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x>
- Djeugap, J. F., Abireche, H. U., Donfack, C. P., Sonkoue, A. M., Ndogho, A., & Nouteka, J. N. (2023). Cultural characterization of five isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (banana fusarium wilt) and antifungal activity of plant extracts. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 35(1), 43-53. <https://doi.org/10.33866/phytopathol.035.01.0844>
- Drancourt, M., Bollet, C., & Raoult, D. (2000). 16 S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiol*, 38, 362-363. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3623-3630.2000>
- El-Sapagh, S., Allam, N. G., El-Sayed, M. N. E. D., El-Hefnawy, A. A., Korbecka-Glinka, G., & Shala, A. Y. (2023). Effects of *Silybum marianum* L. seed extracts on Multi Drug Resistant (MDR) Bacteria. *Molecules*, 29(1), 64. <https://doi.org/10.3390/molecules29010064>
- Fan, M., Tan, S., Wang, W., & Zhang, X. (2024). Improvement in Salt Tolerance Ability of *Pseudomonas putida* KT2440. *Biology*, 13(6), 404. <https://doi.org/10.3390/biology13060404>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Flury, P., Vesga, P., Péchy-Tarr, M., Aellen, N., Dennert, F., et al. (2017). Antimicrobial and insecticidal: cyclic lipopeptides and hydrogen cyanide produced by plant-beneficial *Pseudomonas* strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 contribute to insect killing. *Frontiers in microbiology*, 8, 100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00100>

- Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2019). Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-protocol*, 9(9), e3230-e3230. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOCOL.3230>
- Gethahun, A., Kiros, S., Muleta, D., & Assefa, F. (2020). Genetic and metabolic diversities of rhizobacteria isolated from degraded soil of Ethiopia. *Heliyon*, 6(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05697>
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- Guato-Molina, J. J., Auhing-Arcos, J. A., Crespo-Ávila, J. A., Esmeraldas-García, G. A., Mendoza-León, A. F., & Canchignia-Martínez, H. F. (2019). Bacterias promotoras del crecimiento en plantas con potencial agente biocontrolador a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, y *Monilophthora roreri*. *Scientia Agropecuaria*, 10(3), 393-402. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.03.10>
- Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: a review. *Journal of hazardous materials*, 176(1-3), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.038>
- Gurdaswani, V., Ghag, S. B., & Ganapathi, T. R. (2020). FocSge1 in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 is essential for full virulence. *BMC microbiology*, 20, 1-15. <https://doi.org/10.4067/S0717-34582008000500005>
- Gusmiaty, Restu, M., Bachtiar, B., & Larekeng, S. H. (2019). Gibberellin and IAA production by rhizobacteria from various private forest. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 270(1), 012018. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/270/1/012018>
- Hernández García, M., Morgante, V., Avila Perez, M., Villalobos Biaggini, P., Miralles Noé, P., González Vergara, M., & Seeger Pfeiffer, M. (2008). Novel s-triazine-degrading bacteria isolated from agricultural soils of central Chile for herbicide bioremediation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(5), 5-6. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582008000500005>
- Hernández, A., Rives, N., Caballero, A., Hernández, A. N., & Heydrich, M. (2004). Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de biotecnología*, 6(1), 6-13.
- Holbrook, A. A., Edge, W. J. W., & Bailey, F. (1961). Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. <https://doi.org/10.1021/ba-1961-0028.ch018>
- Izquierdo-García, L. F., Carmona, S. L., Zuluaga, P., Rodríguez, G., Dita, M., Betancourt, M., & Soto-Suárez, M. (2021). Efficacy of disinfectants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 isolated from La Guajira, Colombia. *Journal of Fungi*, 7(4), 297. <https://doi.org/10.3390/jof7040297>
- Jaroszk-Ścisł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., ... & Janusz, G. (2019). Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase *in vitro* synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DENTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4923. <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>
- Kalimuthu, R., Suresh, P., Varatharaju, G., Balasubramanian, N., Rajasekaran, K. M., & Shanmugaiah, V. (2019). Isolation and characterization of Indole acetic acid [IAA] producing tomato Rhizobacterium *pseudomonas* sp VSMKU4050 and its potential for plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(06), 443-455. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.806.050>
- Kang, S. M., Adhikari, A., Lee, K. E., & Park, Y. G. (2019). Gibberellin producing rhizobacteria *Pseudomonas koreensis* MU2 enhance growth of lettuce (*Lactuca sativa*) and Chinese cabbage (*Brassica rapa*, chinensis). *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences*, 9(2). <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.166-170>
- Kesaulya, H., Zakaria, B., & Syaiful, S. A. (2015). Isolation and physiological characterization of PGPR from potato plant rhizosphere in medium land of Buru Island. *Procedia Food Science*, 3, 190-199. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.021>
- Keswani, C., Singh, S. P., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., ... & Sansinenea, E. (2022). Biosynthesis and beneficial effects of microbial gibberellins on crops for sustainable agriculture. *Journal of applied microbiology*, 132(3), 1597-1615. <https://doi.org/10.1111/JAM.15348>
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44(2), 301-307. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:002221435490222X>
- Kochar, M., Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2011). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Research in microbiology*, 162(4), 426-435. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.03.006>
- Lee, Y. S., & Kim, K. Y. (2015). Statistical optimization of medium components for chitinase production by *Pseudomonas fluorescens* strain HN1205: role of chitinase on egg hatching inhibition of root-knot nematode. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(3), 470-478. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1010702>
- Lenin, G., & Jayanthi, M. (2012). Indole acetic acid, gibberellic acid and siderophore production by PGPR isolates from rhizospheric soils of *Catharanthus roseus*. *International Journal of Pharmaceutical Biological Archive*, 3(4), 933-938.
- Li, M. H., Yu, X. T., Wang, H. F., Zhou, J. N., Xi, P. G., & Jiang, Z. D. (2012). Rapid detection and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(19), 3971-3979. <http://10.3864/j.issn.0578-1752.2012.19.008>
- López-Zapata, S. P., & Castañón-Zapata, J. (2019). Integrated management of Panama disease *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *cubense* (EF SM.) WC Snyder & HN Hansen: a review. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1240>
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., & De Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*, 60(7), 2286-2295. <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2286-2295.1994>
- Macías-Holguín, C. J., Canchignia-Martínez, H. F., Delgado-Basurto, V. D., Paucar-Nieto, F. P., Arellano-Ibarra, K. V., & Cedeño-Moreira, Á. V. (2023a). Efectos de la co-inoculación de Bioformulados (PGPR's) sobre el porcentaje de germinación y promover el crecimiento en plántula de papaya (*Carica papaya* L.). *Manglar*, 20(2), 149-155. <http://dx.doi.org/10.57188/manglar.2023.017>
- Macías Holguín, C. J., Valarezo Padilla, F. C., Tapia Quintana, D. N., Canchignia Martínez, H. F., Cedeño Moreira, Ángel V., & García Intriago, E. (2023b). Efecto de bioformulados bacterianos como controladores de *Radopholus similis* y potenciadores del desarrollo de plántulas de banano (*Musa acuminata*) cultivar Williams. *Ciencia y Tecnología*, 16(2), 9-16. <https://doi.org/10.18779/cyt.v16i2.705>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., Sosa, D., Geiser, D. M., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2019a). Comparative analysis uncovers the limitations of current molecular detection methods for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 strains. *PLoS One*, 14(9), e0222727. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0222727>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2020b). Genetic Diversity of

- Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, 9(9), 1133. <https://doi.org/10.3390/plants9091133>
- Martín, M. C., Leyva, L., Suárez, M. A., Pichardo, T., Caraballos, I. B., & Capó, Y. A. (2021). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Agronomía Mesoamericana*, 466-478. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.39720>
- Maurhofer, M., Baehler, E., Notz, R., Martinez, V., & Keel, C. (2004). Cross talk between 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol pseudomonads on wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1990-1998. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1990-1998.2004>
- Meldrum, R. A., Daly, A. M., Tran-Nguyen, L. T. T., & Aitken, E. A. B. (2013). The effect of surface sterilants on spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Crop protection*, 54, 194-198. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.08.014>
- Meyer, J. A., & Abdallah, M. A. (1978a). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology*, 107(2), 319-328. <https://doi.org/10.1099/00221287-107-2-319>
- Meyer, J. M., Azelvandre, P., & Georges, C. (1992b). Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *BioFactors (Oxford, England)*, 4(1), 23-27.
- Mishra, A. K., & Baek, K. H. (2021). Salicylic acid biosynthesis and metabolism: a divergent pathway for plants and bacteria. *Biomolecules*, 11(5), 705. <https://doi.org/10.3390/biom11050705>
- Mostert, D., Molina, A. B., Daniells, J., Fourie, G., Hermanto, C., Chao, C. P., ... & Viljoen, A. (2017). The distribution and host range of the banana Fusarium wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. *PLoS One*, 12(7), e0181630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181630>
- Naik, P. R., Sahoo, N., Goswami, D., Ayyadurai, N., & Sakthivel, N. (2008). Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. *Microbial ecology*, 56, 492-504. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9368-9>
- Niwas, R., Chand, G., & Gupta, R. N. (2022). Fusarium wilt: a destructive disease of banana and their sustainable management. In *Fusarium-An Overview of the Genus. IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101496>
- Odori, C., Ngaira, J., Kinyua, J., & Nyaboga, E. N. (2020). Morphological, genetic diversity and symbiotic functioning of rhizobia isolates nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in soils of Western Kenya and their tolerance to abiotic stress. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1), 1853009. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1853009>
- Oktaviani, M., Winata, S. R., Syafriani, E., Syukriani, L., & Jamsari, J. (2020, April). Isolation of Chitinase B [ChiB] gene from *Serratia plymurtica* strain UBCF_13. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 497(1), 012020. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/497/1/012020>
- Parvin, W., Rahman, M. M., Govender, N. T., & Wong, M. Y. (2020). Identification, determination and quantification of indole-3-acetic acid produced by *Pseudomonas aeruginosa* UPMP3 and its effect on the growth of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *World Journal of Agricultural Research*, 8(3), 75-83. <https://doi.org/10.12691/wjar-8-3-2>
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996a). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), 207-220. <https://doi.org/10.1139/mj96-032>
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002b). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Patten, C. L., Blakney, A. J., & Coulson, T. J. (2013c). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 39(4), 395-415. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.716819>
- Peng, H., Zhang, P., Bilal, M., Wang, W., Hu, H., & Zhang, X. (2018). Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microbial cell factories*, 17, 1-12.
- Peñafiel-Jaramillo, M., Barrera-Álvarez, A. E., Torres-Navarrete, E. D., Canchignia-Martínez, H. F., Prieto-Encalada, H., & Morante-Carriel, J. (2016). Producción de ácido indol-3-acético por *Pseudomonas veronii* R4 y formación de raíces en hojas de vid "Thompson seedless" in vitro. *Ciencia y Tecnología*, 9, 31-36. <https://doi.org/10.18779/cyt.v9i1.158>
- Prisa, D., Fresco, R., & Spagnuolo, D. (2023). Microbial biofertilisers in plant production and resistance: A review. *Agriculture*, 13(9), 1666. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE13091666>
- Qin, Y., Xie, X. Q., Khan, Q., Wei, J. L., Sun, A. N., Su, Y. M., ... & Xing, Y. X. (2022). Endophytic nitrogen-fixing bacteria DX120E inoculation altered the carbon and nitrogen metabolism in sugarcane. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1000033. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1000033>
- Rai, R., Srinivasamurthy, R., Dash, P. K., & Gupta, P. (2017). Isolation, characterization and evaluation of the biocontrol potential of *Pseudomonas protegens* RS-9 against *Ralstonia solanacearum* in Tomato. *Indian Journal of Experimental Biology*, 55, 595-603.
- Ramaiah, N., Hill, R. T., Chun, J., Ravel, J., Matte, M. H., Straube, W. L., & Colwell, R. R. (2000). Use of a chiA probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(1), 63-71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00755.x>
- Ramette, A., Moëne-Loccoz, Y., & Défago, G. (2001). Polymorphism of the polyketide synthase gene phlD in biocontrol fluorescent pseudomonads producing 2, 4-diacetylphloroglucinol and comparison of PhlD with plant polyketide synthases. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(5), 639-652. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.5.639>
- Ranjbar, R., Tabatabaee, A., Behzadi, P., & Kheiri, R. (2017). Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from different animal stool specimens. *Iranian journal of pathology*, 12(1), 25. <https://doi.org/10.30699/ijp.2017.21506>
- Rijavec, T., & Lapanje, A. (2016). Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontiers in microbiology*, 7, 216209. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785>
- Rouhraz, K., & Khodakaramian, G. (2015). Phenotypic and genotypic diversity of root-nodulating bacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Iran. *Annals of microbiology*, 65, 2219-2227. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1062-9>
- Sarker, A., & Al-Rashid, J. (2013). Analytical protocol for determination of Indole 3 acetic acid (IAA) production by Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB). Technical report of Quantification of IAA by microbes September: 3-5.
- Satilmis, S., Toprak, N. U., Ilgin, C., & Soyletir, G. (2019). Evaluation of direct 16S rRNA PCR from clinical samples for bacterial detection in normally sterile body sites. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(11), 978-983. <https://doi.org/10.3855/jidc.11732>
- Shrivastava, U. P. (2017). Molecular diversity assessment of plant growth promoting rhizobacteria using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16s rRNA gene. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(1), 72-80. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v5i1.17029>
- Siamak, S. B., & Zheng, S. (2018). Banana Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) control and resistance, in the context of developing wilt-resistant bananas within sustainable production systems. *Horticultural Plant Journal*, 4(5), 208-218. <https://doi.org/10.1016/j.HPJ.2018.08.001>

- Singh, B. P. (2014). Genetic fingerprinting of antimicrobial fluorescent *Pseudomonads* associated with banana rhizosphere. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 1(2), 1-6.
- Statgraphics Technologies (2019). Statgraphics Centurion Version 18 User's Manual. The Plains, VA, USA: Statgraphics Inc.
- Suresh, P., Varathraju, G., Shanmugaiyah, V., Almaary, K. S., Elbadawi, Y. B., & Mubarak, A. (2021). Partial purification and characterization of 2, 4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* VSMKU3054 against bacterial wilt disease of tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2155-2167. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.073>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-29. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thangavelu, R., Gopi, M., Pushpakanth, P., Loganathan, M., Edwin Raj, E., Marimuthu, N., ... & Uma, S. (2021). First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* VCG 0125 and VCG 01220 of Race 1 Infecting Cavendish Bananas (*Musa* sp. AAA) in India. *Plant Disease*, 105(4), 1215-1215. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-2052-PDN>
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos tropicales*, 37, 33-39. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Verma, P., Chandra, P., Rai, A. K., Basak, N., Sundha, P., Sehrawat, A., ... & Yadav, R. K. (2023). Isolation, Screening and Evaluation of Biocontrol Potential of Rhizobacteria isolated from different agro-ecologies. *Journal of Soil Salinity and Water Quality*, 15(2), 229-241.
- Versalovic, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40.
- Visca, P., Ciervo, A., Sanfilippo, V., & Orsi, N. (1993). Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. *Microbiology*, 139(9), 1995-2001. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-9-1995>
- Were, E., Viljoen, A., & Rasche, F. (2023). Iron necessity for chlamydospore germination in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4. *BioMetals*, 36(6), 1295-1306. <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00519-4>