



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora  
(BAFEs) de suelos rizosféricos, como agentes de control  
biológico de  
*Burkholderia glumae***

**Luz Adriana Pedraza Herrera**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá, Colombia  
2015

**Evaluación de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora  
(BAFEs) de suelos rizosféricos, como agentes de control  
biológico de *Burkholderia glumae***

**Luz Adriana Pedraza Herrera**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias - Microbiología**

Director (a):

Ph.D. Daniel Uribe Vélez

Línea de Investigación:

Microbiología Agrícola

Grupo de Investigación:

Microbiología Agrícola

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá, Colombia

2015



*A mis padres, Ana y Miguel, por ser mi mayor ejemplo de vida, por enseñarme a ser fuerte y valiente, a ser constante y no darme nunca por rendida... y.....*

*..... a mi hijo Julián, por ser el motor de mi vida, mi pedacito de cielo, por sacarme una sonrisa aun en los momentos más agobiantes*

***El éxito en la vida no se mide por lo que logras, sino por los obstáculos que superas.***

*Anónimo*



## Agradecimientos

A Dios por ser el dueño de mis sueños, por darme fortaleza para iniciar y terminar todos mis proyectos. A él, por su infinita misericordia y bondad, por ser mi esperanza, mi fuerza y consuelo en todos los momentos de la vida.

A la Universidad Nacional por ser mi hogar por más de 10 años y por ser el lugar donde lo tengo todo

Al Profesor Daniel Uribe Vélez por aceptarme y permitirme trabajar en su grupo de investigación, por su entera disposición para guiar, atender y entender todas las situaciones, por sus enseñanzas y su completa dirección y en especial por su apoyo incondicional.

A la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres por creer en mí y apoyarme en esta etapa a través del crédito-beca otorgado para la realización de mi Maestría

A la Facultad de Ciencias por la asignación de la admisión directa a la Maestría mediante la Resolución 1460 de 2012

Al Posgrado Interfacultades de Microbiología por aceptarme en la Maestría y su compromiso constante por la formación de sus estudiantes

Al Instituto de Biotecnología por facilitar sus instalaciones y la gestión de todo el personal que permitió el desarrollo de este trabajo

A mis hermanos, Andrés y Camilo, por el cuidado, manutención y amor que les brindan a mis padres y por su apoyo moral durante este tiempo.

A la Profesora Martha Fontanilla por sus consejos y sus palabras de consuelo

A Socorrito Prieto por su amistad, sus palabras de aliento y sus consejos que me han hecho ser una mejor persona.

Al Grupo de Investigación de Microbiología Agrícola, Ana, Carlos, Luis Fernando, Karen, Catalina, Inés, Jessica, Lorena, Hugo, Shaia, Fernanda y Diana por todo su apoyo durante los momentos más difíciles, por entender mi situación (aunque pareciera ficticia) y por regalarme un pedacito de cada uno de ellos y a los seminarios por permitirme cumplir un sueño llamado Microbiología Agrícola.

A Jessica Bautista por entenderme, apoyarme, escucharme, acompañarme en esta aventura y por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

A Elizabeth Méndez y Daniela Pórtela por su apoyo y amistad en momentos muy claves y sumamente difíciles en estos dos años.

Al Profesor Camilo López por facilitar las instalaciones del invernadero para la realización de los ensayos que así lo ameritaron.

A Javier Guerrero, por apoyarme siempre en mis sueños y locuras, sin preguntar, sin juzgar y aún sin entender pero siempre estando ahí.

A las instituciones que de manera indirecta me acompañaron durante esta etapa. Al Colegio Instituto Pedagógico Arturo Ramírez Montufar por la aceptación de Julián para iniciar sus estudios y en especial a la Profesora Stella y el Profesor Mauricio por el cuidado de mi hijo durante las largas jornadas en el laboratorio. Y al Instituto Nacional de Cancerología por estos largos 18 meses de tratamiento de mi padre.

Y a todas las personas que no alcance a nombrar acá pero que hicieron parte de esta aventura.

## Resumen

El añublo bacterial de la panícula es una enfermedad que causa la reducción de hasta el 75% del rendimiento del cultivo del arroz y el agente causal principal es la bacteria *Burkholderia glumae*. Para esta enfermedad no se ha encontrado un control efectivo y el control biológico podría ser una opción. Las Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) han sido reconocidas como una estrategia de control de microorganismos fitopatógenos a través de diferentes mecanismos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad biocontroladora de aislados de BAFEs rizosfericos nativos contra el fitopatógeno *Burkholderia glumae* en semillas de una variedad colombiana de arroz (F733). Antes de iniciar el tamizaje con las BAFEs se adaptaron dos sistemas de infección de *B. glumae* (iniciando desde semilla y sustrato) que mostraron el desarrollo de síntomas de enfermedad en plántulas siendo consistentes y reproducibles. Basado en ensayos de antagonismo dual *In vitro* se pudieron seleccionar 26 cepas de BAFEs que mostraban la formación de halo de inhibición contra tres cepas de *B. glumae* para su evaluación en semillas.

Para la evaluación de BAFEs *In vivo* se adaptaron seis modelos de co-inoculación en semilla del patógeno y biocontrolador, encontrando adecuado el modelo 4 (*B. glumae* en semilla) y el 6 (*B. glumae* en sustrato). Empleando ambos modelos de infección se elaboró un tamizaje de las 26 cepas seleccionadas previamente, encontrando 12 con actividad biocontroladora *in semilla* cuyo criterio de selección fue la disminución en el grado de infección en relación a un control de enfermedad (semillas sólo con *B. glumae*). Estas cinco mejores cepas, donde se reduce el grado de infección y se mantiene una longitud de vástago similar al control no inoculado, fueron evaluadas bajo condiciones de invernadero usando el modelo de inoculación de *B. glumae* en semilla, encontrando que las cepas evaluadas disminuyen la población de *B. glumae* en plantas de 10 y 3

0 días, destacándose las cepas 4P03 y 15A09 por su consistencia. Los resultados encontrados permiten concluir que cepas de BAFEs rizosfericas controlan *B. glumae* a nivel *In vivo* e *In vitro*.

**Palabras clave:** *Burkholderia glumae*, BAFEs, *Oryza sativa*, semillas, control biológico



# Abstract

The bacterial panicle blight is a disease that causes reduction of up to 75% of the yield of rice cultivation and the main causal agent is the bacterium *Burkholderia glumae*. There is not an effective control for this disease, therefore biological control could be an option. Aerobic Endospore Forming Bacteria (AEFBs) have been recognized as a biological control strategy of phytopathogenic microorganisms through different mechanisms. The aim of this study was to evaluate the biocontrol capacity of isolated native rhizosphere AEFBs against *Burkholderia glumae* in seeds of a Colombian rice variety (F733). Before starting the screening of the AEFBs two infection systems of *B. glumae* (starting from seeds and substrate), that showed the development of disease symptoms in seedlings were adapted, being consistent and reproducible. Based on dual antagonism *In vitro* assays, it could be selected for evaluation in infected rice seeds, 26 AEFBs strains showing the formation of inhibition zone against three strains of *B. glumae*.

For *In vivo* evaluation of AEFBs strains, 6 models of co-inoculation were adapted for the pathogen and biocontrol agent coinfection, finding suitable for the screening model 4 (*B. glumae* seed) and model 6 (*B. glumae* on substrate). By using both screening models with the previously selected 26 AEFBs strains, it was found 12 strains with biocontrol activity in seeds. As selection criterium the decrease in the degree of infection in relation to disease control (only with *B. glumae* seeds) was used. The best 5 strains, where the degree of infection was reduced and seedlings length was similar to uninoculated control were evaluated under greenhouse conditions using model of inoculation 4, finding that evaluated strains decrease the population of *B. glumae* after 10 and 30 days of incubation. It is important to highlight the strains 4P03 and 15A09 for their consistency. The obtained results allowed to conclude that rhizospheric strains of AEFBs are able control *B. glumae* under *in vivo* and *in vitro* conditions.

**Keywords:** *Burkholderia glumae*, AEFBs, *Oryza sativa*, seeds, biological control

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	VI
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas .....	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIV
Introducción .....	15
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>19</b>
1.1 El cultivo del arroz .....	19
1.2 Características fenológicas y morfológicas del cultivo .....	20
1.3 <i>Burkholderia glumae</i> .....	21
1.3.1. Factores de virulencia .....	22
1.3.1.1. Toxoflavina.....	23
1.3.1.2. Producción de Exopolisacaridos (EPSs): .....	24
1.3.1.3. Lipasas .....	24
1.3.1.4. Poligalacturonasas.....	24
1.3.1.5. Biosíntesis flagelar .....	25
1.3.1.6. Sistema de secreción tipo III (SSTIII) .....	25
1.3.1.7. Otros factores .....	26
1.3.2. Enfermedad causada por <i>B. glumae</i> .....	26
1.3.2.1. Transmisión de la enfermedad.....	29
1.3.3. Manejo de la enfermedad causada por <i>B. glumae</i> .....	30
1.3.3.1. Control químico .....	31
1.3.3.2. Líneas y cultivares resistentes y tolerantes .....	31
1.3.3.3. Control biológico .....	32
1.3.3.4. Otros aportes al manejo .....	33
1.4 Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) .....	33
<b>2. Justificación del problema .....</b>	<b>37</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>40</b>
3.1 Objetivo general.....	40
3.2 Objetivos específicos .....	40
<b>4. Metodología .....</b>	<b>41</b>
4.1 Material biológico.....	41

4.2	Preparación del inóculo bacteriano.....	41
4.3	Flujo de trabajo.....	42
4.4	Determinación de la actividad biocontroladora de BAFEs <i>In vitro</i> .....	44
4.4.1.	Ensayos de antagonismo dual <i>In vitro</i> .....	44
4.4.2.	Evaluación de la actividad de <i>Quorum Quenching In vitro</i> .....	45
4.5	Estandarización de un sistema de inoculación de semillas de arroz con <i>B. glumae</i> .....	46
4.6	Determinación de la presencia de <i>B. glumae</i> en plantas de arroz desde semillas inoculadas.....	48
4.7	Evaluación de la actividad de control biológico <i>In vivo</i> en semillas de arroz ..	50
4.7.1.	Estandarización de la dosificación de los aislamientos de BAFEs en las semillas	50
4.6.1.	Evaluación de la actividad de control biológico <i>In vivo</i> en semillas de arroz	52
4.6.2.	Evaluación de la actividad biocontroladora <i>In vivo</i> de las BAFEs bajo condiciones de invernadero .....	53
4.8	Análisis Estadístico .....	54
4.9	Caracterización molecular de BAFEs con actividad biocontroladora contra <i>B. glumae</i> .....	55
<b>5.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>56</b>
5.1.	Evaluación de la actividad biocontroladora de BAFEs <i>In vitro</i> .....	56
5.1.1.	Ensayos de antagonismo dual <i>In vitro</i> .....	56
5.1.2.	Evaluación de mecanismo de <i>quorum quenching</i> cualitativo <i>In vitro</i> ...	63
5.2.	Desarrollar un modelo de infección de <i>B. glumae</i> en plantas bajo condiciones de invernadero.....	66
5.2.1.	Estandarización un modelo de infección de <i>B. glumae</i> en semillas de arroz	66
5.2.2.	Determinación de la presencia de <i>B. glumae</i> en plantas desde semillas inoculadas.....	72
5.3.	Evaluación de la capacidad biocontroladora de las BAFEs <i>In vivo</i> contra <i>B. glumae</i> .....	80
5.3.1.	Estandarización de la dosificación de aislamientos de BAFEs para la evaluación de control biológico contra <i>B. glumae</i> .....	80
5.3.2.	Evaluación de actividad biocontroladora de BAFEs contra <i>B. glumae</i> en semilla	86
5.3.3.	Evaluación de actividad biocontroladora de BAFEs contra <i>B. glumae In vivo</i> bajo condiciones de invernadero .....	94
5.4.	Caracterización molécula de aislamientos de BAFEs con actividad contra <i>B. glumae</i> .....	103
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>103</b>
6.1.	Conclusiones.....	103
6.2.	Recomendaciones.....	104
	<b>ANEXO A: Composición medios de cultivo .....</b>	<b>105</b>
	<b>ANEXO B: Conteos de UFC de <i>B. glumae</i> por gramo de planta en ensayo de invernadero de biocontrol de BAFEs .....</b>	<b>106</b>

<b>ANEXO C: Resultados primera repetición de la evaluación actividad biocontroladora de BAFEs a nivel <i>In vivo</i> contra <i>B. glumae</i> en semillas de arroz. ....</b>	<b>109</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>113</b>

# Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1. Síntomas del añublo bacterial de la panícula causados por <i>Burkholderia glumae</i> .....	28
Figura 2. Flujo de trabajo mostrando cada una de las etapas para la evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas de BAFEs contra <i>B. glumae</i> .....	43
Figura 3. Esquema general de la formación de halo de inhibición del crecimiento de <i>B. glumae</i> por la acción de las BAFEs <i>in vitro</i> .....	44
Figura 4. Esquema general del ensayo de actividad de <i>quorum quenching In vitro</i> en la evaluación de aislamientos de BAFEs contra <i>B. glumae</i> usando el biosensor <i>C. violaceum</i> CV026.....	45
Figura 5. Escala de severidad (Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, 2011).....	47
Figura 6. Caja de Petri mostrando la producción de halos de inhibición de la cepa de BAFE MM4C4 contra la cepa de <i>B. glumae</i> 3853 en medio LB. ....	58
Figura 7. Cantidad de aislamientos de BAFEs con actividad contra las tres aislamientos de <i>B. glumae</i> .....	62
Figura 8. Ensayo presencia o ausencia de AHLs lactonasas en aislamientos de BAFEs... ..	63
Figura 9. Efecto de la concentración del inóculo de <i>B. glumae</i> en semillas de arroz F733 inoculadas al vacío. ....	67
Figura 10. Efecto de la concentración del inóculo de <i>B. glumae</i> en semillas de arroz F733 inoculadas sin vacío.....	68
Figura 11. Efecto de la concentración de <i>B. glumae</i> incorporada en sustrato sobre el crecimiento de plántulas de arroz F733 .....	71
Figura 12. Longitud de vástago y raíz en plantas 30 días desde semillas inoculadas con <i>B. glumae</i> .....	75
Figura 13. Morfología de colonia presuntiva de <i>B. glumae</i> 3200-12 en medio S-PG....	76
Figura 14. Morfología de colonia presuntiva de <i>B. glumae</i> 3200-12 en medio King B....	76
Figura 15. Morfología microscópica de <i>B. glumae</i> 3200-12 en tinción de Gram... ..	77
Figura 16. Confirmación por PCR de <i>B. glumae</i> aislada a partir plantas de 10d inoculadas cuando el patógeno se incorpora en sustrato.....	77
Figura 17. Confirmación por PCR de <i>B. glumae</i> aislada desde plantas de 10d desde semillas inoculadas al vacío.....	78
Figura 18. Confirmación por PCR de <i>B. glumae</i> aislada desde plantas de 30d inoculadas desde semilla mediante el sistema al vacío. ....	78
Figura 19. Evaluación del efecto controlador de aislamientos de BAFEs sobre semillas de arroz inoculadas con <i>B. glumae</i> .....	82
Figura 20. Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs contra <i>B. glumae</i> cuando esta es incorporada en sustrato (modelo 6). ....	89
Figura 21. Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs contra <i>B. glumae</i> cuando esta es incorporada en la semilla (modelo 4) .....	93

Figura 22. Porcentaje de germinación de semillas en ensayo de actividad <i>In vivo</i> de BAFEs en invernadero..	96
Figura 23. Longitud de vástago y raíz de plántulas de 10 días de postinoculación dentro del ensayo de actividad <i>In vivo</i> de BAFEs en invernadero.....	97
Figura 24. PCR aisladas presuntivas de <i>B. glumae</i> en ensayo de invernadero para plantas de 10 días postinoculación.....	99
Figura 25. Longitud de vástago y raíz de plantas de 30 días de postinoculación dentro del ensayo de actividad <i>In vivo</i> de BAFEs en invernadero .....	100
Figura 26. PCR aisladas presuntivas de <i>B. glumae</i> en ensayo de invernadero para plantas de 30 días postinoculación.....	103
Figura 27. Análisis filogenético resumen de 25 aislamientos de BAFEs evaluados en el control biológico de <i>B. glumae</i> <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> .....	14

# Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Modelo co-inoculación BAFEs en semillas de arroz para determinar su actividad biocontroladora <i>In vivo</i> contra <i>B. glumae</i> .....	50
<b>Tabla 2.</b> Conteos <i>B. glumae</i> en plantas desde semillas inoculadas por los dos modelos de infección 10 y 30 d postinoculación .....	74
<b>Tabla 3.</b> Resultado de BLAST de la secuencia resultado de la PCR con primers de Saylor et al., (2006) para la cepa <i>B. glumae</i> 3200-12 y un aislamiento presuntivo de <i>B. glumae</i> desde plantas de arroz.....	79
<b>Tabla 4.</b> Cepas seleccionadas para ensayo en antagonismo dual contra <i>B. glumae</i> .....	57
<b>Tabla 5.</b> Resultados del ensayo de antagonismo dual <i>In vitro</i> mostrando los halos de inhibición de cada cepa de BAFE contra tres cepas de <i>B. glumae</i> .....	59
<b>Tabla 6.</b> Resultados correspondiente a presencia o ausencia de acil homoserin lactonasas en las cepas de BAFEs .....	64
<b>Tabla 7.</b> Concentración final de inóculos en ensayo de biocontrol de BAFEs bajo condiciones de invernadero .....	94
<b>Tabla 8.</b> UFC de <i>B. glumae</i> por gramo de plantas 10 días de postinoculación dentro del ensayo de actividad <i>In vivo</i> de BAFEs en invernadero.....	98
<b>Tabla 9.</b> UFC de <i>B. glumae</i> por gramo de plantas 30 días de postinoculación dentro del ensayo de actividad <i>In vivo</i> de BAFEs en invernadero.....	101

# Lista de Símbolos y abreviaturas

AHLs: Acil Homoserin lactonas

BAFEs: Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora

Bg: Burkholderia glumae

C (+): Control positivo B. glumae en PCR

C (-): Control negativo PCR

gr: gramos

LB: Luria-Bertani

μl: Microlitros

mL: Mililitros

nm: nanómetros

QS: Quorum sensing

OD: Densidad Óptica

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

S-PG: Medio semiselectivo para B. glumae

UFC: Unidades Formadoras de Colonias





## Introducción

*B. glumae* fue reconocida como el agente causal del añublo bacterial de la panícula del arroz en los Estados Unidos (Shahjahan et al., 2000) y primeramente descubierta en Japón como causante de podredumbre del grano, lámina y plántula, dependiendo del estado de crecimiento de la planta de arroz (Kurita y Tabei, 1967; Uematsu et al., 1976). Actualmente, se ha reportado su presencia en varias partes del mundo como Japón, Tailandia, Vietnam, Korea del Sur, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Estados Unidos, Panamá, Nicaragua, Costa Rica y Colombia (Zhu et al., 2008; Devescovi et al., 2007; Nandakumar et al., 2009; Fory et al., 2014).

Reconociendo que la enfermedad causada por *B. glumae* en la planta de arroz tiene dos momentos principales, como se indicó anteriormente, dado que se manifiestan síntomas en plántulas, pudrición de la plántula, (Uematsu et al., 1976; Hikichi, 1991; Devescovi et al., 2007; Flórez-Zapata y Uribe-Veléz, 2011) y en la etapa de floración, este último denominado añublo bacterial de la panícula (Nandakumar et al., 2009). Reconociéndose que durante la etapa vegetativa, a excepción de la plántula, no se observan síntomas de enfermedad lo que estaría relacionado con la concentración del inóculo de *B. glumae* en la planta de arroz de una manera directamente proporcional durante todo el ciclo de cultivo (Tsushima et al., 1985; Hikichi, 1991).

A nivel de plántulas, se incluye el tizón de las mismas y su pudrición (Devescovi et al., 2007), además de clorosis sobre la superficie de la planta e incluso maceración completa de coleoptilo y plúmula que le impide el desarrollo de la plántula (Flórez-Zapata y Uribe-Veléz, 2011). Lo que pone en evidencia dos ventanas temporales para el control de la bacteria *B. glumae* como agente causal, la plántula y la etapa de floración.

El rango de T° óptimo para el crecimiento de *B. glumae* es de 35 a 40°C (Nandakumar et al., 2009) por lo que algunos autores relacionan esta condición para explicar la epidemia del añublo de la panícula que se mostró en los años 1995, 1998 y 2000 en Louisiana,

Estados Unidos dado las altas temperaturas nocturnas en esos periodos (Nandakumar et al., 2008; Shahjahan et al., 2000). Así mismo, condiciones prolongadas de calor y humedad durante el crecimiento de las plantas de arroz, favorecen el desarrollo de añublo de la panícula y dado que la temperatura optima es alta, es posible que la enfermedad sea más frecuente en países tropicales o subtropicales o en países con estaciones donde se presenten altas temperaturas (Nandakumar et al., 2009).

El cambio climático mundial puede incrementar la frecuencia de enfermedades que están relacionadas con la presencia de fitopatógenos con temperaturas óptimas altas (Shaad, 2008) de tal forma que en el caso de *B. glumae*, en los últimos tiempos, se ha venido incrementando el número de casos de la enfermedad en países productores de arroz (Ham et al., 2011).

En Colombia, en el año 1987 el CIAT (Zeigler y Álvarez, 1987), realizó el primer reporte de complejos bacterianos en arroz, pero hasta el 2007 en el Caribe, se reportó una sintomatología en la panícula que correspondía a una decoloración y vaneamiento en el grano, descrita como *B. glumae* correspondiente al añublo bacteriano de la panícula (Pérez y Saavedra, 2007). Esta se vio con mayor incidencia y severidad en la fase de floración con la esterilidad de las espiguillas. Posteriormente, se detectó la enfermedad en los departamentos de Tolima y Huila, así bajo las evaluaciones de FEDEARROZ y el CIAT se confirmó la presencia de *B. glumae* (GOMÉZ ET AL., 2010; Fory et al., 2014). Con la aparición de la enfermedad en el país, se observaron diversos factores fitosanitarios, ambientales y de manejo de cultivo que podían favorecerla, como las condiciones ambientales afectadas por el cambio climático, las siembras extemporáneas, la alta densidad de siembra, el uso de semilla de costal o no certificada, manejo inadecuado de malezas, nutrición desbalanceada y el abuso en la aplicación de plaguicidas (Pérez y Saavedra, 2011). Recientemente, la bacteria también ha sido detectada a través de técnicas específicas como la PCR en muestras de plantas del Cesar, Meta, Santander y Valle del Cauca, mostrando una distribución amplia en el país y de manera más reciente en Antioquia (Fory et al., 2014) y Cúcuta (Galvis et al, 2015).

Se ha establecido que *B. glumae* se encuentra presente epífita en hojas de plantas de arroz durante la etapa de crecimiento, en semillas almacenadas, en malezas de campo y en tejido vegetal residual de cosechas anteriores (Suzuki et al., 2004). El patógeno también puede multiplicarse sobre la semilla sin causar síntomas, pero se desconoce si la falta de

enfermedad está asociada a condiciones ambientales o factores propios de la planta (Fory et al., 2014) y por tal razón se presume que la fuente más importante de la bacteria son las semillas y de hecho se sugiere que el ingreso de *B. glumae* a Colombia fue a través de semillas contaminadas que manifestaron el desarrollo de la enfermedad por la variabilidad climática del país (Pérez, 2010).

Diversas son las estrategias que han surgido en el país para el control de la enfermedad, posteriores a una alta tendencia a la implementación de métodos moleculares para el diagnóstico de la enfermedad. Dentro de ellas, el manejo integrado de cultivo, partiendo del establecimiento de programas para la identificación y selección de variedades resistentes y la determinación de épocas de siembra adecuadas con miras a la disminución de la incidencia (Fory et al., 2010; Fory et al., 2014; Fedearroz, 2012; Beltrán-Molina et al., (2014)). Así mismo, aparece en la literatura la posibilidad de control con ácido oxolinico que ha mostrado efectividad sobre semillas, pero que en la actualidad se encuentra prohibido en los Estados Unidos y otros países por la aparición de cepas de *B. glumae* resistentes a dicho compuesto (Nandakumar et al., 2009), además FEDEARROZ (2010) afirma que tras ensayos, a nivel *in vitro* por difusión con disco en agar, de diferentes ingredientes activos con actividad bactericida frente a *B. glumae*, se encontró que los productos a base de ácido oxolinico muestran una acción a corto tiempo frente a la bacteria que posteriormente se pierde y teniendo en cuenta su característica de antibiótico también puede ser tóxico en altas concentraciones. De esta manera, la problemática del añublo bacterial de la panícula es actual en el país y a pesar de todos los esfuerzos humanos, no ha sido posible controlar la enfermedad y se afirma de manera contundente que aún no se ha encontrado control efectivo contra la bacteria y por ahora FEDEARROZ y el CIAT se encuentran trabajando en la búsqueda de variedades de arroz tolerantes. Adicionalmente, se considera dentro de las estrategias la proliferación de enemigos naturales dentro de los microorganismos benéficos edáficos.

De esta manera, el control biológico podría ser una opción para el control de la enfermedad, debido a que es posible aprovechar los enemigos naturales del agente causante. Es así como en Serbia, de 203 aislados de Bacterias Formadoras de Endospora (BAFEs) de suelo, estiércol y heno, 127 mostraron actividad antagonista frente a diversas bacterias fitopatógenas incluida *B. glumae* (Beric et al., 2012). Es de destacarse que las BAFEs son un grupo de bacterias que abarca en la actualidad más de 25 géneros, con cerca de 200 especies y que corresponde al género *Bacillus* y otros relacionados. Son

bacterias Gram positivas, omnipresentes en los sistemas agrícolas, con capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles y cuya característica más distinguida es la formación de una estructura de resistencia llamada endospora (Fritze, 2004). Los BAFEs son candidatos para control biológico dada su versatilidad metabólica, dentro de la que se incluye la producción de enzimas catabólicas (proteasas, quitinasas, lipasas entre otras), la producción de lipopéptidos (como surfactinas e iturinas) que pueden funcionar como moléculas inhibidoras de crecimiento de patógenos y en la activación de la inmunidad vegetal (Ongena y Jacques, 2008 ). También pueden producir antibióticos como la bacitracina y polimixina B y además tienen la capacidad de realizar *quorum quenching* por la producción de enzimas que degradan las moléculas de señalización del tipo acil homoserin lactonasas (Lee et al., 2002), interfiriendo así en la comunicación celular y la regulación de algunos mecanismos de virulencia de *B. glumae*.

Es así como 74 cepas de bacterias aerobias formadoras de endospora de la colección de aislamientos nativos de rizosfera de arroz, maíz e iraca, pertenecientes a la colección de genes y cepas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, fueron evaluados en ensayo dual *in vitro* contra tres cepas de *B. glumae*. Las cepas que mostraron halo de inhibición fueron evaluadas por su capacidad de inhibir los síntomas de pudrición de semilla y plántulas, bajo diferentes modelos de inoculación tanto del controlador como del patógeno permitiendo seleccionar 5 cepas que fueron evaluadas bajo condiciones de invernadero en semillas de arroz inoculadas con una cepa de *B. glumae*. Los resultados permitieron evidenciar mediante parámetros agronómicos y recuentos de UFC de *B. glumae*/g de planta, la actividad biocontroladora de algunas cepas BAFEs. Concluyendo que los BAFEs tienen potencial biocontrolador tanto *In vitro* como *In vivo* y por tanto estos aislamientos resultan promisorios como alternativa para el control del añublo bacterial de la panícula.

# 1. Marco teórico

## 1.1 El cultivo del arroz

El arroz es una gramínea anual de gran importancia en la dieta humana, ya que constituye el principal alimento en varios países asiáticos y en algunos de sur América, siendo el segundo cereal más cultivado en el mundo después del trigo, alcanzando una producción de 752 millones de toneladas métricas en 165 millones de hectáreas (FAO, 2016) de las cuales Asia produce el 90% total del valor mundial, siendo el mayor productor China (Ospina y Aldana, 2001).

Se registran dos especies de arroz cultivadas, *Oryza sativa* y *O. glaberrima*, la primera de origen asiático y dispersa en varias regiones tropicales y templadas del mundo, en tanto la segunda es de origen africano y fue sustituida de manera paulatina por el arroz asiático (Dalrymple, 1986). *Oryza sativa* es la especie más cultivada de arroz y actualmente existe innumerables tipos genéticamente divergentes adaptadas a diferentes condiciones agro ecológicas y por tanto hay diversas subespecies, grupos y eco tipos. Dentro de estas la subespecie indica prevaleciente en la región tropical y la japónica presente en el subtropico y regiones templadas de Asia (Acevedo et al., 2006).

En Colombia el arroz se cultiva en varias condiciones de clima y suelo, bajo los sistemas de riego y secano. Las principales zonas arroceras en el país son: la zona centro comprendiendo Tolima, Huila y Valle del Cauca; los llanos orientales en los departamentos de Meta y Casanare, la zona del caribe húmedo contando Antioquia, Bolívar, Córdoba y Sucre y la zona del Caribe seco comprendiendo los departamentos de Cesar, Guajira y Santanderes (Fedearroz, 2000).

Se trata de un cultivo de zonas tropicales o subtropicales con temperatura optima fluctuante entre mínimo de 32 y 34 °C y máxima entre 40 y 42°C. Así, el crecimiento de la planta depende en gran parte del clima, pero además del agua y los nutrientes (Ospina y Aldana, 2001). El arroz secano y de riego se cultiva en diversos tipos de suelos siendo más recomendados los franco arcillosos (FEDEARROZ, 2000)

## **1.2 Características fenológicas y morfológicas del cultivo**

El arroz es una planta con sistema radical principalmente adventicio, cuyo crecimiento y desarrollo depende de la variedad, las condiciones climáticas y edáficas y los niveles de fertilización. Se caracteriza por presentar un tallo erecto y cilíndrico estructurado por alternación de nudos, las hojas compuestas de una lámina y una vaina hendida de manera longitudinal que abraza una porción de tallo y una inflorescencia característica denominada panícula que corresponde a un conjunto de espiguillas, cada una es la unidad que encierra una sola flor. Por su parte la semilla es un ovario maduro, seco e indehiscente, formado por cáscara constituida por la lema y la palea, el embrión y el endospermo (Vergara, 1985).

El crecimiento de la planta es continuo que comprende un ciclo completo desde el momento de la germinación de la semilla hasta la madurez del grano, en general se puede distinguir tres fases de crecimiento dentro de las cuales ocurren 10 etapas de desarrollo. La primera fase denominada vegetativa comienza con la germinación de la semilla y culmina con la formación del primordio foliar (Fernández et al., 1985), es de duración variable y determina el ciclo de las variedades.

La segunda fase es la reproductiva y abarca la iniciación de la panícula hasta la floración, está caracterizada por la formación de los órganos reproductivos y tiene una duración constante entre variedades aproximadamente de 35 días. La última fase es la de maduración e inicia con la floración y termina con la maduración del grano y tiene una duración aproximada de 30 días.

### 1.3 *Burkholderia glumae*

El género *Burkholderia* fue descrito por primera vez en 1992, por homología del rRNA con el grupo II de *Pseudomonas*, conteniendo siete especies diferentes: *B. solanacearum*, *B. pickettii*, *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. mallei*, *B. pseudomallei* y *B. caryophylli* (Yabuuchi et al., 1992). En la actualidad, el género *Burkholderia* contiene más de 30 especies que han sido adaptadas a un gran espectro de nichos desde suelos contaminados, plantas y el tracto respiratorio de humanos entre otros (Coenye y Vandamme, 2003). Adicionalmente, se conocen algunas especies de *Burkholderia* fitopatógenas y nueve especies del género conformando el complejo *Burkholderia cepacia*, el cual tiene capacidad para colonizar diferentes nichos medioambientales (Karki, 2010) y emplear diferentes tipos de hospederos como plantas, animales y humanos (Mahenthiralingam et al., 2005; Sosa et al., 2010).

*Burkholderia* es un género bacteriano caracterizado por ser Gram negativa, con bacterias aeróbicas y tener motilidad mediante 2 a 4 flagelos polares, tienen forma de bastón y tiene una temperatura de crecimiento que oscila entre 11 a 40°C con un óptimo en el rango 30 a 35°C. Puede ser aislada en medio semiselectivo (S-PG) y en otros medios comúnmente usados en el laboratorio (Schaad et al., 2001). Las colonias son blancas en agar nutritivo y no fluorescentes en medio King B, en S-PG las colonias son circulares, convexas con márgenes uniformes las cuales son de color rojo y café o son opalescentes con un centro purpura o rojo (Correa et al., 2006).

El genoma de *Burkholderia* spp. comprende de dos a tres cromosomas frecuentemente con algunos plásmidos (Ussery et al., 1997; Holden et al., 2004; Tumapa et al., 2008). La flexibilidad y plasticidad de su genoma le permite colonizar diferentes ambientes y condiciones como tejidos y órganos humanos, plantas, animales y el suelo (Chain et al., 2006). En 2009 se secuenció la totalidad del genoma de *B. glumae* encontrándose 2 cromosomas y 4 plásmidos. El cromosoma 1 de 3,906, 529 pares de bases y 3290 secuencias codificantes, 144 pseudogenes, 3 operones rRNA y 56 tRNAs; el cromosoma 2 es de 2, 827,355 pb y 2079 secuencias codificantes, 192 pseudogenes, 2 operones rRNA y 8 tRNAs (Lim et al., 2009).

*B. glumae* se encuentra estrechamente relacionada con otros fitopatógenos de arroz como *B. gladioli* y *B. plantarii*, pero relativamente distante del complejo *B. cepacia* que incluye



especies patógenas de cebolla (Jacobs et al., 2008) y patógenos de animales como *B. mallei* y *B. pseudomallei* (Payne et al., 2005). Es importante mencionar que *B. glumae* no es limitada a arroz, si no que puede encontrarse infectando otros cultivos incluyendo *Capsicum* sp (pimentón), *Solanum melongena* (Berenjena), *Sesamun indicum* (Ajonjolí), *Allium cepa* (Cebolla) y *Lycopersicum esculentum* (tomate) (Jeong et al., 2003). También ha sido considerada como patógeno oportunista en humanos (Weinberg et al., 2007; Kennedy et al., 2007) y no existe una distinción clara entre cepas que infecten humanos/animales y plantas por lo que es probable que cepas fitopatógenas de *B. glumae* puedan infectar humanos (Devescovi et al., 2007).

### 1.3.1. Factores de virulencia

*B. glumae* tiene diversos factores de virulencia importantes sobre el desarrollo de la enfermedad y en su rol de agente fitopatógeno. Dentro de éstos se puede mencionar la biosíntesis flagelar, la síntesis de toxinas, síntesis de lipasas, sistema de secreción tipo III, enzimas degradadoras de la pared celular como poligalacturonasas y exopolisacáridos (EPSs), sin embargo se sabe que los determinantes de virulencia son la toxoflavina, la síntesis de flagelo y la síntesis de lipasas (Ham et al., 2011). La mayoría de factores de virulencia se encuentran regulados por *Quórum sensing* (QS) la cual esta mediada por Acil homoserin lactonas (Kim et al., 2004)

Mutantes de *B. glumae* deficientes en señalización QS no causan síntomas sobre granos de arroz, sugiriendo que el mecanismo de autoinducción mediado por QS juega un papel importante en patogénesis (Kim et al., 2004). Así, la inhibición de QS es considerado una posibilidad de manejo de la enfermedad causada por *B. glumae*, un ejemplo es la degradación de moléculas señal de QS "quórum quenching" llevado a cabo por algunas bacterias del genero *Bacillus* y algunas Gram negativas (Dong et al., 2000; Lee et al., 2002; Cho et al., 2007).

*B. glumae* posee un sistema QS de tipo LuxR/LuxI, TofI/TofR, así TofI es responsable de la biosíntesis de N-octanoil homoserin lactona (C8-HSL) y TofR codifica para el receptor de C8-AHLs (Sun Jang et al., 2013). Así, el sistema QS regula varios procesos en *B. glumae* incluyendo la síntesis de toxoflavina, la biosíntesis flagelar y la secreción de algunas proteínas (Kim et al., 2007; Kim et al., 2004; Goo et al., 2010; Goo et al., 2012).

### 1.3.1.1. Toxoflavina

Las bacterias pueden producir diferentes tipos de fitotoxinas que son tóxicas para las células vegetales y están involucradas en el desarrollo de los síntomas. *B. glumae* produce toxoflavina, fervenulina y reumicina, sin embargo la toxoflavina es el más importante factor de virulencia en la podredumbre y marchites de tallo y plántula en varios cultivos (Iiyama et al., 1994; Jeong et al., 2003). La toxoflavina reduce el crecimiento de hojas y raíz de plántulas de arroz e induce síntomas de clorosis sobre la panícula (Sato et al., 1989; Iiyama et al., 1995), sin toxoflavina *B. glumae* es incapaz de inducir clorosis en la panícula de arroz (Suzuki et al., 2004). Así mismo, se ha reportado que la toxoflavina induce pudrición bacteriana sobre un gran número de cultivos (Jeong et al., 2003). También es antibacteriano, anti fúngico, herbicida y tóxico en mamíferos (Nagamatsu, 2002). La toxoflavina hace que se incrementen los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plántulas de arroz, e interfiere en diferentes procesos celulares y metabólicos de la planta como en la defensa celular, homeostasis-redox, transducción de señales, síntesis y degradación de proteínas, fotosíntesis y fotorespiración y metabolismo energético (Wan y Liu et al., 2008). Todos estos mecanismos de acción sustentan por que la toxoflavina representa un factor de virulencia determinante en el desarrollo de la enfermedad de *B. glumae*. La biosíntesis y el transporte de toxoflavina son regulados de manera policistronica por el operón *tox*. Así, se conocen cinco genes para biosíntesis *tox A*, *tox B*, *tox C*, *tox D* y *tox E* (Suzuki et al., 2004; Shingu y Yoneyama, 2004) y cuatro genes de transporte *tox F*, *tox G*, *tox H* y *tox I* (Kim et al., 2004).

A pesar de estos conocimientos, no puede reducirse el proceso de virulencia a la síntesis de toxoflavina, de esta manera existe evidencia que mutantes por disrupción por genes de biosíntesis de toxoflavina en *B. glumae*, se muestran también como cepas virulentas en plántulas de arroz similar a la cepa *wild type* y también son capaces de inducir síntomas sobre las panículas de arroz aunque con menor severidad que el *wild type* (Suzuki et al., 2004). Así mismo, mutantes para *toxA* muestran poca virulencia, pero pueden inducir síntomas de necrosis sobre las panículas de arroz de cultivares susceptibles (Ham et al., 2011), lo que puede llevar a pensar que la patogénesis de *B. glumae* es un proceso complejo que involucra la acción de diversos factores de virulencia.

### **1.3.1.2. Producción de Exopolisacaridos (EPSs):**

*B. glumae* puede sintetizar polisacáridos extracelulares (EPS) (Cornelis y Van Gijsegem, 2000), los cuales juegan un papel importante en diversas enfermedades bacterianas de patógenos vasculares de plantas y generalmente su producción es un factor de virulencia primario como ocurre en *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii* y *Xanthomonas campestris* (Denny, 1995). Para *B. glumae* el papel de EPSs no ha sido reportado dentro del añublo bacterial de la panícula pero se sabe que en otras enfermedades se produce de manera visible cantidades importantes de EPSs sobre agar CPG (Schaad et al., 2001).

### **1.3.1.3. Lipasas**

*B. glumae* produce lipasas como estrategia/mecanismo de ataque a la membrana plasmática, el cual es regulado por AHLs dependiente de QS (Devescovi et al., 2007). Se conocen enzimas lipasas producidas por cepas de *B. glumae* que han sido comercializadas ya que pueden ser usada en diferentes ámbitos industriales como producción de detergentes (Boekema et al., 2007). Devescovi et al., (2007) reporta que un aislado clínico de *B. glumae* (AU6208), puede ocasionar enfermedad en plantas de arroz y que un derivado de esta cepa defectivo en *lipA* (gen que codifica para una lipasa) puede perder su capacidad de virulencia en relación a la cepa silvestre, indicando que la lipasa es un factor de virulencia importante para patogenicidad en arroz.

En un análisis proteómico para *B. glumae*, se encontraron 16 proteínas extracelulares consideradas sustratos del sistema de secreción tipo II incluyendo lipasas (Kang et al., 2008).

### **1.3.1.4. Poligalacturonasas**

Se ha reportado que cepas fitopatógenas de *B. glumae* secretan dos endo poligalacturonasas, PehA y PehB. La primera está involucrada en el estado inicial de la patogenicidad de añublo bacterial de la panícula de arroz, dado su alta actividad transcripcional en contraste con Peh B (Degrassi et al., 2008). Peh B está regulado por QS. Actualmente, no ha sido completamente elucidada las funciones de estas enzimas debido a la redundancia entre las dos isoformas, sin embargo, se conoce que las

poligalacturonasas son importantes enzimas clasificadas como degradadoras de la pared celular que están presentes como factores de virulencia de otras bacterias fitopatógenas (Abbott y Boraston, 2008; Wang et al., 2008).

### **1.3.1.5. Biosíntesis flagelar**

Los flagelos son importantes factores de virulencia en bacterias patogénicas (Josenhans y Suerbaum, 2002). El movimiento a través de flagelos, es importante para patogenicidad porque es la forma de llegar hasta el sitio de infección en el hospedero y provee una ventaja *fitness* durante el establecimiento del inicio de las fases de infección (Davey y O'Toole, 2000). Mutantes no móviles de *B. glumae* que producen toxoflavinas, fallan causando podredumbre del grano bacteriano (Kim et al., 2007). El mecanismo de QS juega un papel importante en la formación de flagelo y *B. glumae* aflagelada pierde actividad *swimming* y *swarming* e infección a 37°C (Kim et al., 2007). En el caso de añublo bacteriano de la panícula, su incidencia puede ser severa cuando las plantas son inoculadas durante floración y dicha incidencia podría ser baja si se inocula en días diferentes a floración con condiciones ambientales favorables (Tsushima et al., 1995). Esto podría ser porque el estado de floración es más adecuado para la invasión de *B. glumae* con bacterias moviéndose activamente desde el sitio de infección y posterior colonización de la superficie de la espiguilla. En todos estos pasos de desarrollo de la enfermedad la motilidad juega un papel importante (Karki, 2010), de tal forma que cepas de *B. glumae* avirulentas muestran pérdida de flagelo bajo microscopía electrónica de transmisión (TEM) y no muestran actividades *swimming* y *swarming*, en tanto cepas virulentas presentan flagelo polar bajo TEM. Estas evidencias indican que la movilidad es un factor de virulencia para patogenicidad de *B. glumae* (Karki, 2010)

### **1.3.1.6. Sistema de secreción tipo III (SSTIII)**

Muchas bacterias Gram negativas usan el sistema de secreción tipo III para traslocar proteínas efectoras a sus plantas hospederas con el fin de suprimir la defensa basal y facilitar el proceso de patogénesis y de invasión del hospedero. *B. glumae* puede elicitar respuesta hipersensible (HR) en hojas de tabaco indicando la presencia de un sistema de secreción tipo III, de hecho se ha caracterizado un grupo de genes que codifican para dicho sistema de secreción y 28 proteínas extracelulares que dependen del regulador HrpB

(elemento clave para la regulación de genes del sistema de secreción tipo III) (Kang et al., 2008). A pesar de que se tienen estos indicios no se ha demostrado que *B. glumae* requiera de estos efectores para la virulencia ni que todas estas proteínas sean sustrato del SSTIII, lo que si se ha evidenciado es que mutantes deficientes en SSTIII muestran reducción de la virulencia sobre panículas de arroz en relación al *wild type* (Kang et al., 2008) pero no se tiene la seguridad que el SSTIII en *B. glumae* sea un determinante de virulencia como si ocurre en otras bacterias Gram negativas.

### **1.3.1.7. Otros factores**

La producción de melanina en microorganismos está relacionada con virulencia y patogenicidad, en los hospederos reduciendo su resistencia antimicrobiana y convirtiendo la respuesta inmune del hospedero en infección. *B. glumae* produce melanina involucrada probablemente en *fitness* de supervivencia ante condiciones adversas, como es la fuerte radiación en días soleados. Ya que microorganismos melanizados son asociados a condiciones extremas como es el caso de suelos contaminados por radionucleótidos (Dadchova et al., 2007). Cepas epidémicas de *B. cepacia* producen melanina como un factor de virulencia en respuesta a radicales superóxidos que atenúa daños en el sistema de respiración, colonización y transmisión (Zughaier et al., 1999). Así mismo, la melanina es un factor de virulencia en *B. glumae* que puede proveer una ventaja de sobrevivencia para el patógeno ya que la melanina está involucrada en hipervirulencia de cepas productoras en relación a las no productoras (Karki, 2010).

### **1.3.2. Enfermedad causada por *B. glumae***

*B. glumae* fue reconocida como el agente causal del añublo bacterial de la panícula del arroz en los Estados Unidos (Rush, 1998; Shahjahan et al., 2000) y primeramente descubierta en Japón como causante de podredumbre del grano, lámina y plántula, dependiendo del estado de crecimiento de la planta de arroz (Kurita y Tabei, 1967; Uematsu et al, 1976). Actualmente, se ha reportado su presencia en varias partes del mundo como Japón, Tailandia, Vietnam, Korea del Sur, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Estados Unidos, Panamá, Nicaragua, Costa Rica y Colombia (Zhu et al., 2008; Devescovi et al., 2007; Nandakumar et al., 2009; Fory et al., 2014).

Reconociendo que la enfermedad causada por *B. glumae* en la planta de arroz tiene dos momentos principales, como se indicó anteriormente, dado que se manifiestan síntomas de pudrición de semillas y plántulas (Uematsu et al., 1976; Hikichi, 1991; Devescovi et al., 2007; Flórez-Zapata y Uribe-Veléz, 2011) y en la etapa de floración, este último denominado añublo bacteriano de la panícula (Nandakumar et al., 2009). Igualmente se ha descrito que durante la etapa vegetativa, a excepción de la plántula, no se observan síntomas de enfermedad lo que estaría relacionado con la concentración del inóculo de *B. glumae* en la planta de arroz de una manera directamente proporcional durante todo el ciclo de cultivo (Tsushima et al., 1985; Hikichi, 1991).

A nivel de plántulas, se incluye el tizón de las mismas y su pudrición (Devescovi et al., 2007), además de clorosis sobre la superficie de la planta e incluso maceración completa de coleoptilo y plúmula que le impide el desarrollo de la plántula (Flórez-Zapata y Uribe-Veléz, 2011). Lo que pone en evidencia dos ventanas temporales relevante para el control de la bacteria *B. glumae* como agente causal, la plántula y la etapa de floración.

El añublo bacteriano de la panícula aparece en la etapa de floración como se mencionó previamente y se presentan sobre la hoja bandera y las espiguillas en la panícula (Sayler et al., 2006). Las panículas que se ven afectadas por la enfermedad presentan espiguillas de color pajizo, decoloración del grano, pudrición y vaneamiento. Aunque, se conoce que el síntoma más importante es la esterilidad de la panícula (Groth, 2007; Giuliano et al., 2008). De manera más específica se presenta la aparición de lesiones verticales grises rodeadas de color rojizo en la vaina (Nandakumar et al., 2009), en floración las espiguillas muestran una base de color oscuro con una línea marrón rojizo y sufren una ausencia del llenado del grano (FEDEARROZ, 2009). Los granos que se forman muestran decoloración y manchado en un tercio del grano (Nandakumar et al., 2009; Fory et al., 2014).

Debido a que *B. glumae* causa esterilidad de la inflorescencia, reducción del peso del grano y aborto del grano se pueden presentar reducción del rendimiento del cultivo de arroz hasta del 75% (Chien et al., 1987; Tsushima et al., 1996; Nandakumar et al., 2008, Sayler et al., 2006). El rango de temperatura óptimo para el desarrollo de la enfermedad en arroz es de 35 a 40°C para el crecimiento de *B. glumae* (Nandakumar et al., 2009), lo que explica de alguna forma la epidemia del añublo de la panícula durante los años 1995, 1998 y 2000 en Louisiana, Estados Unidos dado altas temperaturas nocturnas (Nandakumar et al., 2008; Shahjhan et al., 2000).

El cambio climático mundial puede incrementar la frecuencia de este tipo de enfermedades, en especial por la existencia de numerosos fitopatógenos con temperaturas óptimas altas (Shaad, 2008), lo que podría explicar en el caso de *B. glumae* el incremento en los últimos tiempos del número de casos de la enfermedad en países productores de arroz (Ham et al., 2011).



**Figura 1.** Síntomas del añublo bacterial de la panícula causados por *Burkholderia glumae*. En (A) lesiones verticales ocasionados en la vaina de la hoja, en (B) Síntomas asociados a la panícula como manchado de las espiguillas, en (C) Síntomas en campo, donde la falta de llenado de grano ocasiona que la panícula se mantenga erecta durante esta etapa del ciclo del cultivo (Tomado de Nandakumar et al., 2009).

En Colombia, en el año 1987 el CIAT realizó el primer reporte de complejos bacterianos en arroz (Zeigler y Álvarez, 1987), pero hasta el 2007 en el Caribe, específicamente para los distritos de riego de Montería y La Doctrina (Córdoba), se reportó una sintomatología en la panícula que correspondía a una decoloración y vaneamiento en el grano, donde se realizaron 72 aislamientos de semillas identificando 15 de ellos como *B. glumae* (Pérez y Saavedra, 2007). Esta sintomatología se vio con mayor incidencia y severidad en la fase de floración con la esterilidad de las espiguillas. Posteriormente, se detectó la enfermedad

en los departamentos de Tolima y Huila, así bajo las evaluaciones de FEDEARROZ y el CIAT se confirmó *B. glumae* como el agente causal de la enfermedad. Con la aparición de la enfermedad en el país se observó diferentes condiciones fitosanitarias, ambientales y de manejo de cultivo que podían favorecerla. Dentro de ellas se pueden mencionar, las condiciones ambientales afectadas por el cambio climático como la temperatura superior a 35°C, lluvias constantes y la nubosidad (FEDEARROZ, 2009); las siembras extemporáneas dado a que se pudo determinar que las producciones del cultivo en las zonas arroceras de riego en Córdoba y Bolívar se asociaban con la época de siembra, mostrando que los efectos del añublo bacterial fueron más fuertes en los meses de siembra de febrero y marzo, lo cual permitió decretar una fecha límite de siembra confirmando que los menores rendimientos se observaron a la siembra entre los meses de enero a abril. En consecuencia se reportó que quienes desacataron la resolución expedida y sembraron fuera de la época recomendada, sufrieron mayores pérdidas, debido a que la incidencia del añublo bacterial aumento en la escala de evaluación (Pérez y Saavedra, 2011); otro factor es la alta densidad de siembra dado que proporciona un microclima que favorece el desarrollo de enfermedades. En este sentido evidencias encontradas en Cúcuta, mostraron que la incidencia de *B. glumae* aumentó a medida que se incrementó el número de plantas de arroz por metro cuadrado (Diago et al., 2009); el uso de semilla de costal o no certificada es otro factor importante debido a que se ha determinado la presencia de la bacteria en semillas asintomáticas y es necesario el uso de herramientas moleculares para garantizar que la semilla se encuentre libre del patógeno (Fory et al., 2014); además de los ya mencionados existen otros factores, dentro de los que se menciona, el manejo inadecuado de malezas, nutrición desbalanceada y el abuso en la aplicación de plaguicidas (Pérez y Saavedra, 2011).

La bacteria también ha sido detectada a través de PCR en muestras de plantas del Cesar, Meta, Santander y Valle del Cauca, mostrando una distribución amplia en el país (Mosquera, 2010).

### **1.3.2.1. Transmisión de la enfermedad**

*Burkholderia glumae* es considerado un patógeno transmitido por semilla (Hikichi et al., 1993) ya que la bacteria ha sido detectada en varias partes de la semilla incluyendo la epidermis y el parénquima (Tsuchima y Naito, 1991; Tsuchima et al., 1996). Además se ha demostrado que es un habitante de la filosfera (Tsushima et al., 1991; Tsushima et al.,



1996), por tanto se podría decir que es necesario este paso para la infección primaria en el sentido que facilita la fuente del inóculo para las panículas en emergencia e incluso al inocular la planta mediante inyección del patógeno se observan inicialmente síntomas sobre la lámina foliar y posteriormente se observan los síntomas sobre la panícula (Yuan, 2005).

De otra parte, algunos autores sugieren que el mecanismo de infección primaria en las plántulas es a través de las plúmulas (Hikichi et al., 1993; Hikichi et al., 1995). Incluso Tabei et al., (1989) encontraron que la bacteria entra por la lema y la palea por medio de los estomas, multiplicándose en los espacios intercelulares del parénquima y se puede mover en las células y tejidos sanos. Por su parte Correa (2006) recalca que las células bacterianas presentes en la vaina de la hoja bandera juegan un papel importante en la infección, teniendo en cuenta que *B. glumae* se multiplica muy rápido en la superficie de las panículas emergidas e infecta las flores después de que estas han brotado. Adicionalmente, se ha establecido que *B. glumae* se encuentra presente en hojas de planta de arroz durante la etapa de crecimiento, en semillas almacenadas, en malezas de campo y en tejido vegetal residual de cosechas anteriores (Suzuki et al., 2004), por lo cual cada una de estas podrían ser fuente de inóculo.

Aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual *B. glumae* infecta la planta de arroz, pero se conoce que semillas sintomáticas y asintomáticas muestran evidencia que la bacteria se multiplica sobre las mismas y es posible que estas sean el mayor reservorio de la enfermedad (Pérez, 2010; Suzuki et al., 2004; Fory et al., 2014). Por esta razón resulta importante encontrar mecanismos que puedan proteger las semillas y que a la vez resulten amigables con el medio ambiente y la salud del ser humano.

### **1.3.3. Manejo de la enfermedad causada por *B. glumae***

Existen pocos métodos para el control de la enfermedad (Sayler et al., 2006). El uso de una semilla certificada y por tanto libre del patógeno es tal vez la solución más importante, ya que esta medida ha conducido a una reducción importante de la incidencia de la enfermedad (Saichuk, 2009). En este sentido se han hecho algunos intentos por controlar la enfermedad tanto a nivel de la semilla como a nivel de campo, a continuación se presentan algunas de esas estrategias.

### **1.3.3.1. Control químico**

De varios productos evaluados el único que ha mostrado funcionar es el antibiótico derivado de quinolona, denominado ácido oxolinico, cuyo blanco principal es la ADN girasa en las subunidades GyrA y GyrB de bacterias Gram negativas (Drlica y Zhao, 1997). En Colombia se ha probado el ácido oxolinico indicando una acción a corto tiempo frente a la bacteria que posteriormente es perdida en evaluaciones a nivel *in vitro* a mas de 48h (Beltran-Molina et al., 2010) y por su característica de antibiótico también puede ser toxico en altas concentraciones. De esta manera, en los Estados Unidos y otros países está prohibida su comercialización dada la aparición de cepas resistentes naturales al principio activo (Maeda et al., 2004; Nandakumar et al., 2009). Esta resistencia se ha atribuído a una sustitución aminoacidica de la posición 83 de gyrA, así mismo se dice que gracias a esto se incrementa el *fitness* parasítico en la panícula (Maeda et al., 2007). Actualmente no existen otros tratamientos químicos.

### **1.3.3.2. Líneas y cultivares resistentes y tolerantes**

A nivel mundial se ha podido identificar diferentes niveles de susceptibilidad y resistencia al añublo bacterial de la panícula en algunas variedades de arroz (Sayler et al., 2006). Esta resistencia puede variar en grados, identificándose resistencia parcial (Shahjahan et al., 2000), como en la variedad Júpiter que hasta ahora ha sido descrita con un alto nivel de resistencia (Sha et al., 2006). Sayler et al., (2006) muestran que mediante inoculación por inyección y conteo de la población de *B. glumae* en las hojas, se pueden identificar líneas con resistencia como la línea Drew de Estados Unidos y LM-1, una línea mutante generada por radiación gamma la cual muestra alta resistencia al añublo bacteriano (Groth et al., 2007).

Cabe mencionar que para identificar variedades tolerantes y/o resistentes, es necesario conocer los mecanismos moleculares dentro de la planta y es por esto que la búsqueda de marcadores moleculares en líneas resistentes facilita el manejo de diversas enfermedades. Shannon et al., (2010), identificaron 12 QTLs (quantitative trait loci) para resistencia al añublo bacterial de la panícula, en una población de 300 RILs (recombinant inbred lines) derivados del cruce de las variedades Lemont y TeQing evaluadas entre 2001 y 2002 inoculadas con *B. glumae*. Sin embargo, no existen más trabajos relacionados en este aspecto.

En Colombia existen trabajos de tolerancia varietal como componente importante del manejo integrado de enfermedades, entendiéndose como tolerante aquella variedad o línea que se enferma pero puede producir un rendimiento normal del cultivo. El resultado de cinco semestres de evaluación estableció que las variedades Fedearroz 733 y Fedearroz Mocari presentan mayor grado de tolerancia a la enfermedad medidas en términos de severidad sobre la panícula (Pérez y Saavedra, 2011). Un análisis de la infección en plántulas de arroz inoculadas en semilla, demostró que las variedades Fedearroz F369 y F733 presentaron mayor severidad en tanto las variedades F60, Panorama y F174 presentan menor grado de infección (Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, 2011). Estos resultados sugieren que la variedad F733 es tolerante en la etapa de floración y llenado de grano pero susceptible en plántula cuando la semilla lleva el inóculo de *B. glumae*. Es posible que la tolerancia reportada en campo para dicha variedad puede ser debido a una mayor tolerancia a temperaturas altas que son usualmente conducentes de la enfermedad en variedades susceptibles, así mismo no se conoce si la tolerancia de algunas variedades se deba principalmente a su capacidad de tolerar condiciones de altas temperaturas máximas y mínimas (Castilla et al., 2010), más que a su capacidad genética para evitar el desarrollo de la enfermedad. Teniendo en cuenta que ciertas condiciones climáticas la favorecen como se indico anteriormente.

En la actualidad, no se conoce claramente variedades o líneas tolerantes en Colombia, trabajos más recientes (Beltrán et al., 2015) indican que en campo la variedad F733 muestra una cantidad menor de inóculo que otras variedades, pero esto no es una garantía de que la enfermedad no se desarrolle ya que al parecer hay un componente ambiental importante.

### **1.3.3.3. Control biológico**

El control biológico puede definirse como el uso de enemigos naturales para prevenir o reducir el daño causado a los cultivos por plagas o enfermedades (Crump et al., 1999). El propósito es el uso de organismos antagonistas para disminuir la población del patógeno y reducir su actividad patogénica (De Bach y Rosen, 1991).

El control biológico podría ser una opción para atenuar *B. glumae* y más específicamente el añublo bacterial de la panícula en el cultivo de arroz. Así, se ha evidenciado que algunas cepas avirulentas de *Burkholderia* spp, pueden evitar el desarrollo de la enfermedad. En

este sentido, una cepa de *B. gladioli* avirulenta funciona en el control del añublo bacterial de la panícula cuando se co-inocula con *B. glumae* en panículas de arroz (Miyagawa y Takaya, 2000), lo que puede deberse a inducción de resistencia sistémica. En semillas se ha inoculado cepas avirulentas de *B. glumae* que suprimen la pudrición en plántula (Furuya et al., 1991).

Beric et al., (2012), encontró aislados de Bacterias Formadoras de Endospora (BAFEs) de suelo, estiércol y heno que mostraron actividad antagonista *In vitro* frente a diversas bacterias fitopatógenas incluida *B. glumae*. Así mismo, Chung et al., (2015) mostró la actividad biocontroladora contra *B. glumae* *In vitro* e *In vivo* de una cepa de *Bacillus* sp aislada de la rizosfera de arroz

En Colombia, se ha probado la adición de cepas de *Trichoderma* en 7 variedades de arroz demostrando buenos rendimientos promedio y menor incidencia de la enfermedad (Pérez y Saavedra, 2011), sin embargo los resultados no han sido 100% satisfactorios dado que a pesar de que estos tratamientos contribuyen a una mejor sanidad foliar pero no mejoran el rendimiento del cultivo.

#### **1.3.3.4. Otros aportes al manejo**

Diversas son las estrategias que han surgido en el país para el control de la enfermedad, pero en su mayoría hay una alta tendencia a la implementación de sistemas de diagnóstico mediante métodos moleculares con el objeto de conocer la incidencia de la enfermedad en campo y de esta manera implementar estrategias de manejo integrado de cultivo y determinación de épocas de siembra con miras a la disminución de la incidencia en función de evitar las condiciones ambientales que favorecen la enfermedad durante los estados fenológicos más susceptibles del cultivo (Fory et al., 2014; Fedearroz, 2012; Beltrán-Molina et al., (2014)). Varios estudios apuntan a que las condiciones ambientales y la época de siembra influye de manera importante en la incidencia de la enfermedad (Correa, 2007).

### **1.4 Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs)**

Las Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) corresponden a 31 especies de *Bacillus* y siete de otros géneros de bacterias Gram positivas, aerobias y cuya

característica más especial es la formación de endospora. Se encuentran presentes en todos los sistemas agrícolas y gracias a sus características microbianas pueden sobrevivir en ambientes hostiles y bajo condiciones de estrés (McSpadden, 2004).

Varios autores han propuesto las BAFES como candidatos para el control biológico de plagas y enfermedades por sus características metabólicas, dentro de las que se destacan la producción de antibióticos (Emmert y Handelsman, 1999; Ongena y Jacques, 2008), moléculas peptídicas señalizadoras, enzimas extracelulares (Han-Soo et al., 2003) y lipopeptidos. Adicionalmente, tienen diferentes mecanismos de control como el antagonismo directo mediante la producción de enzimas catalíticas y moléculas inhibidoras del crecimiento microbiano (Emmert y Handelsman, 1999); su capacidad de colonizar diferentes ambientes como la rizosfera a través de la formación de biopelículas y la excreta de diversos metabolitos como los lipopéptidos y la inducción de resistencia sistémica en las plantas (Ongena y Jacques, 2008, Kloepper et al., 2004).

Cabe destacar la producción de lipopéptidos como moléculas que participan activamente en los diferentes mecanismos de acción de los BAFEs y se conocen que existen tres tipos principales de lipopéptidos como lo son las iturinas, surfactinas y fengicinas que actualmente son muy estudiados por sus características físicas y químicas que les confiere su actividad antagonista contra diferentes fitopatógenos (Kumar y Johrer, 2011; Ongena y Jacques, 2008; Ongena et al., 2007)

Además de los compuestos descritos anteriormente, las BAFEs producen compuestos orgánicos volátiles que también presenta efecto antagónico y se muestran afectando características importantes para la virulencia de fitopatógenos (Kai et al, 2007). Adicionalmente, las BAFEs pueden producir enzimas acil homoserin lactonasas que pueden interrumpir la comunicación entre cepas de bacterias gram negativas que regulan la expresión de genes a través de QS, generando lo que se conoce como *quorum quenching*. Esto incluye a *B.glumae*, ya que los principales factores de virulencia dependen de QS usando como moléculas señalizadoras AHLs (Dong et al., 2002).

Existen diversos productos comerciales basados en especies de *Bacillus* para control biológico de diferentes enfermedades, en especial a lo que refiere el control de enfermedades fúngicas. A manera de ejemplo, se referencia Avogreen® a base de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Cercospora* sp; la referencia Ballad® el cual tiene capacidades de antibiosis, competición, promoción de crecimiento e inducción de

resistencia y puede actuar frente a diferentes patógenos incluyendo *Rhizoctonia oryzae*, *Erysiphe graminis*, *Puccinia* spp, *Xanthomonas* spp, *Sclerotinia sclerotiorum*, entre otros y Rhapsody® a base de *B. subtilis*, el cual puede ser usado para patógenos bacterianos como *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* en plantas ornamentales (Cawoy et al., 2011)

A pesar del uso de *Bacillus* como productos para control biológico, la mayoría de estos son usados para fitopatógenos fúngicos y es muy baja la existencia de productos dirigido contra bacterias. Así mismo, existen pocos estudios que muestran claramente el manejo de enfermedades bacterianas en plantas usando control biológico con especies de *Bacillus* y relacionadas. Para mencionar algunos pocos ejemplos, tenemos el trabajo realizado por Lanna et al., (2013) donde reportan la actividad de biocontrol de las cepas endófitas *B. amyloliquefacies* y *B. pumilus* contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato la cual fue modificada para expresar la proteína GFP, encontrándose que las poblaciones de *P. syringae* pv. tomato son reducidas drásticamente y con esta reducción también se reduce el número de lesiones sobre hoja de tomate en presencia de las bacterias endófitas. Así mismo merece mencionar el estudio de Bais et al., (2004) donde se reporta la capacidad de control de la cepa *B. subtilis* 6051 contra *P. syringae* pv. tomato DC3000 mediante la colonización y formación de biopelículas en la raíz de *Arabidopsis* a través de la producción de surfactina.

Otro aspecto a tener en cuenta es que en arroz son pocos los estudios de control biológico (Bouizgarne, 2013; McSpadden Gardener, 2010) la mayoría de ellos están dirigidos contra patógenos fúngicos como *Fusarium moniliforme* y *F. fujikuroi* (Kazempour y Elahinia, 2007). Contra enfermedades bacterianas se menciona el estudio de Chung et al., (2015) donde se evalúa la bacteria endófitas *Bacillus oryzicola* sp. Nov contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y *Burkholderia glumae* en su capacidad de realizar antagonismo *In vitro* y producir resistencia sistémica inducida en plantas de arroz bajo condiciones de invernadero.

Varias referencias indican que las BAFEs pueden tener capacidad de biocontrolar varios microorganismos fitopatógenos incluyendo bacterias y para destacar dentro de los antecedentes del grupo de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia han sido probados contra otros patógenos como *Rhizoctonia solani* (Blanco, 2012) y

*Mycosphaerella fijiensis* (Ceballos et al., 2012) mostrando excelentes resultados e indicando el potencial de las BAFEs rizosfericas como biocontroladores biológicos.

## 2. Justificación del problema

El arroz (*O. sativa*) es un alimento de gran importancia a nivel mundial dado que constituye la base alimenticia de alrededor de 2000 millones de personas en todo el planeta y en Colombia es el tercer producto agrícola en extensión, representando el 6% de la producción agropecuaria y 10% de la actividad agrícola nacional. La economía de 215 municipios de Colombia depende del cultivo del arroz, producto de primera necesidad de la canasta familiar y cuyo consumo anual varía entre 40 y 42 kg. per cápita y puede llegar a los 70 kg. en zonas como la Costa Caribe. Se siembran entre 420.000 y 450.000 hectáreas al año y se producen entre 2 y 2.4 millones de toneladas anualmente en el país (CIAT, 2014).

Dado que es un producto de alto consumo se requiere una alta productividad del cultivo, ya que de acuerdo a estadísticas realizadas por la FAO para el año 2016 la demanda del arroz supera la producción anual. En este contexto, se debe reconocer que a pesar de mantener una producción anual creciente a través de los años, se ha mostrado estabilidad en los últimos tres. Así, en Colombia se ha identificado casos como en los años 2010 y 2011, presentando una disminución en los rendimientos del cultivo de arroz, pasando de producir 6.2 toneladas por hectárea en promedio en el país en 2009 a producir para el año 2013 5.3 ton/ha (FEDEARROZ, 2013). Las causas de disminución del rendimiento son diversas atribuyéndoselas a factores limitantes del cultivo dentro de las que se mencionan el agua, el clima, el costo de los fertilizantes, las enfermedades, entre otros (FAO, 2010). Las enfermedades, especialmente aquellas causadas por agentes microbianos representan un factor limitante muy importante (Pérez, 2010; BELTRÁN-MOLINA ET AL., (2014)). Dentro de estas, la causada por la bacteria *B. glumae* ha traído fuertes efectos negativos sobre los rendimientos de la producción de arroz dado un complejo de síntomas que se pueden manifestar en la pudrición de la semilla y las plántulas de arroz y terminan en la esterilidad de la inflorescencia, reducción del peso del grano, aborto y vaneamiento del mismo (Nandakumar et al., 2009). De acuerdo con el CIAT esta enfermedad ha causado pérdidas hasta del 75% del rendimiento en el país (Fory et al., 2014), siendo además una “enfermedad silenciosa”, dado que los síntomas se presentan en dos etapas importantes, a nivel de la plántula y hacia el final del ciclo de cultivo en el estadio de la floración y el llenado del grano, pero durante las restantes etapas del cultivo las plantas



son asintomáticas y pueden pasar desapercibidas aun manteniendo un inóculo de la bacteria durante todo el ciclo (Hikichi, 1991).

Debe destacarse que *B. glumae* se encuentra en la mayoría de los países productores mundiales de arroz (Zhu et al., 2008) y fue reportada en Colombia desde 1987 estando actualmente distribuida en todas las zonas arroceras del país (Fory et al., 2014).

En Colombia, la enfermedad ha sido favorecida por diversas condiciones fitosanitarias, ambientales y de manejo de cultivo. En las condiciones ambientales se incluye el aumento de las temperaturas nocturnas y de la precipitación (Nandakumar et al., 2009). Mientras en el manejo se destaca las siembras extemporáneas, la alta densidad de siembra, el uso de semilla de costal o no certificada, manejo inadecuado de malezas, nutrición desbalanceada y el abuso en la aplicación de plaguicidas (Pérez y Saavedra, 2011). De estos factores, se le ha dado gran peso a la semilla, postulándose como mayor reservorio del causante, mostrándose incluso que el patógeno puede multiplicarse sobre la semilla sin causar síntomas y extendiéndose el ideal de uso de semilla certificada (Ham et al., 2011; Fory et al., 2014).

Actualmente, son muchos los esfuerzos en el país por darle solución al problema y aún no se han tenido resultados totalmente satisfactorios. De varios productos químicos evaluados, sólo el ácido oxolinico resulta tener actividad bactericida contra *B. glumae*, pero tiene únicamente efectos positivos a corto plazo, además se encuentra prohibido su uso en los Estados Unidos y otros países productores por la generación de cepas resistentes y por su nivel toxicológico ya que podría afectar la salud del ser humano (Nandakumar et al., 2009; Gómez et al., 2010). También se ha considerado la búsqueda de variedades tolerantes, donde esfuerzos del Programa Amtek de FEDEARROZ y algunas estrategias usadas por el CIAT han permitido identificar variedades con tolerancia parcial, por lo que aun se sigue trabajando en este aspecto.

Dentro de los puntos de trabajo se ha considerado un manejo cultural importante considerando las épocas de siembra adecuadas en relación a las condiciones climáticas presentadas durante el año y otros importantes como la densidad adecuada de siembra y el uso de abonos orgánicos. Estableciendo a través de varios ensayos que aún no hay solución en la actualidad para la problemática causada por *B. glumae*.

El control biológico entendido como el uso de enemigos naturales para el control de enfermedades, podría ser una alternativa para el manejo de la enfermedad. En este sentido, son muy pocos los trabajos que se han realizado para el control de *B. glumae*, así, Beric et al., (2012) identificó Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) con actividad antagonista *In vitro* contra cepas de este fitopatógeno. Por su parte Chung et al., (2015) reportó la cepa de *Bacillus* Y7007 con actividad de resistencia sistémica inducida sobre plantas de arroz mediante la aplicación por aspersión foliar del cultivo celular y del sobrenadante del mismo, evidenciando reducción de síntomas de enfermedad en hasta un 70.8%. De manera más reciente, Shertda et al., (2016) encuentra que la aplicación por aspersión de bacterias asociadas a rizosfera de arroz reduce la severidad de la enfermedad en la panícula.

Se destaca en estos estudios el uso de cepas de *Bacillus*, reconociendo las BAFEs como un grupo de bacterias gram positivas que pertenecen a este género y 7 géneros relacionados que han sido ampliamente usados como agentes de control biológico contra diversos microorganismos fitopatógenos. Esto se debe a la capacidad de las BAFEs para producir moléculas biológicamente activas dentro de las que se destacan los lipopéptidos del tipo iturinas, surfactinas y fengicinas, los cuales participan en los mecanismos de control de estos microorganismos como el antagonismo directo, la colonización de la rizosfera y la inducción de resistencia sistémica. Adicionalmente, estas bacterias forman una estructura de resistencia denominada endospora que no sólo les permite sobrevivir en ambientes hostiles y bajo condiciones de estrés, sino facilita la formulación de productos a base de estos microorganismos.

Existe varios antecedentes de resultados exitosos del uso de BAFEs en distintos patosistemas y dada su versatilidad resultan buenos candidatos como agentes de control de *B. glumae*, insistiendo en que su aplicación debería hacerse en semillas de arroz atendiendo a que es el mayor reservorio del fitopatógeno y entendiendo que hay dos ventanas importantes blancos control que son las etapas en las cuales se desarrolla la sintomatología causada por *B. glumae* (plántula y etapa de floración).

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad biocontroladora de aislados de BAFEs en plántulas de arroz infectadas con *B. glumae*.

### 3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un modelo de infección de *B glumae* en plantas de arroz bajo condiciones controladas de invernadero.
- Evaluar la actividad antagonista de aislados BAFEs de origen rizosféricos *In Vitro* contra *Burkholderia glumae*
- Evaluar la actividad de control biológico *In Vivo* de los aislados de BAFEs de suelos rizosféricos frente a *B. glumae* en semillas de arroz bajo condiciones controladas de invernadero

## 4. Metodología

### 4.1 Material biológico

Semillas de arroz proveniente de lotes comerciales certificados de la variedad Fedearroz 733 identificada como más susceptible a la enfermedad dado la presencia de niveles de mayor severidad en semillas en reportes anteriores (Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, 2011). Tres cepas de *B. glumae* 3200-12, 3853 y 3855 de diferentes origen geográfico en Colombia y facilitadas por la Dra Gloria Mosquera del Laboratorio de Patología de Arroz del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Setenta y cuatro aislados de bacterias formadoras de endospora (BAFES) de suelos rizosféricos de arroz, maíz e iraca conservadas en el banco de genes y cepas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá fueron evaluadas por su potencial biocontrolador contra *B. glumae*.

La cepa biosensora *Chromobacterium violaceum* CV026 proporcionada por el Dr Vittorio Venturi del International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) de Trieste Italia

### 4.2 Preparación del inóculo bacteriano

Se preparó un inóculo bacteriano de cada una de las cepas de *B. glumae* a partir de un vial almacenado a -20°C en caldo Luria Bertani (LB) con glicerol al 15%. Se realizaron siembras por agotamiento en agar King B y se incubaron por 48h a 28°C. Transcurrido este tiempo de incubación se verificó la pureza del aislado y una colonia pura se sembró en caldo LB, con incubación a 28°C y agitación de 150 rpm por 24 h. La biomasa bacteriana se recuperó por centrifugación (7500 rpm por 5 min) y se re suspendió en 20mL de agua destilada estéril, hasta obtener una suspensión de la bacteria con una concentración de densidad óptica 0,2 +/- 0,05 a 600nm, la cual corresponde aproximadamente a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, se verificó la concentración del inóculo a través de conteo en placa.

De forma similar los aislamientos de BAFES se obtuvieron, partiendo de una suspensión de endosporas almacenada a -20°C en medio LB con 15% de glicerol. Para ello se activó cada una de las cepas desde dicha suspensión en medio LB, luego se verificó su pureza

después de 24 h de crecimiento y una colonia pura se sembró en caldo LB incubándola a 28°C y 150 rpm durante 24 h. La biomasa bacteriana se recuperó por centrifugación (7500 rpm por 5 min) y se le realizaron tres lavados y posteriormente se re suspendió en 20mL de agua destilada estéril, hasta una suspensión de la bacteria con una concentración de  $1,0 \times 10^7$  esporas/mL o una densidad óptica (DO) de  $0,2 \pm 0,05$  a 600 nm. Esto con el fin de obtener un inóculo de células vegetativas.

En la fase final del proceso de caracterización de las cepas de BAFEs, los aislamientos seleccionados se llevaron a esporulación con el objeto de evaluar la suspensión bacteriana partiendo de las esporas. Iniciando desde un cultivo puro en LB de cada BAFE, se hizo una siembra masiva en el medio sólido de esporulación (modificado de Abarca et al., 1992) y se incubó a 28°C por 15d, transcurrido este tiempo, la biomasa bacteriana se recuperó usando un asa bacteriológica y 10mL de agua destilada estéril, esta suspensión final fue calentada a 80°C durante 10min en baño termostático y posteriormente se determinó la concentración de la suspensión en UFC/mL mediante el método de diluciones seriadas y siembra en placa. Verificada la pureza de las cepas y la concentración, se empacaron dichas suspensiones de esporas en viales ámbar 20 mL de capacidad y se almacenó a 4°C.

### 4.3 Flujo de trabajo

Para cumplir con los objetivos propuestos en esta investigación, se usó el siguiente flujo de trabajo (Figura 2). Para ello, se usaron dos tipos de evaluaciones, a nivel *in vitro* e *in vivo*. Para el primer tipo se seleccionaron cepas de BAFEs del Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, las cuales fueron usadas para hacer un tamizaje.

Las cepas seleccionadas de acuerdo a la actividad presentada en los ensayos *in vitro* propuestos fueron evaluadas a nivel *in vivo*. Para esta evaluación, se debió estandarizar un modelo de infección de *B. glumae* en arroz teniendo en cuenta los dos reservorios más importantes de la bacteria, el sustrato y la semilla. Con estos modelos se adaptaron dos modelos de co-inoculación BAFE + *B. glumae* con el fin de encontrar una manera adecuada para observar control biológico en plántulas de siete días.

Los dos modelos se usaron para realizar las evaluaciones a nivel *in vivo*, lo que permitió seleccionar cinco aislados de BAFEs para ensayo en invernadero.

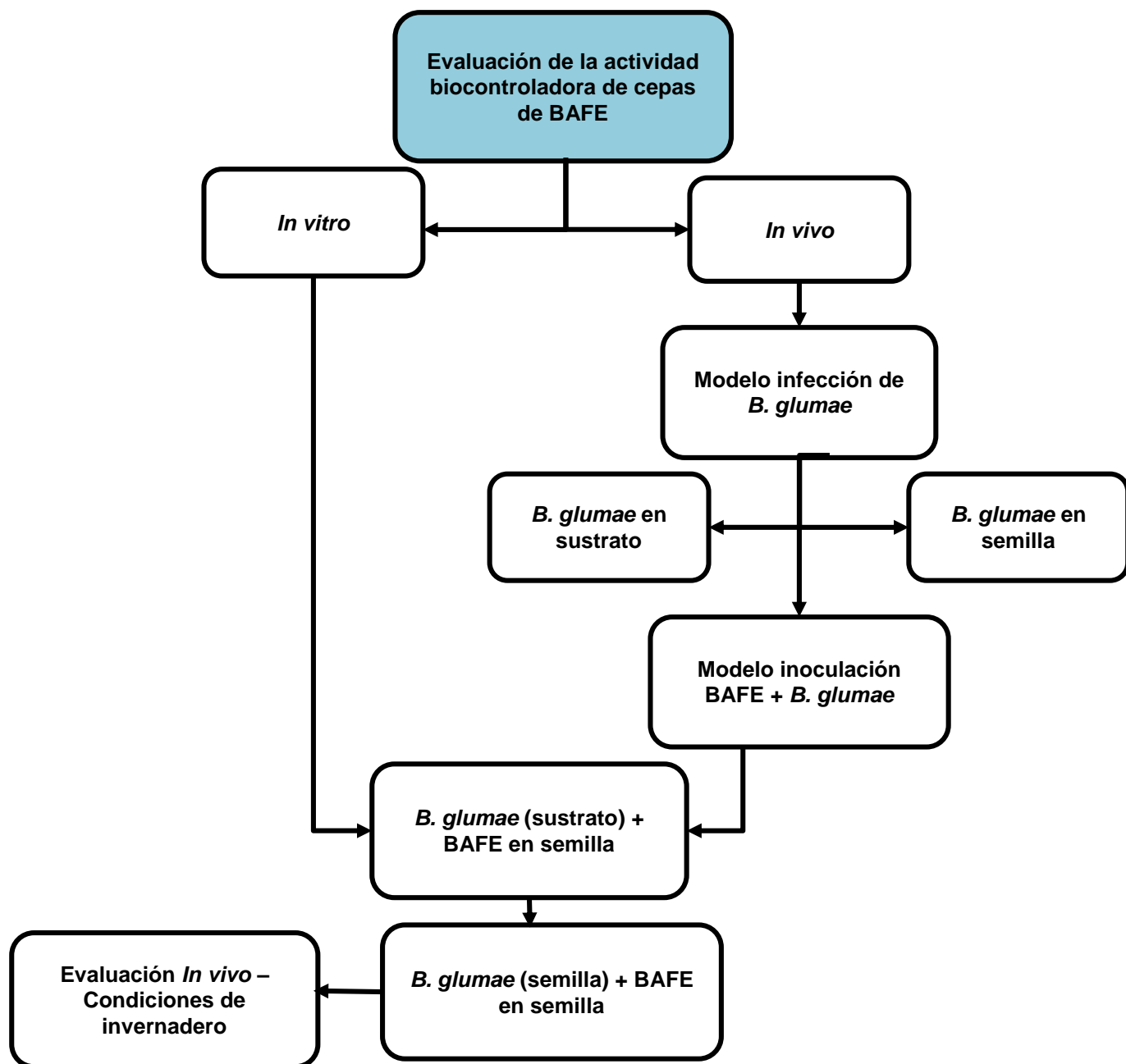


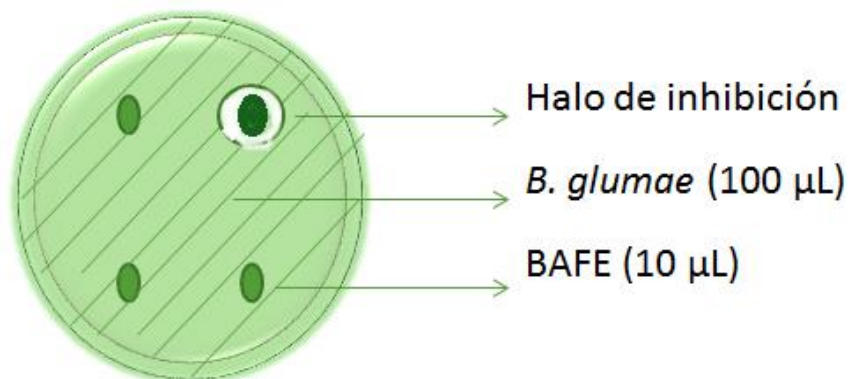
Figura 2. Flujo de trabajo mostrando cada una de las etapas para la evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas de BAFEs contra *B. glumae*

## 4.4 Determinación de la actividad biocontroladora de BAFEs *In vitro*

### 4.4.1. Ensayos de antagonismo dual *In vitro*

Una vez preparados los inóculos bacterianos de acuerdo a lo descrito previamente, se sembró en medio LB dispersando en forma de tapete 100  $\mu$ l de inóculo de *B. glumae* previamente ajustado a una concentración de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL (DO 0,2 +/- 0,05 a 600 nm) realizando la siembra con ayuda de un hisopo de algodón estéril sobre toda la superficie de la caja. Una vez se llevó a cabo la siembra del inóculo de *B. glumae* se colocaron 4 discos de papel filtro (Whatman No 1 de 5mm) por caja distribuidos equidistantemente tal y como se muestra en la figura 3. En cada disco se colocó posteriormente 10  $\mu$ l de inóculo ajustado a una concentración de  $1,0 \times 10^7$  UFC/ mL de cada BAFE a evaluar.

La capacidad antagonista se determinó por la aparición de un halo de inhibición cuyo diámetro se calcula midiendo el halo total de inhibición generado sobre el crecimiento de la bacteria *B. glumae* y restándole el diámetro de la colonia de BAFE (Fravel et al., 1993). El resultado de inhibición de crecimiento se reporta como el promedio para los cuatro discos BAFEs. Para cada ensayo se evaluó como control positivo la BAFE AP303 correspondientes a *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi et al., 2004) proporcionada por el Dr. Joshep Kloepper de la Universidad de Auburn en Estados Unidos, la cual tienen actividad contra diversos agentes a nivel *in vitro* pero no se había comprobado actividad contra cepas de *B. glumae*, y como control negativo cada disco se inoculó con solución salina NaCl al 0,85%.

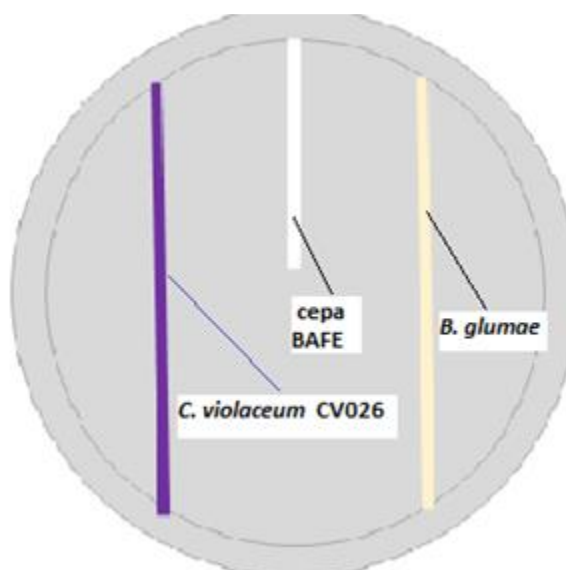


**Figura 3.** Esquema general de la formación de halo de inhibición del crecimiento de *B. glumae* por la acción de las BAFEs *in vitro*

De los resultados obtenidos en la evaluación de antagonismo en la prueba de enfrentamiento dual se seleccionaron aquellos aislamientos de BAFEs que mostraron actividad antagonista contra las tres cepas de *B. glumae*, sin tener cuenta categorías en relación al diámetro del halo de inhibición. Para estos aislamientos se realizó una repetición en el tiempo y las cepas consistentes en términos de su actividad antagonista fueron escogidas para la siguiente fase de evaluación de su capacidad antagonista.

#### 4.4.2. Evaluación de la actividad de *Quorum Quenching In vitro*

En cajas con medio agar LB se realizaron dos estrías paralelas de extremo a extremo de la caja con cada una de las cepas de *B. glumae* 3200, 3853 y 3855 y el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026. Posteriormente, se colocó una estría en medio de las dos anteriores, sólo hasta la mitad de la caja, con cada una de las 26 cepas de BAFEs seleccionadas en los ensayos de antagonismo dual como se observa en la figura 4. Los ensayos se incubaron a 30°C por 24 horas. Al término del tiempo de incubación se consideró positivo para *quorum quenching* el ensayo donde la cepa CV026 sólo producía violaceína en la mitad de su estría. Para el control de la producción de acil homoserin lactonas por parte de las cepas de *B. glumae* y la consecuente detección por parte del biosensor, se usó un tratamiento en el cual no se colocaba estría de BAFE (este se denominó negativo para *quorum quenching*).



**Figura 4.** Esquema general del ensayo de actividad de *quorum quenching In vitro* en la evaluación de aislamientos de BAFEs contra *B. glumae* usando el biosensor *C. violaceum* CV026



## 4.5 Estandarización de un sistema de inoculación de semillas de arroz con *B. glumae*

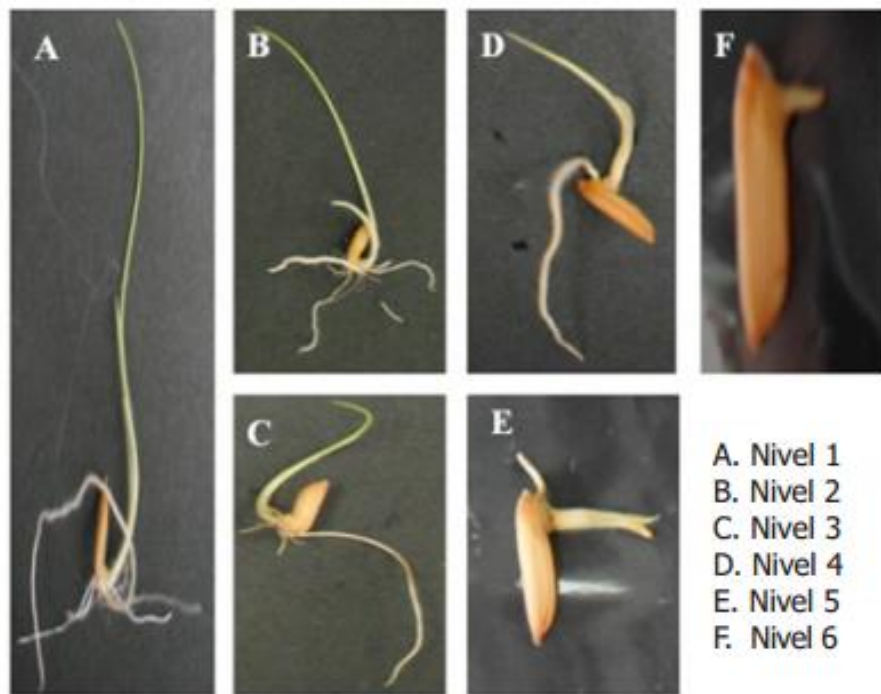
Semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Fedearroz 733 previamente lavadas con agua destilada estéril fueron desinfectadas superficialmente, empleando una solución de hipoclorito de sodio al 6% durante 6 minutos con agitación constante, luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (ADE), posteriormente se colocaron en etanol al 70% durante 6 minutos con agitación constante y finalmente se realizó nuevamente tres lavados con ADE. Finalmente, las semillas desinfectadas fueron embebidas en ADE durante 48h.

Las semillas desinfectadas y embebidas se sometieron al inóculo de *B. glumae* 3200-12, de origen geográfico Córdoba en Colombia reportada por Fory et al., (2014) con porcentajes de reducción del rendimiento del cultivo del 75% y usada previamente en el trabajo de Flórez-Zapata y Uribe-Vélez (2011) mostrando capacidad de infección en semillas de arroz usando un sistema de inoculación al vacío. Este fue ajustado a las concentraciones de  $1,0 \times 10^8$ ,  $1,0 \times 10^7$  y  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL y se empleó dos sistemas de infección, uno al vacío basado en la metodología de Flórez-Zapata y Uribe-Vélez (2011) con el objeto de asegurar que *B. glumae* estuviese dentro de la semilla y otro en el cual se colocó las semillas en un inóculo ajustado a las diferentes concentraciones por 30 min con agitación constante asumiendo que *B. glumae* se quedaría inoculada en la superficie de la semilla de arroz, transcurrido el tiempo las semillas se transfirieron en una caja de Petri estéril con papel filtro humedecido con 5mL de agua destilada estéril, con el objeto de inducir la germinación de las semillas.

Se adaptó un tercer modelo de infección en el cual se incorporó *B. glumae* en el sustrato, para ello un inóculo ajustado a una concentración final de  $1,0 \times 10^5$ ,  $1,0 \times 10^6$  y  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL se incorporó en agar-agua (4g de agar/L) antes de la temperatura de solidificación y sirviendo de manera homogénea 10 mL en cajas de Petri. Las semillas desinfectadas fueron transferidas a la superficie del agar.

En todos los casos, las cajas de Petri con las semillas fueron incubadas a 30°C durante 7d en oscuridad para favorecer su germinación. Se usaron semillas no inoculadas como control en cada uno de los experimentos, las cuales tenían el mismo tratamiento de desinfección e imbibición para no generar sesgos.

Semillas inoculadas bajo cada uno de los sistemas descritos con la cepa de *B. glumae* 3200-12, fueron usadas para medir la longitud del vástago y la raíz en centímetros y la severidad a los 7 días de acuerdo a la escala modificada por Flórez-Zapata y Uribe-Vélez (2011) (figura 5) y se calculó el grado de infección de acuerdo a la fórmula propuesta en el mismo artículo y que corresponde al Grado de infección =  $\Sigma$  (número de semillas en cada nivel x nivel)/número total de semillas. La unidad experimental fue de 10 semillas y se realizaron tres réplicas y tres repeticiones en el tiempo con el fin de encontrar reproducibilidad y conocer la capacidad de infección de la cepa de *B. glumae* 3200-12. Se usó un Diseño completamente aleatorizado (DCA) para validar los resultados estadísticamente.



**Figura 5.** Escala de severidad (Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, 2011)

- Nivel 1: Plántulas completamente verdes e igual de vigorosas a las del control no inoculado.
- Nivel 2: Plántulas completamente verdes, pero con las raíces y la parte aérea menos vigorosas en comparación con el control no inoculado.
- Nivel 3: Plántulas con desarrollo de la parte aérea de la planta, con decoloración parcial en menos de un 50% de la superficie.

- Nivel 4: Plántulas con desarrollo de la parte aérea de la planta, con decoloración parcial en más de un 50% de la superficie.
- Nivel 5: Plántulas con desarrollo de la parte aérea de la planta, con decoloración completa o con crecimiento limitado a menos de 1 cm de altura.
- Nivel 6: Coleóptilo y plúmula macerados, sin desarrollo de la planta

## **4.6 Determinación de la presencia de *B. glumae* en plantas de arroz desde semillas inoculadas**

Una vez estandarizados los diferentes sistemas de inoculación de *B. glumae* en semillas de arroz y conociendo las concentraciones adecuadas para el desarrollo de síntomas en las plántulas de 7 días, se decidió evaluar la presencia de *B. glumae* y su asociación con los síntomas encontrados para los sistemas de vacío y el sistema de inoculación en sustrato previamente descrito de acuerdo a los postulados de Koch (1881). Para ello plántulas de 7 días, de cada uno de los sistemas de infección, fueron trasplantadas a un suelo libre del patógeno (suelo: gravilla 80:20). Transcurrido 10 días, plántulas con síntomas, cuya escala de severidad fue asignada igual o mayor a 3 de acuerdo a Flórez-Zapata y Uribe-Vélez (2011), fueron muestreadas en un total de 60 plántulas. Para ambos modelos de *B. glumae* (vacío y sustrato) 12 plántulas fueron llevadas a condiciones de invernadero por treinta días (fotoperiodo 12 horas luz: 12 horas oscuridad, 28°C +/- 1 de temperatura y humedad relativa de 75%), al final del tiempo de incubación las plantas fueron evaluadas para la infección de *B. glumae*. Así, a estas plantas se les midió longitud de vástago y raíz y cuando se pudo se determinó el grado de infección de acuerdo a la escala descrita por Flórez-Zapata y Uribe-Vélez (2011). Posteriormente las plantas fueron desinfectadas superficialmente (hipoclorito de sodio al 2% por 5 min, tres lavados con ADE, etanol al 70% por 2 min y se finalizó con tres lavados con ADE) y maceradas en mortero con agua destilada estéril en una relación 0,3g de peso fresco de planta en 0,7 mL de ADE; luego se realizaron diluciones seriadas y se sembró 100µl en el medio semiselectivo para *B. glumae* S-PG (Tsushima et al., 1986; Quesada-Gonzales y Garcia-Santamaria, 2014) para las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$ . Las cajas se incubaron durante 48 h a 30°C y transcurrido el tiempo se buscaron colonias opalescentes, convexas, redondas y pequeñas o Tipo B de acuerdo con lo reportado por Mew y Misra (1994) y a lo determinado en ensayos preliminares antes de este estudio para la cepa 3200-12 y finalmente se realizaron

los conteos (figura 12). Posteriormente se aislaron colonias presuntivas para *B. glumae* en medio King B las cuales se caracterizaron por morfología de colonia y microscópicamente por tinción de gram.

Para confirmar que las presuntivas se trataban de *B. glumae*, se hicieron crecer los aislamientos en medio King B por 24 h y transcurrido el tiempo se tomaron de una a dos colonias para extracción de ADN por lisis química usando buffer de lisis alcalina (NaOH 0,05M y SDS 0,25%) de acuerdo al protocolo de Sahoo et al., (2014). Una vez realizada la extracción de ADN se procedió a realizar la PCR usando los primers y condiciones descritas por Takehuchi et al., (1995) y Sayler et al., (2006). Para verificar la calidad de la PCR siempre se usó un control positivo correspondiente a ADN extraído directamente desde la cepa pura de *B. glumae* 3200-12, como control negativo se usaron otros morfotipos que diferían de la morfología reportada para *B. glumae* en el medio S-PG y como blanco de reacción se usó agua destilada estéril HPLC grado PCR. Los productos de PCR fueron corridos en gel de electroforesis en agarosa de acuerdo a la metodología de Sambrook et al 2001. El bandedo se visualizó con SYBR Green® (1µl/100mL); los gels se digitalizaron en el transiluminador Gel Doc®, con ayuda del software QuantityOne® (BioRad). Se uso el marcador de peso molecular Hyperladder II (50-2000pb, BioLabs).

Una muestra de la amplificación resultado de la PCR fue purificado y enviado a su secuenciación al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Con las secuencias obtenidas se realizó su depuración usando el software BioEdit (Sequence Alignment Editor) versión 7.2.5 y se realizó el análisis de la secuencia limpia mediante el algoritmo BLAST de acidos nucleicos (Basic Local Alignment Search Tool) usando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Para las plantas de 30 días de incubación se emplearon 3 plantas en muestra compuesta separándolas en vástago y raíz para garantizar suficiente material vegetal para el ensayo. Las diluciones fueron sembradas por triplicado. Se debe recalcar que en todos los casos se usó como control negativo plantas no inoculadas con *B. glumae*.

## 4.7 Evaluación de la actividad de control biológico *In vivo* en semillas de arroz

Semillas de arroz de la variedad F733 previamente desinfectadas fueron usadas para los ensayos de evaluación de la actividad de control biológico *In vivo* para las aislamientos de BAFEs previamente seleccionadas en el ensayo *In vitro*.

### 4.7.1. Estandarización de la dosificación de los aislamientos de BAFEs en las semillas

Para conocer la mejor manera de inocular los BAFEs en las semillas de arroz de tal manera que estos aislamientos mostraran un efecto de control biológico contra *B. glumae In vivo*, se establecieron una serie de seis sistemas de inoculación teniendo en cuenta la manera de inocular el patógeno y el biocontrolador, así como se explica en la tabla 1.

**Tabla 1.** Modelo co-inoculación BAFEs en semillas de arroz para determinar su actividad biocontroladora *In vivo* contra *B. glumae*

Sistema de inoculación	Descripción
1 BAFE (vacío) → Bg (vacío)	Cepa BAFE al vacío (colocar semillas en inóculo ajustado a una concentración de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL por 30 min, 150 rpm y 28°C y realizar vacío por 10 min a 20psi), pasado este tiempo se inocula la semilla de arroz con la cepa 3200-12 de <i>B. glumae</i> (a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL) al vacío repitiendo el mismo procedimiento anterior
2 BAFE + Bg (vacío)	Coinóculo 50:50 (v/v) cepa BAFE + cepa <i>B. glumae</i> al vacío: Se preparó un coinóculo de 5 mL compuesto por volúmenes iguales de cada BAFE (a una concentración de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL) y la cepa 3200-12 de <i>B. glumae</i> (a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Una vez preparado el inóculo se adicionaron las semillas de arroz F733 a la suspensión bacteriana y se dejó en incubación por 30 minutos, 150 rpm y 30°C, pasado el tiempo se realizó vacío por 10 min a 20psi.
3 Bg (vacío) → BAFE (vacío)	<i>B. glumae</i> al vacío (colocar semillas en inóculo ajustado $1,0 \times 10^8$ UFC/mL por 30 min, 150 rpm y 28°C y realizar vacío por 10 min a 20psi de acuerdo a metodología de Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, (2011)), pasado este tiempo se inocula la semilla de arroz con cada cepa de BAFE al vacío (a una concentración de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL). repitiendo el mismo procedimiento anterior
4	<i>B. glumae</i> al vacío (colocar semillas en inóculo a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL), 150 rpm y 28°C y realizar vacío por 10 min a 20psi de acuerdo a

<b>Bg (vacío) → BAFE</b>	metodología de Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, (2011), pasado este tiempo se sumergieron las semillas de arroz con una suspensión de cada cepa de BAFE (a una concentración de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL). por 30 min, 150 rpm y 28°C
<b>5 BAFE + Bg</b>	Coinóculo 50:50 (v/v) cepa BAFE + cepa <i>B. glumae</i> sin vacío: Se preparó un coinóculo de 5 mL compuesto por volúmenes iguales de cada BAFE (a una concentración de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL). y la cepa 3200 de <i>B. glumae</i> (a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Una vez preparado el inóculo se adicionaron las semillas de arroz F733 a la suspensión bacteriana y se dejó en incubación por 30 minutos, 150 rpm y 30°C.
<b>6 Bg (agar- sustrato) →BAFE (semilla)</b>	<i>B. glumae</i> se incorpora en el sustrato agar semisólido (Un inóculo ajustado a una concentración de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL es incorporado en agar semisólido (4g/L) y llevado a una concentración final de $1 \times 10^6$ UFC/mL y sirviendo 10mL en cada caja de Petri), paralelamente las semillas de arroz se colocan en un inóculo ajustado de cada BAFE a una concentración de $1,0 \times 10^7$ por 30 min, 150 rpm y 28°C. Transcurrido el tiempo las semillas inoculadas con la cepa de BAFE fueron colocadas sobre la superficie del agar semisólido previamente preparado con <i>B. glumae</i> incorporada.

Para la preparación de los inóculos bacterianos y coinóculos se usaron tubos Falcón de 50 mL en los cuales se colocó una cantidad de suspensión bacteriana ajustada de tal manera que se mantenga una proporción de 30 semillas por cada cinco mL de dicha suspensión.

En el caso que el sistema de inoculación involucrara vacío, las semillas fueron colocadas en una caja de Petri estéril con papel absorbente húmedo e incubadas por siete días en oscuridad a  $28^\circ\text{C} \pm 2$  y humedad relativa del 70% en un cuarto temperado. En el caso del sistema 6, las semillas con el BAFE se colocaron sobre el agar y posteriormente las cajas se incubaron igual a lo descrito previamente.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la evaluación de la severidad de la infección de acuerdo con la escala modificada por Flórez-Zapata y Uribe-Vélez (2011) y se calculó el grado de infección de acuerdo a la fórmula propuesta y de manera adicional se midió la longitud de vástago y raíz.

Los ensayos preliminares para seleccionar el mejor modelo de inoculación de BAFEs en semillas de arroz para el control biológico de *B. glumae* *In vivo* fueron llevados a cabo usando los aislamientos 4P03 y 15A09 escogidas porque se habían destacado por su actividad antagonista en los ensayos *In vitro*. Para estos ensayos se emplearon cinco semillas como unidad experimental con tres réplicas y se realizó una repetición en el tiempo. Como control negativo se usó semillas sin inocular a las cuales se les hacía o no

vacío de acuerdo con el sistema usado y para el control de enfermedad se usaron semillas únicamente inoculadas con *B. glumae* 3200-12 empleando vacío o no de acuerdo con el sistema de co-inoculación usado.

#### **4.6.1. Evaluación de la actividad de control biológico *In vivo* en semillas de arroz**

Los 26 aislamientos de BAFEs que mostraron actividad *in vitro* contra las tres cepas de *B. glumae* fueron probadas para determinar su actividad biocontroladora en semillas de arroz. Las semillas de arroz F733 desinfectadas superficialmente fueron coinoculadas con el sistema 6 (*B. glumae* en sustrato) para realizar un tamizaje de las cepas BAFEs en tres concentraciones:  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL. Cabe mencionar que se evaluaron los aislamientos en el sistema 6 porque de acuerdo a los resultados anteriores permitía más fácilmente seleccionar aquellas BAFEs que mostraban la reducción del grado de infección de *B. glumae*.

Las suspensiones bacterianas a las diferentes concentraciones fueron preparadas de acuerdo a las consideraciones descritas anteriormente (Preparación del inóculo bacteriano), sin embargo se debe tener en cuenta que la concentración  $10^8$  esporas/mL se realizó a partir de esporas bacterianas, mientras que las concentraciones de  $10^6$  y  $10^7$  se realizaron a partir de células. Se evaluaron los parámetros longitud de vástago, longitud de raíz y grado de infección como se describió previamente.

Los aislamientos de BAFEs que mostraron actividad en cada una de las diferentes concentraciones en el sistema 6 (*B. glumae* en sustrato) fueron repetidas en el tiempo para evaluar la reproducibilidad, en la (o las) concentración(es) en las cuales mostraron actividad biocontroladora. Así, los aislamientos de BAFEs que fueron reproducibles en el tiempo fueron evaluados posteriormente en el sistema 4 (*B. glumae* incorporado en semilla al vacío), con el objeto de evaluar si los aislamientos de BAFES además de controlar el efecto de *B. glumae* asumiendo su presencia en el sustrato también poseen la capacidad de controlar el patógeno cuando este se encuentra dentro de la semilla. Esta evaluación se evaluó empleando concentraciones de  $10^6$  y  $10^8$  UFC/mL como se describió previamente. Se evaluaron los parámetros longitud de vástago, longitud de raíz y grado de infección como se describió previamente.

Nuevamente, se realizó la repetición en el tiempo con todos los aislamientos evaluados en el sistema 4 (*B. glumae* incorporado en semilla al vacío) para evaluar la reproducibilidad, y aquellos que mostraron consistencia durante todos los ensayos fueron escogidos para el ensayo de invernadero.

Para los ensayos se usaron cinco semillas como unidad experimental con tres réplicas. Como control negativo se empleó semillas sin inocular a las cuales se les hacía o no vacío de acuerdo con el sistema usado y para el control de enfermedad se usaron semillas únicamente inoculadas con *B. glumae* 3200-12 al vacío o no de acuerdo con el sistema co-inoculación usado.

#### **4.6.2. Evaluación de la actividad biocontroladora *In vivo* de las BAFEs bajo condiciones de invernadero**

Semillas desinfectadas de arroz de la variedad F733 fueron inoculadas usando el sistema 4 (*B. glumae* en semilla) y posteriormente sembradas en bolsas que contenían 1Kg de la mezcla suelo-gravilla en una proporción 80:20 e incubado bajo condiciones controladas de invernadero (fotoperiodo 12 horas de luz: 12 horas oscuridad, temperatura de 28°C +/- 1 °C y humedad relativa de 75%). Se manejaron dos ensayos en paralelo que se hicieron exactamente igual con el fin de realizar las evaluaciones de las variables respuesta en dos tiempos diferentes. En total cinco aislamientos de BAFEs (15A09, 4P03, 16A08, 12A04 e IT1C8), un control negativo (semillas no inoculadas) y un control positivo de enfermedad (semillas inoculadas únicamente con la cepa de *B. glumae* 3200-12) fueron usados y en cada tratamiento se usó una unidad experimental de una planta y 30 réplicas.

A los cinco días de siembra se calculó el porcentaje de germinación para cada uno de los tratamientos. En tanto a los 10 días postinoculación, las plántulas de uno de los ensayos fueron muestreadas y se les realizó la medida de la longitud de vástago y raíz y en el caso de la presencia de síntomas se calculó el grado de infección de acuerdo a la escala descrita previamente.

Adicionalmente, las plántulas fueron desinfectadas superficialmente y se realizaron los conteos para determinar UFC de *B. glumae*/gramo de planta de acuerdo a la metodología descrita previamente. Posteriormente se aislaron colonias presuntivas para *B. glumae* y se confirmaron molecularmente como se había descrito previamente.



Plantas de 30 días fueron muestreadas y se les realizó el mismo procedimiento descrito arriba para las plantas de 10 días postinoculación.

## 4.8 Análisis Estadístico

Para los ensayos en semilla del modelo de infección de *B. glumae*, los modelos de aplicación de los BAFEs y la evaluación de la actividad biocontroladora de los BAFEs en semilla se usó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con triplicado. En el caso del ensayo de invernadero de uso un DCA con una planta con unidad experimental y 30 replicas en cada tratamiento.

Siempre y para todos los datos se determinó la normalidad a través del Test de Shapiro Wilk con un porcentaje de confianza del 95% y la homocedasticidad a través de la prueba de Levene con 95% de confianza. Cuando los datos cumplían con estos supuestos, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan con un grado de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ).

En caso de que los datos no cumplieran con estos supuestos se hizo transformación de acuerdo con la simetría y curtosis de la distribución de los datos y se verificó nuevamente la normalidad y homocedasticidad con los datos transformados y posteriormente se corrió la prueba de ANOVA y en caso de haber diferencias estadísticas entre los tratamientos se determinó cuáles a través de un Test de Duncan con el 95% de confianza. Las letras muestran las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Después de probar todas las posibilidades de transformación y establecer la persistencia de datos no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (KW) por pares a un valor de significancia  $P = 0,05$ , para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas.

Se usó el software SAS 9.4 licenciado para la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, en el Departamento de Ciencias Agrarias.

## **4.9 Caracterización molecular de BAFEs con actividad biocontroladora contra *B. glumae***

Para realizar la determinación taxonómica de los aislamientos, se llevo a cabo la caracterización de la secuencia de DNA del gen 16s rDNA de las BAFEs seleccionadas. Para ello, los aislamientos de rizosfera de arroz con actividad biocontroladora fueron usadas para la extracción de ADN mediante el método de lisis química usando buffer de lisis alcalina (NaOH 0,05M y SDS 0,25%) de acuerdo al protocolo de Sahoo et al., (2014) partiendo de los aislamientos crecidos por 24h en medio LB sólido. Con este ADN se realizó la amplificación del gen 16s rRNA por PCR usando los primers universales 27F y 1492R de acuerdo al protocolo de Martin-Lauren et al., (2001).

Los productos de amplificación con la PCR fueron purificados y enviados para secuenciación al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Con las secuencias obtenidas se realizó su depuración usando el software BioEdit (Sequence Alignment Editor) versión 7.2.5 y se realizó el análisis de la secuencia limpia en el BLAST de ácidos nucleicos (Basic Local Alignment Search Tool) usando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Usando el software BioEdit versión 7.2.5 se realizó el alineamiento de las secuencias usando la herramienta Clustal W multiple alignment y se realizó la limpieza correspondiente de las secuencias con el fin de elaborar un árbol filogenético mediante el método Neighbor-joining usando el mismo software.

Para los aislamientos con actividad correspondientes a rizosfera de iraca y maíz, las secuencias del 16s fueron suministradas por el Dr. Camilo Ramírez del Grupo de Biocontrol y Microbiología Ambiental de la Universidad de Antioquia, Colombia. Estas secuencias fueron analizadas junto a las de los aislamientos de arroz.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Evaluación de la actividad biocontroladora de BAFEs

#### *In vitro*

##### 5.1.1. Ensayos de antagonismo dual *In vitro*

Setenta y cuatro aislamientos de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) aisladas de suelos rizosféricos de diferente origen vegetal que hacen parte del cepario del Grupo de Microbiología Agrícola fueron evaluados en el presente trabajo (tabla 2). El criterio de selección de las BAFEs consistió en los resultados reportados en trabajos previos del grupo de investigación en relación a la capacidad de control biológico de diferentes microorganismos fitopatógenos. En este contexto se seleccionaron 21 aislamientos provenientes de la rizosfera de arroz previamente evaluados que mostraron actividad *In vitro* contra *Burkholderia glumae* (Sánchez, 2012). Así mismo, se seleccionaron 52 aislamientos: 27 aislamientos de rizosfera de Maíz y 25 aislamientos de rizosfera de Iraca los cuales mostraban actividad contra dos o tres hongos fitopatógenos de tres evaluados (*Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium sp.*) y unos aislamientos adicionales seleccionados al azar que no mostraron actividad contra ninguno de los hongos de acuerdo con el trabajo de Camelo (2014), con el fin de que fueran contrastantes de acuerdo a la técnica de enfrentamiento dual. Adicionalmente, se usó una cepa de rizosfera de papa criolla dado que se demostró actividad antagónica importante contra seis tipos diferentes de hongos (Área de inhibición mayor a 9,51 cm<sup>2</sup>), y contra la bacteria *B. glumae* *In vitro* (Blanco, 2012). Además se usó una cepa de referencia denominada AP303 previamente descrita en la metodología, la cual es conocida por poseer capacidades biocontroladoras contra diferentes microorganismos fitopatógenos pero no ha sido evaluada contra *B. glumae*.

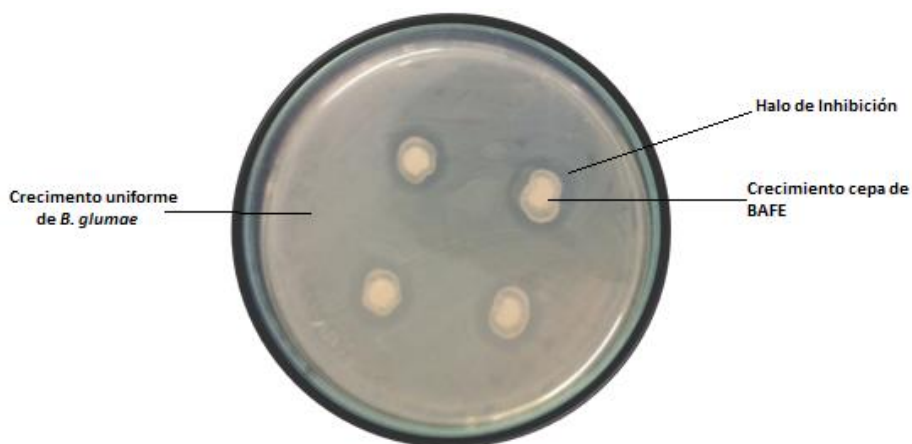
**Tabla 2.** Aislamientos seleccionadas para ensayo en antagonismo dual contra *B. glumae*

Cepa	Rizosfera de origen	Cepa	Rizosfera de origen	Cepa	Rizosfera de origen
1A08	Arroz	IGC3	Iraca	MA1C8	Maíz
9A05	Arroz	IM4C3	Iraca	MG1C1	Maíz
1A10	Arroz	IM2C8	Iraca	MMGC9	Maíz
15A03	Arroz	IT1C15	Iraca	MT1C6	Maíz
9A06	Arroz	IA3C11	Iraca	MT2C3	Maíz
13A07	Arroz	IM4C5	Iraca	MA3C7	Maíz
16A09	Arroz	IM3C5	Iraca	MM4C1	Maíz
2A05	Arroz	IM2C10	Iraca	MM4C8	Maíz
11A10	Arroz	IT2C3	Iraca	MT1C3	Maíz
2A03	Arroz	IT2C9	Iraca	MA3C8	Maíz
10A04	Arroz	IT2C8	Iraca	MA8C5	Maíz
5A06	Arroz	IM4C2	Iraca	MA1C9	Maíz
8A05	Arroz	IM4C6	Iraca	MA1C16	Maíz
12A04	Arroz	IA1C10	Iraca	MA3C3	Maíz
7A06	Arroz	IGC8	Iraca	MGC2	Maíz
16A08	Arroz	IGC4	Iraca	MM4C6	Maíz
13A06	Arroz	IM3C3	Iraca	MT1C1	Maíz
4A07	Arroz	IGC2	Iraca	MT2C4	Maíz
15A09	Arroz	IA1C8	Iraca	MT2C1	Maíz
15A04	Arroz	IA3C6	Iraca	MGC11	Maíz
13A08	Arroz	IM2C2	Iraca	MM2C10	Maíz
IM2C5	Iraca	MA3C9	Maíz	MGC9	Maíz
IM2C6	Iraca	MA1C2	Maíz	MM4C4	Maíz
IT1C8	Iraca	MA3C2	Maíz	4P03	Papa
IGC1	Iraca	MM4C3	Maíz	AP303	-----

De los 74 aislamientos de BAFEs evaluados en el ensayo de antagonismo por la técnica de enfrentamiento dual, 34 aislamientos mostraron actividad mediante la formación de un halo de inhibición (Figura 15) contra alguna de las cepas de *B. glumae* usadas. De estos, 26 mostraron actividad contra las tres cepas de *B. glumae*, tres contra dos cepas y cinco contra sólo una de las cepas de *B. glumae*, mientras los restantes 40 aislamientos no mostraron presencia de halo de inhibición. Se debe mencionar que la cepa de referencia AP303 mostró actividad contra las tres cepas de *B. glumae*, por lo que se puede decir que en realidad de 75 aislamientos evaluados, 35 aislamientos mostraron actividad contra al menos una cepa de *B. glumae*, así el 46,7% de los aislamientos evaluados fueron positivos

para antagonismo dual *In vitro* contra *B. glumae* (figura 6). De acuerdo con los resultados obtenidos y la intención de este tamizaje, era importante escoger aislamientos de BAFEs que tuvieran actividad contra varias cepas de *B. glumae* de tal manera que mostraran amplio espectro a la hora de ser usados contra la enfermedad causada por el fitopatógeno dado que en el país se han encontrado cepas de *B. glumae* en todas las zonas arroceras, las cuales muestran gran variabilidad genética existiendo más de un genotipo por zona geográfica (Beltrán-Molina et al., (2014)). De acuerdo a lo anterior, los aislamientos de BAFEs seleccionados para la siguiente fase de evaluación fueron los 26 que mostraron actividad de antagonismo *In vitro* contra las tres cepas de *B. glumae*.

En concordancia con la tabla 3 donde se presentan los halos de inhibición (cm) de cada uno de los aislamientos BAFEs positivos contra cada una de las cepas de *B. glumae*, no hay un patrón del halo de inhibición para las tres cepas de *B. glumae* en el sentido de que aquella BAFE que mostró el mayor halo de inhibición contra una, no mostraba el mismo halo de inhibición contra las otras dos cepas, por tanto no se estableció un criterio de selección uniforme que garantizará una selección más restrictiva de los aislamientos de BAFEs, lo que dio lugar a la selección automática de los 26 aislamientos previamente mencionados. Dependiendo de la cepa de *B. glumae* evaluada se obtuvieron halos de inhibición entre 0,04 (cm) y 1,42(cm) por la actividad de las BAFEs. En la tabla 3 se muestran los halos de inhibición obtenidos ordenados de mayor a menor en relación a los resultados contra la cepa *B. glumae* 3200-12, la cual fue usada posteriormente para las evaluaciones *In vivo*.



**Figura 6.** Caja de Petri mostrando la producción de halos de inhibición de la cepa de BAFE MM4C4 contra la cepa de *B. glumae* 3853 en medio LB.

**Tabla 3.** Resultados del ensayo de antagonismo dual *In vitro* mostrando los halos de inhibición de cada cepa de BAFE contra tres aislamientos de *B. glumae*

CEPA BAFE	<i>Cepa Burkholderia glumae</i>		
	3200-12	3855	3853
	Halo de Inhibición (Cm)		
IT1C15	0,90 ± 0,00	0,82 ± 0,17	0,72 ± 0,15
IAIC10	0,80 ± 0,10	0,88 ± 0,14	0,84 ± 0,16
IM2C8	0,80 ± 0,16	0,72 ± 0,10	0,95 ± 0,15
IM2C2	0,75 ± 0,26	0,12 ± 0,00	0,28 ± 0,00
IGC1	0,72 ± 0,19	0,8 ± 0,23	1,42 ± 0,41
MAIC2	0,68 ± 0,17	0,35 ± 0,06	0,52 ± 0,19
IGC3	0,60 ± 0,08	1,00 ± 0,20	1,05 ± 0,06
IM2C6	0,60 ± 0,00	0,65 ± 0,06	0,52 ± 0,05
15A09	0,60 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,61 ± 0,08
MA1C8	0,56 ± 0,10	0,34 ± 0,03	0,57 ± 0,14
MM4C4	0,55 ± 0,06	0,52 ± 0,13	0,75 ± 0,33
MA3C9	0,55 ± 0,32	0,5 ± 0,08	0,52 ± 0,17
16A08	0,54 ± 0,13	0,63 ± 0,04	0,74 ± 0,08
IM4C3	0,50 ± 0,16	0,7 ± 0,31	0,70 ± 0,08
MG1C1	0,46 ± 0,07	0,55 ± 0,10	0,22 ± 0,03
IM4C6	0,44 ± 0,05	0,63 ± 0,06	0,82 ± 0,21
4P03	0,39 ± 0,03	0,53 ± 0,11	0,81 ± 0,10
IGC4	0,37 ± 0,12	0,23 ± 0,07	0,20 ± 0,17
ITIC8	0,35 ± 0,10	1,18 ± 0,22	0,60 ± 0,23
12A04	0,32 ± 0,16	0,72 ± 0,05	0,33 ± 0,05

IM2C5	0,31 ± 0,03	0,60 ± 0,18	0,88 ± 0,18
MA3C2	0,30 ± 0,10	0,22 ± 0,06	0,55 ± 0,14
IA3C11	0,25 ± 0,14	0,5 ± 0,47	0,32 ± 0,14
AP303	0,21 ± 0,06	0,37 ± 0,09	0,32 ± 0,12
IM3C5	0,12 ± 0,07	0,53 ± 0,12	0,5 ± 0,15
IM2C10	0,12 ± 0,07	0,3 ± 0,10	0,55 ± 0,06
7A06	0,04 ± 0,03	0,86 ± 0,12	0,96 ± 0,14
15A04	0,42 ± 0,11	0,50 ± 0,05	0,00 ± 0,00
MM4C3	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,00 ± 0,00
IM4C2	0,12 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,06
IT2C9	0,82 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
13A06	0,46 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
8A05	0,20 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
IM4C5	0,2 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
IT2C8	0,15 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Adicionalmente, se pudo destacar que todos los 34 aislamientos que mostraron actividad contra al menos una cepa de *B. glumae*, tenían actividad contra la cepa 3200-12 y que los halos de inhibición iban desde 0,04 cm hasta 0,9 cm. En este sentido, el aislado con mayor halo de inhibición contra *B. glumae* 3200-12 fue IT1C5 (0,9 cm), en tanto contra la cepa 3853 fue la cepa IGC1 (1,42 cm) y contra 3855 fue IT1C8 (1,18 cm), destacando que estos aislamientos son provenientes de la rizosfera de Iraca. Así mismo, se encontró que de los 34 aislamientos positivos *In vitro*, 19 aislamientos de BAFEs eran de origen rizosfera de Iraca, 7 de rizosfera maíz, 7 de rizosfera de arroz y 1 de rizosfera papa, es decir que de los 25 aislamientos evaluados de iraca, el 76% de los mismos mostró actividad antagonista contra al menos una cepa de *B. glumae*, en tanto apenas el 25,9% de los aislamientos de maíz usadas fueron positivos, el 33,3% para los aislamientos de arroz y el aislado 4P03 de rizosfera papa pudo ser confirmado en actividad de acuerdo a los resultados de Blanco, (2012).

De estos resultados, se puede observar el gran potencial de los aislamientos de iraca como antagonistas en evaluación *In vitro*, que concuerda con lo observado por Camelo (2014), donde la mayoría de aislamientos que mostraron antagonismo contra dos o tres de los hongos fitopatógenos evaluados fueron aislamientos de origen rizosfera de iraca. Así mismo, de 35 aislamientos entre rizosfera de iraca y maíz que habían sido pre seleccionados para realizar el presente trabajo dado que mostraban actividad antagónica fuerte para dos o tres hongos incluido *R. solani* del trabajo de Camelo (2014), 24 aislamientos resultan tener actividad contra alguna de las aislamientos de *B. glumae*, en tanto que 11 no mostraron actividad y de aquellos aislamientos seleccionadas al azar y que para el mismo trabajo no se encontró actividad contra los hongos evaluados o en algunos casos mostraron actividad leve contra uno o dos de los hongos, sólo dos de estos aislamientos mostraron actividad contra las tres aislamientos de *B. glumae*. Estos resultados podrían indicar que a pesar que estos aislamientos no tienen actividad fungicida o fungioestatica sí podrían tener algún potencial para el control bacterias y de manera contraria algunos aislamientos de BAFEs con actividad antifugica no muestran actividad contra bacterias, esto podría ser debido a que las BAFEs de manera general poseen diferentes mecanismos de control biológico y sustancias antimicrobianas como lipopeptidos, los cuales poseen cierta especificidad contra los diferentes grupos de microorganismos, siendo la fengicinas por ejemplo mas específicas contra hongos (Blanco, 2012; Ongena y Jaques, 2008). Es claro que la actividad *In vitro* de aislamientos de BAFEs se debe a la capacidad de producir diferentes metabolitos dentro de los que se destacan los lipopeptidos cíclicos los cuales tienen alto potencial como antibióticos y antifúngicos que por lo general son de amplio espectro (Ongena y Jacques, 2007), además de una serie de enzimas líticas (Bouizgarne, 2013; Fravel et al., 1993).

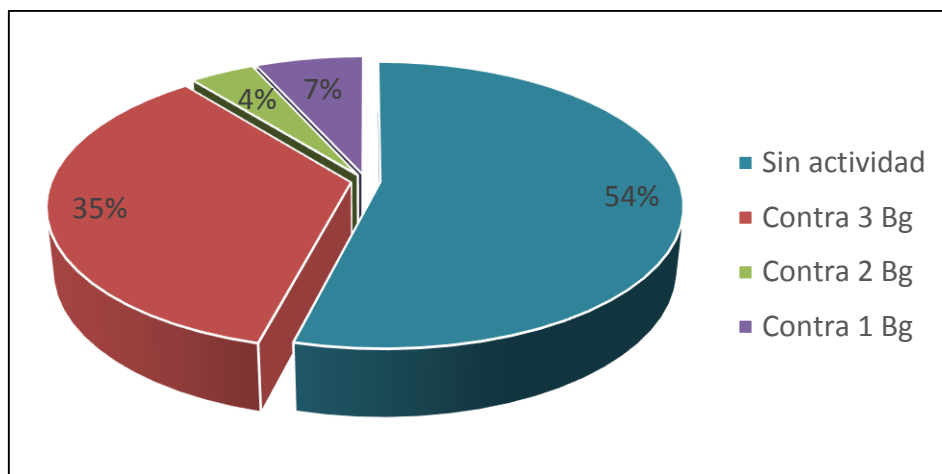
Respecto a los aislamientos de arroz, se pudo confirmar la actividad de algunos como 15A09, 16A08, 12A04, 7A06 en relación al trabajo de Sánchez, (2012), respecto a su capacidad antagonista *In vitro* contra las tres cepas de *B. glumae*, indicando la reproducibilidad y la consistencia de las mismas en el tiempo.

Como se mencionó anteriormente, se presentó un efecto del origen de los aislamientos sobre la actividad contra *B. glumae* insistiendo en que la mayoría de aislamientos de rizosfera de Iraca evaluadas mostraron más actividad que aislamientos aislados de otras rizosferas. Efecto de la especie de planta sobre el fenotipo antagonista de rizobacterias había sido encontrado por Berg et al., (2002), donde de un total de 5854 aislados que



mostraban actividad contra *Verticillium In vitro* el 9,5% era de rizosfera de fresa, el 6,3% de rizosfera de nabo, el 3,7% de papa y 3,3% de aislados del suelo.

De otra parte, es de mencionar que pocos son los trabajos de control biológico contra bacterias fitopatógenas y en especial contra *B. glumae*. Dentro de esta última categoría se destaca el trabajo de Beric et al., (2012) quienes evaluaron 203 cepas de BAFES aisladas de heno y suelos y encontraron 127 con actividad contra al menos una de cinco bacterias fitopatógenas y dentro de estas 16 cepas con actividad biocontroladora contra una cepa de *B. glumae*. En comparación al presente trabajo, en Beric et al., (2012) solamente el 7,90% de los aislamientos evaluados tuvieron actividad contra *B. glumae* en tanto de los aislamientos evaluados aquí el 46,7% muestran actividad mostrando su gran potencial contra este agente fitopatógeno (figura 7).



**Figura 7.** Cantidad de aislamientos de BAFEs con actividad contra las tres aislamientos de *B. glumae*

Por otra parte Chung et al., (2015) reportaron el filtrado de la cepa de *Bacillus* YC7007 a 60h de cultivo con capacidad de inhibir una cepa de *B. glumae*, mostrando una zona de inhibición de aproximadamente 0,02 cm, valor que está dentro del rango del halo de inhibición que mostraron los BAFEs en el presente trabajo. Cabe destacar que respecto a ese trabajo sólo el 6% de los aislados endófitos de bacterias formadoras de endospora, mostraron actividad antagonista lo que difiere nuevamente con el gran número de aislamientos positivos en este trabajo (figura 7).

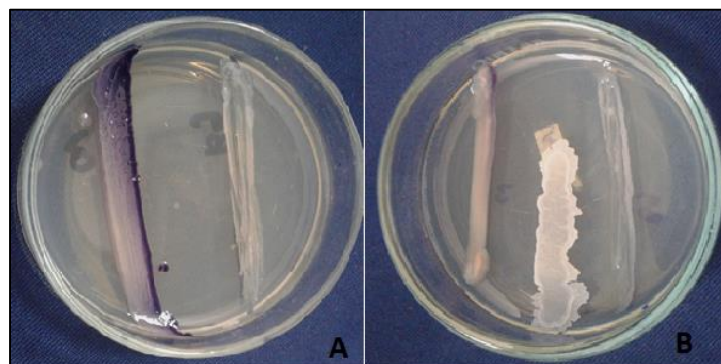
Mora et al., (2015) encontraron la relación entre la actividad antibacteriana contra algunas bacterias patógenas de plantas y la producción de lipopeptidos cíclicos por parte de 64 aislamientos de *Bacillus* spp, aislados desde diferentes ambientes vegetales. Indicando

que la mayoría de aislados con actividad antibacteriana producen isoformas de surfactina, iturinas y fengicinas de manera simultánea, en tanto que los aislamientos que muestran actividad antibacteriana muy baja o nula se relacionan con la no producción o la producción de un sólo tipo de lipopeptido cíclico. Así, podría ser posible que un mecanismo de acción dentro de los aislamientos positivos para los ensayos de antagonismo dual *In vitro* es la producción de lipopeptidos cíclicos; sin embargo, no se descartan otros mecanismos de acción por lo que sería importante elucidar estos mecanismos en estudios futuros.

### 5.1.2. Evaluación de mecanismo de *quorum quenching* cualitativo

#### *In vitro*

Con el objeto de conocer si los aislamientos de BAFES que fueron seleccionados por su actividad biocontroladora contra *B. glumae*, producían la enzima lactonasa que permitiera eventualmente llevar a un proceso de *quorum quenching* (interrupción de la comunicación celular entre células de *B. glumae*), y atendiendo el hecho de que el *quorum sensing* es el mecanismo principal que controla los factores de virulencia en *B. glumae*. Se procedió a evaluar la actividad de *quorum quenching* de los 26 aislados seleccionados de manera cualitativa. Para ello se usó la cepa biosensora *Chromobacterium violaceum* CV026 como se describe en el capítulo de la metodología. Así, para reportar los resultados de los aislamientos que presentaban la capacidad de degradar las moléculas de acil homoserin lactonas, y de esta forma interrumpir la formación de coloración violácea alrededor de la cepa biomarcadora (*quorum quenching*) se usó un signo “+” indicando la presencia del mecanismo *quorum quenching* y un signo “-” para representar su ausencia (figura 8).



**Figura 8.** Ensayo presencia o ausencia de AHLs lactonasas en aislamientos de BAFES. (A) Control producción de AHLs por *B.glumae*, (B) ensayo positivo para AHLs lactonasas por la cepa de BAFE

**Tabla 4.** Resultados correspondiente a presencia o ausencia de *quorum quenching* en los aislamientos de BAFEs

Tratamiento	Bg 3200	Bg 3853	Bg 3855	Tratamiento	Bg 3200	Bg 3853	Bg 3855
IGC1	+	+	+	AP303	-	-	+
IM4C3	+	+	+	IM3C5	-	-	+
IM2C5	+	+	+	16A08	-	-	+
IM2C2	+	+	+	IM2C6	-	ND	+
12A04	+	+	+	4P03	-	-	+
MA3C2	-	+	+	MG1C1	-	-	+
ITIC15	-	+	+	15A09	-	ND	+
MM4C4	-	+	+	MA1C2	-	+	-
7A06	-	+	+	IM2C10	-	+	ND
IA1C10	-	+	+	MA3C9	+	-	-
IGC3	+	-	+	IM4C6	-	-	ND
IM2C8	+	-	+	IA3C11	ND	ND	-
IGC4	+	-	+	IT1C8	-	-	-
MA1C8	+	-	+	AP303	-	-	+

\*Los resultados corresponden al consenso de tres replicas y una repetición en el tiempo, ND quiere decir no determinados por que la cepa de *B. glumae* no mostró crecimiento o simplemente por contaminación en todos los ensayos

Kim et al., (2004) reportaron que especies de *B. glumae* producen dos tipos de acil homoserin lactonas, N-hexanoil homoserin lactona (C6-AHLs) y N-octanoil homoserin lactona (C8-AHLs). Los aislamientos de *B. glumae* en este ensayo producen acil homoserin lactonas como lo reporta Sánchez (2012) y se confirmó con los controles negativos de este ensayo. Así, en base a la tabla 6 se puede decir que únicamente cinco aislamientos de BAFEs (12A04, IM2C2, IM2C5, IM4C3 e IGC1) mostraron actividad de *quorum quenching* contra las tres cepas de *B. glumae* usadas, otros aislamientos muestran actividad contra una o dos cepas y que la BAFE IT1C8 no muestra actividad contra ninguna cepa.

No es novedad que cepas de *Bacillus* sp presenten actividad de *quorum quenching* y más específicamente por producción de enzimas que degraden AHLs. Ya previamente Dong et al., (2002) había reportado más de 20 aislamientos pertenecientes al género *Bacillus* capaces de inactivar AHLs debido a la producción de enzimas AHL lactonasas. Así mismo, Pedroza (2010) en su trabajo de tesis caracterizó una AHL-lactonasa recombinante desde una cepa de *B. thuringensis* cuyo mecanismo de interrupción de AHLs fue a través de su hidrólisis en la posición 1 del anillo de lactona, mostrando buen comportamiento bajo todas las condiciones y sustratos evaluados por lo que se proponía como una molécula para ser utilizada en bloqueo de quorum sensing mediado por AHLs. En la literatura existen varios aislamientos de *Bacillus* sp, con producción de AHL-lactonasas mediada por el gen *aiiA* (Dong et al., 2000; Dong et al., 2002), cuyas enzimas tienen un amplio rango de sustratos (AHLs C4, C6, C10-HSL, 3OC4, 3OC6, 3OC8, 3OC12-HLS, 3-OH-C4-HLS). Adicionalmente, cabe destacar que existen diferentes mecanismos de *quorum quenching*, dentro de los que se incluye también la actividad oxidoreductasa como la que presenta una cepa de *B. megaterium* sobre diversos sustratos (Chowdhary et al., 2007).

*Quorum quenching* podría ser un buen mecanismo de acción contra bacterias fitopatógenas cuyos factores de virulencia se expresan en un sistema regulado por QS mediado por AHLs como es el caso de *B. glumae*. Park et al., (2010) realizaron un estudio usando el gen *aiiA* de *Bacillus* sp para expresarlo en una cepa de *B. glumae* bajo el control de un promotor constitutivo, indicando en sus resultados que los transformantes de *B. glumae* disminuyeron notablemente los niveles de AHLs y así los síntomas en plántulas de arroz.

Se sugiere que para los aislamientos encontrados con estos atributos se confirmen los hallazgos de este estudio mediante cromatografía de capa fina. Esto con el fin de evaluar si hay una disminución cuantitativa de las AHLs de *B. glumae* ocasionada por parte de los aislamientos de BAFEs que cualitativamente muestran este atributo como se muestra en el ensayo. Además, de esto es necesario conocer específicamente que tipo de AHLs están siendo degradadas por las BAFEs en especial por el comportamiento que muestran los aislamientos positivos para *quorum quenching* sobre las tres diferentes aislamientos de *B. glumae* evaluadas.

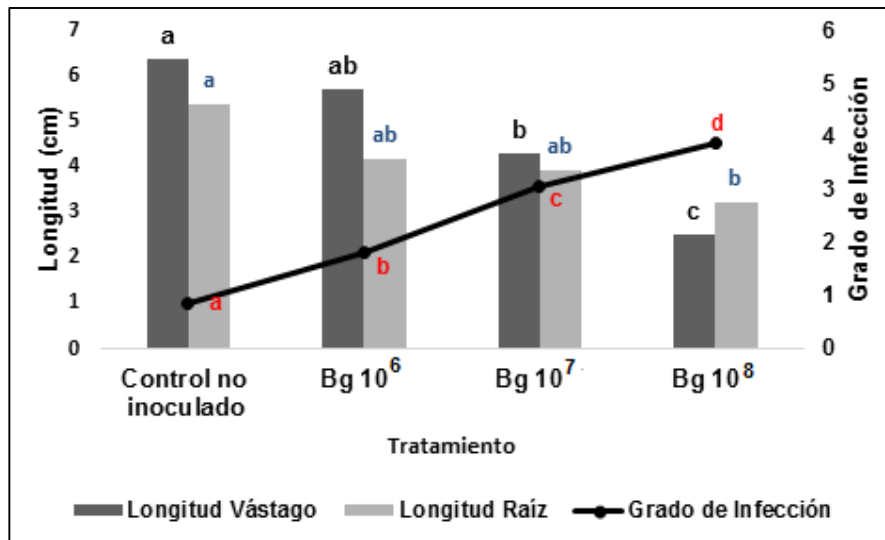
## **5.2. Desarrollar un modelo de infección de *B. glumae* en plantas bajo condiciones de invernadero**

### **5.2.1. Estandarización un modelo de infección de *B. glumae* en semillas de arroz**

Para el estudio del control biológico de un microorganismo fitopatógeno, es necesario conocer el patosistema, en este caso es muy poca la información con la que se cuenta en relación a la manera en que el inóculo de *B. glumae* llega a la planta y causa los síntomas de la enfermedad, esto es particularmente importante por el hecho de tratarse de una enfermedad silenciosa durante la mayoría del ciclo de cultivo, dado que los síntomas visibles sólo se presentan a nivel de la plántula, en la etapa de floración y de llenado de grano. Varios autores apuntan a que *B. glumae* es un patógeno originado a partir de semillas infectadas, lo que indica que el mayor reservorio de la enfermedad es la semilla (Chung et al., 2015; Takeuchi et al., 1997, Tsushima et al., 1996; Hikichi et al., 1993; Ham et al., 2011). Igualmente, se espera que *B. glumae* sea un habitante del microbioma normal del suelo (Compant et al., 2008). De acuerdo a lo anterior en este trabajo se diseñaron dos modelos de infección en los cuales se logró abarcar los dos reservorios naturales mediante la incorporación de *B. glumae* en la semilla o en el sustrato. Para el caso de *B. glumae* en semilla, se evaluó dos maneras de inoculación, una asumiendo que la bacteria se encuentra dentro de la semilla haciendo una infección al vacío (de acuerdo a Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, 2011) y una segunda forma de infección asumiendo que *B. glumae* puede encontrarse sobre la superficie de la semilla sin forzar su entrada. De esta manera, se presentan los resultados a continuación (figura 9 y 10).

Para ambos casos de inoculación de *B. glumae* en la semilla (con vacío o sin vacío), se observó un efecto de dosis respuesta con respecto a las variables longitud de vástago y grado de infección, de manera directamente proporcional para el grado de infección e inversamente proporcional para el vástago respecto a las concentraciones de *B. glumae*. En la raíz este efecto no es claro y se mostró sólo una fuerte reducción en el modelo de vacío para la concentración de  $10^8$  UFC/mL de *B. glumae*, mientras en el caso de inoculación sin vacío no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos por lo que se considero que esta variable agronómica no era informativa. En tanto, al comparar con un control no inoculado se evidenció en ambos modelos que para las dosis de *B. glumae* de

$10^6$  y  $10^7$  UFC/mL de *B. glumae* hay una disminución notable del vástago con diferencia estadística y se observa adicionalmente la ausencia de síntomas de la enfermedad en el tratamiento control (sin inocular), indicando, que el inóculo bacteriano colocado artificialmente en las semillas es el causante de los síntomas en las plántulas de 7 días de crecimiento.

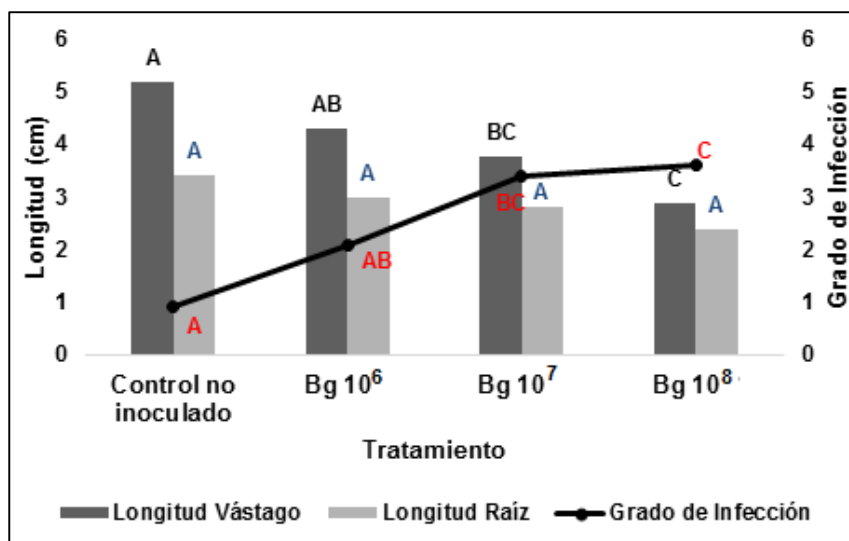


**Figura 9.** Efecto de la concentración del inóculo de *B. glumae* en semillas de arroz F733 inoculadas al vacío.

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza.

De acuerdo con los resultados se pudo concluir que estos dos modelos de infección fueron efectivos para reproducir los síntomas en plántulas de arroz ya que son consistentes tanto en las réplicas experimentales como en las repeticiones en el tiempo, permitiendo así usar dichos modelos de infección para las evaluaciones de la actividad biocontroladora de los aislamientos de BAFES. Cabe destacar que el grado de infección fue mayor en el modelo de infección al vacío (3,8). Igualmente merece mencionar que usar un inóculo de  $10^8$  UFC/mL de *B. glumae* para la infección en semillas (con vacío o sin vacío), fue la concentración más adecuada para generar los síntomas de enfermedad. En primer lugar debido a que la longitud de vástago resultó ser un parámetro indicador de enfermedad mostrando una fuerte disminución en relación al control no inoculado como se detalló anteriormente y además el grado de infección fue mayor con diferencias significativas en relación al control sin inocular. Merece mencionar además que los resultados del modelo de infección al vacío son comparables a los reportados por Flórez-Zapata y Uribe-Vélez

(2011), en la medida que se obtuvo un efecto dosis-respuesta en relación al grado de infección, sin embargo en el presente estudio se debieron evaluar concentraciones más altas que las usadas por dichos investigadores para obtener los síntomas de enfermedad en las plántulas, se desconoce la causa de estos resultados pero es posible que la cepa haya perdido virulencia en el tiempo, como sugiere Kato et al., (2012), quienes reportan la emergencia de colonias mutantes de subcultivos de *B. glumae* las cuales pueden variar respecto al fenotipo y reducir su virulencia sobre plántulas y espiguillas. De cualquier forma es importante mencionar que durante la elaboración de la presente investigación se hizo una constante verificación de la cepa de trabajo en cuanto a aspectos morfológicos como el crecimiento y características de colonia en King B además de la morfología microscópica y funcional en términos de la reproducción de los síntomas a través del tiempo.



**Figura 10.** Efecto de la concentración del inóculo de *B. glumae* en semillas de arroz F733 inoculadas sin vacío

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, mediante un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza.

Debe aclararse que para la evaluación de la severidad para los diferentes tratamientos de estos ensayos iniciales y de los mostrados posteriormente en la evaluación de las aislamientos biocontroladoras las observaciones fueron realizadas el mismo día por la misma persona, a fin de evitar sesgos por la asignación del nivel de severidad.

Trabajos de inoculación de *B. glumae* en semillas habían sido presentados anteriormente como el realizado por Desvescovi et al., (2007) donde semillas de arroz fueron germinadas

en una suspensión bacteriana de  $5 \times 10^6$  UFC/mL de *B. glumae* durante dos días y posteriormente las semillas pregerminadas fueron transferidas a una caja Petri con cámara húmeda (HR 100%) a 30°C durante 7 días empleando un fotoperiodo de 8:16 (luz: oscuridad). En este ensayo (Devescovi et al., 2007) se encontró que un poco más del 70% de las semillas evaluadas se encontraban en una clase de infección alrededor de tres (3) y el resto de las semillas en clase de infección tipo dos (2), indicando que a pesar de que las semillas permanezcan en la suspensión de *B. glumae*, la infección no fue tan efectiva. En contraste, en el estudio actual la inoculación sin usar vacío causó un grado de infección de 3.6, lo cual probablemente se deba a que una concentración en el orden de magnitud de  $10^6$  UFC/mL de *B. glumae*, no es suficiente para causar los síntomas tal y como se mostró en el presente trabajo con la cepa 3200-12. Adicionalmente, se presentan otros trabajos como el de de Flórez-Zapata y Uribe Vélez (2011) donde se estandariza el sistema de infección que se usa aquí al vacío con el fin de identificar variedades colombianas susceptibles y tolerantes a la infección de *B. glumae*, para futuras aplicaciones en la interacción planta-microorganismo e incluso para la evaluación de alternativas de control de la enfermedad, mencionándose que en el presente trabajo se revalida este sistema de infección complementándolo con la identificación de la longitud de vástago como variable importante dentro de los síntomas de la enfermedad.

En el presente trabajo se demostró que al inocular la semilla con *B. glumae* se pueden generar los síntomas de la enfermedad, encontrando este como un modelo de infección artificial que permitirá posteriormente evaluar el control biológico de la bacteria en la semilla. Para explicar la importancia de la aplicación de un control de la enfermedad en semilla debe especificarse que en varios estudios se ha detectado a *B. glumae* en semillas sintomáticas y asintomáticas como el caso de Zhu et al., (2008) donde reportaron el aislamiento de 6 cepas de *B. glumae* a partir de muestras de semillas de arroz, estableciendo que la bacteria puede encontrarse en la semilla sin causar síntomas. De manera similar, Fory et al., (2014) encontraron que semillas colectadas en campos de arroz colombianos el 54% de las muestras fueron sintomáticas y el 21,4% del total de las muestras asintomáticas fueron positivas por PCR para *B. glumae*.

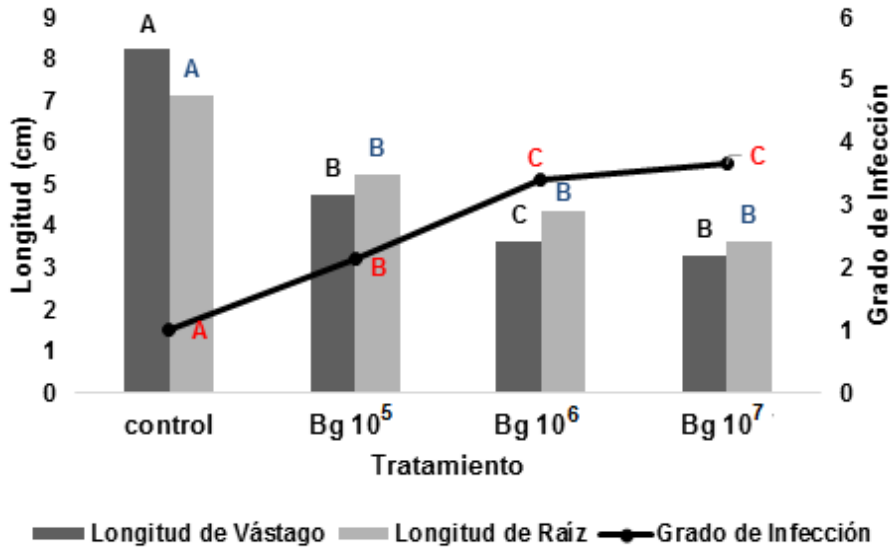
De otra parte, para ampliar las posibilidades de infección de las semillas y así mismo de la aplicación del control biológico de *B. glumae*, se decidió partir del supuesto que es posible que *B. glumae* se encuentre en el sustrato y pueda entrar cuando la semilla es sembrada.



Para ello se estandarizó un modelo de infección en el cual la bacteria se incorporó en agar semisólido como se indicó en la metodología.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó un efecto de dosis respuesta respecto a las variables respuesta longitud de vástago, longitud de raíz y grado de infección, en el cual las longitudes de la plántula se comportaron de manera inversamente proporcional a la concentración, en tanto el grado de infección mostró una tendencia directamente proporcional (figura 11). Debe mencionarse que en este caso se usaron concentraciones de  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  UFC de *B. glumae*/mL dado que en una concentración de  $10^8$  UFC/mL no se lograron desarrollar las plántulas (datos no mostrados). En todas las concentraciones de *B. glumae* se evidenció una disminución de la longitud de vástago, las cuales presentan una diferencia significativa en relación al control no inoculado, siendo mayor en las concentraciones  $10^6$  y  $10^7$  UFC de *B. glumae* /mL, aunque no hay diferencias estadísticas entre las mismas. En relación a la longitud de raíz, todos los tratamientos inoculados con la bacteria muestran disminución en la longitud siendo diferentes estadísticamente al control no inoculado pero no mostrando diferencia entre las diferentes concentraciones (figura 9). En tanto, para la variable grado de infección se mostró diferencia estadística entre los tratamientos inoculados respecto al control y no hay diferencias estadísticas para las concentraciones  $10^7$  y  $10^6$  UFC/mL lo que indica que se puede usar cualquiera de estas dos para generar los síntomas y por lo tanto para posteriores evaluaciones de control biológico. En este caso específico para las evaluaciones realizadas en control biológico usando este tipo de inoculación de *B. glumae* se decidió usar una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *B. glumae*.

Al igual que en los demás sistemas de infección, el control no inoculado no mostró los síntomas, indicando nuevamente, que estos son causados por el microorganismo que se está inoculando artificialmente y los resultados fueron consistentes para replicas y repeticiones en el tiempo, pudiendo ser usado este modelo para evaluaciones posteriores igual que los otros dos modelos obtenidos previamente.



**Figura 11.** Efecto de la concentración de *B. glumae* incorporada en sustrato sobre el crecimiento de plántulas de arroz F733

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza.

Se presume en el presente estudio que el desarrollo de los síntomas a partir del sistema de infección del modelo *B. glumae* en sustrato, se presenta debido a que la bacteria pudo colonizar la planta partiendo de su ubicación en el sustrato de soporte, lo cual es un hecho posible por la presencia de la bacteria en el suelo o en residuos de cosechas anteriores como lo reportan Uematsu et al., (1976) y Tsushima et al., (1996) y Yuan, (2004). Se debe tener en cuenta que la estrategia de inoculación en sustrato puede ser un escenario real dado que las especies del género de *Burkholderia* pueden ocupar diferentes nichos y que de manera general pueden encontrarse en el suelo y en otros ambientes debido a su versatilidad (Coenye y Vandamme, 2003; Compant et al., 2008). Sin embargo, se requieren mas estudios que demuestren que la inoculación en sustrato si ocasiona los síntomas observados a nivel de invernadero en los estadios plántula y floración.

En Colombia *B. glumae* ha sido encontrada en suelos de zonas arroceras, como en la Costa Caribe (Córdoba) y en los Llanos Orientales en concentraciones aproximadas de  $1 \times 10^3$  UFC/g de suelo durante todo el ciclo del cultivo, haciendo su caracterización a través de PCR en tiempo real (Beltrán et al., 2015). Estos hallazgos ponen en evidencia que el suelo y residuos del cultivo pueden ser reservorio de la bacteria. Existen muy pocos trabajos donde se muestre inoculación artificial de *B. glumae* en suelo encontrando

únicamente dos, el de Uematsu et al., (1976) donde se inocula 0,3mL de una suspensión *B. glumae* de  $1 \times 10^9$  UFC/mL en macetas de 1kg demostrando plántulas con pudrición 14 días postinoculación y el de Tsushima et al., (1996) donde se inocula suspensión de  $1 \times 10^7$  UFC/mL de *B. glumae* en cajas de vivero de 16x30cm (aproximadamente 500mL por caja) y realiza un spray adicional en el cultivo encontrando la presencia de la bacteria a nivel de la vaina de la hoja siendo mayor en la hoja bandera, lo cual permite especular que si es posible que el suelo mantenga un inóculo de *B. glumae* que resulte importante para la enfermedad.

Asumiendo además que es posible que *B. glumae* entre a la planta a través de otra ruta sin que este dentro de la semilla, como lo reporta Tabei et al., (1989) donde la bacteria puede entrar vía estomática entre la palea y la lema de la inflorescencia y puede multiplicarse en los espacios intracelulares del parénquima del grano, de tal manera que el suelo también podría ser una importante fuente de inóculo de la enfermedad. Por tanto, la protección de las semillas con un controlador biológico podría ser una alternativa del control de la enfermedad especialmente cuando el inóculo bacteriano se encuentra en el medio ambiente. Sin embargo, se debe reconocer que aún faltan estudios que demuestren que un inóculo de *B. glumae* en el suelo infecta efectivamente plantas de arroz de diversos estadios, o que la planta infectada desde el estado de semilla mantiene una población endófitas basal del patógeno que se incrementa en el momento de floración. Por ahora es importante saber que se ha descrito la presencia de este microorganismo en el suelo de campos arroceros afectados con la enfermedad y que en el presente trabajo se demuestra que al colocar semillas libres del patógeno en un sustrato que lo contiene, hay desarrollo de síntomas de la enfermedad y que para este caso específico, este modelo permitirá evaluar posteriormente, protección de semillas inoculadas con microorganismos biocontroladores.

### **5.2.2. Determinación de la presencia de *B. glumae* en plantas desde semillas inoculadas**

En los estudios de fitopatología resulta importante comprobar los postulados de Koch dado que se debe demostrar que el microorganismo que se detecta es el que se encuentra produciendo los síntomas de la enfermedad. En el presente estudio, a pesar que las plántulas del control no inoculado no mostraron síntomas, fue necesario comprobar que la

sintomatología observada en las plántulas posterior a la infección en semillas con *B. glumae*, tanto para los modelos de inoculación en vacío como en sustrato, eran producidos por la cepa de *B. glumae* 3200-12 con la que se realizó las inoculaciones. De esta manera, en plántulas de 10 días postinfección bajo el modelo al vacío se pudo detectar *B. glumae* en el medio semiselectivo S-PG de acuerdo con la figura 13 y se realizó los conteos en UFC de *B. glumae* por gramo fresco de planta. En este contexto se encontró  $3,7 \times 10^7$  UFC de *B. glumae* por gramo de planta, en tanto que en el control no se encontró colonias que mostraran aspectos morfológicos similares a *B. glumae* (tabla 5). Así, es posible que el agente causante de los síntomas en estas plántulas sea la cepa de *B. glumae* que se inoculó artificialmente.

Al realizar el mismo procedimiento, para plántulas de 10 días postinfección en el modelo de infección en sustrato también se pudo detectar *B. glumae* en el medio semiselectivo encontrando  $4,1 \times 10^5$  UFC de *B. glumae*/gr de planta, en el caso del vástago, y  $1,78 \times 10^5$  UFC de *B. glumae*/gr de planta para la raíz (tabla 5). Estos resultados mostraron que con el modelo de infección de semillas al vacío tuvo una mayor población de *B. glumae* en la planta con respecto a la infección en el sustrato. Sin embargo para el modelo al vacío las plántulas no pudieron separarse en los diferentes órganos (vástago y raíz) porque no pesaban lo suficiente para el procedimiento, de tal manera que estos datos no son del todo comparables. Así, sólo se puede afirmar que para ambos modelos de infección de *B. glumae* en semillas de arroz (vacío y sustrato), se puede aislar la bacteria inoculada en una concentración mayor de  $1,0 \times 10^5$  UFC de *B. glumae*/gr de planta y que por esta razón efectivamente el agente causal de los síntomas que se muestran en las plántulas es la cepa con la que se está inoculando para ambos modelos. Estos datos son comparables a los obtenidos por Hikichi (1993) donde al inocular semillas en una suspensión bacteriana de  $10^8$  UFC de *B. glumae*/mL incubando por 4h y dejándolas secar por un periodo de aproximadamente 16 h, se obtuvieron plántulas a los 3 días postinfección con una población de  $2,0 \times 10^5$  UFC de *B. glumae*/gr de peso fresco de planta para la plúmula y  $3,0 \times 10^5$  UFC de *B. glumae* por gramo de peso fresco de planta para la raíz y en plantas de 20 días postinoculación se encontró  $5,0 \times 10^5$  UFC de *B. glumae*/gr de planta en la parte aérea y  $4,0 \times 10^6$  UFC de *B. glumae*/gr de planta en raíz.

A las plantas inoculadas desde semillas mediante el sistema vacío y sustrato se les realizó un seguimiento hasta los 30 días bajo condiciones de invernadero, como se describe en la metodología, con el fin de observar si se presentaban síntomas de enfermedad y para

validar el modelo de infección para la aplicación de control biológico posteriormente. Sin embargo, al transcurrir el tiempo estas plantas no mostraron lesiones indicadoras de síntomas de enfermedad pero, al realizar la medición de la longitud de vástago y raíz, se encontró que las plantas control presentaban una mayor longitud de vástago en relación a las plantas inoculadas con *B. glumae*, a pesar de que no se mostraron diferencias estadísticas significativas (figura 12, A y B). Así mismo, en plantas inoculadas a 30 días para ambos sistemas se pudo evidenciar la presencia de la bacteria.

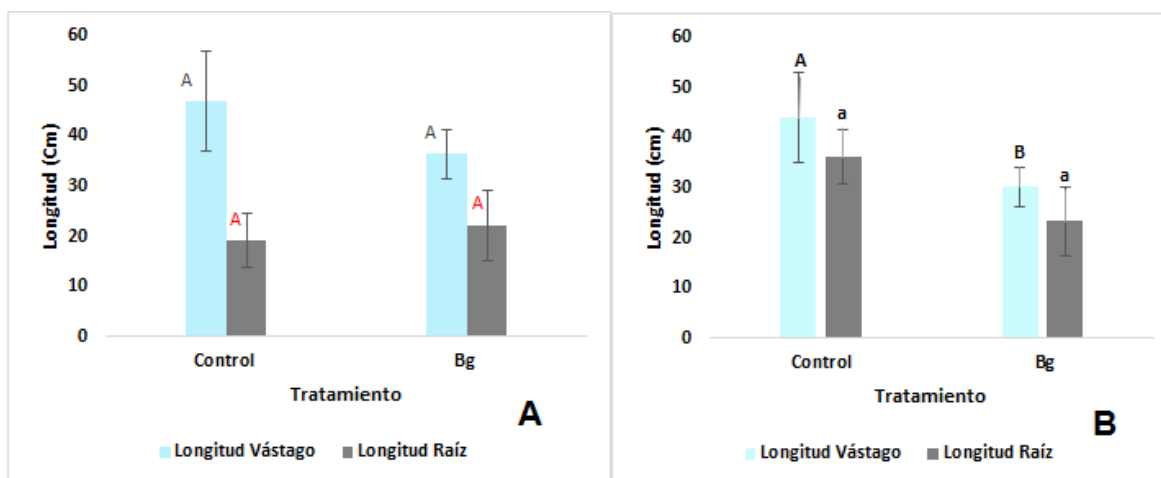
En el caso de modelo de infección de *B. glumae* en semillas y al vacío, los resultados de los conteos fueron de  $1,2 \times 10^4$  UFC de *B. glumae*/gr de planta en vástago y  $7,69 \times 10^4$  UFC de *B. glumae*/gr planta en raíz (tabla 5). Mientras en el modelo de infección en sustrato se encontró conteos para los 30 días de  $1,28 \times 10^5$  UFC de *B. glumae*/gr de vástago y  $2,67 \times 10^4$  UFC de *B. glumae*/gr de raíz. Esto evidencia para el caso de sustrato un orden de magnitud mayor en el vástago en relación a los datos obtenidos en vacío.

**Tabla 5.** Conteos de *B. glumae* obtenidos de plantas provenientes de semillas inoculadas para 2 modelos de infección (semilla y sustrato) 10 y 30 días postinoculación

Modelo de infección <i>B. glumae</i>	Edad planta	Órgano vegetal	UFC de <i>B. glumae</i> /g de planta
Vacío	10 días	Plántula completa	$3,73 \times 10^7$
	30 días	Vástago	$1,19 \times 10^4$
		Raíz	$7,69 \times 10^4$
Sustrato	10 días	Vástago	$4,11 \times 10^5$
		Raíz	$1,78 \times 10^5$
	30 días	Vástago	$1,28 \times 10^5$
		Raíz	$2,67 \times 10^4$

Estos conteos resultaron comparables a los obtenidos por Hikichi (1993) para plantas de 31 días postinfección, donde se presenta una población de  $1,0 \times 10^4$  UFC de *B. glumae*/g de hojas y  $2,0 \times 10^5$  UFC de *B. glumae*/g de raíz, no únicamente porque los conteos son similares, sino porque a pesar de que las plantas a los 30 fueron asintomáticas, si hay una

relación entre la concentración y otros parámetros agronomicos como el tamaño de la planta. Este mismo autor demuestra una relación directa entre la severidad de la enfermedad y la densidad de la población de *B. glumae* en la planta de manera directamente proporcional, indicando que hacia la floración, la densidad bacteriana puede alcanzar hasta un orden de magnitud de  $10^9$  UFC de *B. glumae*/g de planta y se presentan los síntomas típicos de la enfermedad en la panícula y por eso el autor sugiere que en el control de la enfermedad se debe tratar de disminuir la población de *B. glumae* antes de llegar a floración.

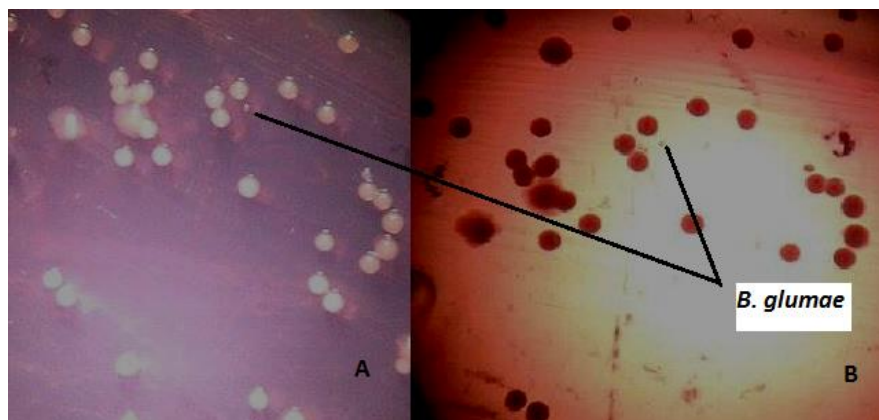


**Figura 12.** Longitud de vástago y raíz en plantas 30 días desde semillas inoculadas con *B. glumae*. **(A)** mediante inoculación de semillas al vacío. **(B)** mediante incorporación del patógeno en el sustrato.

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empeando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza

Debido a que el medio S-PG no es completamente selectivo para *B. glumae*, en el sentido de que otras bacterias como las del genero *Pseudomonas* pueden crecer allí, e incluso otras especies de *Burkholderia* sp, era necesario confirmar los conteos realizados y re aislar la bacteria para comprobar que definitivamente era el agente causal de los síntomas observados. Por este motivo, se aislaron colonias presuntivas de *B. glumae* desde las placas de S-PG donde se hicieron los conteos y estos aislamientos se sembraron en medio King B con el fin de observar las características morfológicas de las colonias. Adicionalmente, se realizó una tinción de Gram para observar características microscópicas y se comprobó mediante el uso de PCR con primers específicos (Takeuchi et al., 1994; Saylor et al., 2006). Así, en medio King B se observaron, para aislamientos presuntivos de *B. glumae*, colonias blancas a cremas de 1 a 1,2 mm de diámetro,

circulares, convexas, con margen lisa y que mostraban la producción de un pigmento de color amarillo, no fluorescente y difusible en el agar (figura 14), características correspondientes a lo reportado en la literatura (Yuan, 2004; Zhu, 2014). A nivel microscópico por tinción de Gram se encontraron bastones pequeños Gram negativos (figura 15) cuya característica ha sido previamente reportada en la literatura. Cabe aclarar que la morfología macroscópica y microscópica para las colonias presuntivas aisladas desde plantas fue idéntica a la cepa pura de *B. glumae* 3200-12 usada en este estudio, así se puede decir que lo que se está re aislando es lo que se había inoculado en las semillas para la estandarización de los modelos de infección.



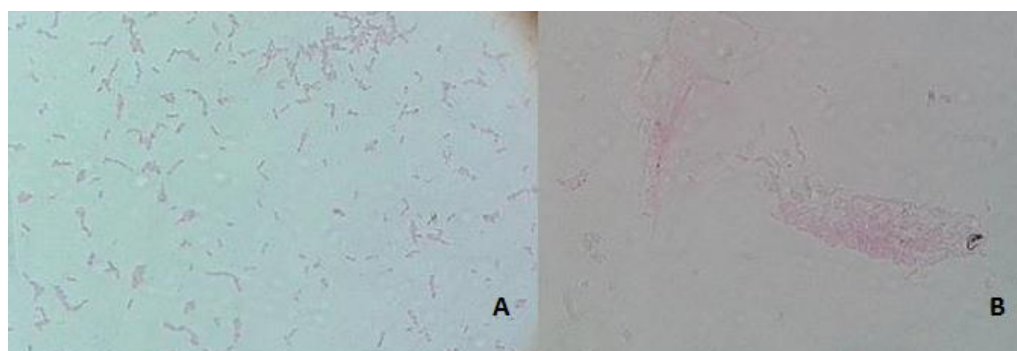
**Figura 13.** Morfología de colonia presuntiva de *B. glumae* 3200-12 en medio S-PG. Anverso (A) y Reverso (B) de caja de Petri observada en estereoscopio



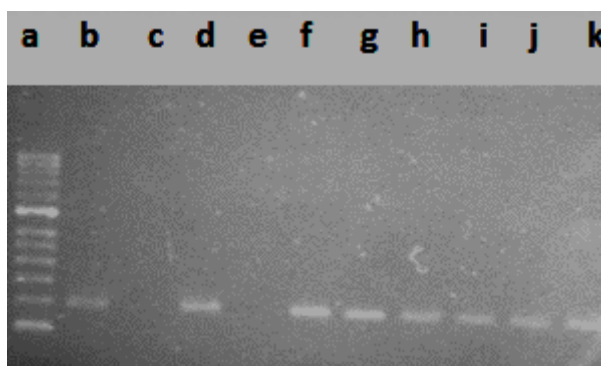
**Figura 14.** Morfología de colonia presuntiva de *B. glumae* 3200-12 en medio King B. Cepa pura (A) y aislamiento desde plantas de arroz bajo diferentes modelos de infección (B). En (C) caja mostrando los aislamientos donde se identifica la presencia del pigmento amarillo en este medio.

En el medio semiselectivo S-PG se evidenciaron colonias Tipo B para *B. glumae* 3200-12, que de acuerdo con Mew y Misra., (1986) son redondas, lisas, convexas y púrpura

opalescente (figura 13). Aclarando que estos autores mencionan que en medio S-PG las especies de *B. glumae* producen dos tipos de colonias denominados A (colonias redondas, lisas, convexas y de color café rojizo) y B, donde se aclara que es posible que especies de *Pseudomonas* no fluorescentes muestren colonias tipo B. Por esta razón, es importante ser cuidadosos en los conteos, teniendo en cuenta que varias *Pseudomonas* spp son endófitas de la planta de arroz (Manos y Morisaki, 2008) y adicionalmente se requiere siempre hacer el pase a King B verificando la morfología de colonia y su confirmación por PCR.



**Figura 15.** Morfología microscópica de *B. glumae* 3200-12 en tinción de Gram. Cepa pura (A) y aislamiento desde plantas de arroz bajo diferentes modelos de infección (B), observaciones realizadas a 100X.



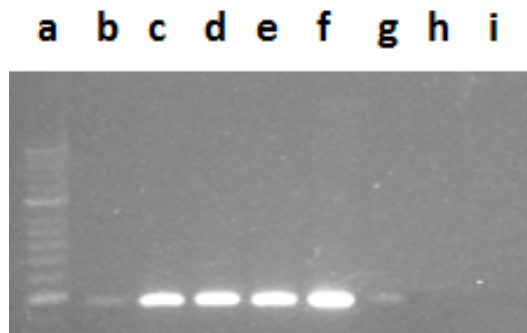
**Figura 16.** Confirmación por PCR de *B. glumae* aislada a partir plantas de 10d inoculadas cuando el patógeno se incorpora en sustrato. Pozos: (a) Patrón de peso molecular; (b) control positivo (*B. glumae* 3200-12 pura); (c) blanco reacción; (d-g) *B. glumae* aislada desde vástago; (h-k) *B. glumae* aislada desde raíz.

\*se uso los primers de Takeuchi et al., (1997) y el producto de amplificación fue de 400 pb lo cual corresponde a lo reportado previamente.

Para finalizar esta verificación, se realizó la PCR (Takeuchi et al., 1994; Sayler et al., 2006) de colonias aisladas desde plantas de ambos modelos de infección (vacío y sustrato), de

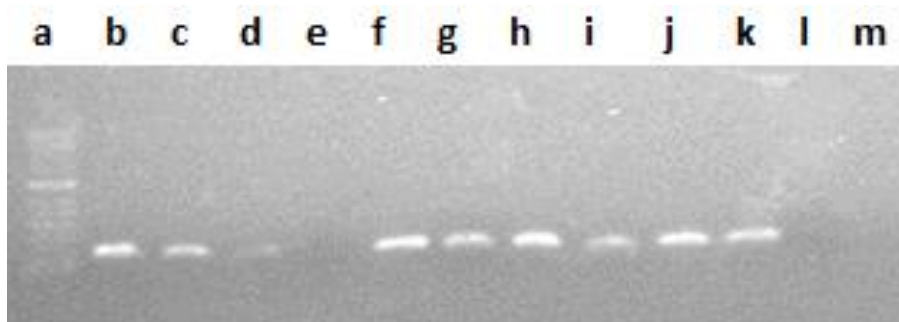


esta manera se encontró que aislamientos presuntivos de *B. glumae* amplificaron para un fragmento de tamaño similar al propuesto para el set de primers (figuras 16, 17 y 18). Para los dos modelos los aislamientos fueron positivos para *B. glumae* mediante PCR y algunos morfotipos del control no inoculado no amplificaron para dicho gen.



**Figura 17.** Confirmación por PCR de *B. glumae* aislada desde plantas de 10d desde semillas inoculadas al vacío. Pozos: (a) Patrón de peso molecular; (b) control positivo (*B. glumae* 3200-12 pura); (c-g) *B. glumae* aislada desde plántulas inoculadas; (h) morfotipo desde plántula sin inocular (Control negativo); (i) blanco reacción

\*se uso los primers de Saylor et al., (2006) y el producto de amplificación fue de 282 pb lo cual corresponde a lo reportado previamente.



**Figura 18.** Confirmación por PCR de *B. glumae* aislada desde plantas de 30d inoculadas desde semilla mediante el sistema al vacío. Pozos: (a) Patrón de peso molecular; (b) control positivo (*B. glumae* 3200-12 pura); (c-f) *B. glumae* desde raíz; (g-k) *B. glumae* aislada desde vástago; (l) morfotipo desde plantas no inoculadas (Control negativo); (m) blanco reacción

\*se uso los primers de Takeuchi et al., (1997) y el producto de amplificación fue de 400 pb lo cual corresponde a lo reportado previamente.

El análisis de la secuencia resultado de la amplificación usando los primers de Saylor et al., (2006) y la posterior comparación con la base de datos del NCBI a través del algoritmo BLAST, permitió encontrar que los aislamientos presuntivos correspondieron a *B. glumae*

con una similitud del 100%. En la tabla 6 se muestra el análisis de similitud para la secuencia resultante de la amplificación para la cepa pura *B. glumae* 3200 y para un aislamiento presuntivo. De esta manera se valida nuevamente que los conteos realizados efectivamente correspondían a *B. glumae* y que por tanto la bacteria inoculada es la causante de los síntomas en las plántulas y cuyo inóculo permanecen en la planta durante en el tiempo.

El tamaño del amplicon fue de aproximadamente 250 pb a los cuales en la edición en el software Bioedit se les quito los primeros y últimos 20 nucleótidos, lo que indica que las secuencias tuvieron un tamaño final aproximado de 240 pb. Lo que permitió afirmar el 100% de identidad.

**Tabla 6.** Resultado de BLAST de la secuencia resultado de la PCR con los primers de Sayler et al., (2006) para la cepa *B. glumae* 3200-12 y un aislamiento presuntivo de *B. glumae* tomado de plantas de arroz previamente inoculadas con la bacteria.

<b><i>B. glumae</i> 3200-12 cepa pura</b>				
<b>No Acceso</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Total Score</b>	<b>E-value</b>	<b>Identidad (%)</b>
CP009435.1	<i>B. glumae</i> LMG 2196	1244	3,0E-112	100
CP001504.2	<i>B. glumae</i> BGR1	823	3,0E-112	100
DQ097386.1	<i>B. glumae</i> 222gr	414	3,0E-112	100
DQ097385.1	<i>B. glumae</i> 336gr	414	3,0E-112	100
<b>Aislamiento presuntivo de <i>B. glumae</i> en S-PG</b>				
<b>No Acceso</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Total Score</b>	<b>E-value</b>	<b>Identidad (%)</b>
CP009435.1	<i>B. glumae</i> LMG	1272	5,0E-115	100
CP001503.2	<i>B. glumae</i> BGR1 Cromosoma 1	1260	5,0E-115	100
CP001504.2	<i>B. glumae</i> BGR1 Cromosoma 2	842	5,0E-115	100
DQ097386.1	<i>B. glumae</i> 222gr	424	5,0E-115	100
DQ097385.1	<i>B. glumae</i> 336gr	424	5,0E-115	100

## **5.3. Evaluación de la capacidad biocontroladora de las BAFEs *In vivo* contra *B. glumae***

### **5.3.1. Estandarización de la dosificación de aislamientos de BAFES para la evaluación de control biológico contra *B. glumae***

Con el objeto de determinar cual era el mejor modelo de presentación de las BAFEs para determinar su potencial biocontrolador se llevó a cabo una estandarización de diferentes propuestas de aplicación del BAFE en la semilla, los cuales se encuentran explicados claramente en la tabla 1 y los resultados se presentan en la figura 19.

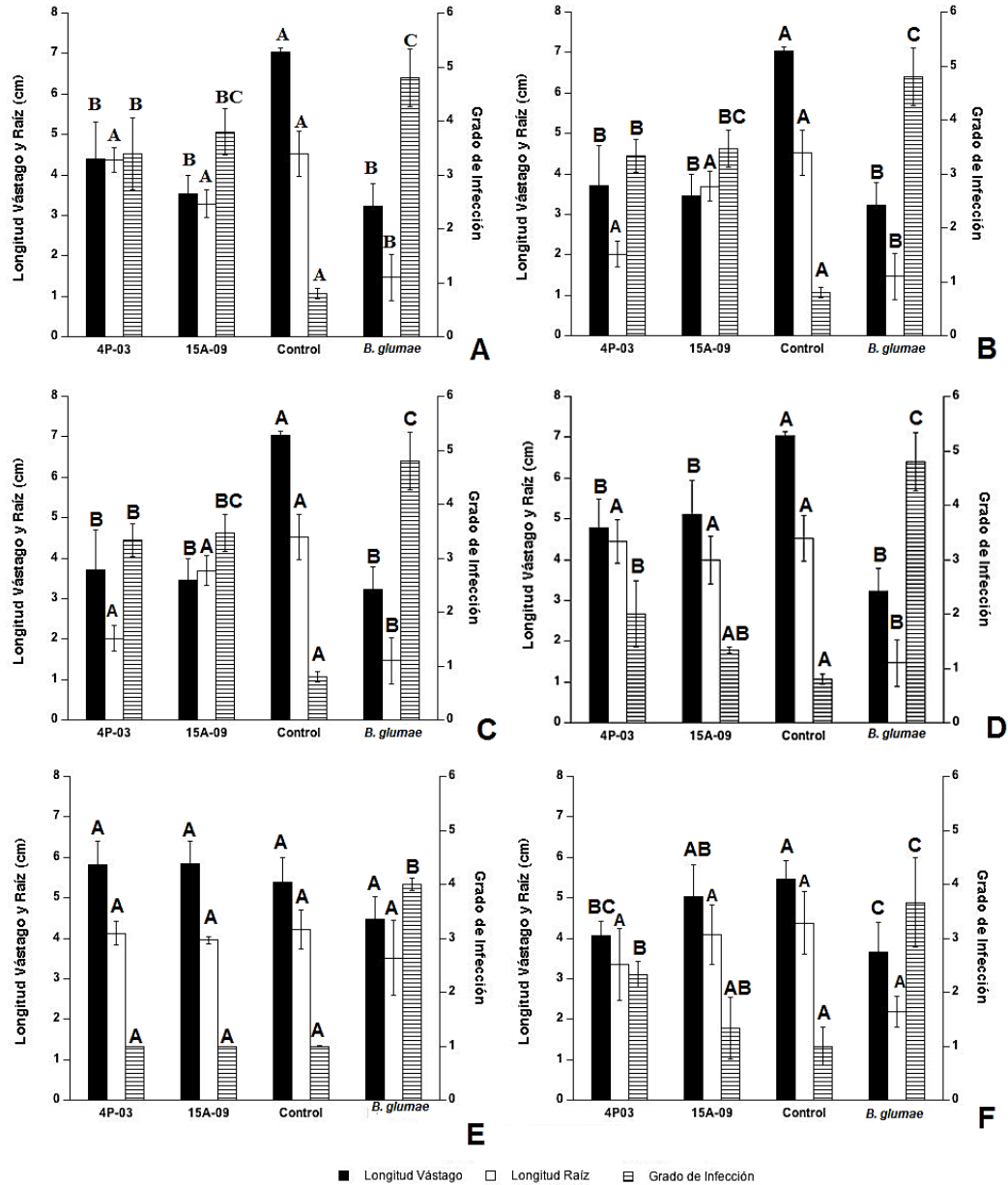
Con el modelo 1, se pretendía que las semillas de arroz estuvieran protegidas por las BAFES, por lo que las BAFES se inocularon artificialmente usando un sistema al vacío de tal manera que al exponer las semillas a *B. glumae*, hubiera algún tipo de protección. Los resultados indicaron que las plantas co-inoculadas con cada aislamiento de BAFE evaluado y la cepa de *B. glumae* no mostraron diferencias significativas respecto al control de enfermedad (Bg  $10^8$  con vacío) en la variable longitud de vástago. En el grado de infección el aislamiento 4P03 mostró diferencias estadística en relación al control de enfermedad pero el valor fue superior a 3 indicando que fueron plántulas enfermas. De forma similar fueron totalmente diferentes al control no inoculado para ambas variables (figura 19, A). Por tanto este modelo no mostró ninguna actividad de control biológico de los BAFES evaluados y por el contrario generó plantas enfermas similares a cuando las semillas están sólo expuestas al fitopatógeno.

Para el modelo 2 (tabla 1), donde se asume que las dos cepas (patógeno y controlador) se encontrarían en el mismo tiempo y espacio. Los resultados mostraron que a pesar de que al emplear este modelo de infección, las plántulas con los aislamientos de BAFE evaluadas disminuyen el grado de infección con *B. glumae*, las plántulas siguen mostrando síntomas de enfermedad y una reducción importante de la longitud de vástago que es similar a lo encontrado en el control de enfermedad (figura 19, B). De acuerdo a lo anterior, se considera que este modelo tampoco es útil para evaluar la actividad biocontroladora de los aislamientos de BAFES *In vivo*, ya que no permite evidenciar todo el potencial biocontrolador de las BAFES. Por otra parte a pesar de que es posible encontrar los enemigos naturales en el mismo nicho en el que se encuentran los microorganismos

fitopatógenos, en la aplicación de un bioinsumo para control no sería tan real que tanto esta bacteria fitopatógena, como el microorganismo benéfico, se encuentre en el mismo espacio y tiempo a las concentraciones evaluadas bajo este modelo.

En el modelo 3, se asume que *B. glumae* entra primero en la semilla y por lo tanto se inoculó al vacío para posteriormente tratar las semillas con cada una de las aislamientos de BAFEs, las cuales fueron también inoculadas al vacío, dándole alguna ventaja al patógeno en términos del tiempo de entrada a la semilla de arroz. En términos del desarrollo de la enfermedad se encontró que las plántulas de los tratamientos co-inoculadas con aislamientos de BAFEs, mostraron claros síntomas de enfermedad en términos de reducción de longitud de vástago, respecto al control no inoculado presentando un alto grado de infección, similar al control de enfermedad. La BAFE 4P03 logro reducir levemente los síntomas de la enfermedad pero aun así las plantas mostraban síntomas típicos de la misma con un grado de infección superior a 3 (figura 19, C).

En el modelo 4, se asume igualmente que *B. glumae* está dentro de la semilla al ser inoculada al vacío pero a diferencia del modelo 3, se adiciono posteriormente la BAFE en la semilla mediante la aplicación de una suspensión bacteriana donde fueron incubadas las semillas por 30 minutos (Tabla 1). Dándole una ventaja a *B. glumae*, en términos del tiempo de infección en la semilla. En el desarrollo de este modelo se encontró que hay una reducción significativa en el grado de infección respecto al control de enfermedad. Este resultado se evidenció para los dos aislamientos de BAFEs donde se mostraron diferencias estadísticas. Así mismo, las plántulas co-inoculadas con BAFEs mostraron una longitud de vástago, mayor en relación al control de enfermedad mostrando diferencias estadísticas lo que sugiere una recuperación del fenotipo y reducción importante de la enfermedad, a pesar de que las plántulas no son iguales al control no inoculado (figura 19, D). Este modelo permitió evidenciar el desarrollo de la enfermedad causada por *B. glumae* en semillas de arroz, pero además la actividad biocontroladora de los BAFEs, por lo que se consideró para evaluaciones posteriores dentro del desarrollo de este trabajo.



**Figura 19.** Evaluación del efecto controlador de aislamientos de BAFEs sobre semillas de arroz inoculadas con *B. glumae*. (A) Modelo 1, (B) modelo 2, (C) modelo 3, (D) modelo 4, (E) modelo 5, (F) modelo 6. Los modelos corresponden a lo descrito en la tabla 1.

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza. En el caso de los modelos 5 y 6 los datos mostraron no cumplir con los supuestos y se les practico prueba de Kruskal Wallis

En el modelo 5, en el cual se elaboró una suspensión del co-inóculo de *B. glumae* con cada aislamiento de BAFE en el cual se sumergieron las semillas, se asume que las dos

aislamientos se encuentran en el mismo tiempo y espacio (tabla 1). En este ensayo en particular se encontró que las plántulas co-inoculadas con cada uno de los aislamientos de BAFE mostraron una recuperación total del fenotipo y por tanto son similares estadísticamente al control no inoculado en términos de longitud de vástago y grado de infección (figura 19, E). Así, los tratamientos con BAFES reducen muy notablemente el grado de infección mostrando diferencias estadísticas respecto al control de enfermedad. Por tanto, este modelo mostró el potencial biocontrolador de los aislamientos de BAFES sin embargo, no se consideró para posteriores evaluaciones dado que no representa un modelo muy real a lo que puede ocurrir en la naturaleza, ya que como se mencionó anteriormente, es poco probable que *B. glumae* llegue al mismo tiempo a su nicho, que el producto que se está aplicando y es posible que cuando se esté incubando el co-inóculo con las semilla tratadas lo que se esté logrando es un antagonismo directo entre el patógeno y el controlador, lo cual a pesar de ser un mecanismo de los BAFES para biocontrol posee una baja probabilidad de ocurrencia en campo.

En el modelo 6, se incorporó *B. glumae* en el sustrato, siendo equivalente a lo mostrado anteriormente en el modelo de infección en semillas correspondiente (figura 9), y posteriormente las semillas de arroz previamente tratadas con las BAFES fueron colocadas sobre el sustrato con el objeto de que germinaran y crecieran sobre el mismo (tabla 1). En este modelo se asumió que *B. glumae* se encontrará en el sustrato y las BAFES actuarán como protección de la planta. Los resultados encontrados sugieren que la inoculación con las BAFE, reducen notablemente el grado de infección mostrando diferencias significativas respecto al control de enfermedad ( $Bg 10^7$  en sustrato) (Figura 19, F). Así mismo, los tratamientos con biocontroladores presentan una mayor longitud de vástago en relación a lo que presenta las plantas inoculadas sólo con la cepa de *B. glumae*. Merece resaltar en este sentido las plantas inoculadas con el aislamiento 15A09 que presentaron una recuperación importante del fenotipo, ya que las plantas de este tratamiento fueron similares al control sin inocular respecto a la longitud de vástago. Por tanto, se seleccionó el modelo 6 para evaluar la capacidad biocontroladora de los aislamientos de BAFES en semillas de arroz, ya que este modelo representa una situación donde se puede evaluar el nivel de protección de semillas de arroz previamente inoculadas con las BAFES una vez se encuentren con la presencia del fitopatógeno en el sustrato, la cual es una situación probable bajo condiciones de campo de acuerdo a lo presentado en

la literatura. Adicionalmente es importante anotar que es una metodología relativamente fácil de ejecutar y que permite hacer un tamizaje de los aislamientos.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la evaluación de los diferentes modelos de infección claramente se mostró que existe un efecto del mecanismo empleado en la aplicación de las BAFEs en la semilla, sobre la expresión de la capacidad de control de estos microorganismos. Efectos de aplicación de microorganismos controladores biológicos en ensayos *in vivo* también ha sido reportados por Szczech y Shoda (2006), quienes evidenciaron que el modo de aplicación de una cepa de *B. subtilis* tiene un efecto sobre la eficacia del control biológico de *Rhizoctonia solanii* en plantas de tomate, mostrando claramente que al realizar un tratamiento combinado (aplicación en suelo y bacterización de la semilla), no se hace control de la enfermedad, en tanto que al introducir el controlador únicamente en el suelo, si muestra una eficacia importante en el control. Así como, Mishra y Arora (2012), encontraron que aislamientos de *P. aeruginosa* y de *B. thuringensis* funcionan como biocontroladores contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, de una manera más efectiva cuando se aplican en una combinación en semilla y por aplicación en el suelo en relación que cuando se aplica por spray foliar en un ensayo empleando plantas de *Brassica*. Incluso Abesynghe (2009) mostró como la bacterización de la raíz de plantas de *Capsicum annum* L. redujó notablemente las lesiones causadas por *S. rolfisii* en relación a otros métodos de aplicación como la bacterización de la semilla y la inoculación del suelo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron evidenciar la enfermedad con los modelos usados de inoculación de *B. glumae* y la reducción de los síntomas de la misma, cuando esta se encuentra en la semilla y cuando está en el sustrato. Es importante mencionar que un modelo de aplicación de control biológico con BAFEs o con los microorganismos que se vayan a usar, siempre debe ser lo más cercano a la realidad en lo que refiere al tiempo y espacio donde se encontrarían el microorganismo patógeno y el biocontrolador. Esto incluye tener en consideración la practicidad de la aplicación, ya que no es lo mismo hacer una bacterización de las semillas sumergiéndolas en el inoculante (modelo 4 y 6), qué realizar la inoculación a través de un sistema al vacío para las semillas que se van a sembrar, como se sugiere en el modelo 1 evaluado en este estudio. Por esta última razón el modelo 4 y 6 de co-inoculación resultaron más favorables y fueron los modelos seleccionados para la evaluación de los 26 aislamientos de BAFEs que presentaron un potencial biocontrolador de acuerdo a las pruebas *in vitro*.

Es importante mencionar que la escogencia de un modelo de aplicación de biocontrol depende de que se acerque a la realidad en términos de las posibilidades de que ambos organismos se encuentren en la naturaleza y además de su efectividad en términos de reducción de los síntomas de la enfermedad. En el presente trabajo la decisión para escoger los dos modelos de aplicación de la BAFE se debió a la conjunción de ambos factores. De acuerdo con Song et al., (2014), el modo de aplicación del biocontrolador en relación al tiempo en que se hace la misma, tiene efecto sobre la reducción del índice de severidad en síntomas en raíz de Ginseng producidos por *Fusarium cf incarnatum*. Con esta idea en mente dichos autores emplearon tres tiempos diferentes de aplicación, previo (antes de inocular el patógeno), simultáneo (al mismo tiempo que el patógeno) y posterior al patógeno, mostrando que cuando se hace una aplicación previa se obtiene una reducción del 50%, en tanto para las aplicaciones simultánea y posterior se obtienen bajas tasa de inhibición. En relación a los resultados de la presente investigación, las BAFEs pueden funcionar para aplicaciones previas (modelo 6) y posteriores (modelo 4) a la llegada de *B. glumae* e incluso simultáneamente (modelo 5). Sin embargo, es importante resaltar la efectividad del modelo 4, dado que como se había mencionado en este *B. glumae* se asume dentro de la semilla y por tanto la aplicación del BAFE es posterior a la llegada del patógeno.

En la literatura se muestra cómo cepas de *Bacillus* sp pueden inducir resistencia sistémica en plantas de arroz contra *B. glumae* al ser aplicadas en spray sobre las hojas y en suelo (Chung et al., 2015). En este contexto, si bien el objetivo del trabajo no era evaluar otras formas de aplicar el biocontrolador como puede ser en spray sobre las hojas o en el suelo directamente, si no desarrollar un modelo de infección/control que permitiera desarrollar los síntomas de la enfermedad y encontrar aislamientos de *Bacillus* que permitan realizar un control de la infección. Para futuros estudios sería muy importante considerar la aplicación de agentes biocontroladores que resulten efectivos en el presente trabajo contra el añublo bacterial de la panícula, evaluando su aplicación en el momento de floración o llenado de grano en plantas adultas, con el fin de ampliar su aplicación y conocer su efectividad bajo condiciones diferentes.



### **5.3.2. Evaluación de actividad biocontroladora de BAFEs contra *B. glumae* en semilla**

De acuerdo con los resultados del tamizaje *In vitro* se pudieron seleccionar 26 aislamientos los cuales se evaluaron a nivel *In vivo*. En este sentido, de acuerdo a esta evaluación bajo las condiciones del modelo 6 (Figura 1, anexo C) se seleccionaron algunos aislamientos de BAFEs usando como criterio la disminución del grado de infección con diferencias estadísticas en relación a un control de enfermedad (semillas inoculadas sólo con la cepa *B. glumae* 3200-12). En algunos casos muy puntuales se seleccionaron algunos aislamientos que no presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación al control de enfermedad ya que por la alta variabilidad de los datos para esta variable la estadística no permitió evidenciar diferencias a pesar de que era clara la disminución de la enfermedad. Para cumplir a cabalidad con el criterio (disminución del grado de infección) no se seleccionaron tratamientos con aislamientos donde el grado de infección en promedio para las tres réplicas fuera igual o mayor que 3, ya que en concordancia con la escala de severidad usada (Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, 2011) estas eran plantas con síntomas de enfermedad. Adicionalmente, para la selección se tuvo en cuenta que la longitud de vástago de las plántulas tratadas con BAFEs fuera similar a un control no inoculado.

Se debe aclarar que todos los 26 aislamientos no pudieron evaluarse al mismo tiempo por capacidad técnica y por este motivo se dividieron en grupos de ensayos cada uno usando un control de semillas no inoculadas y un control de enfermedad (inoculadas sólo con *B. glumae*). De tal manera, que la selección de los aislamientos para la siguiente fase de evaluación, se hizo dentro de cada ensayo y no sobre todo el ensayo global. En este sentido se seleccionaron 6 aislamientos en total a partir de la concentración de  $10^6$  UFC de BAFE/mL: 4P03, 15A09, 16A08, IM2C6, IGC4 y 12A04.

En la concentración de  $10^7$  UFC/mL (figura 2, anexo C) se usó el mismo criterio de selección encontrando nuevamente seis aislamientos con actividad contra *B. glumae* en las plántulas de arroz inoculadas desde las semillas: 4P03, 15A09, 16A08, IM3C5, IGC1 e IT1C8 teniendo en cuenta que no todas mostraron diferencias significativas debido a la variabilidad encontrada dentro del ensayo. Solamente los aislamientos 4P03, 15A09 y 16A08 mostraron actividad en ambas concentraciones, en tanto tres tuvieron sólo en  $10^7$

UFC/mL. Así, en esta concentración apenas el 23,1% de los aislamientos de BAFEs tuvieron actividad.

Bajo el mismo criterio se seleccionaron 11 aislamientos en la concentración de  $10^8$  esporas/mL: 4P03, 15A09, 16A08, IM3C5, IGC1, IM2C5, MA1C2, MA3C2, 12A04, IT1C8 e IM4C6. Debe mencionarse que todas las aislamientos seleccionados en esta concentración si mostraron diferencias significativas para el grado de infección respecto al control de enfermedad (figura 3, anexo C) y por tanto esto hacia más robusta la selección. En esta concentración para la primera repetición, el 34,6% (11) de los aislamientos de BAFEs evaluados mostraron actividad, lo que indicó que los aislamientos tenían mayor potencial en esta concentración en relación a las demás. Cabe mencionar que los aislados 4P03, 15A09 y 16A08 mostraron actividad en las tres concentraciones manteniendo consistencia en los ensayos, en tanto otros aislamientos como IM3C5, IGC1, 12A04, IT1C8 e IM2C6 mostraron actividad en dos de las concentraciones evaluadas, en tanto que los restantes 4 sólo mostraron actividad en una concentración indicando que su funcionalidad es dependiente de la concentración en la cual se colocaron.

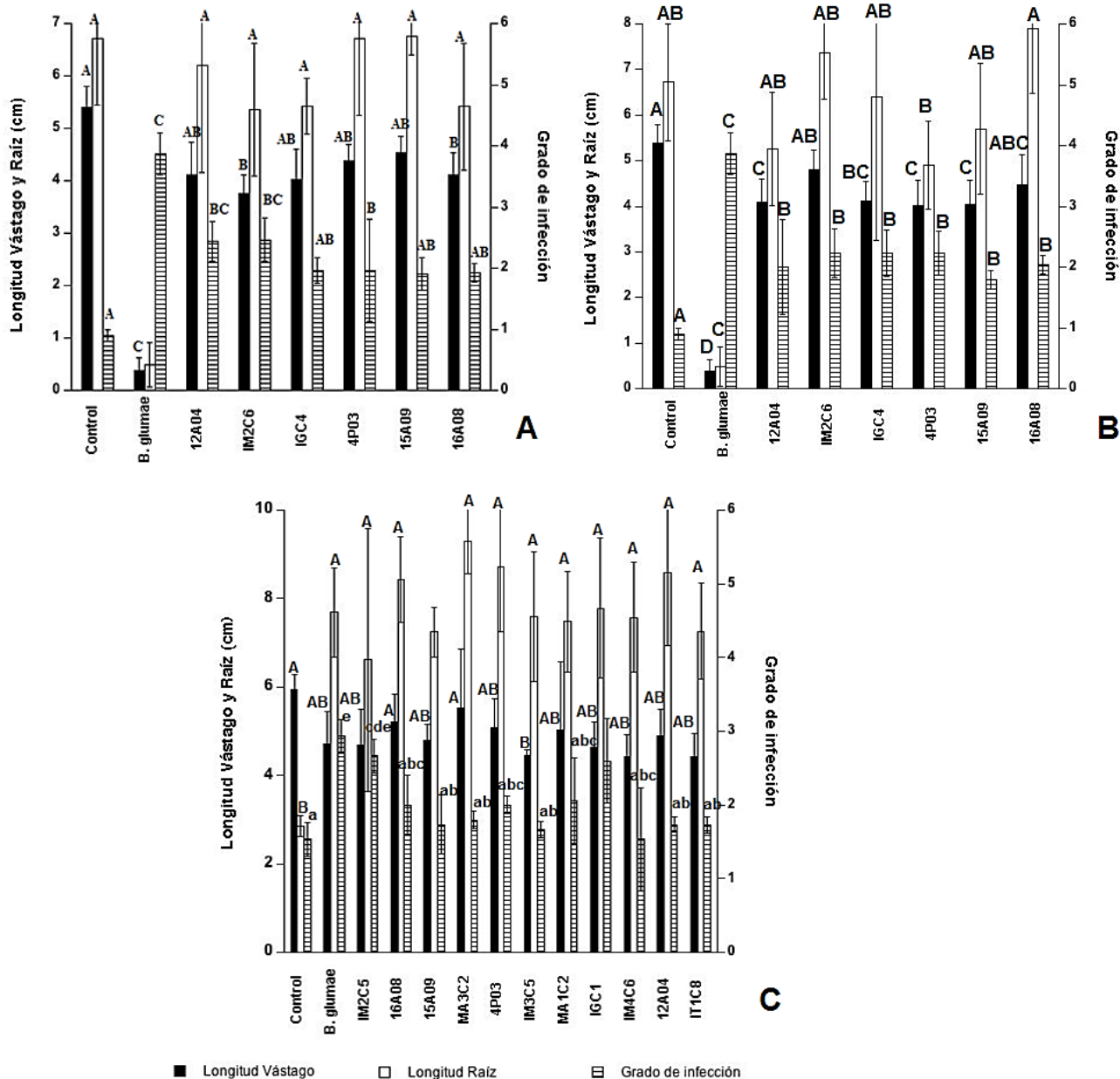
En total este ensayo en semillas de arroz arrojó 13 aislamientos de BAFEs seleccionados de acuerdo con los criterios anteriormente mencionados, estos fueron: 4P03, 15A09, 16A08, IM3C5, IGC1, IGC4, IM2C5, MA1C2, MA3C2, 12A04, IM4C6, IM2C6 e, IT1C8. Estos aislamientos fueron repetidos en el tiempo en la o las concentraciones en la cual mostraron actividad con el fin de evaluar su reproducibilidad y consistencia.

De acuerdo a los resultados presentados donde se muestra la repetición en el tiempo para las bacterias seleccionadas en la concentración correspondiente, se detectó que para el caso de la concentración de  $10^6$ , cuatro BAFEs de los seis que habían tenido actividad fueron reproducibles, en tanto en  $10^7$  UFC/mL todos los seis mostraron consistencia en el tiempo (figura 20, A y B) mostrando una disminución del grado de infección con diferencias significativas respecto al control de enfermedad y una recuperación de la longitud del vástago respecto al mismo control. Por tanto se consideraron estos aislamientos promisorios para continuar con la evaluación.

Adicionalmente, en la concentración de  $10^8$  (figura 20, C), 10 aislamientos de los 11 evaluados mostraron importante reducción del grado de infección siendo consistentes y reproducibles en el tiempo. La cepa IM2C5 no presentó actividad en esta repetición produciendo plántulas enfermas similares al control de enfermedad y por tanto no se

consideró como aislamiento consistente y se decidió descartar para evaluaciones posteriores. Cabe mencionar que todos los aislamientos que mostraron control en términos de disminución de grado de infección tuvieron diferencias significativas para la misma variable.

De esta manera, se preseleccionaron 12 aislamientos de BAFE: 4P03, 15A09, 16A08, IM3C5, IGC1, IGC4, MA1C2, MA3C2, 12A04, IM4C6, IM2C6 e, IT1C8, las cuales fueron posteriormente usadas para evaluar el modelo de co-inoculación 4 que supone a *B. glumae* en la semilla y se incorporará aplicando vacío como se explico en materiales y métodos. De acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo con el modelo de co-inoculación 6, existe un efecto de la concentración de aplicación de los BAFEs en relación al control biológico de *B. glumae* en semilla, debido a que en la concentración de  $10^8$  esporas/mL se logró seleccionar un mayor número de aislamientos de BAFEs (10) bajo el criterio reducción del grado de infección, así, el 83,3% (10) de los aislamientos tuvieron capacidad biocontroladora contra *B. glumae* en semilla mostraron actividad en esta concentración. De la misma manera se logró observar aislamientos que sólo funcionaron en una concentración específica, es decir sólo para  $10^6$ ,  $10^7$  o  $10^8$  UFC/mL. Efectos de la concentración del inóculo sobre la actividad de control biológico han sido reportados por Zhan et al.(2011), demostrando que cuando el inóculo de una cepa de *B. cereus* se encuentra en el nivel de  $10^8$  UFC/mL existe una mayor disminución del porcentaje de severidad y un mayor porcentaje de eficacia de biocontrol, sobre *Ralstonia solanacearum* en plántulas de tomate, en relación a concentraciones de  $10^6$  y  $10^7$ , de hecho cuando se va aumentando la concentración se muestra una tendencia positiva de la eficacia, pero cuando se incrementa la concentración hasta  $10^9$  dicha eficacia vuelve a reducir.



**Figura 20.** Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs contra *B. glumae* cuando esta es incorporada en sustrato (modelo 6) (A)  $10^6$ , (B)  $10^7$  y (C)  $10^8$  ufc/mL.

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza. En el caso donde los datos mostraron no cumplir con los supuestos y se les practico prueba de Kruskal Wallis

De la misma manera, Song et al., (2014) reporta para la cepa de *Bacillus* sp. B2-5 que cuando se usó en concentración de  $10^6$  UFC/mL no se encontraron síntomas de pudrición en raíces de Ginseng inoculadas con *Fusarium* cf. *incarnatum* en relación a una

concentración más alta y en experimentos bajo condiciones de invernadero se reducía la severidad de la enfermedad significativamente con una eficacia de control más alta en un inóculo de concentración de  $10^6$  UFC/mL que en  $10^8$  UFC/ mL.

En este estudio se encontró que el 46,15% (los 12 aislamientos que fueron seleccionados) de los 26 aislamientos evaluados *In vivo* en el modelo 6 mostraron actividad en semillas de arroz contra *B. glumae* indicando el alto potencial de estos aislamientos. A pesar que en el tamizaje realizado *In vitro*, se seleccionaron más número de aislamientos de Iraca con actividad, se debe destacar que de esos 15 aislamientos de BAFE de rizosfera de Iraca seleccionadas sólo seis aislamientos (40%) tienen actividad *In vivo*, en tanto de los seis aislamientos de maíz preseleccionados *In vitro* sólo 2 (33,3%) funcionan reduciendo grado de infección significativamente y de rizosfera de arroz de cuatro aislamientos preseleccionados *In vitro* tres (75%) muestran actividad en semilla. Así mismo, la BAFE 4P03 de rizosfera de papa tiene capacidad biocontroladora *In vivo*. Este resultado sugiere que es importante que los aislamientos seleccionados estén previamente adaptados a la planta donde van a ser evaluados, sin embargo esta situación no implica que una BAFE que no ha sido aislada de la planta hospedera de donde fue seleccionada no funcione en un patosistema particular como se esta demostrando aquí con la BAFE 4P03 que es de origen rizosfera de papa y otros aislamientos provenientes de rizosfera de Iraca como IT1C8, IM3C5, IM2C6, IM4C6, IGC4 e IGC1 y de rizosfera de maíz como los aislamientos MA3C2 y MA1C2.

A grandes rasgos en el modelo de co-inoculación 6 se encontró reducciones importantes en la enfermedad calculados desde el grado de infección, para destacar los aislamientos más importantes de cada concentración se encontró que en el caso de  $10^6$  UFC/mL la BAFE 15A09 mostró una reducción del 50,8%, mientras que en  $10^7$  UFC/mL el mismo aislado tuvo un porcentaje de reducción de la enfermedad en un 53,44% y para la concentración de  $10^8$  UFC/mL la cepa que más mostró reducción de la enfermedad fue la IM3C5 (63,65%). De esta manera encontramos una reducción del grado de infección para el modelo de co-inoculación 6 de hasta el 63,65% lo que corrobora nuevamente el potencial de estos aislamientos de BAFEs con actividad *In vivo*.

Se reporta en la literatura que cepas de *Bacillus* aisladas desde rizosfera de tomate y papa muestran reducción de la incidencia de la marchitez bacteriana del tomate, enfermedad causada por *R. solanacearum*, en plantas de tomate de hasta el 89% bajo condiciones de

invernadero siendo clara la posibilidad de aplicación de los aislados de *Bacillus* como agentes de control biológico en dicha enfermedad. De hecho existen diversos artículos donde se reporta control biológico de diferentes fitopatógenos usando aislamientos de BAFEs, lo que corrobora el gran potencial de este grupo de bacterias en biocontrol (Lanna et al., 2013; Zhan et al., 2011; Chung et al., 2015).

Para generar un tamizaje más estricto y restrictivo de los aislamientos seleccionados, estos se debieron evaluar bajo el modelo 4, en el cual *B. glumae* se asume dentro de la semilla. Para esta evaluación se usaron únicamente dos concentraciones  $10^6$  y  $10^8$  UFC/mL.

De acuerdo con los resultados (figuras 4 y 5, Anexo C), se puede observar que en este modelo de co-inoculación algunos aislamientos mostraron actividad biocontroladora *In vivo* contra *B. glumae*, en términos de disminución del grado de infección y mantenimiento de una longitud de vástago similar al control no inoculado. De esta manera se tuvieron en cuenta aquellos aislamientos que tuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto al control de enfermedad (semillas inoculadas sólo con *B. glumae*) para la variable grado de infección. Así, para la concentración de  $10^6$  UFC/mL se seleccionaron 9 aislamientos: 16A08, 15A09, MA3C2, 4P03, IT1C8, IM3C5, MA1C2, IGC4 e IGC1 (figura 23), en tanto para  $10^8$  UFC/mL se seleccionaron 8 aislamientos: MA3C2, IGC1, 4P03, 16A08, MA1C2, IGC4, IT1C8 y 12A04 (figura 5, anexo C).

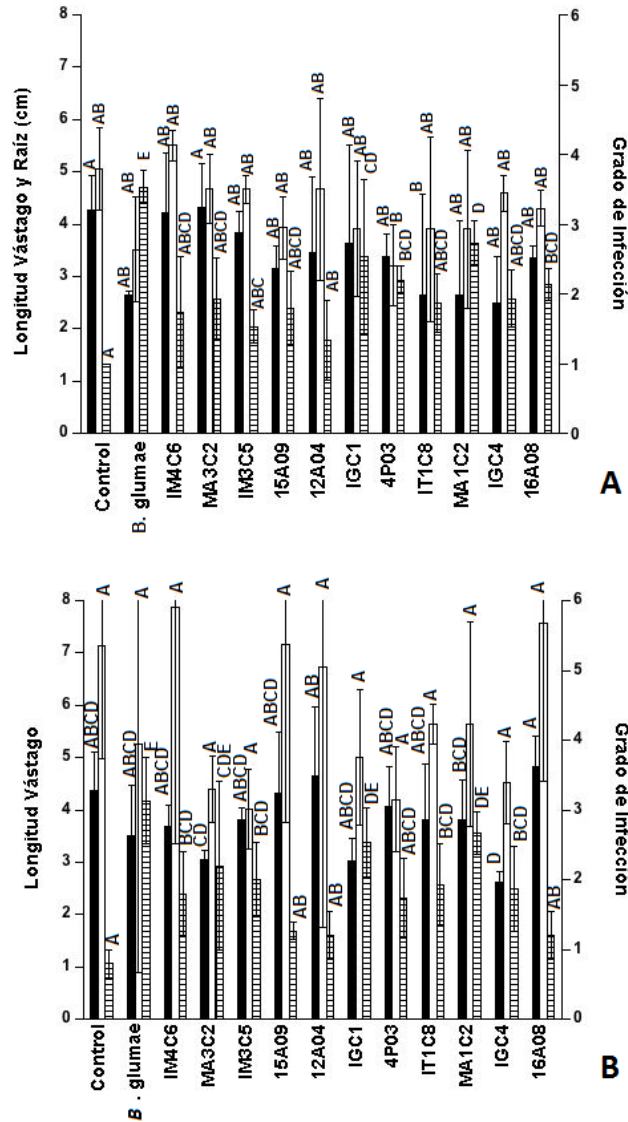
En relación a estos resultados se observó nuevamente un efecto de la concentración sobre la actividad de los aislamientos. Sin embargo, para conocer si los aislamientos son reproducibles se prefirió repetir los 12 aislamientos en un nuevo ensayo en el tiempo.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la concentración de  $10^6$  UFC/mL (figura 21, A), los aislamientos IM4C6, MA3C2, IM3C5, 15A09, 12A04, IGC1, 4P03, IT1C8, MA1C2, IGC4 y 16A08 se caracterizaron por mostrar disminución del grado de infección con diferencias estadísticas significativas en relación al control de enfermedad (*B. glumae*), sin embargo, no todos tuvieron una longitud de vástago similar al control no inoculado, destacándose los aislamientos IM4C6 y MA3C2, aunque se observó claramente una tendencia de todas las BAFEs evaluadas de tener una longitud de vástago superior al control de enfermedad a pesar de que la variabilidad no permitió ver diferencias significativas a excepción los aislados IT1C8, MA1C2 e IGC4 que claramente exhiben un vástago igual de pequeño que el tratamiento inoculado sólo con *B. glumae*.

De otra parte para la concentración de  $10^8$  UFC/mL los aislamientos IM4C6, MA3C2, IM3C5, 15A09, 12A04, IGC1, 4P03, IT1C8, IGC4 y 16A08 tuvieron disminución del grado de infección con diferencias estadísticas en relación al tratamiento control de enfermedad. En términos de la longitud de vástago ningún aislamiento mostró diferencias significativas en relación al tratamiento control de enfermedad, pero se destacaron las BAFEs 15A09, 12A04, 4P03, 16A08 e IM2C6 porque visualmente presentaron una longitud de vástago igual o mayor al control no inoculado (figura 21, B).

Para la selección final de aislamientos que fueron evaluadas bajo condiciones de invernadero, se tuvo en cuenta los resultados de los dos modelos de co-inoculación (cuando *B. glumae* era incorporada en el sustrato y en la semilla). De esta manera, los aislamientos 15A09, 16A08 y 4P03 se destacaron por que funcionaron en el modelo de *B. glumae* en sustrato en las tres concentraciones usadas y adicionalmente tuvieron actividad cuando *B. glumae* fue inoculada en semilla en las dos concentraciones evaluadas y en las dos repeticiones en el tiempo. Adicionalmente, se seleccionaron dos aislamientos más dado que funcionaron en dos concentraciones en el modelo de *B. glumae* en sustrato y además tuvieron reducción en el grado de infección con diferencias estadísticas para las dos concentraciones evaluadas en los dos ensayos realizados cuando *B. glumae* era inoculada en la semilla, estas BAFEs fueron IT1C8 y 12A04.

Cabe mencionar que para la evaluación de los BAFEs usando el modelo 4, se encontró al calcular la disminución del grado de infección, que para la concentración de  $10^8$  los aislamientos 16A08 y 12A04 muestran una reducción del 61,7% y la BAFE 4P03 del 62,7%, mientras en la concentración de  $10^6$  el aislamiento 12A04 muestra una reducción del 62,26%. De esta manera, en este modelo se presentó una reducción del grado de infección de hasta el 62,7%, mostrando nuevamente la alta capacidad de biocontrol de los aislamientos seleccionadas.



**Figura 21.** Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs contra *B. glumae* cuando esta es incorporada en la semilla (modelo 4). (A)  $10^6$  UFC/mL; (B)  $10^8$  UFC/mL

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza. En el caso donde los datos mostraron no cumplir con los supuestos y se les practico prueba de Kruskal Wallis

Respecto el aislamiento 4P03 se destaca los reportado por Blanco (2012) en la cual esta cepa mostró la disminución de la enfermedad causada por *R. solani* en tubérculos de papa criolla hasta de un 80% y presentando una recuperación de la longitud de vástago en relación al control de enfermedad. Así el presente estudio permite identificar la ampliación del espectro de esta cepa hacia patógenos bacterianos a nivel *In vivo*.



### 5.3.3. Evaluación de actividad biocontroladora de BAFEs contra *B. glumae* *In vivo* bajo condiciones de invernadero

Con el fin de evaluar la actividad biocontroladora de las aislamientos seleccionadas bajo condiciones más reales, se realizó un ensayo usando el modelo de aplicación 4 (*B. glumae* inoculada en semilla) llevándolo a invernadero, tal y como se describe en la metodología. Debe mencionarse que para este ensayo únicamente se usó la concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/mL de las aislamientos de BAFEs, en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente dado que hay un mayor número de aislamientos con actividad en esta concentración, adicionalmente porque la endospora es una estructura de resistencia que le facilita a las BAFEs tener un mayor *fitness* en ambientes hostiles (Ongena y Jaques, 2008) y por esta razón en la aplicación de un bioinsumo sería más ventajoso formular en endospora que en células vegetativas.

Para la cepa de *B. glumae* 3200-12 se ajustó el inóculo a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, de acuerdo a los resultados obtenidos de la estandarización del modelo de infección al vacío en semillas de arroz. Todos los inóculos fueron ajustados a la concentración requerida y se verificó a través de microgotas para conocer con mayor precisión la cantidad inoculada de cada bacteria (tabla 7)

**Tabla 7.** Concentración final de inóculos en ensayo de biocontrol de BAFEs bajo condiciones de invernadero

Cepa	Concentración inóculo (UFC o esporas/mL)
<i>B. glumae</i> 3200-12	$2,5 \times 10^8$
15A09	$3,7 \times 10^8$
4P03	$2,5 \times 10^8$
16A08	$2,7 \times 10^8$
IT1C8	$6,2 \times 10^8$
12A04	$2,6 \times 10^8$

Para la evaluación del efecto de los diferentes tratamientos sobre el desarrollo de la enfermedad de *B. glumae*, se midió la longitud de vástago y raíz de plantas de 10 y 30 días, adicionalmente se evaluó la evidencia de síntomas.. Para confirmar que adicional a

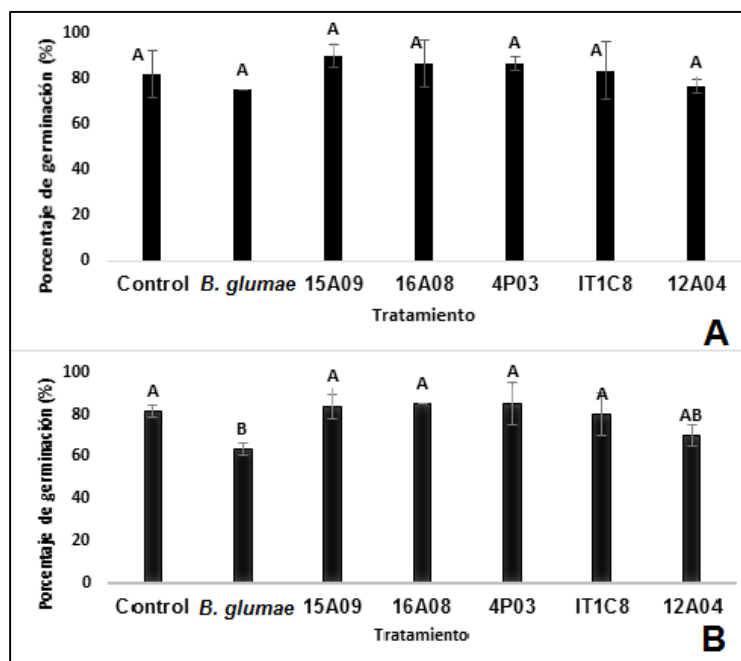
los parámetros agronómicos de crecimiento, había presencia de *B. glumae*, se usó la metodología propuesta para los conteos de la bacteria por gramo en plantas de 10 y 30 días, lo cual se contrastó con los resultados obtenidos en previamente en este mismo estudio.

Por otra parte se midió el porcentaje de germinación de las semillas a los cinco días postinoculación, para ello se usaron 60 semillas para cada tratamiento. En los resultados se consideraron los dos ensayos realizados en el tiempo, para el primero analizó empleando un ANOVA simple, el cual mostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamiento (figura 22 A), destacando que el porcentaje de germinación más bajo perteneció a las semillas del tratamiento del control de enfermedad (75%). Por otra parte, el control no inoculado mostró un porcentaje de germinación del 81,7% y los tratamientos con BAFEs tuvieron porcentajes mayores respecto al control de enfermedad y en especial para la cepa 15A09 se obtuvo el porcentaje de germinación más alto (90%) superando incluso ambos tratamiento control. En el segundo ensayo se observó la misma tendencia, pero esta vez sí hubo diferencias estadísticas entre el control de enfermedad respecto al control no inoculado y las BAFEs a excepción del aislamiento 12A04 (figura 22, B). Estos resultados evidenciaron que la bacteria patógena afecta de manera importante el porcentaje de germinación de las semillas de arroz y además que las BAFEs 15A09, 16A08, 4P03 e IT1C8 reducen el impacto de *B. glumae* sobre esta variable agronómica, manteniendo la germinación similar a un control no inoculado.

En relación al porcentaje de germinación Huynh et al., (2011) reporta que semillas de arroz recolectadas en campo con patógenos fúngicos y bacterianos, incluida *B. glumae*, exhiben un pobre porcentaje de germinación entre 15.50 y el 77.75% y al realizar un tratamiento de lavado con NaCl al 15%, dicho porcentaje incrementa entre 4 y 14%. Cabe mencionar, que en la literatura se ha reportado que aislamientos de *Bacillus* son capaces de incrementar el porcentaje de germinación de semillas de diferentes especies vegetales (Junges et al., 2013), lo que mostraría un plus para la aplicación de este tipo de agentes de control biológico.

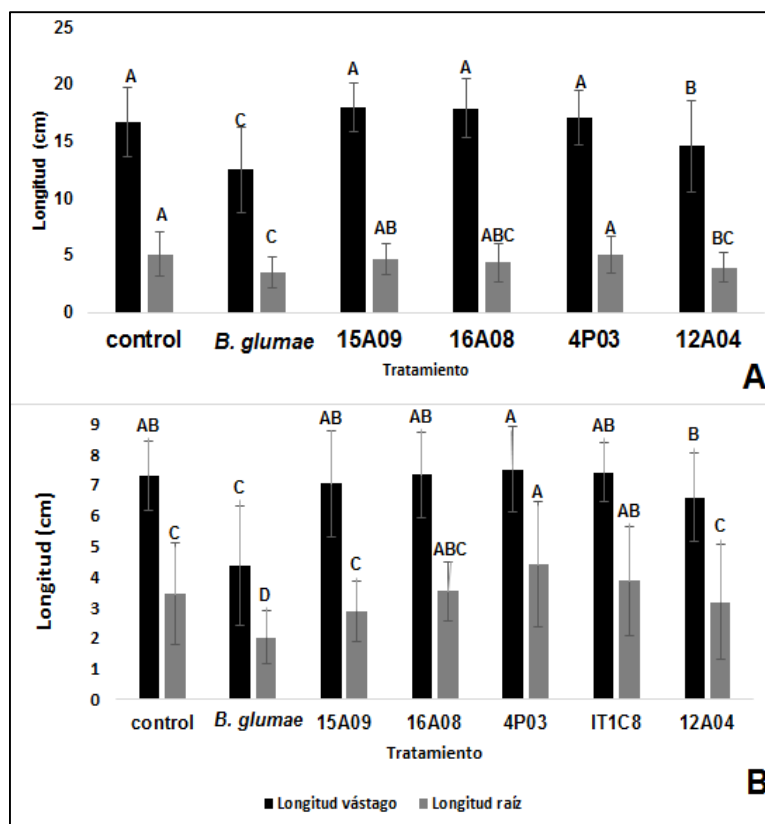
Respecto a las variables longitud de vástago y raíz para las plantas de 10 días postinoculación se encontró que estos dos parámetros fueron informativos, en especial la longitud de vástago corroborando los resultados obtenidos previamente a lo obtenido en la estandarización del modelo de infección de *B. glumae*, ya que el control no inoculado

muestra diferencias estadísticas en longitud de vástago en relación al control de enfermedad. De la misma manera, los tratamiento inoculados con los cinco aislamientos de BAFEs mostraron una mayor longitud de vástago con diferencias estadísticas respecto a la plántulas inoculadas únicamente con *B. glumae* (figura 23, A y B). Se destaca además los aislamientos 15A09, 16A08, IT1C8 y 4P03 quienes exhibieron una longitud de vástago mucho mayor al control no inoculado a pesar de que no hay diferencias estadísticas, esta información podría informar acerca de un efecto de promoción de crecimiento vegetal. Este supuesto puede respaldarse por el hecho de que existen varias aislamientos de BAFEs que son multifuncionales y además de ser controladores biológicos pueden mostrar otras características como promoción de crecimiento (Camelo, 2014). En este sentido Chung et al., (2015), encuentran que la cepa de *Bacillus* YC7007 muestra inducción de la resistencia sistémica en plantas de arroz contra las bacterias *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y *B. glumae*, adicionalmente esta cepa es capaz de promover crecimiento vegetal en plántulas de arroz con alto incremento de la tasa de germinación en relación al control no inoculado.



**Figura 22.** Efecto de diferentes tratamientos con aislados BAFEs porcentaje de germinación de semillas en inoculadas con *B. glumae* bajo condiciones de invernadero. En A) Ensayo 1 y en B) Ensayo 2.

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza.



**Figura 23.** Longitud de vástago y raíz de plántulas de 10 días de postinoculación dentro del ensayo de actividad *In vivo* de BAFEs en invernadero. (A) Ensayo 1, (B) Ensayo 2.

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza. En el caso donde los datos mostraron no cumplir con los supuestos y se les practico prueba de Kruskal Wallis

Es evidente que las plántulas del ensayo 1 mostraron una mayor longitud de vástago respecto al ensayo 2, pero se guarda la misma tendencia entre los tratamientos.

En relación a los conteos de *B. glumae* en las plantas (tabla 8) se encontró que el tratamiento en el cual sólo se inoculó *B. glumae* muestra un conteo de  $7,78 \times 10^6$  UFC de *B. glumae*/gr de planta para el primer ensayo y  $6,60 \times 10^5$  UFC de *B. glumae*/gr de planta para el segundo ensayo habiendo una diferencia de un orden de magnitud entre los dos ensayos. Sin embargo, ambos ensayos presentan la misma tendencia y evidencian que *B. glumae* permanece en plántulas inoculadas desde semillas por el periodo de evaluación. Para el tratamiento control no inoculado no se encontró colonias de *B. glumae* como era de esperarse.

En la tabla 8, se debe aclarar que en donde se presenta el símbolo "menor que" (<) es porque se encontraron un número de colonias inferior a 30 que es el límite inferior para el conteo confiable en la técnica de conteo en placa. Esta limitación se corrigió en el segundo ensayo sembrando una dilución menor.

**Tabla 8.** UFC de *B. glumae* por gramo de plantas 10 días de postinoculación dentro del ensayo de actividad *In vivo* de BAFEs en invernadero

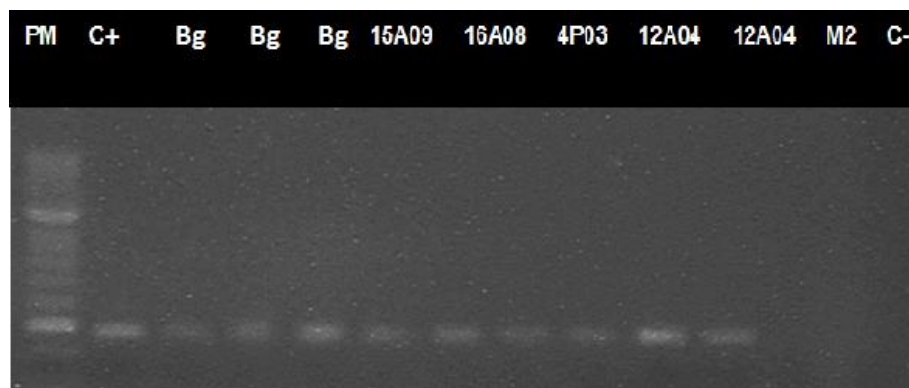
Tratamiento	Ensayo 1	Ensayo 2
	UFC de <i>B. glumae</i> /g de planta	UFC de <i>B. glumae</i> /g de planta
control	0,00	0,00
Bg 10 <sup>8</sup>	7,78x10 <sup>6</sup>	6,60x10 <sup>5</sup>
15A09	<10 <sup>4</sup> *	1,78x10 <sup>3</sup> *
16A08	<10 <sup>4</sup> *	4,39x10 <sup>3</sup> *
4P03	6,22x10 <sup>4</sup> *	1,67x10 <sup>3</sup> *
IT1C8	4,06x10 <sup>4</sup> *	4,89x10 <sup>3</sup> *
12A04	2,40x10 <sup>4</sup> *	3,44x10 <sup>3</sup> *

\* Diferencias estadísticas en relación al control de enfermedad (semillas inoculadas sólo con *B. glumae*) usando un Test de Duncan con el 95% de confianza

Claramente en las plantas tratadas con BAFEs se observó una alta reducción de la población de *B. glumae* de hasta 2 órdenes de magnitud respecto al control de enfermedad para todos los aislamientos evaluados. Calculando el porcentaje de reducción de la densidad de población de *B. glumae* en base al log de las UFC por gramo obtenidas en las plantas de cada tratamiento se encontró reducción en un rango desde el 21,9% (12A04) hasta del 40,13% (15A09).

Para confirmar que las colonias del conteo desde el medio S-PG si correspondieran a *B. glumae* y por tanto validar el conteo se realizó un aislamiento a King B donde se confirmó la morfología y posteriormente se realizó la PCR de acuerdo a la metodología propuesta. Para cada tratamiento se tomó un aislamiento y en el caso del tratamiento con sólo la cepa de *B. glumae* y el tratamiento con BAFE 12A04 se tomó más de un aislamiento ya que se mantenía una buena cantidad de colonias.

De acuerdo con los resultados de la PCR (figura 24), todos los aislamientos presuntivos para *B. glumae* amplifican con los *primers* usados (Sayler et al., 2006) de una forma similar al control (+) de *B. glumae*, en tanto un morfotipo de las plantas control no amplifican. De tal manera que, el conteo es válido y efectivamente los resultados corresponden a la densidad de población de *B. glumae* en la planta.



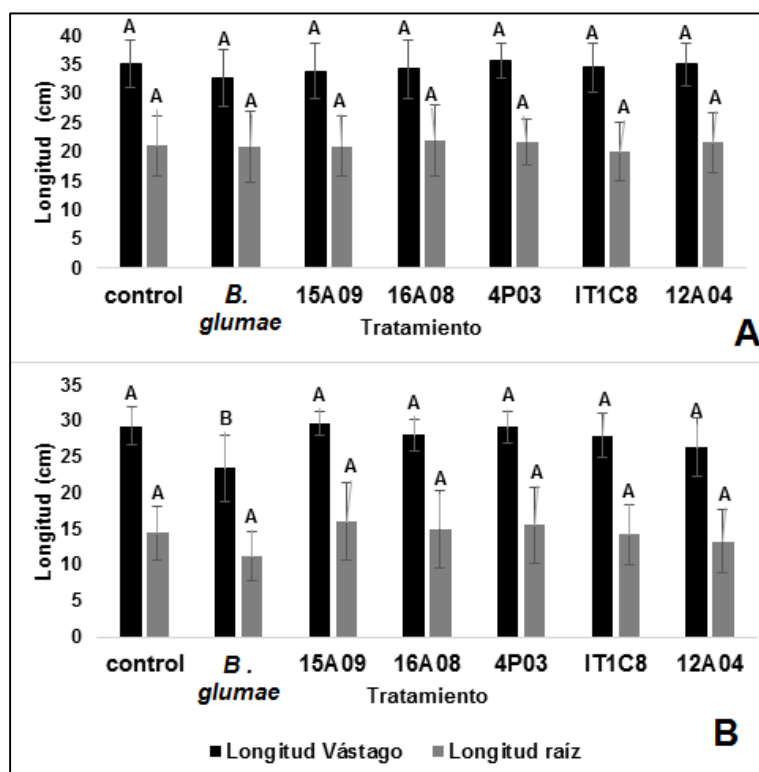
**Figura 24.** PCR aisladas presuntivas de *B. glumae* en ensayo de invernadero para plantas de 10 días postinoculación

\*M2 correspondía al control negativo y era un morfotipo diferente a *B. glumae* aislados de las plantas sin inocular y C- es el blanco de reacción. El tamaño del fragmento obtenido fue de 282 pb con los primer y condiciones de Sayler et al., (2006).

En el ensayo de 30 días postinoculación, se encontró respecto a la longitud de vástago diferencias estadísticas entre el control no inoculado y el control de enfermedad en el segundo ensayo, en tanto que en el primero el ANOVA no mostró diferencias entre los tratamientos. A pesar de las diferencias este sugiere nuevamente que la longitud de vástago es un parámetro importante, siendo un posible síntoma de enfermedad la disminución en esta variable en relación a un control no inoculado. Todos los tratamientos con aislamientos de BAFEs son mayores en longitud en relación al control de enfermedad con diferencias estadísticas (Figura 25, A y B). El aislamiento 4P03 había mostrado recuperación de la longitud de vástago en el trabajo de Blanco, (2012) bajo un esquema de control en condiciones de invernadero para *R. solani* en papa criolla.

En relación al conteo de UFC de *B. glumae*/gr de vástago o raíz (Tabla 9) se observa una clara disminución de dos órdenes de magnitud en el primer ensayo respecto a las plantas sólo inoculadas con *B. glumae* a nivel del vástago de la planta (aislamientos 15A09, 4P03 e IT1C8) en el caso de la raíz sólo de un orden de magnitud para las aislamientos (15A09, 4P03 y 16A08), en tanto en el segundo ensayo se observó disminución de dos órdenes de

magnitud de todas las BAFEs evaluadas en vástago como para raíz y para el aislamiento 4P03 hubo una disminución de hasta tres órdenes de magnitud en caso de vástago. Acá nuevamente para el primer ensayo se encontraron conteos donde el número de colonias no era suficiente para darle validez al ensayo por tanto se reportan con el mismo símbolo previamente mencionado, este problema fue corregido en el segundo ensayo de invernadero.



**Figura 25.** Longitud de vástago y raíz de plantas de 30 días de postinoculación dentro del ensayo de actividad *In vivo* de BAFEs en invernadero

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, mediante un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza.

Calculando el porcentaje de reducción del efecto del tratamiento con aislamientos de BAFEs, se encontró hasta 57% en vástago (4P03). Debe aclararse que para la elaboración de estos cálculos se usó el log de UFC por gramos de cada uno de los órganos y no directamente las UFC. Así, las BAFEs tienen la capacidad de reducir la población de *B. glumae* en dos órdenes de magnitud en los dos órganos de la planta, incluso hasta tres órdenes para el aislado 4P03 en vástago, adicionalmente reducen síntomas asociados a

la enfermedad como lo observado en los ensayos en semilla y en la recuperación de longitud de vástago de los ensayos de invernadero.

**Tabla 9.** UFC de *B. glumae* por gramo de plantas 30 días de postinoculación dentro del ensayo de actividad *In vivo* de BAFEs en invernadero

Tratamiento	Ensayo 1		Ensayo 2	
	UFC de <i>B. glumae</i> /g de vástago	UFC de <i>B. glumae</i> /g de raíz	UFC de <i>B. glumae</i> /g de vástago	UFC de <i>B. glumae</i> /g de raíz
<b>Control</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Bg 10<sup>8</sup></b>	1,39x10 <sup>5</sup>	6,00x10 <sup>4</sup>	2,51x10 <sup>5</sup>	2,45x10 <sup>5</sup>
<b>15A09</b>	<1,0x10 <sup>3</sup> *	<1,0x10 <sup>3</sup> *	<1,0x10 <sup>3</sup> *	1,11x10 <sup>3</sup> *
<b>16A08</b>	<1,0x10 <sup>4</sup> *	<1,0x10 <sup>3</sup> *	1,22x10 <sup>3</sup> *	1,22x10 <sup>3</sup> *
<b>4P03</b>	<1,0x10 <sup>3</sup> *	<1,0x10 <sup>3</sup> *	<1,0x10 <sup>2</sup> *	<1,0x10 <sup>3</sup> *
<b>IT1C8</b>	<1,0x10 <sup>3</sup> *	2,28x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>3</sup> *	5,39x10 <sup>3</sup> *
<b>12A04</b>	5,39x10 <sup>4</sup> *	3,11x10 <sup>4</sup>	1,22x10 <sup>3</sup> *	2,67x10 <sup>3</sup> *

\* Diferencias estadísticas en relación al control de enfermedad (semillas inoculadas sólo con *B. glumae*) usando un Test de Duncan con el 95% de confianza

El trabajo de Hikichi et al., (1993) muestran el control de *B. glumae* usando ácido oxolinico, que es evidenciado a través de la reducción de la severidad de la enfermedad en panicula en hasta un 92%, pero adicionalmente reporta la reducción de la población de la bacteria fitopatógena entre uno y tres órdenes de magnitud en las plantas de arroz durante todo el ciclo de cultivo. Aunque estos resultados son importantes, se debe mencionar que el ácido oxolinico está prohibido en varios países debido a la aparición de aislamientos resistentes y su efecto residual en el medio ambiente que muestra niveles de toxicidad (Maeda et al., 2008) lo cual indica que aún no existe un tratamiento la enfermedad causada por *B. glumae*

Por otra parte, Hikichi et al., (1993) también reporta una importante relación directa entre la densidad poblacional de *B. glumae* y la severidad de la enfermedad en términos observados en la planta. Esto sugiere que el control de la enfermedad esta asociado a la disminución de la densidad poblacional de *B. glumae* en la planta. En este contexto, la disminución de la población del patógeno durante la fase vegetativa podría ser una indicación del control de *B. glumae*, no únicamente en términos de la pudrición de las semillas o plántulas de arroz, sino incluso en estadios posteriores donde se logro la reducción de la población tanto en plántulas de 10 días como en plantas de 30 días.

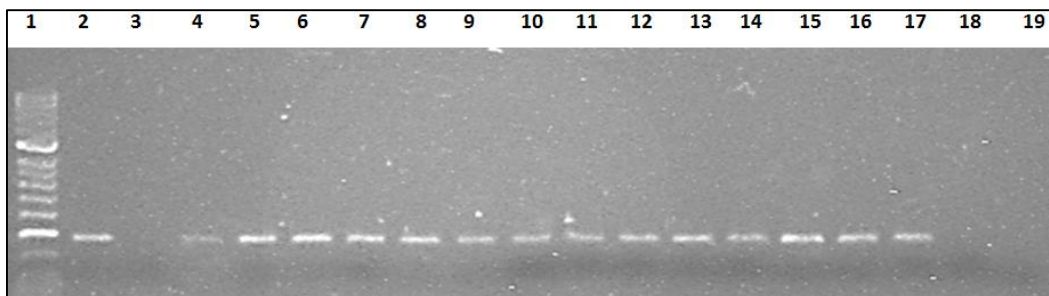


Como las plantas de 30 días no mostraron síntomas, no se pudo calcular un índice de severidad de la enfermedad y mucho menos el efecto de los aislamientos de BAFEs en la reducción de la misma, pero es importante la reducción de la población del fitopatógeno lo que podría ser resultado de antagonismo directo del microorganismo fitopatógeno o inducción de resistencia sistémica en la planta. A propósito de este último término, Chung et al., (2015) reporta que el tratamiento con una cepa de *Bacillus* aplicado por *spray* junto con la adición de inóculo en las raíces en una concentración de  $2,0 \times 10^7$  UFC/mL, induce resistencia sistémica en plantas de arroz con una eficacia de control de 65,2%, en tanto, el filtrado de un cultivo de 60 horas muestra una reducción de la enfermedad en un 70,8%. Estos hallazgos generan antecedentes respecto al control biológico de *B. glumae* bajo condiciones de invernadero usando aislamientos de *Bacillus*.

De manera importante, el presente estudio muestra claramente la actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs nativos de suelos colombianos contra una cepa colombiana de *B. glumae* tanto a nivel *In vitro* como a nivel *In vivo* en semillas de una variedad de arroz colombiana que es ampliamente usada en zonas arroceras del país.

Para finalizar este estudio, se confirmó aislamientos de colonias presuntivas de *B. glumae* en las plantas de 30 días, encontrando nuevamente que todos los aislamientos amplifican por PCR con *primers* específicos (figura 26) indicando la validez de los conteos realizados en el medio S-PG. Así mismo, se verificaron morfotipos que aparecen tanto en las placas de los tratamientos que fueron inoculados con *B. glumae*, como en el control no inoculado, atendiendo a terminar de verificar los conteos realizados. En este sentido se encontró que la morfología de estos morfotipos no corresponden a los descritos previamente y en la PCR no amplifican indicando que colonias consideradas no presuntivas para *B. glumae* en el medio semiselectivo no corresponden a *B. glumae* como era de esperarse.

Pocos estudios existen de control biológico *In vivo* de *B. glumae* (Chung et al., 2015) y hasta ahora este es el primero que se realiza sobre semillas de arroz mostrando resultados interesantes que pueden abrir avenidas hacia una investigación más profunda y exhaustiva en este tema, asumiendo que no es para nada descabellado realizar el control de la enfermedad en la semilla ya que varios autores han propuesto la semilla como mayor reservorio de la enfermedad (Ham et al., 2011) y la bacteria *B. glumae* es encontrada normalmente en semillas sintomáticas y asintomáticas en campo (Fory et al., 2014).



**Figura 26.** PCR aisladas presuntivas de *B. glumae* en ensayo de invernadero para plantas de 30 días postinoculación. (1) Patrón de peso, (2) control +, (3) blanco reacción, (4-6) Bg vástago, (7-8) Bg raíz, (9) 15A09 vástago, (10) 15A09 raíz, (11) 16A08 vástago, (12) 16A08 raíz, (13) 4P03 vástago, (14) 4P03 raíz, (15-16) 12A04 vástago, (17) 12A04 raíz, (18) morfotipo 2 desde plantas sin inocular (C- 1), (19) morfotipo 3 desde plantas sin inocular (C- 2)

## 5.4. Caracterización molecular de aislamientos de BAFEs con actividad contra *B. glumae*

El análisis molecular de los 26 aislamientos que tienen actividad contra tres cepas de *B. glumae* a nivel *In vitro*, muestra que 12 aislamientos (IM2C6, IM2C10, IM2C8, MA3C9, 7A06, IA1C10, MA3C2, MM4C4, IM2C2, 4P03, IM2C5 y 15A09) de 26 (46,15%) tienen alta similitud a aislamientos de *Bacillus subtilis*. Estos 12 aislamientos tienen actividad degradadora de AHLs de *B. glumae* a nivel *In vitro* pero solamente cuatro aislamientos (15,4% de las 26 aislamientos) tienen actividad *In vivo* evaluada en semilla y de estos aislamientos sólo dos fueron llevados a invernadero (4P03 y 15A09) y muestran reducción de la población de *B. glumae* en la planta (figura 27).

Dentro del análisis se encontró seis (23,1%) aislamientos de BAFEs que se agrupan en un clado (16A08, 12A04, IGC3, IT1C15, IGC1, IM4C3) con alta similitud a las especies *B. methylotropicus* y *B. amyloliquefasciens*, de estos, tres aislamientos (11,5% del total de las 26 aislamientos) muestran actividad en semilla y dos (12A04 y 16A08) fueron llevados a invernadero mostrando disminución de la población de *B. glumae*.

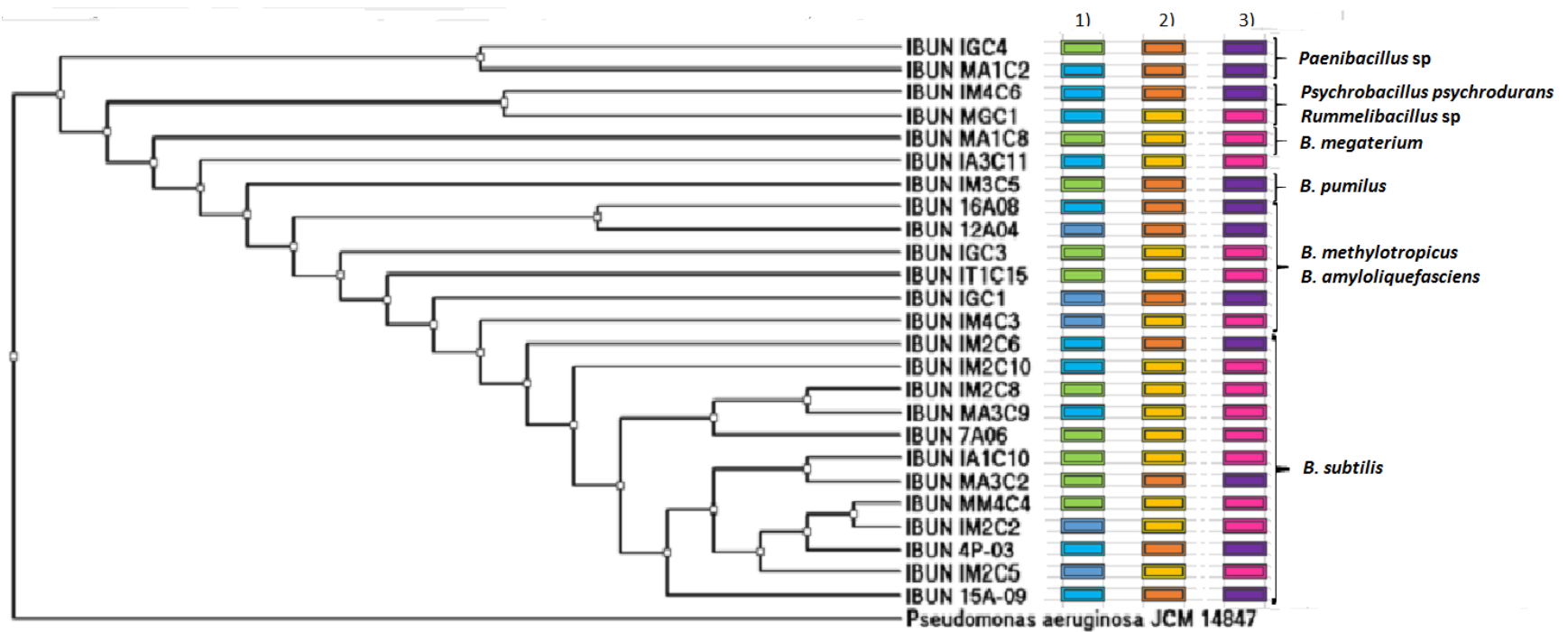
Además de estos grupos encontrados, hubo una cepa cercana a *B. pumilus* (IM3C5), una a *B. megaterium* (MA1C8), además de dos aislamientos del género *Paenibacillus* (IGC4, MA1C2) y uno del género *Psychrobacillus* (IM4C6) y otro del género *Rummebacillus* (IGC1). Cabe destacar que de estos aislamientos sólo la *B. megaterium* y *Rummelibacillus* no muestran actividad en semilla y por ende ninguno fue llevado a invernadero.

Adicionalmente, la cepa IA3C11 se agrupó con *Bacillus* sp como mejor *match* de acuerdo a los resultados obtenidos en la base NCBI (datos no mostrados) y aunque se encontró también cercana a *B. cereus*, sin embargo, cabe mencionar que esta cepa no tienen actividad biocontroladora en los ensayos a nivel *In vivo* en plantas de arroz.

Esta caracterización molecular no permitió definir especie para los aislamientos de BAFEs evaluados, ya que en la base de datos NCBI se presentaron varios *match* con el 100% de similitud para las secuencias. Por lo que sería importante usar otro tipo de genes para hacer un análisis multilocus que aporte más información para la identificación de los aislamientos. El análisis tampoco mostró una correlación entre la filogenia arrojada molecularmente respecto a las características fenotípicas, indicando que no hay un clado o grupo en particular que muestren ciertos resultados en la evaluación de actividad *In vitro* e *In vivo* (figura 27).

De esta manera, sólo se puede destacar que varios autores han encontrado que especies de *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefasciens* (Ryu et al., 2004; Zhang et al., 2002, Ryu et al., 2003) y *Paenibacillus* sp (Li et al., 2007) son controladores biológicos, indicando nuevamente el potencial de los aislamientos evaluadas en el presente trabajo.





Convenciones

- |   |   |  |
|---|---|--|
| 1) Actividad lactonasa <i>In vitro</i> contra cepas de Bg | 2) Actividad biocontrol <i>In vivo</i> , Bg en sustrato | 3) Actividad biocontrol <i>in vivo</i> , Bg en semilla |
| Contra 1  | SI  | SI   |
| Contra 2  | NO  | NO   |
| Contra 3  |   |  |
| Ninguna   |   |  |

Figura 27. Análisis filogenético resumen de 25 aislamientos de BAFEs evaluados en el control biológico de *B. glumae* *In vitro* e *In vivo*

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1. Conclusiones

Se adaptaron dos modelos de infección de *B. glumae*, uno asumiendo que *B. glumae* se encuentra en las semillas y el otro donde *B. glumae* se encuentra en el sustrato. Ambos modelos son reproducibles y consistentes para replicas y repeticiones en el tiempo en función del desarrollo de la infección, lo cual permite su uso para la evaluación de la actividad antagonista de aislamientos de BAFEs *In vivo*.

Los modelos de infección tienen un efecto dosis-respuesta en el desarrollo de los síntomas en plántulas de arroz respecto a la concentración de *B. glumae*, el cual es directamente proporcional para el grado de infección e inversamente proporcional para la longitud de vastago. Así, se encontró que la longitud de vástago es una variable agronómica que se encuentra afectada por la infección de *B. glumae* en plántulas de más de 10 días de germinadas, e incluso en plantas de 30 días postinoculación,

Para los dos modelos de infección se pudo re-aislar la cepa de *B. glumae* en plántulas de 10 días, indicando que la bacteria que se está colocando artificialmente es la causante de los síntomas observados. Adicionalmente, la bacteria permanece en la planta y es posible re-aislarla a los 30 días.

Mediante ensayos de antagonismo *In vitro* se pudieron seleccionar 26 aislamientos de BAFEs, de 74 evaluados, con actividad contra tres cepas de *B. glumae* colombianas. De estos aislamientos con actividad la mayoría son de rizosfera de iraca, seleccionadas en trabajos previos del grupo por su actividad contra otros fitopatógenos. Adicionalmente 46,2% de los aislamientos evaluadas en este trabajo tienen actividad contra al menos una cepa de *B. glumae* estableciendo el gran potencial biocontrolador de estos aislamientos.

En ensayos *In vivo* se seleccionaron dos modelos de co-inoculación de los seis evaluados, estos son cuando se usa una infección de *B. glumae* en sustrato (modelo 6) y en semilla (modelo 4), ya que permitieron además de visualizar el desarrollo de la enfermedad, identificar el potencial biocontrolador de las aislamientos de BAFEs evaluadas.

Se encontraron 12 aislamientos de BAFES que presentan actividad biocontroladora cuando son evaluadas partiendo de la infección de *B. glumae* en sustrato, mostrando una

reducción importante de la enfermedad (hasta 63,5%). Al evaluar los mismos aislamientos partiendo de la infección en semilla se destacaron cinco (12A04, 15A09, 4P03, IT1C8, 16A08), que funcionan en dos concentraciones y son consistentes en el tiempo. En este último modelo se mostró reducción de hasta el 62,4% de la enfermedad por parte de los aislamientos.

Bajo condiciones de invernadero de los cinco aislamientos evaluados se encontró que todos mostraron alto potencial biocontrolador a los 10 y 30 días, disminuyendo la concentración de *B. glumae* por gramo de planta en aproximadamente dos órdenes de magnitud. Adicionalmente, los tratamientos con aislamientos muestran mayor longitud de vástago en relación al control de enfermedad, evidenciando que BAFEs disminuyen el efecto del patógeno sobre esta variable de crecimiento.

## 6.2. Recomendaciones.

Es importante poder evaluar de una manera amplia los mecanismos de control biológico de los aislamientos 15A09 y 4P03 los cuales resultan promisorios en el presente estudio, con el fin de diseñar estrategias para mejorar la actividad biocontroladora de un eventual producto comercial desarrollado a partir de estos aislamientos.

Es importante evaluar los aislamientos de BAFEs seleccionados en otros estados fenológicos de plantas de arroz infectadas con *B. glumae*, como la floración o llenado de grano, para poder determinar cual podría ser el momento de mayor efectividad para el control de este agente fitopatógeno.

En cuanto al modelo de inoculación de *B. glumae* en sustrato desarrollado en este trabajo, es importante validar el modelo de infección en sustrato partiendo de suelo directamente en un diseño de "dosis respuesta", con el objeto de determinar cual es la concentración a partir de la cual se desarrollan los síntomas de la enfermedad bajo dichas condiciones, e incluso complementar dicha evaluación con la determinación del potencial biocontrolador de las BAFEs bajo esas condiciones.

Finalmente, se sugiere que los aislamientos que mostraron resultados promisorios bajo condiciones de invernadero puedan ser evaluadas en campo en condiciones de infección natural de *B. glumae*, con el fin de conocer si tienen el mismo potencial y ampliar su aplicación a una situación real.

## ANEXO A: Composición medios de cultivo

Agar Luria-Bertani (LB)

Reactivo	gramos/L
<b>Triptona</b>	10
<b>NaCl</b>	10
<b>Extracto de levadura</b>	5
<b>Agar</b>	14

Medio S-PG (semiselectivo de *B. glumae*)

Reactivo	gramos/L
<b>Sorbitol</b>	10,0
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	5,00
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,30
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1,20
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>	0,25
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	0,024
<b>EDTA-Fe</b>	0,010
<b>Metil violeta</b>	0,001
<b>Rojo de fenol</b>	0,020
<b>L-cisteina</b>	0,000010
<b>Cetrimida</b>	0,010
<b>Ampicilina</b>	0,010
<b>Agar</b>	14

Medio King B

Reactivo	gramos/L
<b>Proteasa peptona</b>	20,0
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,50
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>	1,50
<b>Glicerol al 100%</b>	8,70
<b>Agar</b>	14



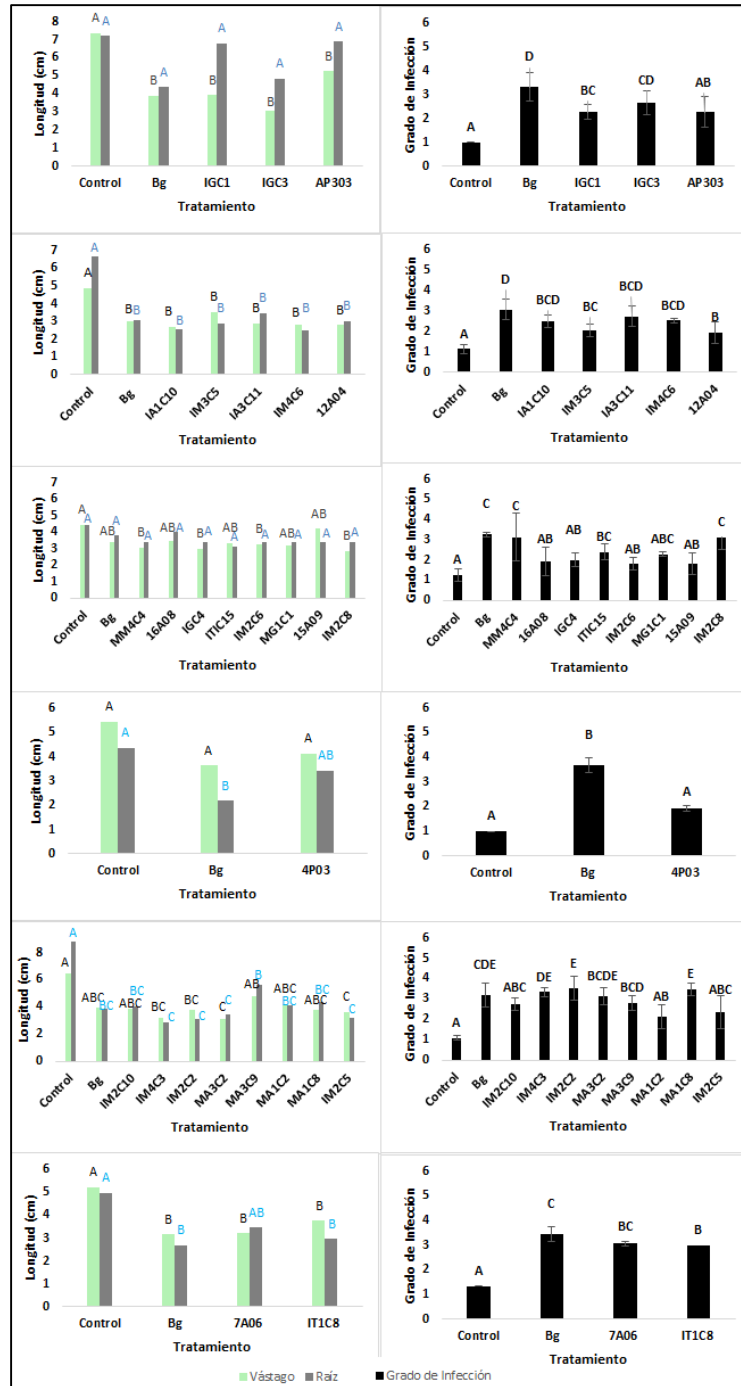
## ANEXO B: Conteos de UFC de *B. glumae* por gramo de planta en ensayo de invernadero de biocontrol de BAFEs

Plantas 10 días postinoculación				
Tratamiento	Dilución	Replica 1	Replica 2	Replica 3
<b>Control</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	0	0	0
<b><i>B. glumae</i> 10<sup>8</sup></b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	2	5	0
	1,00E-03	31	69	36
	1,00E-02	102	98	102
<b>15A09</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	2	6	4
<b>16A08</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	6	10	0
<b>4P03</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	4	7	6
	1,00E-02	12	14	30
<b>IT1C8</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	8	13	16
<b>12A04</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	6	24	16
	1,00E-02	73	76	67

Plantas 30 días postinoculación				
Tratamiento	Dilución	Replica 1	Replica 2	Replica 3
<b>Control Vástago</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	0	0	0
<b>Control Raíz</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	0	0	0
<b><i>B. glumae</i> 10<sup>8</sup> Vástago</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	31	62	32
<b><i>B. glumae</i> 10<sup>8</sup> Raíz</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	18	14	22
<b>15A09 Vástago</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	0	3	2
<b>15A09 Raíz</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	0	0	3
<b>16A08 Vástago</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	6	1	5
<b>16A08 Raíz</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	6	1	1
<b>4P03 Vástago</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	2	6	0
<b>4P03 Raíz</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0

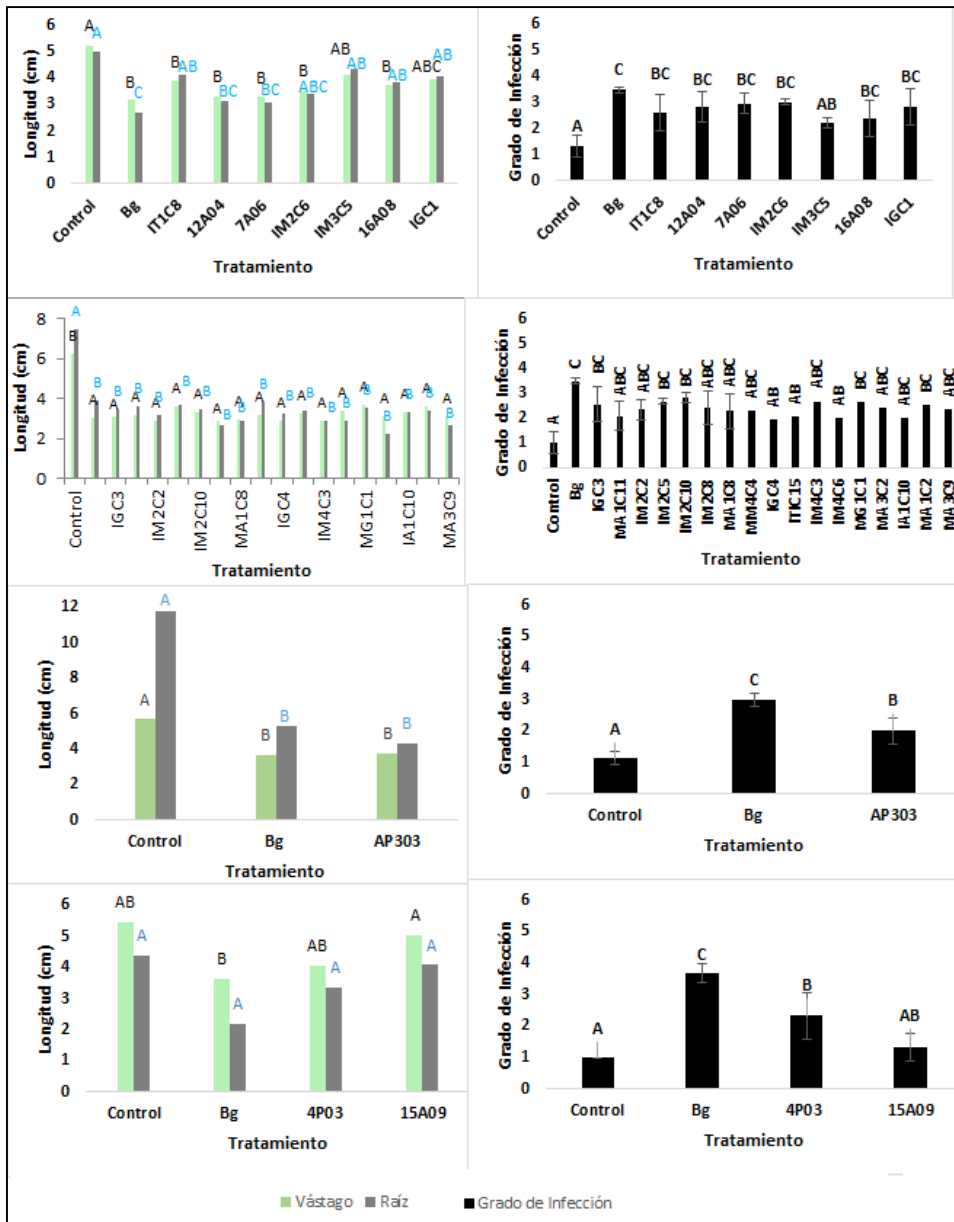
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	0	5	0
<b>IT1C8</b> <b>Vástago</b>	1,00E-07	0	0	0
	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	2	1	0
	1,00E-07	0	0	0
<b>IT1C8 Raíz</b>	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	3	1	16
	1,00E-07	0	0	0
<b>12A04</b> <b>Vástago</b>	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	10	4	14
	1,00E-07	0	0	0
<b>12A04 Raíz</b>	1,00E-05	0	0	0
	1,00E-03	0	0	0
	1,00E-02	34	2	13
	1,00E-07	0	0	0

## ANEXO C: Resultados primera repetición de la evaluación actividad biocontroladora de BAFEs a nivel *In vivo* contra *B. glumae* en semillas de arroz.



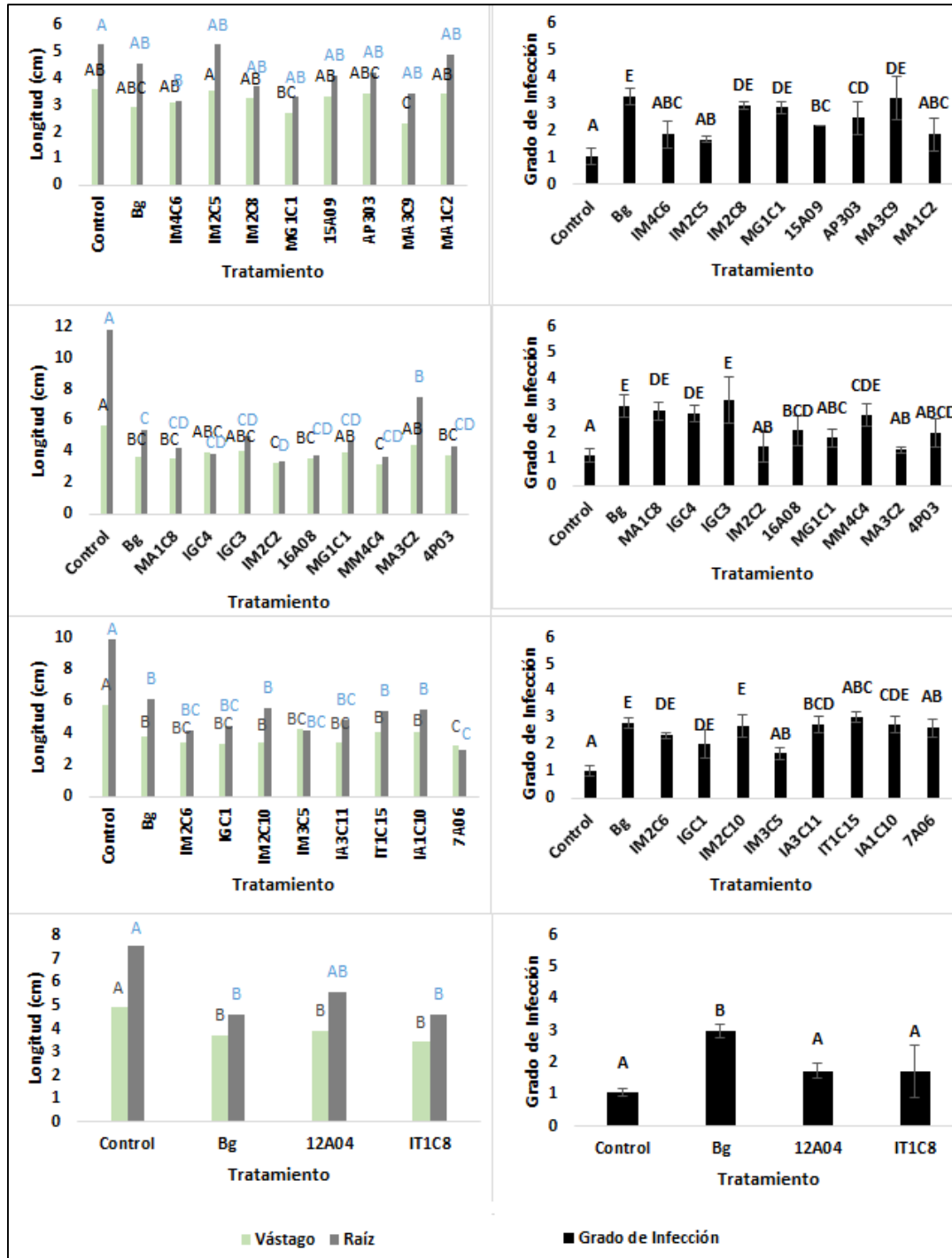
**Figura 1.** Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs, a concentración de  $10^6$  UFC/mL, contra *B. glumae* cuando esta es incorporada en sustrato (modelo 6)

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza.



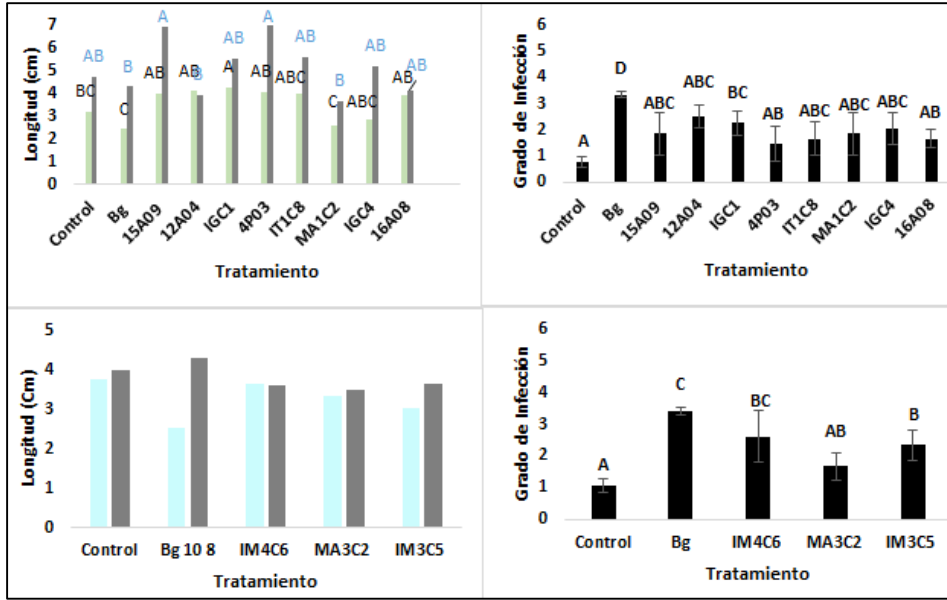
**Figura 2.** Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs, a concentración de  $10^7$  UFC/mL, contra *B. glumae* cuando esta es incorporada en sustrato (modelo 6)

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza.



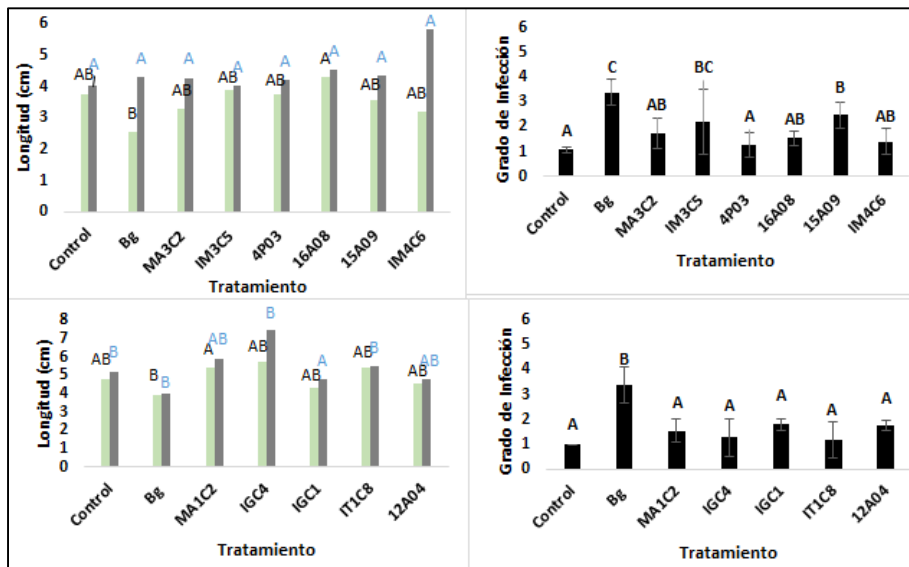
**Figura 3.** Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs, a concentración de  $10^8$  UFC/mL, contra *B. glumae* cuando esta es incorporada en sustrato (modelo 6)

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza. En el caso donde los datos mostraron no cumplir con los supuestos y se les practico prueba de Kruskal Wallis



**Figura 4.** Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs, a concentración de  $10^6$  UFC/mL, contra *B. glumae* cuando esta es incorporada en la semilla (modelo 4)

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, mediante un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza. En el caso donde los datos mostraron no cumplir con los supuestos y se les practico prueba de Kruskal Wallis



**Figura 5.** Evaluación de actividad biocontroladora de aislamientos de BAFEs, a concentración de  $10^8$  UFC/mL, contra *B. glumae* cuando esta es incorporada en la semilla (modelo 4)

\*Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con cada una de las variables, empleando un Test de Duncan con un nivel del 95,0% de confianza. En el caso donde los datos mostraron no cumplir con los supuestos y se les practico prueba de Kruskal Wallis

# Bibliografía

Abarca C, Martínez A, Caro M y Quintero R. (1992), Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. Aisawai. Universidad: Ciencia y tecnología. Vol.2.(3): 51-56.

Abeyasinghe S. (2009). The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* CA32r on control of *Sclerotium rolfsii* on *Capsicum annum*. Archives of Phytopathology and Plant Protection. Vol 42(9): 835-846.

Acevedo M, Castrillo W y Belmote U. (2006). Origen, evolución y diversidad del arroz. Agronomía Trp. 56(2): 151-170.

Bais H, Fall R and Vivanco J. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology. Vol 134: pp 307-319.

Beltrán-Molina J, Cuellar-Cuestas I y Suarez-Moreno Z. (2014). Diagnostico y epidemiología: nuevas estrategias de estudio de las enfermedades bacterianas del arroz en Colombia. Revista Arroz Vol 61. No 507: 4-22.

Beric T, Kojic M, Satnkovic S, Topisirovic L, Degrassi G, Myers M, Venturi V y Fira D. (2012) Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. Natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. Food Technol. Biotechnol. 50:25-31  
Beltran J. (2015).

Blanco D. (2012). Evaluación de Bacilos Aerobios Formadores de Endospora (BAFEs) para el control biológico de *Rhizoctonia solani* Kuhn en el cultivo de papa criolla (*solanum tuberosum* Grupo Phureja). Tesis para optar el título de M. Sc. En Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

BoekeMa, B., Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., Rosenau, F., Jaeger, K.E. and Tommassen, J. (2007) Hexadecane and tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3838-3844.

Bouizgarne, B. 2013. Bacteria for plant growth promotion and disease management. In: *Bacteria in Agrobiology, Disease Mangement*, ed. by D. K. Maheshwari, pp. 15-34. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg.

Burkholder, W.H. (1942) Three bacterial plant pathogens: Pathogens *Caryophylli* sp, *Phytomonas alliiicola* sp, and *Phytomonas manihotis* (Arthaud-Berthet et Bondar) Viegas. *Phytopathology* 32, 141-149.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. and Garrity, G.M. (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. New York: Springer.

Burkholder, W.H. (1950) Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40, 115-117. 59

Chain, P.S.G., Deneff, V.J., Konstantinidis, K.T., Vergez, L.M., Agulla, L., Reyes, V.L., Hauser, L., Cardova, M., Gomez, L., Gonzalez, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S.A., Marx, C.J., Parnell, J.J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W.J., Tsoi, T.V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B. and Tiedje, J.M. (2006) *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multireplicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19990-19997.



- Caballero-Mellado J, Martinez-Aguilar L, Paredes-Valdez G and Estrada-De-Los Santos P. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1165–1172.
- Camelo C, (2014). Efecto de la selección rizosferica sobre la actividad promotora de crecimiento vegetal de bacterias aerobicas formadoras de endosporas provenientes del Uraba Antioqueño, Tesis para optar el grado de Magister en Microbiologia. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
- Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., and Ongena, M. (2011) Bacillus-based biological control of plant diseases. In *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*. Stoytcheva, M. (ed.). Rijeka, Croatia: InTech, pp. 274–302.
- Ceballos I, Mosquera S, Angulo M, Mira J, Argel L, Uribe-Vélez D, Romero-Tabarez, Orduz-Peralta S y Villegas V. (2012). Cultivable bacteria populations of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Environmental Microbiology*. Vol 64 (3): 641-653.
- Chen WM, James EK, Coenye T, Chou JH, Barrios E, De Faria SM, Elliot GN, Sheu SY, Sprent JI and Vandamme P. 2006. *Burkholderia mimosarum* sp.nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. From Taiwan and South America. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1847–1851.
- Chien, C. C., and Y. C. Chang. (1987) The susceptibility of rice plants at different growth stages and of 21 commercial rice varieties to *Pseudomonas glumae*. *Journ. of Agric. Res. of China* 36 (3): 302-310
- Cho, H., Park S., Ryu, C., Kim, J., Kim, J and Park SH. (2007). Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 14-23
- Chun, H., Choi, O., Goo, E., Kim, N., Kim, H., Kang, Y., Kim, J., Moon, J.S. and Hwang, I. (2009) The quorum sensing-dependent gene *KatG* of *Burkholderia glumae* is important for protection from visible light. *Journal of Bacteriology* 191, 4152-4157.
- Coenye, T., LiPuma, J., Henry, D., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert, D. and Vandamme, P. (2001) *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 271-279.
- Coenye, T. and Vandamme, P. (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 5, 719-729.
- Compant J, Coenye T, Clement C & Barka E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev* 32: 607–626
- Correa-Victoria, F. 2006. Asociación de la bacteria *Burkholderia glumae* al complejo acarohongobacteria en Panamá. Observaciones sobre muestras afectadas por el complejo en campos de arroz de Panamá. Aislamientos y pruebas de patogenicidad. [http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/jspui/bitstream/123456789/6691/1/complejo\\_acaro\\_costa\\_rica.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/jspui/bitstream/123456789/6691/1/complejo_acaro_costa_rica.pdf) (Consultado 15 marzo. 2013).
- Cottyn, B., Cerez, M.T., VanOutryve, M.F., Barroga, J., Swings, J. and Mew, T.W. (1996). Bacterial diseases of rice. Pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. *Plant Disease* 80, 429-437.

- Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T.W. and Swings, J. (2001) Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology* 91, 19992-292.
- Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X.C., Moadel, T., Schweitzer, A.D., Aisen, P., Nosanchuk, J.D. and Casadevall, A. (2007) Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *Plos One* 2.
- Denny, T.P., Carney, B.F. and Schell, M.A. (1990) Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3, 293-300.
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J.J., Kim, J., Hwang, I. and Venturi, V. (2007) Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4950-4958.
- Diago, M., J.O Ospina, C.R. Pérez, E. Saavedra, J. Echeverri, A. Cuevas, L.A. Castilla, D.F. Pineda, O. Ramírez y N. Bejarano. 2009. Un buen manejo del cultivo, verdadera barrera contra el añublo bacterial. *Revista Arroz* 57(482):30-38.
- Dong YH, Wang L, Xu J, Zhang, H, Zhang X. (2001). Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813-817.
- Dong YH, Xu JL, Li XZ & Zhang LH (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3526–3531.
- Dong YH, Gusti A, Zhang Q, Xu J and Zhang L. (2002). Identification of Quorum-Quenching N-Acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology* 68. No 4: 1754-1759.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Bassler, B. and Miller, M. (2006) Quorum sensing. In *The Prokaryotes*. pp.336-353: Springer New York.
- Eberl, L. (2006) Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 103-110.
- Emmert, E. A., and J. Handelsman. (1999). "Biocontrol of plant disease: a Gram positive perspective." *FEMS Microbiology Letters* 171: 1-9.
- Fedearroz, 2000. Manejo y conservación de suelos para la producción de arroz en Colombia. Fedearroz - Fondo Nacional del Arroz. Primera Edición. 78pp.
- Fedearroz. (2010). Cambio climático y producción de arroz. *Revista Arroz* Noviembre. Vol 59-489: 4-20. <http://www.Fedearroz.com.co/revistanew/arroz489.pdf>. Revisado 25 de Noviembre de 2014
- Fedearroz. (2010). Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae*. *Revista Arroz* Octubre. Vol 58-488: 4-8. <http://www.Fedearroz.com.co/revistanew/arroz488.pdf>. Consultado 30 de Octubre de 2014
- Flórez-Zapata y Uribe Vélez. (2011). Determinación de la Infección de *Burkholderia glumae* en Semillas de Variedades Comerciales Colombianas de Arroz. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 64, 1-9.
- Fravel D R. (1993). Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 75-91.

- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11), 1245-1248.
- Fory, P, Triplett, L, Ballen, C, Abello, J, Duitama, J, Aricapa, M, Prado, G, Correa, F, Hamilton, J, Leach, J, Tholme, J and Mosquera G. (2014). *Phytopathology* 104 (5): 436-444
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria - The Luxr-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176, 269-275.
- Giuliano, D., Giulia, D., Jinwoo, K., Ingyu, H. and Vittorio, V. (2008) Identification, characterization and regulation of two secreted polygalacturonases of the emerging rice pathogen *Burkholderia glumae*. *Fems Microbiology Ecology* 65, 251-262.
- Gómez, L. F.; Cardozo, O. & Echeverri, J. 2010. Nuevos análisis lo confirman: Control químico poco efectivo contra la bacteria. Noticias Fedearroz. Febrero de 2016. [http://www.fedearroz.com.co/noticias-docs/control\\_quimico.pdf](http://www.fedearroz.com.co/noticias-docs/control_quimico.pdf).
- Gonzalez, C.F., Pettit, E.A., Valadez, V.A. and Provin, E.M. (1997) mobilization, cloning, and sequence determination of a plasmid-encoded polygalacturonase from a phytopathogenic *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 840- 851.
- Ham J, Melanson R and Rush C. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?. *Molecular plant pathology*. 12, 329-339.
- Han-Soo, K.; Jiyong, P.; Sung-Won, C.; Kee-Hyun, C.; Gung, L.; Soo, B.; Chang, L.; Chung, K. (2003). Isolation and characterization of *Bacillus* Strains for biological control. *The journal of microbiology* 41, no. 3: 196-210.
- Holden, M.T.G., Titball, R.W., Peacock, S.J., Cerdeno-Tarraga, A.M., Atkins, T., Crossman, L.C., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S.D., Sebaihia, M., Thomson, N.R., Bason, N., Beacham, I.R., Brooks, K., Brown, K.A., Brown, N.F., Challis, G.L., Cherevach, I., Chillingworth, T., Cronin, A., Crossett, B., Davis, P., DeShazer, D., Feltwell, T., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Keith, K.E., Maddison, M., Moule, S., Price, C., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Simmonds, M., Songvilai, S., Stevens, K., Tumapa, S., Vesaratchavest, M., Whitehead, S., Yeats, C., Barrell, B.G., Oyston, P.C.F. and Parkhill, J. (2004). Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14240-14245.
- Hikichi, Y. (1993). Relationship between population dynamics of *Pseudomonas glumae* on rice plants and diseases severity of bacterial grain rot of rice. *J. Pestic. Sci.* 18: 319-324
- Holmes, A., Govan, J., and Goldstein, R. 1998. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: A threat to human health? *Emerg. Infect. Dis.* 4:221-227.
- Iiyama, K., Furuya, N., Hara, K., Nakashima, N., Takanami, Y. and Matsuyama, N. (1994) Phytotoxin produced by *Pseudomonas-glumae* Kurita-Et-Tabei, A causal bacterium of the grain and seedling rot of rice. *J Fac Agric Kyushu Univ* 38, 175-181.
- Iiyama, K., N. Furuya, Y., Takanami., and N. Matsuyama. A role of phytotoxin in virulence of *Pseudomonas glumae* Jurita et Tabei. (1995). *Annals of the Phytol. Soc. of Jap.* 61(5): 470-476.
- Jacobs, J.L., Fasi, A.C., Ramette, A., Smith, J.J., Hammerschmidt, R. and Sundin, G.W. (2008) Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3121–3129.

Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T. and Hwang, I. (2003) Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Disease* 87, 890-895.

Josenhans, C. and Suerbaum, S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* 291, 605-614.

Kai M. Effmert U, Berg G and Piechulla B. (2006). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol.*187(5):351-60

Karki Hari Sharan. 2010. Physiological, biochemical and molecular characteristics associated with virulence of *Burkholderia glumae*: the major causative agent of bacterial panicle blight of rice. Thesis for Master of Science Plant Pathology and Crop Physiology. Louisiana State University and Agriculture and Mechanical College. EU.

Kato T, Morohoshi T, Tsushima S and Ikeda T. (2012). Phenotypic characterization of colony morphological mutants of *Burkholderia glumae* that emerged during subculture. *J Gen Plant Pathology* 79: 249-259.

Kawamura, C., Tsujimoto, T. and Tsuge, T. (1999) Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the *Japanese pear* pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 59-63.

Kazempour, M. N. and Elahinia, S. A. 2007. Biological control of *Fusarium fujikuroi*, the causal agent of bakanae disease by rice associated antagonistic bacteria. *Bulg. J. Agric. Sci.* 13: 393-408

Keith, K.E., Killip, L., He, P.Q., Moran, G.R. and Valvano, M.A. (2007) *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *Journal of Bacteriology* 189, 9057-9065.

Kennedy, M.P., Coakley, R.D., Donaldson, S.H., Aris, R.M., Hohneker, K., Wedd, J.P., Knowles, M.R., Gilligan, P.H. and Yankaskas, J.R. (2007). *Burkholderia gladioli*: five year experience in a cystic fibrosis and lung transplantation center. *J. Cyst. Fibros.* 6, 267-273.

Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., DeVos, P., Gillis, M. and Schleifer, K.H. (1996) Recent changes in the classification of the *Pseudomonads*: An overview. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 465-477.

Kim K, Lee S and Ryu C. (2013). Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. *Nature Communications* 4. 1809.

Kim, J., Kang, Y., Choi, O., Jeong, Y., Jeong, J.E., Lim, J.Y., Kim, M., Moon, J.S., Suga, H. and Hwang, I. (2007) Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Molecular Microbiology* 64, 165-179.

Kim, J., Kim, J.G., Kang, Y., Jang, J.Y., Jog, G.J., Lim, J.Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T. and Hwang, I. (2004) Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Molecular Microbiology* 54, 921-934.

King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307

Kloepper, J.W. et al. (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259-1266

- Kong, H, Shimosaka, M, Ando, Y, Nishiyama, K, Fujii, Y and Miyashita, T. (2001). Species-specific distribution of a modular family 19 chitinase gene in *Burkholderia gladioli*. *FEMS Microbiology Ecology* 37: 135-141.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., and Franke, P., 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186: 1084–1096.
- Kumar A and Johri B. (2011). Antimicrobial lipopeptides of *Bacillus*: Natural weapon for biocontrol of plant pathogens. In chapter: Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology. PP: 91-111.,
- Kurita, T. and Tabei, H.(1967) On the pathogenic bacterium of bacterial grain rot of rice. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 33, 111.
- Lanna R, De Souza, Ferreira A, Quecine M, Alves E and De Azevedo J. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP\_marked *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* on tomato phylloplane. *Australasian Plant Pathology* 42: 643-651.
- Latuasan, H.E. and Berends, W. (1961) On origin of toxicity of toxoflavin. *Biochimica Et Biophysica Acta* 52, 502-508
- Laub, M.T. and Goulian, M. (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics* 41, 121-145.
- Lazar Adler, N.R., Govan, B., Cullinane, M., Harper, M., Adler, B. and Boyce, J.D. (2009). The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease? *Fems Microbiology Reviews* 33, 1079-1099.
- Lee SJ, Park SY, Lee JJ, Yum DY, Koo BT & Lee JK (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 68: 3919–3924.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P. and Sokol, P.A. (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: Identification of the *LuxRI* homologs CepRI. *Journal of Bacteriology* 181, 748-756.
- Lim, J., Lee, T.H., Nahm, B.H., Do Choi, Y., Kim, M. and Hwang, I. (2009) Complete genome sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. *Journal of Bacteriology* 191, 3758-3759.
- Mahenthalingam, E., T. Urban, y J. Goldberg. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex". *Nat. Rev. Microbiol.* 3:144-156.
- McSpadden Gardener, B.B. (2004). "Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems." *Phytopathology* 94: 1252-1258.
- Mishra S and Arora N. (2011). Evaluation of rizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol 2: 693-702.
- Nandakumar, R., Rush, M., Shahjahan, A., O'Reilly, K. and Groth, D. (2005) Bacterial panicle blight of rice in the southern United States caused by *Burkholderia glumae* and *Bgladioli*. *Phytopathology* 95, S73-S73.
- Nandakumar, R., Rush, M.C. and Correa, F. (2007) Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with Panicle Blight Symptoms on Rice in Panama. *Plant Disease* 91, 767-767.

- Nandakumar, R., Bollich, P.A., Shahjahan, A.K.M., Groth, D.E., and Rush, M.C. (2008) Association of soilborne *Burkholderia gladioli* with rice sheath rot and panicle blight symptoms. *Can.J.Plant Pathol* 30:148-154.
- Nandakumar, R., Shahjahan, A.K.M., Yuan, X.L., Dickstein, E.R., Groth, D.E., Clark, C.A., Cartwright, R.D. and Rush, M.C. (2009) *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States. *Plant Disease* 93, 896-905.
- Nierman, W.C., DeShazer, D., Kim, H.S., Tettelin, H., Nelson, K.E., Feldblyum, T., Ulrich, R.L., Ronning, C.M., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Davidsen, T.D., Deboy, R.T., Dimitrov, G., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M.L., Haft, D.H., Khouri, H., Kolonay, J.F., Madupu, R., Mohammoud, Y., Nelson, W.C., Radune, D., Romero, C.M., Sarria, S., Selengut, J., Shamblyn, C., Sullivan, S.A., White, O., Yu, Y., Zafar, N., Zhu, L. and Fraser, C.M. (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101,14246-14251.
- Nickzard A, Lepine F and Deziel E. (2015). Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids. *Plos ONE* 10(6). E0128509. Doi:10.1371/journal.pone.0128509
- Ongena, M. et al. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbio.* 9, 1084-1090
- Ongena M y Jacques P. (2007). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Review. Trends in Microbiology* 16 (3): 115-125
- Park J, Lee Y, Yang K and Kim Y. (2010). AiiA-mediated quorum quenching does not affect virulence or toxoflavin expression in *Burkholderia glumae* SL2376. *Letters in Applied Microbiology* 51: 619-624.
- Parke, J. L., and Gurian-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:225-258.
- Payne, G.W., Vandamme, P., Morgan, S.H., LiPuma, J.J., Coenye, T., Weightman, A.J., Jones, T.H. and Mahenthiralingam, E. (2005) Development of a recA gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol* 71, 3917-3927.
- Pérez C.R. y E. Saavedra. 2007. En: Añublo bacterial de la panícula del arroz en Colombia *Burkholderia glumae* (Kurita y Tabei), [http://www.Fedearroz.com.co/correo/198\\_art.shtml](http://www.Fedearroz.com.co/correo/198_art.shtml). Consulta 15 de Abril de 2014
- Pérez, C.R. 2010. Avances en el manejo integrado de *Burkholderia glumae*. *Revista Arroz* 58(488): 4-8.
- Pérez, C.R. y E. Saavedra. 2011. Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el Caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 3(1): 111-124.
- Pedroza C. (2010). Caracterización de la enzima acil homoserina lactonasa de una cepa de *Bacillus thuringiensis*. Trabajo de grado para optar el título de Magister en Ciencias – Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.
- Rajeshwari, R., Jha, G. and Sonti, R.V. (2005) Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 830-837.

Romero Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabni, W., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (1996) Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *Journal of Biological Chemistry* 271, 28052-28056.

Sato, Z., Koiso, Y., Iwasaki, S., and Matsuda, I. (1989) Toxins produced by *Pseudomonas glumae*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 55: 356–359.

Savary S, Willocquet L, Elazegui F, castilla N and Teng P. (2000). Rice pest constraints in tropical Asia: Quantification of yield losses due to rice pest in a range of production situations. *Plant. Dis.* 84: 357-369.

Sayler, R.J., Cartwright, R.D. and Yang, Y.N. (2006) Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. (vol 90, pg 603, 2006). *Plant Disease* 91, 1050-1050.

Schaad, N., J. Jones, y W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. APS Press, Minnesota, USA

Shahjahan, A. K., M. C. Rush, D. Groth, and C. Clark. (2000) Panicle Blight. *Rice Journ.* 15: 26-29.

Shaw, P.D., y cols. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 6036-41.

Shingu, Y. and K. Yoneyama. 2004. Essential regulator gene toxR for toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *Journal of General Plant Pathology* 70(2): 108-114.

Sogou, K. and Y. Tsuzaki. (1983). Overwintering of grain rot bacterium *Pseudomonas glumae* and its infection to rice plant in the paddy field. *Proc. Assoc. Plant Prot. Shikoku.* 18: 15-20.

Solis, R., Bertani, I., Degrassi, G., Devescovi, G. and Venturi, V. (2006) Involvement of quorum sensing and RpoS in rice seedling blight caused by *Burkholderia plantarii*. *Fems Microbiology Letters* 259, 106-112.

Song M, Young H, Kim Y. (2014). Antagonist Bacillus species as a biological control of ginseng root rot caused by Fusarium cf. incarnatum. *Ginseng Res* 38: 136-145

Sosa, S., Ramos, C and Leitao, H. (2010). *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. *International Journal of Microbiology.* 2011, 1-9

Sotokawa, N. and Takikawa, Y. (2004) Occurrence of bacterial rot of onion bulbs caused by *Burkholderia cepacia* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 70, 348-352.

Springman, A.C., Jacobs, J.L., Somvanshi, V.S., Sundin, G.W., Mulks, M.H., Whittam, T.S., Viswanathan, P., Gray, R.L., Lipuma, J.J. and Ciche, T.A. (2009) Genetic diversity and multihost pathogenicity of clinical and environmental strains of *Burkholderia cenocepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75,5250–5260.

Suzuki, F., Sawada, H., Azegami, K. and Tsuchiya, K. (2004) Molecular characterization of the operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *Journal of General Plant Pathology* 70, 97-107.

Szczeczek and Shoda. (2006). The effect of mode of application of Bacillus subtilis RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against Rhizoctonia solani. *Journal of Phytopathology.* Vol 154(6): 370-377.

- Tabei, H., K. Azegami, T. Fukuda, and T. Goto. (1989). Stomatal infection of rice grain with *Pseudomonas glumae*, the causal agent of the bacterial grain rot of rice. *Ann. Phyto. Soc. Jap.* 55 (2): 224-228.
- Takeuchi, T., Sawada, H., Suzuki, F., and Matsuda, I. 1997. Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S- 23S rDNA spacer regions. *Ann. Phytopathol. Plant Disease / September 2009* 905 Soc. Jpn. 63:455-462.
- Tsushima, S., H. Naito, and M. Koitabashi.(1996) Population dynamics of *Pseudomonas glumae*, the causal agent of bacterial grain rot of rice, on leaf sheaths of rice plants in relation to disease development in the field. *Ann. Phyto. Soc. Japan.* 62: 108-113.
- Tsushima, S., H. Naito, and M. Koitabashi. (1995) Change in panicle susceptibility associated with flowering rate of spikelets in bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. *Ann. of the Phytopath. Soc. of Jap.* 61 (2): 109-113.
- Tumapa, S., Holden, M.T.G., Vesaratchavest, M., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Chierakul, W., Feil, E.J., Currie, B.J., Day, N.P.J., Niernan, W.C. and Peacock, S.J. (2008) *Burkholderia pseudomallei* genome plasticity associated with genomic island variation. *Bmc Genomics*9.
- Ulrich, R.L., Hines, H.B., Parthasarathy, N. and Jeddelloh, J.A. (2004) Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. *Journal of Bacteriology* **186**, 4350-4360.
- Uematsu, T., Yoshimura, D., Nishiyama, K., Ibaraki, T. and Fujii, H. (1976). Occurrence of bacterial seedling rot in nursery flat, caused by grain rot bacterium *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 42, 310–312.
- Ura, H, Furuya, N, Iiyama, K, Hidasa, M, Tsuchiya, K and Matsuyama, N. (2006). *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf sheath browning of rice plants. *J Gen Plant Pathol.* 72: 98-103.
- Ussery, D.W., Kiil, K., Lagesen, K., Sicheritz-Pontaaon, T., Bohlin, J. and Wassenaar, T.M. The genus *Burkholderia*: Analysis of 56 genomic sequences. *eBooks Collection 1997-2009* 6, 140-157.
- Vandamme, P., Henry, D., Coenye, T., Nzula, S., Vancanneyt, M., LiPuma, J.J., Speert, D.P., Govan, J.R.W. and Mahenthiralingam, E. (2002) *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 33, 143-149.
- Venturi, V., Friscina, A., Bertani, I., Devescovi, G. and Aguilar, C. (2004) Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Research in Microbiology* 155, 238-244.
- Vergara B. (1985). Growth and development of the deepwater rice plant. IRPS. 103: 1-38. International Rice Research Institute, Philippines.
- Wan, X.-Y. and Liu, J.-Y. (2008) Comparative Proteomics Analysis Reveals an Intimate Protein Network Provoked by Hydrogen Peroxide Stress in Rice Seedling Leaves. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**, 1469-1488.
- Weinberg, J.B., Alexander, B.D., Majure, J.M., Williams, L.W., Kim, J.Y., Vandamme, P. and LiPuma, J.J. (2007) *Burkholderia glumae* Infection in an Infant with Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Microbiol* 45, 662-665.



- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen-nov and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group-ii to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*
- Yoneyama, K., Y. Kono, I. Yamaguchi, M. Horikoshi, and T. Hirooka. (1998) Toxoflavin is an essential factor for virulence of *Burkholderia glumae* causing rice seedling rot disease. *Ann. of the Phytopath. Soc. of Jap.* 64(2): 91-96.
- Yuan X. (2004). Identification of bacterial pathogens causing panicle blight of rice in Louisiana. Thesis Master of Science. Department of Plant Pathology and Crop Physiology. Louisiana, United States.
- Zhan Y, Xu Q, Liu H, Wang Y y Guo J. (2011). Effect of different concentrations of bacterial suspensions on biocontrol efficacy and storage stability of *Bacillus cereus* AR156, *Pantoea ananatis* YT11 and *Pseudomonas fluorescens* ABc9. *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 5 (23): 4019-4022.
- Zhang, L and Dong Y. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53: 1563-1571.
- Zhu B, Lou M, Huai Y, Luo J and Xu Li. (2008). Isolation and identification of *Burkholderia glumae* from symptomless rice seeds. *Rice Science.* 15 (2): 145-149.
- Zeigler, R. S. and E. Alvarez. (1989) Grain discoloration of rice caused by *Pseudomonas glumae* in Latin America. *Plant Dis.*73(4): 368.