



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EFFECTO DE LA CEPA BIOCONTROLADORA
IBUN 2755 SOBRE LA POBLACIÓN DE
Burkholderia glumae EN PLANTAS DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

Paula Andrea Perea Molina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Instituto de Biotecnología de la universidad Nacional (IBUN)
Bogotá, Colombia

2020

EFFECTO DE LA CEPA BIOCONTROLADORA IBUN 2755 SOBRE LA POBLACIÓN DE *Burkholderia glumae* EN PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Paula Andrea Pera Molina

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 de la universidad Nacional (IBUN)

Bogotá, Colombia

2019

A mis padres...

*El amor que se pone en las acciones es la
fuerza creadora que materializa los sueños.*

Paula Horta.

Agradecimientos

A Dios y a la virgen de Guadalupe por todos los milagros.

A mi mami Luz Angela y mi papito Pablo Alfonso por ser los cómplices más hermosos y amorosos, y apoyarme en este camino llamado Microbiología Agrícola.

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá por otorgarme la beca de exención de derechos académicos.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, por facilitar sus instalaciones para la realización de este proyecto

Al profesor Daniel Uribe Vélez, por su paciencia y orientación siempre dispuesta.

A Luz Adriana por su ayuda y compartir siempre su conocimiento, y a su hijo Julian por prestármela tiempo extra.

A Lore, Laura, Vane, y Nico por su ayuda y los incontables momentos de risa; a mis compañeros de laboratorio por su disposición y colaboración; a Socorro quien siempre estuvo como un foco brillante de buena energía.

Al gobierno de Canadá por otorgarme la beca Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP).

A la profesora Pascale B. Beauregard y su equipo de investigación por acogerme durante 6 meses en su laboratorio; a la Universidad de Sherbrooke por prestarme sus instalaciones durante la pasantía.

Al Coro de Adultos de la Catedral primada de Bogotá, a su director Nivaldo Guinche, al Coro Sinfónico UniAndes y a su directora Diana Cifuentes por darme un espacio que me permitió crecer como investigadora desde lo musical con el trabajo en equipo, la escucha y la disciplina.

Resumen

La cepa de *Bacillus velezensis* IBUN 2755 fue aislada de la rizósfera de papa criolla, la cual posee capacidad de control biológico contra *Burkholderia glumae*, un patógeno muy limitante en el cultivo de arroz. Semillas de arroz infectadas con *B. glumae* y tratadas con la cepa IBUN 2755, reducen la severidad de los síntomas generados a niveles similares a los del control sin inocular. Por otra parte, en plantas infectadas con el patógeno la presencia de *B. glumae* se mantiene constante durante los estadios fenológicos analizados, sin embargo, en plantas tratadas con IBUN 2755 su población se ve reducida e incluso indetectable en período de floración. Si bien estos atributos sugieren control biológico contra *B. glumae*, actualmente no es claro cuáles son los mecanismos llevados a cabo por la cepa IBUN 2755 para lograr el control de este patógeno. Adicionalmente, las plantas inoculadas presentan atributos de promoción de crecimiento vegetal mostrando una longitud mayor a pesar de estar en presencia del patógeno.

Tanto IBUN 2755 como *B. glumae* tienen quimiotaxis frente a los compuestos presentes en los exudados radiculares de arroz secretados a los 7, 14, 21 y 28 días, en la variedad Fedearroz 2000, aunque IBUN 2755 tiene una mayor quimiotaxis por los exudados secretados al día 7. Por otra parte, IBUN 2755 presenta una marcada quimiotaxis por alanina y serina, baja por prolina e indetectable por leucina, en contraste con *B. glumae* que presenta quimiotaxis por todos los compuestos presentes en los exudados de arroz probados, sin presentar diferencias estadísticas entre estos. Ambas poblaciones mantienen un patrón similar de atracción hacia estos exudados sugiriéndose un posible solapamiento de nicho.

IBUN 2755 es capaz de colonizar como endófito plantas de arroz hasta el día 28 tanto en raíz como vástago bajo un sistema controlado estéril, así mismo puede mantener su población superficialmente en la planta. Por otra parte, la cepa forma biofilm en caldo LB y LB-MG a las 24 horas y se mantiene firme hasta las

48 horas, sin embargo, *B. glumae* no es capaz de formar biofilm en las condiciones analizadas, sugiriendo que el efecto de la cepa IBUN 2755 en la reducción de las poblaciones de *B. glumae* en plantas de arroz y su estrategia de control está asociada a una mayor capacidad de colonización mediada por una mayor capacidad de formación de biopelícula y competencia por espacio que *B. glumae*.

Palabras clave: (Quimiotaxis, Biofilm, *B. velezensis*, *B. glumae*)

Abstract

The strain *Bacillus velezensis* IBUN 2755 was isolated from the rhizosphere of Criolla potato. This strain has the ability of biological control against *Burkholderia glumae* a limiting pathogen in rice crops. Rice seeds infected with *B. glumae* and treated with IBUN 2755 reduce the severity of the symptoms generated by the disease, showing the same characteristics when is compared with healthy plants. On the other hand, the presence of *B. glumae* remains constant during the phenological stages analyzed, however, in plants treated with IBUN 2755 its population is reduced and even undetectable during flowering. Even if those features suggest biological control against *B. glumae*, nowadays is not clear what are the mechanisms used by the strain IBUN 2755 to achieve the pathogen control. Moreover, the plants inoculated with IBUN 2755 showed plant growth promotion features, showing a longer length despite being in pathogen presence. Both IBUN 2755 and *B. glumae* have chemotaxis against compounds present in rice exudates and against rice root exudates secreted at 7, 14, 21 and 28 days, rice variety Fedearroz 2000, though IBUN 2755 has higher chemotaxis for exudates secreted at day 7. On the other hand, IBUN 2755 presents a chemotaxis towards alanine and serine, low by proline and undetectable by leucine, in contrast to *B. glumae* that shows chemotaxis for all the compounds present in the tested rice exudates, without presenting statistical differences between them. Both microorganism have a similar attraction patron towards exudates suggesting a possible niche overlapping.

IBUN 2755 is able to colonize rice plants as an endophyte until day 28 in both root and stem under a sterile controlled system, and it can also keep its population superficially in the plant. On the other hand, the strain forms biofilm in LB and LB-MG broth 24 hours and remains firm until 48 hours, however, *B. glumae* is not able to form biofilm under the analysed conditions, suggesting that the effect of the strain IBUN 2755 in the reduction *B. glumae* population in rice plants and its

control strategy are associate to a better colonization ability mediated by a biofilm formation ability and space competition than *B. glumae*.

Keywords: (Chemotaxis, Biofilm, *B. velezensis*, *B. glumae*)

Contenido

Resumen	IX
Lista de tablas	1
Introducción	2
MARCO TEÓRICO	5
1.1 El arroz en Colombia y el mundo	5
1.2 Añublo bacteriano de la panícula del arroz, enfermedad generada por <i>B. glumae</i>	6
1.2.1 <i>Burkholderia glumae</i>	6
1.2.2 Ciclo infectivo de <i>Burkholderia glumae</i>	7
1.2.3 Añublo bacteriano de la panícula del arroz.....	9
1.2.4 Epidemiología	11
1.2.5 Manejo de la enfermedad.....	12
1.3 Control Biológico.....	13
1.3.1 La cepa IBUN 2755 como biocontrolador	16
1.4 Mecanismos de colonización en <i>Bacillus</i>	17
1.4.1 La quimiotaxis como desencadenante de la colonización	17
1.4.2 Producción de Biofilm y su relación con la colonización de cepas de <i>Bacillus</i> biocontroladores.....	18
1.4.2.1 Biofilm en <i>Bacillus</i> biocontroladores	20
2. Pregunta de investigación	22
2.1 Objetivos.....	22
2.1.1 Objetivo General	22
Determinar la distribución, abundancia y generación de síntomas de la población de <i>Burkholderia glumae</i> en presencia de la cepa biocontroladora IBUN 2755 en plantas de arroz (<i>Oryza sativa L.</i>).....	22
2.1.2 Objetivos específicos	22
3. Metodología	24
3.1 Cepas bacterianas.....	24
3.1.1 Obtención del mutante IBUN 2755-M1 resistente a espectinomicina. .	25
3.1.2 Desinfección superficial de semillas de arroz	26
3.2 Evaluación de la cinética de colonización de IBUN 2755 como endófito en plantas de arroz	26
3.2.1 Colonización de IBUN 2755 en plantas de arroz F2000	26
3.2.2 Inoculación de semillas de arroz	26
3.2.3 Crecimiento de plantas en condiciones controladas y seguimiento de la población bacteriana de IBUN 2755-M1 como endófito.....	27

3.2.4	Colonización en raíz a partir de exudados radiculares.....	28
3.3	Determinación bajo condiciones <i>in vitro</i> del solapamiento de nicho en términos de nutrientes de la cepa biocontroladora IBUN 2755 y la cepa CIAT 3200 de <i>B. glumae</i>	28
3.3.1	Crecimiento de las cepas en sustratos específicos de exudados de plantas de arroz F2000.....	28
3.3.2	Ensayos de Quimiotaxis.....	29
3.3.3	Ensayos de quimiotaxis hacia los exudados radiculares.....	30
3.3.3.1	Extracción de los exudados radiculares.....	30
3.3.4	Evaluación de la producción de <i>Biofilm</i> por IBUN 2755 y por <i>B. glumae</i> 31	
3.4	Determinación del efecto de la cepa IBUN 2755 sobre la dinámica de la población de <i>B. glumae</i> en plantas de arroz a través de los diferentes estados fenológicos bajo condiciones controladas.....	32
3.4.1	Infección de semillas de arroz con <i>B. glumae</i>	32
3.4.2	Seguimiento a la colonización de <i>B. glumae</i> en diferentes fases de cultivo bajo invernadero.....	33
3.4.2.1	Verificación de la presencia de <i>B. glumae</i> y confirmación de colonias presuntivas mediante métodos moleculares.....	33
3.5	Tratamiento estadístico de los datos.....	33
4.	Resultados y discusión.....	35
4.1	Cinética de colonización de la cepa biocontroladora IBUN 2755 en plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	35
4.1.1	Colonización de IBUN 2755 en plantas de arroz F2000.....	35
4.1.2	Colonización de IBUN 2755 en raíces de arroz usando exudados radiculares como fuente de carbono.....	40
4.2	Solapamiento de nicho en términos de nutrientes de la cepa biocontroladora IBUN 2755 y la cepa CIAT 3200 de <i>B. glumae</i>	41
4.2.1	CONSUMO DE SUSTRATOS.....	41
4.2.2	QUIMIOTAXIS.....	44
4.2.3	Formación de <i>Biofilm</i> de las cepas IBUN 2755 y <i>B. glumae</i> CIAT 320052	
4.3	Efecto de la cepa IBUN 2755 sobre la dinámica de la población de <i>B. glumae</i> en plantas de arroz a través de los diferentes estados fenológicos bajo condiciones controladas.....	53
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	58
5.1	Conclusiones.....	58
5.2	Recomendaciones.....	59
6.	Material Suplementario.....	61
	Bibliografía.....	66

Lista de figuras

- Figura 1.** Población endófito de la cepa IBUN 2755 (M1) en plantas de arroz a diferentes tiempos post inoculación. Las plantas control (No inoculadas) no presentaron presencia del microorganismo cuando fueron sembradas en agar LB + 100 ug/ ml de espectinomicina. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia. Letras mayúsculas corresponden a la diferencia en el tiempo para vástago y las minúsculas para raíz. 38
- Figura 2.** Población epífita de la cepa IBUN 2755 (M1) sobre la superficie de plantas de arroz en varios tiempos postinoculación. Las plantas control no presentaron presencia del microorganismo cuando fueron sembradas en agar LB + 100 ug/ ml de espectinomicina. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia. Letras mayúsculas corresponden a la diferencia en el tiempo para vástago y las minúsculas para raíz. 36
- Figura 3.** Verificación de la desinfección superficial de las plantas para garantizar conteo de la población endófito de la cepa IBUN 2755, dentro del círculo rojo se evidencian colonias de 24 horas, blancas, mucosas, pequeñas, compatibles con IBUN2755 (M1).. 39
- Figura 4.** Plantas de 14 días postinoculación correspondientes al ensayo de colonización. A) Plantas control sin inocular, B) Plantas inoculadas con M1. 39
- Figura 5.** Colonización de IBUN 2755 en raíz de arroz usando los exudados radiculares como única fuente de carbono. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia. 41
- Figura 6.** Consumo de fuentes de carbono presentes en los exudados de arroz por la cepa IBUN 2755. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan con un 95% de significancia. Letras mayúsculas reflejan las diferencias a las 24 horas, letras minúsculas reflejan diferencias a las 48 horas. 43
- Figura 7.** Consumo de fuentes de carbono presentes en los exudados de arroz por la cepa IBUN 2755. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan con un 95% de significancia. Letras mayúsculas reflejan las diferencias a las 24 horas, letras minúsculas reflejan diferencias a las 48 horas. 44
- Figura 8.** a) Quimiotaxis de IBUN 2755 hacia los amino ácidos presentes en los exudados de arroz. Control positivo (C+) Glucosa 200µM, Control negativo (C-) Buffer de quimiotaxis. Alanina (Ala), Ácido glutámico (GLU), Glicina (Gly), Leucina (Leu), Prolina (Pro), Serina (Ser), Treonina (Thr), Valina (Val). b) Quimiotaxis hacia las fuentes de

carbono presentes en los exudados de arroz. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia	48
Figura 9. a) Quimiotaxis de IBUN 2755 hacia exudados de arroz extraídos a los 7, 14, 21 y 28 días. Control positivo (C+) Glucosa 250μM, Control Negativo (C-) Buffer de quimiotaxis, Hoagland al 50% usado para el cultivo hidropónico. b) Quimiotaxis por los exudados radiculares del arroz en comparación a la quimiotaxis generada cuando se encontraba en presencia de <i>B. glumae</i> (Bg). Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia	49
Figura 10. a) Quimiotaxis de <i>B. glumae</i> hacia los amino ácidos presentes en los exudados de arroz. Control positivo (C+) Glucosa 200μM, Control negativo (C-) Buffer de quimiotaxis. b) Quimiotaxis de <i>B. glumae</i> hacia las fuentes de carbono presentes en los exudados de arroz. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia.....	50
Figura 11. a) Quimiotaxis de <i>B. glumae</i> hacia exudados de arroz extraídos a los 7, 14, 21 y 28 días. Control positivo (C+) Glucosa 250μM, Control Negativo (C-) Buffer de quimiotaxis, Hoagland al 50% usado para el cultivo hidropónico. b) Quimiotaxis por los exudados radiculares del arroz en comparación a la quimiotaxis generada cuando se encontraba en presencia de IBUN 2755. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia.	51
Figura 12. Formación de Biofilm en IBUN 2755. No hay formación de biofilm en <i>B. glumae</i>	53
Figura 13. Cultivo de <i>B. glumae</i> donde no hay formación de biofilm después de 14 días.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Escala de severidad donde 0 – 1 plantas asintomáticas, vigorosas igual al control y 4 plántulas con decoloración del 50% de la superficie, según escala propuesta por Flórez Zapata & Uribe-Vélez, (2011) Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia	54
Figura 15. Tamaño de plantas de arroz a lo largo del cultivo con los tratamientos probados. En las gráficas se puede observar que las plantas tratadas con IBUN 2755 alcanzan una longitud mayor que el control sin inocular a pesar de estar infectadas con el patógeno. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia	55
Figura 16. Cuantificación de la población endófitas de <i>glumae</i> a lo largo del cultivo de arroz. La presencia del patógeno es reducida durante el cultivo en plantas tratadas con IBUN 2755. Las plantas control no presentaron colonias sugestivas de <i>B. glumae</i> Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia	57

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica (Kurita and Tabei, 1967).....	6
Tabla 2. Clasificación taxonómica cepa IBUN2755 (Pedraza Herrera, et al, <i>In preparation</i>).....	16

Introducción

El 12% del área cosechada de cereales cultivados en el país pertenece a cultivos de arroz según la Encuesta Nacional Agropecuaria (Prada F. & Freire E., 2016) logrando en el año 2018 una producción de 2.514.063 millones de toneladas (DANE, 2019). Sin embargo, estos niveles de producción habían venido disminuyendo en años anteriores debido a las condiciones ambientales producto del cambio climático, que oscilan entre intensas sequías, hasta periodos de lluvia que inundan los cultivos (Fontalvo, 2014). Sumado a estos inconvenientes, los agricultores habían venido enfrentando constantes infecciones por diferentes agentes patógenos como ácaros, hongos y bacterias (Suárez, 2009), entre estas últimas destaca *Burkholderia glumae*, la cual ocasiona pudrición de plántulas y granos, marchitamiento, decoloración en las espigas y glumas vacías (Gnanamanickam, 2006; Jeong et al., 2003) generando la enfermedad conocida como Añúblo bacteriano del arroz, lo que ha limitado la producción y ocasiona pérdida de cultivos principalmente en Asia (Zhu et al., 2008), sin embargo, desde mediados de este siglo se ha reflejado un incremento de la enfermedad en Norte América (Sayler, 2006) y América Latina (Quesada & García, 2014) ocasionando pérdidas del 40% hasta el 75% del cultivo (Ham et al., 2011; Fory et al., 2014).

Se ha demostrado que el mayor reservorio de la infección es la semilla (Ham, Melanson, & Rush, 2011), sin embargo, aún se desconoce la verdadera causa de la entrada del patógeno a la planta, se han reportado estudios donde expresan que las condiciones climáticas y ambientales están directamente relacionados con el proceso infectivo y que factores como la brisa, la temperatura diurna superior a los 30°C y nocturna arriba de los 22°C y alta humedad favorecen la infección (Nandakumar et al., 2009), por lo cual el calentamiento global ofrece un

escenario para un aumento futuro de la infección (Ham et al., 2011; Schaad, 2001) y por lo tanto, aumentando la pérdida en la producción generando una reducción en el consumo de arroz hasta de 204 millones de dólares (Shew et al., 2019)

Hasta el momento no se han desarrollado estrategias que permitan un control efectivo sobre *B. glumae*, el método de control para el patógeno anteriormente usado era ácido oxolínico ya que tiene un amplio espectro bactericida (Hikichi, 1993), sin embargo, no es el más favorable para el cultivo ni para el agricultor, de hecho, su uso se encuentra prohibido dentro de los Estados Unidos y otros países por la aparición de cepas de *B. glumae* resistentes (Maeda, et al, 2004; Nandakumar et al., 2009). Por otra parte, los agroquímicos generan cepas multirresistentes que ponen en peligro la salud de los cultivos además de generar la producción de metabolitos secundarios por parte de los agentes patógenos que pueden alterar las características propias de los alimentos. Los controladores biológicos surgen como una alternativa al uso de agroquímicos, además de otorgar beneficios que mejoren la seguridad del cultivo (Arguelles-Arias et al., 2009).

La cepa IBUN 2755 fue aislada de la rizósfera de papa criolla (*Solanum tuberosum*, Grupo: Phureja) identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* con un 100% de identidad frente a las registradas en NCBI (Blanco Zapata, 2012), pertenece a la colección de Cepas del grupo de Investigación de Microbiología Agrícola en el Instituto de Biotecnología de La Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, es productor de lipopéptidos tipo fengicinas y surfactinas (Blanco Zapata, 2012). Con actividad biocontroladora *in vitro* contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis var graminis* y *B. glumae* e *in vivo* contra *R. solani* en papa y *B. glumae* en arroz (Blanco Zapata, 2012; Pedraza Herrera, 2015; Zuluaga, 2019). Adicionalmente ha sido reportado como

promotor de crecimiento vegetal en plantas de arroz (Gómez Ramírez, 2015; Pedraza Herrera, 2015)

IBUN 2755 presenta actividad biocontroladora en plántulas de arroz cuando el patógeno se encuentra en sustrato y/o en semilla, presentan reducción de la población del patógeno en plantas de un estadio fenológico correspondiente a de 1-2 hojas y de 5-6 hojas (Pedraza Herrera, 2015). Es conocido que las cepas de *Bacillus* biocontroladores se destacan por su capacidad de colonizar la planta hospedera percibiendo los exudados radiculares secretados por esta (Ongena & Jacques, 2008), mediante formación de biofilm (Cairns, et al, 2014) y producción de metabolitos secundarios (Kloepper, et al, 2004; Choudhary & Johri, 2009), las características mencionadas lo convierten en un competidor capaz de solapar el nicho que comparte espacialmente con el organismo patógeno (Hunting et al., 2015), por lo tanto estudiar la interacción de IBUN 2755 con el patógeno, su cinética de colonización y la afinidad por los exudados radiculares del arroz, puede revelar detalles que faciliten dilucidar el mecanismo de acción de la cepa IBUN 2755 en plantas de arroz que a futuro permitan un control efectivo del patógeno optimizando su aplicación sin alterar el cultivo y el bienestar de la planta.

MARCO TEÓRICO

1.1 El arroz en Colombia y el mundo

El arroz es el tercer cereal con mayor producción después del trigo, actualmente hay una producción mundial anual de 503,9 millones de toneladas (FAO, 2018). El cultivo depende entre otros factores de la temperatura por lo tanto esta debe permanecer entre Min 28°C - Max 35° C y la humedad relativa, las cuales pueden variar de acuerdo a las condiciones climáticas, estas variables se han visto afectadas en los últimos años por el cambio climático, el cual ha generado variaciones de alrededor de 4°C llevando a generar estrés físico en la planta (Castilla, et al., 2010).

Para la FAO, las condiciones climáticas de 2018 como la estabilidad en los periodos de lluvia y poca sequía generaron un alza en las expectativas de rendimiento de arroz propuestas para ese año, sin embargo, la producción de arroz está sólo un 0,6% arriba de la registrada en 2017 (FAO, 2018). De acuerdo a la FAO, Colombia es el tercer productor de arroz en América Latina teniendo una producción de 2,7 millones de toneladas (FAO, 2018). Sin embargo, bajas en productividad pueden deberse a diversos factores ya sean climáticos, procesos oferta – demanda, daño o pérdida de cultivos por plagas y enfermedades del cultivo (Pérez, et al, 2003).

La superintendencia de Industria y comercio registra el cultivo de Arroz como uno de los principales productos agrícolas en términos de producción después del Café y el maíz en Colombia, en el período comprendido entre 2000 - 2012 representaba entre el 11-13% de la producción agrícola nacional, presentando la

mayor oferta de ese cultivo en los departamentos de Tolima – Huila, Meta y Casanare (SIC, 2012).

En la encuesta nacional de arroz mecanizado publicado por el DANE en 2019 la cual resalta el aprovechamiento del suelo, la producción y rendimiento del arroz, se muestra que durante el primer semestre de 2019 el área sembrada de arroz fue de 352.850 hectáreas un 5,7% más que el primer semestre de 2018 y tuvo una producción de 1´008.081 toneladas. Adicionalmente resalta la zona central del país y los llanos orientales como las principales productoras de arroz, el mayor rendimiento lo registraron los departamentos de Meta y Tolima (DANE, 2019). Para FEDEARROZ el consumo per cápita de arroz durante 2018 fue de 42.22kg un 7% más que el año anterior (FEDEARROZ, 2019) lo cual refleja un aumento en el consumo del cereal.

1.2 Añublo bacteriano de la panícula del arroz, enfermedad generada por *B. glumae*.

1.2.1 *Burkholderia glumae*

Tabla 1. Clasificación taxonómica (Kurita and Tabei, 1967)

Clasificación Taxonómica	
Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Orden	Burkholderiales
Familia	Burkholderiaceae
Género	<i>Burkholderia</i>
Especie	<i>Burkholderia glumae</i>

El análisis bacteriológico muestra que es un bacilo, Gram negativo, no productor de esporas, capaz de reducir nitratos, catalasa positiva, hábil de crecer en concentraciones de 1.4% de NaCl (Zhu et al., 2008). Puede infectar una extensa

variedad de cultivos tales como: berenjena, tomate, arroz, girasol (Jeong et al., 2003).

Es un microorganismo móvil (Kato, et al 2013) que se desarrolla mejor a temperaturas elevadas entre 38 – 40°C, lo que facilita la producción de toxinas (Nandakumar et al., 2009) La concentración con mayor grado de infección artificial en semillas es de 10^5 UFC/ml y 10^4 UFC/ml (Flórez Zapata & Uribe-Vélez, 2011), sin embargo, la mínima concentración infectiva en plantas oscila entre 1×10^4 y 1×10^2 UFC (Tsushima, 1996)

Las colonias representativas en medio selectivo SPG y King B (Tsushima, Wakimoto, & Mogi, 1986) son circulares, húmedas, convexas y mucosas. Adicionalmente en medio King B se puede observar un pigmento amarillo no fluorescente relacionado con la producción de Toxoflavina, (Jeong et al., 2003, Nandakumar et al., 2009). Sin embargo, pueden presentar nuevas características morfológicas durante un subcultivo, colonias grandes con centro oscuro (Morado en agar SPG) (Mew & Misra, 1994). A medida que se incrementa el número de subcultivos es susceptible de generar colonias diferentes que van a influenciar directamente la patogenicidad disminuyendo su capacidad de infección, por lo que se puede considerar que *B. glumae* es un microorganismo de patogenicidad y fenotipo variable (Kato et al., 2013).

1.2.2 Ciclo infectivo de *Burkholderia glumae*

Diferentes autores consideran que el patógeno puede estar dentro de la semilla al inicio de la infección (Tsushima, 1996; Flórez Zapata & Vélez, 2011; Pedraza, et al, 2018) otros consideran que el patógeno logra transmitirse de forma aérea de panículas enfermas a sanas (Li et al., 2016, 2017; Nandakumar et al., 2009) adicional a esto los estudios de Pedraza, et al, (2018) muestran que semillas infectadas artificialmente o semillas sanas que crecen en un sustrato infectado con *B.glumae* pueden desarrollar plántulas sintomáticas.

Para Hikichi, (1993), el patógeno se encuentra en la superficie de la semilla y la plúmula es el punto mediante el cual el microorganismo ingresa, a su vez Li et al., (2016) señala que la colonización en la semilla se logra con una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Semillas infectadas artificialmente muestran que durante el desarrollo de la plántula, en etapa de dos hojas hay una colonización intensiva 1×10^5 UFC/g y aumenta a medida que el vástago se desarrolla a 1×10^8 UFC/g (Li et al., 2016, Pedraza et al., 2018). Para Hikichi, (1993) la población bacteriana durante la fase de dos hojas es de 2×10^5 UFC/g peso fresco. La colonización durante la etapa de dos hojas es crucial para la población bacteriana e incide directamente con la colonización y síntomas de enfermedad en las panículas (Hikichi, 1993; Li et al., 2016).

El estudio de la infección de *B. glumae* a través de fluorescencia revela que después de la infección el patógeno, inoculando plántulas de manera artificial, este se ubica en los pelos radicales y las células epidermales, una vez transcurre el tiempo de infección migra al parénquima y el cortex (Li et al., 2016). De igual manera el mismo estudio revela que durante la fase de macollamiento el patógeno se encuentra en la lígula, la pared celular y los espacios intracelulares.

Desde el inicio de la fase vegetativa y durante su desarrollo no se evidencian síntomas de la enfermedad a pesar de aislarse el microorganismo; se vuelven a evidenciar síntomas hasta la etapa de floración (Hikichi, 1993; L. Li et al., 2016; Pedraza et al., 2018) Una vez se forma la panícula se le da oportunidad al patógeno de migrar hacia las glumas (Li et al., 2016), durante la etapa de formación de la panícula la concentración bacteriana tiende a aumentar (Hikichi, 1993), debido a que la panícula es más sensible a la infección durante éste estadio (Tsushima, et al, 1995) y finaliza con el vaneamiento del grano (Hikichi, 1993; Pedraza et al., 2018)

El estudio más reciente de colonización en plantas de arroz realizado por Pedraza, et al, (2018), revela que *B. glumae* permanece como endófito en todas las fases de desarrollo del arroz, cuando el patógeno se encuentra ya sea

inoculado en el substrato o en la semilla, alcanzando una concentración entre 1×10^1 – 1×10^5 UFC/ml durante la fase vegetativa.

La espiguilla también posee elevadas concentraciones del patógeno llegando a ser entre 1×10^8 y 2×10^9 UFC/ml (Hikichi, 1993; Li et al., 2017) El contacto entre glumas infectadas y glumas sanas también es un evento involucrado en la dispersión de la enfermedad, evento conocido como infección secundaria (Tsushima, 1996), sin embargo, aún continúa sin esclarecerse si la infección aérea puede también afectar la parte baja de la planta o la bacteria se limita a habitar en la panícula.

1.2.3 Añublo bacteriano de la panícula del arroz

Burkholderia glumae una vez infecta puede desarrollar dos patologías, la primera pudrición de plántulas y la segunda se denomina añublo bacteriano de la panícula de arroz, enfermedad que afecta plantas maduras generando vaneamiento del grano, un falso llenado de las espigas (espiguillas estériles), además de otros síntomas que se reflejan en la etapa final de la planta, lo que ocasiona grandes pérdidas en productividad (Uematsu, et al, 1976, Hikichi, 1993 ,Fory et al., 2014).

Esta enfermedad fue reportada por primera vez en Japón (Goto & Ohata, 1956) y está presente en climas cálidos productores de arroz donde las temperaturas son superiores a los 30°C con humedad prolongada, por lo tanto países con climas tropicales o semi-tropicales son susceptibles de desarrollar la enfermedad que puede ocasionar pérdidas del 40% hasta el 75% del cultivo (Ham et al., 2011; Fory et al., 2014) Se considera que el calentamiento global puede aumentar la pérdida del rendimiento en producción de arroz a causa de la enfermedad, y se puede generar una reducción en el consumo de arroz hasta de 204 millones de dólares (Shew et al., 2019)

El inicio de la enfermedad sigue sin ser elucidado totalmente, sin embargo, *B. glumae* es un patógeno que ha sido reportado en la semilla de arroz (Ham et al, 2011; Magbanua et al.,2014), por lo tanto, se considera que las semillas infectadas inician la infección en arrozales aparentemente libres de enfermedad (Magbanua et al.,2014). Basado en lo anterior hay que tener en cuenta que diferentes variedades de semilla de arroz pueden presentar mayor o menor susceptibilidad a la infección por *B. glumae* (Flórez Zapata & Vélez, 2011). En unión con lo anterior Pedraza, et al, (2018) demostró que semillas infectadas artificialmente con *B. glumae*, permiten que el patógeno mantenga una población basal durante todo el ciclo de cultivo, observando síntomas de enfermedad en plántulas como pudrición y plantas asintomáticas durante el estadio vegetativo y finaliza con afectar el llenado de grano en la fase reproductiva.

Adicional a la sospecha que la enfermedad pueda iniciar a partir de semillas enfermas, factores como: el clima, elevadas temperaturas, humedad durante la noche y el agua de riego están involucrados en su desarrollo (Nandakumar et al., 2009; Kim et al., 2012); otro factor importante a incluir es el número de plantas por lote, ya que un exceso de plantas en un cultivo aumenta la incidencia de la enfermedad dado que disminuye la aireación (Pérez & Saavedra, 2011).

Dentro de los síntomas de la enfermedad en el estadio de plántulas destacan: pudrición, retardo del crecimiento al verse afectada su longitud, hojas pequeñas, clorosis y maceración del tejido (Uematsu, et al, 1976; Flórez Zapata & Uribe-Vélez, 2011; Pedraza et al., 2018). Para Tsushima, (1996) adicional a la semilla, otra fuente de infección son los residuos de cosechas anteriores y el suelo, con lo anterior se puede ver el comportamiento del patógeno como un organismo epífito, de igual manera se puede observar su comportamiento como endófito cuando se inoculan semillas de manera artificial (Pedraza et al., 2018). Relacionado a lo anterior, un sustrato contaminado con el patógeno puede ser fuente de infección y las plántulas que crecen en él desarrollan síntomas de enfermedad y finalizan el ciclo de cultivo con el vaneamiento del grano (Li et al., 2016, Pedraza et al., 2018) sin embargo, no solo la semilla y el sustrato pueden desarrollar síntomas ya que

cuando se realiza una inoculación directa sobre las hojas, los síntomas de amarillamiento y necrosis se presentan entre las 72 horas y las 96 horas (Magbanua et al., 2014).

Con lo anterior, cuando se inocula de manera artificial la panícula, *B. glumae* es capaz de colonizar la gluma, lo cual frena la floración ya que durante esta fase la susceptibilidad de la planta al patógeno aumenta (Li et al., 2017), la enfermedad causa que las panículas pierdan su color o se sequen (Mew & Misra, 1994), el síntoma más importante es la pérdida significativa en el rendimiento de las cosechas ya que las panículas quedan totalmente erguidas debido a la ausencia de grano en ellas (Jeong et al., 2003)

1.2.4 Epidemiología

La enfermedad se ubica en los países de elevada producción arroceras, la gran mayoría de Asia: Japón, Korea, China, Malasia, Indonesia (Zhu et al., 2008). Sin embargo, ha iniciado su expansión hacia América incluyendo países como Estados Unidos, Colombia, Ecuador entre otros, causando pérdidas en los cultivos de entre el 15 y el 75%. (Nandakumar et al., 2009; Zhu et al., 2008; Fory et al., 2014). El 76% de los aislamientos realizados en arrozales en diferentes zonas del sur de los Estados Unidos revelan la presencia de *B. glumae* en los estados de Louisiana, Texas, Mississippi y Arkansas (Nandakumar et al., 2009).

En Costa Rica se evidenció la presencia del patógeno en 2009 en las zonas de Chorotega, Brunca y Pacífico Central, reportando un brote de *B. glumae* entre 2009 y 2010 promovido por las variaciones meteorológicas (Quesada-González & García-Santamaría, 2014). El primer aislamiento del patógeno en Ecuador se registra en la ciudad de Palestina reportando los primeros síntomas en 2012, a pesar de esto, el reporte oficial se hizo hasta el 2014 (Riera-Ruiz et al., 2014).

En Colombia se registra el primer reporte de la presencia del patógeno desde 1987 (Zeigler & Álvarez, 1989), sin embargo, es desde el primer semestre de 2007 que se tienen registros de una extensión grande de cultivos afectados en el

departamento de Córdoba, municipio Montería, corregimiento La doctrina; desde allí se encontró que diferentes regiones del país se ven afectadas (Correa, F., Pérez, C. Saavedra, 2007). Así mismo se ha logrado determinar que el periodo de siembra en los meses de febrero y marzo es un factor importante que contribuye a la incidencia de la enfermedad en el país (Pérez & Saavedra, 2011). Durante el 2009 en la región del Tolima se registró una disminución en la producción de arroz debido al vaneamiento de la panícula, generado por factores climáticos y debido a la presencia de patógenos entre estos *B. glumae* (Castilla. et al., 2010).

Análisis realizados hacia el 2012 señalan que, en Los Llanos, zona Centro, Caribe Húmedo y Caribe Seco demuestran que *B. glumae* está presente en el 80% de los aislamientos obtenidos a partir de 189 muestras vegetales (Molina, et al 2013). Las zonas de Norte de Santander, específicamente Cúcuta y Zulia, cuentan con aislados que responden a la infección por *B. glumae* (Galvis & Carrillo, 2015)

1.2.5 Manejo de la enfermedad

Actualmente no se tiene un método efectivo que permita el control de la enfermedad. Desde 1993 se usan productos químicos para combatirla, especialmente el ácido oxolínico el cual es efectivo controlando la enfermedad al reducir la población del patógeno (Hikichi, 1993), sin embargo, su uso está prohibido en algunos países debido al surgimiento de fenómenos de resistencia (Nandakumar et al., 2009).

El método que podría disminuir los riesgos, es realizar una detección temprana de la enfermedad en la etapa de plántulas para no contaminar los campos de siembra (B. K. Kim et al., 2012), por lo cual se sugiere implementar pruebas de germinación en lotes con semillas al azar para probar su inocuidad (Nandakumar et al., 2009). Otros autores sugieren la implementación de semillas certificadas que presenten resistencia a la infección y disminuir la concentración de abonos verdes, ya que estos propician condiciones favorables para el desarrollo del patógeno (Pérez & Saavedra, 2011). Finalmente, se recomienda realizar

siembras en periodos secos y hacer un número de siembras razonables acordes con el área del cultivo que faciliten la aireación una vez formadas las macollas (FEDEARROZ, 2009).

1.3 Control Biológico

Un organismo es considerado bio-controlador cuando es capaz de reducir el crecimiento poblacional y la actividad que genera síntomas de enfermedad por parte de un organismo patógeno, por lo anterior son una alternativa a los agroquímicos para enfrentar las enfermedades agrícolas y reducir el uso de biopesticidas (Kloepper, et al, 2004; Choudhary & Johri, 2009). Los mecanismos de acción de estos biocontroladores pueden ser variados y expresarse en un mismo momento dentro de la planta; los mecanismos de acción más estudiados son: Producción de compuestos antimicrobianos, competencia y colonización e inducción de resistencia sistémica (Chet, et al, 1990, Chowdhury, et al, 2015)

El género *Bacillus* sp. ha sido reconocido como uno de los principales microorganismos con capacidad biocontroladora secretando compuestos con actividad antimicrobiana los cuales son de tres tipos: lipopéptidos de síntesis no ribosomal (Surfactinas, Iturinas y Fengicinas), policétidos y péptidos de síntesis ribosomal (Ongena & Jacques, 2008). Estos compuestos desempeñan un rol importante dentro del biocontrol ya sea por antagonismo directo, capacidad de colonización en los espacios radiculares o como elicitores de la defensa en la planta (Ongena & Jacques, 2008). Otra acción conocida de estos lipopéptidos es que median la competencia sobre otras comunidades microbianas por los exudados de la raíz, lo cual disminuye la población de fitopatógenos (Wu et al., 2017)

La colonización consiste en la habilidad del microorganismo de establecer un nicho en las raíces de las plantas, competir, sobrevivir y dispersarse (Choudhary & Johri, 2009). La capacidad biocontroladora está directamente relacionada con la colonización, de acuerdo a Zeriuoh, et al, (2014), Wu et al., (2014) y Pandin, et

al, (2017) la colonización es considerada el principal requisito para que un organismo benéfico pueda efectuar una acción bio-controladora. Esta colonización puede darse a cabo en diferentes partes de la planta tales como, vástago, tallo y hojas, aunque generalmente los más frecuentes son la raíz y el suelo (Ramey, et al, 2004).

La colonización en especies de *Bacillus*, está relacionada con la formación de una biopelícula, la cual es el crecimiento de la población bacteriana dentro de una matriz de polisacáridos (Cairns, et al, 2014, Liu et al., 2014). La formación de una biopelícula está favorecida cuando el microorganismo se encuentra bajo condiciones de estrés (Pandín et al., 2017), esta película provee al organismo un nicho exclusivo, la capacidad de formación de este nicho revela la habilidad de competir por los nutrientes del medio mediante comunicación celular y producción de compuestos antimicrobianos (Pandín, et al, 2017).

Además de conferir nutrición y protección a la comunidad microbiana, la biopelícula protege contra condiciones adversas y daño mecánico, dándole una ventaja adaptativa a los organismos (Rafique et al., 2015). Un ejemplo de lo anterior es la cepa *B. amyloliquefaciens* ZM9, la cual muestra una fuerte colonización en los espacios rizosféricos mediante la formación de una biopelícula (Wu et al., 2016).

Así mismo la producción de compuestos antimicrobianos como surfactina y bacilomicina también está relacionada con la habilidad colonizadora de *Bacillus* sp, ya que estos compuestos le permiten adaptarse a la rizósfera y competir especialmente con organismos patógenos (Chowdhury, Uhl, et al., 2015).

La competencia entre microorganismos depende de las condiciones ambientales, de acuerdo a esto, hay criterios que promueven la competencia, en primer lugar un solapamiento entre cepas que comparten un nicho espacial y nutricional y que tienen un requerimiento similar en recursos (Ghoul & Mitri, 2016; Lloyd & Allen, 2015; Bauer, et al, 2018). Un criterio adicional, es la presencia de una alta densidad celular relativa a los recursos disponibles en el sistema, y finalmente

cuando hay poblaciones mixtas en un mismo nicho espacial lo cual incrementa la probabilidad de interacción y de uso de los mismos recursos (Lloyd & Allen, 2015).

El solapamiento de nicho, es una condición en la cual dos organismos están dentro de un mismo nicho nutricional y espacial (Pocheville, 2015), esto promueve la competencia lo que puede afectar a alguna de las dos poblaciones presentes. Como consecuencia de esta afectación se puede hablar de exclusión competitiva, en donde dos especies que existen en el mismo nicho compiten por los recursos y donde una población domina sobre la otra ya sea limitando su desarrollo poblacional o sometiéndola a desplazarse a un nuevo nicho (Hibbing, et al, 2010). Una consecuencia de la competencia promovida por solapamiento de nicho, es la especialización de las especies por los recursos presentes lo que modifica el nicho nutricional y espacial, logrando habitar de manera independiente de la otra especie (Hunting et al., 2015).

Cuando dos especies sobrelapan un nicho hay dos tipos de competencia, pasiva o activa. La competencia pasiva hace referencia al consumo total de los nutrientes por uno de los competidores, lo que restringe el acceso a los recursos (Stubbendieck & Straight, 2016), esto puede deberse a la producción de enzimas, sideróforos o a la afinidad del competidor por recursos específicos mediante regulación metabólica (Niehus, et ali, & Foster, 2017). Adicionalmente dentro de la competencia pasiva también se involucra la secreción de sustancias que impactan la estructura espacial y la motilidad bacteriana tales como moléculas de adhesión, formación de biofilm, surfactantes o polisacáridos (Schluter, et al, 2015).

El solapamiento de nicho nutricional entre especies que coexisten dentro de un mismo espacio puede ser establecido determinando la semejanza de los recursos usados por la población (Hunting et al., 2015; Orgeira, 2015). Respecto a lo anterior, el estudio de Nijburg, et al, (1998) muestra que hay una competición entre dos especies benéficas como *Pseudomonas fluorescens* y *B. licheniformis*

por la glucosa y los nitratos presentes en el medio, cuando las condiciones de su entorno (medio de cultivo) fluctúan, ya sea por variaciones en la presión de oxígeno o por limitaciones del sustrato. Otro ejemplo es planteado en el estudio de Elshakh et al., (2016) quienes usando diferentes especies de *Bacillus* demostraron que a medida que estos desarrollaban biofilm, las poblaciones de *Xanthomonas oryzae pv oryzae* disminuyeron en un 60% bajo condiciones *in vitro*.

Por su parte la competencia activa refiere a cuando una población elimina a la otra mediante la secreción de compuestos antimicrobianos, enzimas líticas, el sistema de secreción tipo VI entre otros. (Hunting et al., 2015; Stubbendieck & Straight, 2016)

1.3.1 La cepa IBUN 2755 como biocontrolador

Clasificación taxonómica	
Dominio	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Orden	Bacilli
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus velezensis</i>

Tabla 2. Clasificación taxonómica cepa IBUN2755 (Pedraza Herrera, et al, *In preparation*)

La cepa IBUN 2755 hace parte de la colección de cepas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, la cual fue aislada de rizósfera de papa criolla (*Solanum tuberosum*, Grupo: Phureja), es productora de lipopéptidos tipo fengicinas y surfactinas.

Ha mostrado actividad biocontroladora *in vitro* contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis var graminis* y *B. glumae* e *in vivo* contra *R. solani* en papa y *B. glumae* en arroz (Blanco Zapata, 2012; Pedraza Herrera, 2015; Zuluaga, 2019)

La identificación molecular hecha a partir de la región 16S ubican al aislamiento como *Bacillus amyloliquefaciens* con un 100% de identidad frente a las registradas en NCBI (Blanco Zapata, 2012). Adicionalmente ha sido reportado como promotor de crecimiento vegetal en plantas de arroz (Gómez Ramírez, 2015; Pedraza Herrera, 2015)

En el estudio más reciente para IBUN 2755 a través del análisis del genoma completo por comparación con 43 cepas de las especies de *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* y el cálculo del índice ANIb (Average Nucleotide identify bases in BLAST) ubicó a la cepa IBUN 2755 como miembro de la especie *B. velezensis* asociada a plantas y en el mismo clado de *B. velezensis* FZB42 una cepa considerada como de referencia como biocontrolador (Pedraza Herrera, et al, *In preparation*)

1.4 Mecanismos de colonización en *Bacillus*

1.4.1 La quimiotaxis como desencadenante de la colonización

La quimiotaxis es una respuesta de los organismos activada por sustancias específicas en el ambiente, el reconocimiento entre ligandos específicos presentes en el medio y sus respectivos receptores en la bacteria (Ordal & Goldman, 1975). Se ha visto que el reconocimiento de estos compuestos, presentes en los exudados radiculares pueden actuar como quimioatrayentes los cuales mejoran la movilización de los organismos PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, por sus siglas en inglés) hacia la rizósfera; puesto que la quimioataxis coordina los movimientos bacterianos hacia la fuente que produce el sustrato atrayente lo cual se relaciona con la colonización y establecimiento de la población bacteriana (Feng et al., 2018; Ordal & Goldman, 1975).

Una vez el microorganismo es reclutado en la rizósfera comienza su proceso de colonización a través de la formación de biopelículas, como es demostrado en el estudio de Jin et al., (2019) quien reportó que la interacción de *B. velezensis* S3-1 con sustratos radiculares de maíz permitió la colonización en la rizósfera,

promovió la quimiotaxis y la producción de biofilm hasta 2.08 veces en comparación con el control. En plantas de tomate, los ácidos orgánicos presentes en los exudados influyen en la colonización de *B. amyloliquefaciens* T-5 (Tan et al., 2013) Incluso puede haber una mayor atracción por los exudados radiculares de las plantas que se encuentran infectada con patógenos, tal es el caso de *B. amyloliquefaciens* SQR9 que presenta mayor quimiotaxis hacia los exudados de plantas de pepino infectadas con *Fusarium oxysporum* (Liu et al., 2014). En contraste a lo anterior los exudados pueden variar entre plantas si provienen de una clase distinta de semilla, lo que indica que los exudados presentes de acuerdo al tipo de semilla pueden afectar la colonización del biocontrolador, adicionalmente, no solo los exudados radiculares, si no, los secretados por la semilla también pueden influir en la colonización (Yaryura et al., 2008).

En resumen, la colonización de la rizósfera por parte de los organismos PGPR es una interacción combinada entre quimiotaxis y formación de biofilm, la cual va a depender de la composición de los exudados radiculares y la afinidad del microorganismo por estos seguido por la capacidad de formación de biofilm para establecerse en la raíz.

1.4.2 Producción de Biofilm y su relación con la colonización de cepas de *Bacillus* biocontroladores

La habilidad de un organismo promotor de crecimiento vegetal de colonizar la raíz influye en su capacidad de promotor de crecimiento y en la salud de la planta (Xu et al., 2019). La adición de PGPRs modifica la estructura del microbioma de la rizósfera por la secreción de metabolitos secundarios (Chowdhury, et al., 2015), dentro de estos se encuentra la surfactina la cual está relacionada con la colonización de *B. velezensis* FZB42 en plántulas de lenteja de agua (Idris et al., 2007). La colonización de *B. amyloliquefaciens* S499 en plantas de tomate estuvo

estrechamente relacionada con la expresión de surfactina asociada a la raíz, así mismo la concentración de biofilm en las raíces laterales estuvo asociada a la calidad de los exudados radiculares (Nihorimbere et al., 2012). Para *B. amyloliquefaciens* SQR9 también se ha demostrado que su colonización esta mediada por los exudados radiculares del pepino (Liu et al., 2014).

En raíces de *Arabidopsis* y de maíz *B. velezensis* FZB42 es capaz de recubrir las raíces primarias y el nacimiento de las raíces laterales; en este mismo trabajo encontraron que la expresión génica y los transcriptomas expresados por la bacteria eran influenciados por los exudados radiculares de las plantas (Fan et al., 2011). Chowdhury et al., (2013) muestra que la colonización de *B. velezensis* FZB42 y su capacidad de establecerse a lo largo de la rizosfera en plantas de lechuga se relaciona con su capacidad de competir contra *Rhizoctonia solani*, adicionalmente, la formación de esta biopelícula, no genera efectos negativos en la planta o en las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera. En un trabajo similar en estudios realizados en plantas de tomate infectadas con *Botrytis cinerea*, se ha propuesto que la habilidad colonizadora de *B. amyloliquefaciens* BBC047, mejora su actividad biocontroladora; de esta forma cuando el microorganismo es aplicado en la raíz produce una biopelícula, lo que conduce a la disminución de la severidad de la enfermedad y ejerce un efecto de promoción de crecimiento vegetal (Salvatierra-Martinez et al., 2018).

Se entiende como *biofilm* a una comunidad bacteriana que se desarrolla embebida en una matriz celular de exopolisacáridos que confiere a los microorganismos una fuente de soporte, nutrientes y almacenamiento de oxígeno para sobrevivir en ambientes hostiles, cambios de pH o de temperatura (Nazar, 2007). Dentro de la biopelícula hay canales que favorecen el transporte de agua, nutrientes y oxígeno; así mismo confiere resistencia a antibióticos, y se concentran metabolitos o toxinas que pueden ser tóxicos para la superficie donde se desarrolla (Lasa et al., 2005). La conformación de la biopelícula comprende tres etapas principales: Adherencia sobre la superficie, crecimiento sostenido en

la secreción de exopolisacáridos y finalmente liberación para colonizar un nuevo espacio (Espinosa-Urgel et al., 2002). Su formación está regulada gracias a un sistema de *quorum sensing*, el cual permite censar la población y nutrientes en el medio. Esta película puede conferir a los microorganismos que están en ella características benéficas o patogénicas que van a afectar directamente superficie donde se encuentra adherida (Lasa et al., 2005).

Dentro de la conformación estructural de la matriz hay distintos tipos celulares que ocupan diferentes espacios dentro de la misma, en organismos capaces de esporular la ubicación de las células motiles, las vegetativas, y las esporas va a variar en el espacio interno de la matriz (Vlamakis et al., 2008). La organización de las células dentro de la matriz facilita la distribución de bienes comunes, los cuales son las macromoléculas involucradas en la formación de la biopelícula.

Este comportamiento coordinado facilita la supervivencia en el ambiente hasta que se reestablezcan las condiciones favorables de desarrollo; la estructura rígida del *biofilm*, le permite interactuar con el ambiente a través de macromoléculas sin alterar las células al interior de la estructura (Cairns et al., 2014).

1.4.2.1 Biofilm en *Bacillus* biocontroladores

La esporulación en especies de *Bacillus* es un factor importante para la formación de biofilm y así mismo el inicio de la formación de la matriz es un determinante para la esporulación. En este sentido células vegetativas motiles inician la secreción de exopolisacáridos, los cuales son censados por la célula y activan la maquinaria de diferenciación en células esporuladas (Vlamakis et al., 2008). Otro factor determinante para la producción de biofilm son las señales volátiles emitidas por la célula tal como el ácido acético (Chen, Gozzi, Yan, & Chai, 2015) o el contacto con los exudados radiculares (Al-Ali et al., 2018), que inducen la producción de exopolisacáridos. En *B. amyloliquefaciens* SQR9 los mutantes del gen *sfp*, son incapaces de formar biofilm (Xu et al., 2019). Un doble mutante de los genes *sfp*, que codifica para la enzima 4'fosfopanteinil transferasa la cual está

involucrada en la modificación postraduccional de síntesis de péptidos no ribosomales policétidos y de *ggaA*, gen que codifica para la enzima GaA involucrada en la producción de biofilm, limita la capacidad del microorganismo de colonizar en raíces de pepino, esto debido a que se reduce la producción de exopolisacáridos y por lo tanto la formación de biofilm (Xu et al., 2019).

Adicionalmente, la formación de biofilm está relacionada con la capacidad colonizadora de la rizosfera, tal es el caso expuesto por Al-Ali (2018) en *B. velezensis* FZB42 que en plantas de tomate es capaz de colonizar la raíz a partir del consumo de sustratos presentes en los exudados radiculares y de la producción de surfactinas; así mismo los autores demuestran que mutantes deficientes de la formación de polisacáridos reducen su adherencia y formación de biofilm, lo cual es un indicio de que la capacidad colonizadora depende de la formación de biofilm y que puede estar sujeta a la producción de surfactinas (Al-Ali et al., 2018). Sumado a lo anterior, la producción de biofilm a partir de exudados radiculares también ha sido probada en maíz, encontrando que los exudados radiculares de maíz y sus compuestos individuales como ácido málico, prolina, glucosa, sacarosa, entre otros promueven la quimiotaxis y la formación de biofilm en *B. velezensis* S3-1 (Jin et al., 2019). En *B. amyloliquefaciens* SQR9 los amino ácidos presentes en pepino desencadenan la formación de biofilm, adicionalmente cuando los exudados radiculares son obtenidos en los diferentes tiempos de cultivo de pepino, la calidad e intensidad del biofilm varía según la concentración y presencia de aminoácidos en el exudado (Kimani et al., 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior puede considerarse que la capacidad de colonización de *Bacillus* en raíces, es debida a la habilidad de formar biofilm al ser atraída por los exudados radiculares de la planta hospedera lo cual sugiere un acercamiento a desdorar la interacción entre el microorganismo benéfico y la planta, adicionalmente revela la coordinación espacial del microorganismo una vez es inoculado, su relación con la planta y la posible interacción con el microbioma acompañante bien sean saprófitos u organismos patógenos (Pandini, Le Coq, Canette, Aymerich, & Briandet, 2017).

2. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la cepa IBUN 2755 en la población de la cepa CIAT 3200 de *B. glumae* en plantas de arroz?

¿La interferencia de la cepa IBUN 2755 sobre la colonización de la cepa CIAT 3200 está mediada por solapamiento de nicho entre ambas cepas?

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo General

Determinar la distribución, abundancia y generación de síntomas de la población de *Burkholderia glumae* en presencia de la cepa biocontroladora IBUN 2755 en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.)

2.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la cinética de colonización de la cepa biocontroladora IBUN 2755 en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.)
- Determinar bajo condiciones *in vitro* el solapamiento de nicho en términos de nutrientes de la cepa biocontroladora *IBUN 2755* y la cepa CIAT 3200 de *B. glumae*.

- Determinar el efecto de la cepa *IBUN 2755* sobre la dinámica de la población de *B. glumae* en plantas de arroz a través de los diferentes estados fenológicos bajo condiciones controladas.

3. Metodología

3.1 Cepas bacterianas.

Para el desarrollo de este proyecto se emplearon cepas de la colección de genes y cepas del instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. La cepa IBUN 2755, la cual cuenta con el contrato de acceso a recursos genéticos 160 del 7 de diciembre de 2017, fue recuperada a partir de un vial congelado a -20°C compuesto de caldo LB y glicerol 15%, para posteriormente ser sembrada por agotamiento en agar TSA e incubada a 28°C por 24 horas para su reactivación y verificación de la pureza.

Por su parte a partir de un vial congelado a -20°C compuesto de caldo LB y glicerol 15%, la cepa *Burkholderia glumae* CIAT 3200-12 fue sembrada por agotamiento en agar King B e incubada a 28°C por 48 horas para su reactivación y verificación de la pureza. La cepa 3200-12 fue brindada por el Centro de Investigación de Agricultura Tropical (CIAT) y corresponde a un aislamiento de origen geográfico Córdoba - Colombia

La cepa IBUN 2755 cuenta con el permiso acceso a recursos genéticos 160 del 7 de diciembre de 2017, fue transformada con el plásmido pDR111 en la Universidad de Sherbrooke (Quebec, Canadá) en el laboratorio de la Dra. Pascale B. Beauregard, en el departamento de Biología y cuenta con el marcador de selección que le confiere resistencia a espectinomicina en 100µg/ml; concentración a la cual la cepa silvestre no es capaz de desarrollarse. La cepa transformada fue denominada IBUN 2755-M1. Fue activada a partir de un vial congelado a -20°C compuesto de caldo LB y glicerol 15% y, fue sembrada por

agotamiento en agar LB con 100µg/ml de espectinomicina e incubada a 28°C por 24 horas para su reactivación y verificación de la pureza.

Las UFC se confirmaron mediante la técnica de microplaca la cual consiste en hacer diluciones seriadas hasta 1×10^7 UFC/ml. En agar LB se sembraron 20µl de cada una de las diluciones correspondientes a 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC/ml y se incubaron durante 24 horas para la cepa IBUN 2755 y 48 horas para *B. glumae* CIAT 3200

3.1.1 Obtención del mutante IBUN 2755-M1 resistente a espectinomicina.

Con la intención de obtener una cepa de IBUN 2755 que expresara la proteína fluorescente, se insertó el plásmido pDR111 el cual tiene un cassette de resistencia a 100 µg/ml de espectinomicina (*specR*) y hace una inserción de YFP (Yellow fluorescence protein) dentro del gen *amyE* de *Bacillus subtilis* 3610. Se hizo un análisis utilizando BLAST del centro de Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) hallando que el porcentaje de identidad entre los genes *amyE* de *B. subtilis* e IBUN 2755 es de 90%.

La transformación se llevó a cabo con el protocolo de competencia natural para *B. subtilis* (Wilson & Bott, 1968; Allard-Massicotte et al., 2016), como ADN donador se emplearon: extracción de DNA genómico *B. subtilis* 132 y *B. subtilis* 133 que hacen parte de la colección de cepas de la Dra. Pascale B. Beauregard, así mismo se usó producto de amplificación por PCR del gen *amyE* de *B. subtilis* 132 y *B. subtilis* 133 y plásmido pDR111 extraído de *E.coli*- NEB 5-alpha. A pesar que las colonias de la cepa IBUN 2755 resultantes de la transformación presentaban resistencia a 100 µg/ml de espectinomicina, concentración a la cual la cepa silvestre no se desarrolla; los resultados para verificación de la inserción mediante PCR no permitieron evidenciar la inserción en el gen *amyE* de IBUN 2755 nativo, ni la expresión de fluorescencia, sin embargo, la resistencia al antibiótico fue constante en el tiempo y se mantuvo tras 5 repiques en LB sin antibiótico. Al ver que la resistencia era consistente y no requería de la presión por espectinomicina,

se decidió llevar a cabo los ensayos de colonización con lo que se denominó mutante 1 (M1) (Figura S2), el cual de acuerdo a los resultados de PCR es un mutante espontáneo.

3.1.2 Desinfección superficial de semillas de arroz

Semillas de arroz FEDEARROZ variedad F2000 y F733 fueron desinfectadas superficialmente usando hipoclorito de sodio al 6% durante 6min, seguido a tres lavados con agua destilada estéril (ADE), etanol 70% durante 6 minutos y finalmente tres lavados con ADE.

3.1.3 Diseño experimental

Los ensayos fueron llevados a cabo usando 5 plantas como unidad experimental, y tres replicas para un total de 15 plantas por experimento. Los experimentos cuentan con una réplica en el tiempo.

3.2 Evaluación de la cinética de colonización de IBUN 2755 como endófito en plantas de arroz

3.2.1 Colonización de IBUN 2755 en plantas de arroz F2000

Para realizar los estudios de colonización de IBUN 2755 se utilizó la cepa mutante (M1) resistente a 100µg/ml de espectinomicina. La cual conserva las características morfológicas y fenotípicas y a la capacidad de inhibición *in vitro* de *B. glumae* similares a las de la cepa silvestre (Figura S3).

3.2.2 Inoculación de semillas de arroz

Semillas de arroz desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 6% durante 6 min, lavadas con agua destilada estéril (ADE), etanol al 70% durante 6 min, lavadas con ADE, fueron inoculadas con una suspensión de IBUN 2755-M1 ó IBUN 2755 ó *B. glumae* ajustada a una OD 0.200 lo que corresponde a una concentración aproximadamente de 1×10^7 UFC/ml para IBUN 2755 y 1×10^8

UFC/ml para *B. glumae*. 20 semillas fueron dispuestas en un tubo Falcon® de 50 ml de capacidad en 20 ml de suspensión bacteriana, posteriormente las semillas fueron incubadas en cámara de crecimiento con agitación orbital de 150 rpm, y 30°C, durante 30 minutos. Seguido a esto las semillas fueron puestas en cámara húmeda por 3 días para su germinación.

3.2.3 Crecimiento de plantas en condiciones controladas y seguimiento de la población bacteriana de IBUN 2755-M1 como endófito.

Plántulas de arroz con 3 días de germinación con exposición de radícula, inoculadas en su estadio como semillas, fueron dispuestas en un frasco de vidrio estéril de 20 cm de alto por 5 cm de diámetro, que contenía 35 ml de agar Hoagland (4% agar mas Solución Hoagland 50%). El seguimiento de la colonización se hizo durante los días 7, 14, 21 y 28 post inoculación. Los tratamientos fueron dispuestos de la siguiente manera: Plantas inoculadas con la cepa IBUN 2755-M1, y plantas control sin inocular.

Para determinar el crecimiento de la cepa como endófito, luego de cada periodo de incubación, las plantas fueron divididas entre raíz y vástago, y desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 6% 3min, tres lavados con ADE, luego etanol 70% y finalmente tres lavados con ADE; seguido a esto se introdujeron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad para ser macerado con un pistilo plástico y solución salina. Seguido a la maceración se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-2} . Cada dilución fue sembrada en agar LB con 100µg/ml de espectinomicina e incubada 24 horas a 30°C. La población bacteriana endófito fue determinada contando el número de unidades formadoras de colonia crecidas en cada dilución. Se verificó la esterilidad de la raíz y el vástago posterior a la desinfección superficial mediante impronta en agar LB con 100µg/ml de espectinomicina e incubada 24 horas a 30°C.

Para determinar el crecimiento de la cepa en la superficie de las plantas, fueron divididas en raíz y vástago, pero no se realizó ningún tipo de desinfección, se maceró con pistilo y solución salina y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} . Cada dilución fue sembrada en agar LB con $100\mu\text{g/ml}$ de espectinomicina y se incubó 24 horas a 30°C .

3.2.4 Colonización en raíz a partir de exudados radiculares.

En cultivo hidropónico estéril con medio Hoagland 50%, que tenía semillas germinadas estériles, se inoculó con la cepa IBUN 2755 a un volumen final de OD 600nm 0.02, las plantas se desarrollaron en cámara de crecimiento Sanyo® con fotoperiodo 12h: (12h luz, 12h oscuridad), humedad relativa 75% y 28°C de temperatura, haciendo muestreo de 5 plantas luego de 7, 14, 21, y 28 días de crecimiento. Se colectaron las raíces, se pesaron y se lavaron 3 veces con buffer PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM) (Allard-Massicotte et al., 2016). Las bacterias se separaron de la raíz mediante sonicación utilizando un disruptor ultrasónico Sonics Vibra Cell VC-130®. El sonicador se ajustó al 30% para 10 pulsos de 1s, cada uno seguido de una pausa de 1 s. (Allard-Massicotte et al., 2016). Las células obtenidas al final de proceso se determinaron mediante conteo en placa en medio LB, se determinaron las UFC de la cepa IBUN 2755 por gramo de peso fresco de planta.

3.3 Determinación bajo condiciones *in vitro* del solapamiento de nicho en términos de nutrientes de la cepa biocontroladora IBUN 2755 y la cepa CIAT 3200 de *B. glumae*.

3.3.1 Crecimiento de las cepas en sustratos específicos de exudados de plantas de arroz F2000

Con el fin de determinar si la cepa CIAT 3200 de *B. glumae* y la cepa IBUN 2755 eran capaces de crecer usando los sustratos presentes en los exudados

radiculares de arroz reportados por Bacilio-Jiménez et al., (2003) se evaluaron los siguientes amino ácidos: Alanina, Ácido glutámico, Glicina, Leucina, Prolina, Serina, Treonina y Valina y algunos carbohidratos: Ácido glucurónico, Arabinosa, Manosa. Para determinar el crecimiento de IBUN 2755 en una placa de Elisa de 96 pozos se dispensaron 200 μ l de medio mínimo S7 (4 Mm KPO_4 , 50 Mm HEPES, 50 μ M $MnSO_4$, 5 μ M $FeSO_4$, 2 Mm $MgSO_4$, 2 μ M Tiamnina, 1 μ M $ZnCl_2$, 700 μ M $CaCl_2$) de acuerdo a la metodología sugerida por Yang et al., 2015. El medio fue suplementado con los sustratos mencionados anteriormente a una concentración equivalente a 1 mM para cada amino ácido y cada carbohidrato a analizar, según metodología reportada por Yang et al., (2015). Para determinar el crecimiento en *B. glumae* se usó la composición de sales presentes en el medio SPG, que es el medio reportado por Tsushima et al., 1996 para el crecimiento de *B. glumae*, suplementado con el amino ácido o el carbohidrato a probar a una concentración de 1Mm. Con el objeto de determinar la capacidad de consumo de cada uno de los sustratos mencionados, se agregó el microorganismo ya sea la cepa CIAT 3200 de *B. glumae* ó la cepa de *B. velezensis* IBUN 2755 a una concentración de 1×10^5 UFC/ml como concentración final. Se incubó a 30°C en agitador orbital Thermo Scientific en agitación constante de 150 rpm y se leyó en el lector de placas Thermo Scientific Multiskan FC a una absorbancia de 590nm. haciendo seguimiento de crecimiento a las 24 y 48 horas.

3.3.2 Ensayos de Quimiotaxis

Los ensayos de quimiotaxis fueron realizados usando capilares de vidrio Drumond® de 1 μ l de capacidad de acuerdo a la metodología de Adler, 1973 y Ordal, 1976. Brevemente de un cultivo microbiano de 12 h crecido en agar LB, se tomó un asa y se inocularon en 3 ml de caldo LB, las células se colocaron en agitación a 200 rpm por 3h. Se lavaron dos veces en buffer de quimiotaxis (Buffer de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, glicerol al 0,05%, 5 Mm Lactato de Sodio, $CaCl_2$ 0,14 mM y $(NH_4)_2SO_4$ 0,3 Mm) (Ordal, 1976). La

densidad óptica a 600 nm (OD600) se ajustó a 0.200 y utilizando buffer de quimiotaxis se llevó hasta una OD de 0.002. Se añadieron 200 µl de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Posteriormente se sumergió un capilar que contenía los sustratos a probar descritos anteriormente. Seguido de una incubación de 45 min, luego de la cual se retiraron los capilares y se lavaron con agua destilada estéril. El contenido del capilar se diluyó en buffer de quimiotaxis. Se determinó UFC/ml para cada uno de los sustratos evaluados mediante conteo en placa en medio LB. Se utilizó una solución de glucosa 200 µM como control positivo y buffer de quimiotaxis como negativo.

3.3.3 Ensayos de quimiotaxis hacia los exudados radiculares

3.3.3.1 Extracción de los exudados radiculares.

La obtención de los exudados radiculares de arroz se realizó mediante un sistema hidropónico estéril, basado en los sistemas propuestos por Niu & Kolter, (2018) y Bacilio-Jiménez et al., (2003). Brevemente, semillas de arroz fueron desinfectadas como se describió anteriormente, luego en un tubo de vidrio estéril de 15 cm de largo y 2,5 cm de diámetro, se colocó 45 ml de medio Hoagland al 50% estéril; posteriormente se colocaron 5 semillas de arroz estériles; el sistema fue sellado usando otro tubo de las mismas características unidos con papel Parafilm®. Los tubos así preparados fueron dispuestos en una cámara de crecimiento con 12 h de oscuridad y 12 h de luz, 28 °C y humedad relativa 75%. Los tubos fueron dejados en agitación constante a 100 rpm y los exudados fueron recogidos a los 7, 14 y 21 días de incubación.

3.3.3.2 Ensayos de quimiotaxis

Los exudados fueron recuperados de los capilares de vidrio y dispensados a tubos tipo Falcom de 50ml de capacidad estériles y filtrados con filtros Whatman® 0.2µm de tamaño de poro. Con los exudados recuperados se realizaron ensayos de quimiotaxis para ambos microorganismos y ensayos de competencia. Para la elaboración de dichos ensayos se emplearon los dos microorganismos al tiempo

en un solo pozo, ambos ajustados a una OD 600 nm de 0,002 y siguiendo la metodología descrita previamente para quimiotaxis, las suspensiones presentes en cada capilar se sembraron en agar LB cuando los microorganismos fueron evaluados solos; para los ensayos de competencia *B. glumae* fue sembrada en agar SPG e IBUN 2755 fue sembrada en agar LB.

3.3.4 Evaluación de la producción de *Biofilm* por IBUN 2755 y por *B. glumae*

Para la cepa IBUN 2755 los ensayos de biopelícula fueron realizados siguiendo la metodología expuesta por Beauregard, et al., (2013). Brevemente las células se cultivaron a partir de colonias tomadas de un cultivo de 12h en agar LB, luego fueron re-suspendidas en 3 ml de LB y crecidas por 2 h a 200 rpm y a 30°C, posteriormente las células se diluyeron 1:100 en 3 ml de LB, luego fueron crecidas bajo la misma condición y fueron diluidas nuevamente y cultivadas por 2 horas para garantizar que las células estuviesen en fase exponencial. Las células así preparadas se ajustaron a un OD de 0,3 a 600nm. En un frasco de vidrio de 3 cm de alto por 1 cm de diámetro se adicionó 1 ml de caldo LB y 13,5 µl de las células ajustadas, adicionalmente siguiendo la misma metodología y con el propósito de inducir una mejor producción de biofilm se inculó el caldo LB suplementado con 1% de glicerol y MnSO₄ (LBGM) ya que ambos compuestos incrementan la producción de biofilm (Shemesh & Chai, 2013). Luego se incubaron a 30°C en cámara húmeda, introduciendo los frascos de vidrio en caja plástica con servilletas humedecidas con 10 ml de ADE ya que la humedad está involucrada en la adherencia microbiana. Se evaluó de manera cualitativa la producción de *biofilm* a las 24 y 48 horas de acuerdo a la metodología de Beauregard, et al., (2013) y Shemesh & Chai, (2013)

Teniendo en cuenta que no se encontró reportado en la literatura un protocolo para evaluar formación de biofilm en *B. glumae* se empleó un protocolo descrito para *B. pseudomallei* y *B. cepacea* (Borlee et al., 2017; Mangalea, Plumley, & Borlee, 2017; Oppy et al., 2019). Brevemente un cultivo de 12h de la bacteria fue

ajustado a un OD de 1.0 a 600nm, inoculado en 2ml en caldo LB en un frasco de vidrio de 3cm de alto x 1cm de ancho estéril haciendo una dilución 1:10. Se incubaron en cámara húmeda a 30°C. La producción de biofilm en el frasco de vidrio se evaluó a las 12, 24 y 48 horas. También se evaluó la producción de biofilm de *B. glumae* en medio LBGGM.

3.4 Determinación del efecto de la cepa IBUN 2755 sobre la dinámica de la población de *B. glumae* en plantas de arroz a través de los diferentes estados fenológicos bajo condiciones controladas.

3.4.1 Infección de semillas de arroz con *B. glumae*

Usando el modelo de Co-infección propuesto por Pedraza Herrera (2015) para *B. glumae* en semillas, se realizó la inoculación del patógeno y la cepa IBUN 2755 de la siguiente manera: Semillas de arroz Fedearroz F733 desinfectadas superficialmente, se inocularon con 1×10^8 UFC/ml de *B. glumae* CIAT 3200 por sistema al vacío siguiendo la metodología de (Flórez Zapata & Uribe Vélez, 2011) e inmediatamente bacterizadas con 1×10^8 UFC/ml de la cepa IBUN2755 durante 30 min a 30°C a y 150rpm. Finalmente, se aplicaron los siguientes tratamientos: Semillas infectadas con *B. glumae*, semillas infectadas con *B. glumae* y tratadas con IBUN 2755 y como control semillas desinfectadas sin inocular a las cuales se les aplicó el tratamiento de vacío descrito por (Flórez Zapata & Uribe Vélez, 2011).

Una vez co-inoculadas, las semillas se germinaron durante 10 días en caja de Petri estéril con papel absorbente estéril húmedo (cámara húmeda), esto con el fin de mantener el ambiente controlado y poder garantizar la presencia de los microorganismos de interés. Para la germinación se colocaron 5 semillas por caja. Con el objeto de verificar síntomas, la presencia de *B.glumae* en las plantas infectadas y la actividad biocontroladora de IBUN 2755, plantas de 10 días fueron seleccionadas para realizar medición de la longitud del tallo y raíz y determinar el

grado de infección según la escala propuesta por Flórez Zapata & Uribe-Vélez, 2011; a los 10 días postinoculación las plantas se retiraron del ambiente controlado y fueron sembradas en materas con 2 Kg de la mezcla suelo- gravilla (80:20) y puestas en un invernadero con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura constante de 28°C +/- 3 y humedad de 75% hasta la fase de llenado de grano.

3.4.2 Seguimiento a la colonización de *B. glumae* en diferentes fases de cultivo bajo invernadero.

El seguimiento de *B. glumae* en el tejido vegetal fue realizado haciendo muestreos destructivos de manera aleatoria en raíces y vástago para plántulas de 10 días y en raíces, vástago y hojas durante las fases de macollamiento, floración y llenado de grano (Pedraza et al., 2018). En cada una de estas fases las partes de la planta ya mencionadas se desinfectaron superficialmente, luego fueron maceradas y sembradas por dilución en los medios SPG para el conteo de las poblaciones, de acuerdo con la metodología propuesta por Pedraza et al., (2018). Las colonias contadas fueron repicadas en medio King B para confirmar la morfología de *B. glumae*.

3.4.2.1 Verificación de la presencia de *B. glumae* y confirmación de colonias presuntivas mediante métodos moleculares

De cada uno de los tiempos de muestreo se realizó extracción de DNA bajo el método establecido por (Li et al., 2008) una vez extraído el DNA se realizó PCR convencional utilizando los *primers* y las condiciones propuestas por Sayler et al., (2006) (Figura S7)

3.5 Tratamiento estadístico de los datos

Para todos los ensayos se usó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con triplicado. Se analizó la normalidad de los datos con la prueba Shaphiro Wilk con un 95% de significancia y la homocedasticidad de Barlette con la misma

significancia. Adicionalmente se determinó la curtosis y simetría de las curvas de distribución para determinar el tipo de transformación a realizar en caso de ser necesaria.

Para los datos paramétricos 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% ($p \leq 0,05$). Las letras diferentes muestran las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

En los casos en que no se cumplieran los supuestos estadísticos, se realizó transformación de acuerdo con la simetría y curtosis de la distribución de los mismos. Una vez transformados los datos, si no cumplían los supuestos, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (WK) con un valor de significancia $p \leq 0,05$ y se aplicó la prueba múltiple de comparaciones Wilcoxon test para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas a un 95% de significancia, las letras diferentes muestran diferencias significativas. Para el tratamiento de los datos se usó software R versión 3.5 (Team, 2015).

4. Resultados y discusión

4.1 Cinética de colonización de la cepa biocontroladora IBUN 2755 en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.)

4.1.1 Colonización de IBUN 2755 en plantas de arroz F2000

Los ensayos de colonización de la cepa IBUN 2755 en plantas de arroz F2000 bajo condiciones controladas empleando la cepa mutante IBUN 2755-M1 resistente a espectinomicina, los resultados muestran que IBUN 2755-M1 es capaz de desarrollarse como endófito tanto en raíz y como en vástago, y de permanecer en la planta durante la fase vegetativa hasta el día 28 en el sistema empleado (Figuras 1 y 2). Así mismo la cepa puede mantenerse en la superficie de la planta (epífita) con concentraciones constantes a lo largo del tiempo muestreado sin cambios estadísticamente significativos (Figura 1). Merece mencionar que, como era de esperar, las plantas control no presentaron ningún crecimiento del microorganismo.

La colonización superficial de la cepa o población epífita de la cepa IBUN 2755-M1 se mantiene constante a lo largo del tiempo evaluado en 1×10^5 UFC/g.p.f (gramos de peso fresco) tanto en raíz como en vástago (Figura 1), estos

resultados son comparables a los obtenidos por Nihorimbere et al.(2012) para la cepa *B. amyloliquefaciens* S499, quienes al día 23 reportan una población epífita de 5.6×10^5 UFC/gr. En el estudio mencionado atribuyen la colonización efectiva a la producción de surfactinas compuesto también generado por IBUN 2755 de acuerdo a estudios *in vitro* de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) realizado por Blanco Zapata, (2012). Los resultados obtenidos en este estudio, en cuanto a colonización, permiten sugerir que la presencia de este compuesto puede estar asociado a la colonización de IBUN 2755 en plantas de arroz. Lo anterior se debe a que la colonización, la formación de biofilm y la producción de surfactinas son eventos simultáneos favorecidos por la presencia de compuestos orgánicos liberados por la planta y son utilizados por el microorganismo para liderar sus procesos metabólicos (Nihorimbere et al., 2012; Salvatierra-Martinez et al., 2018).

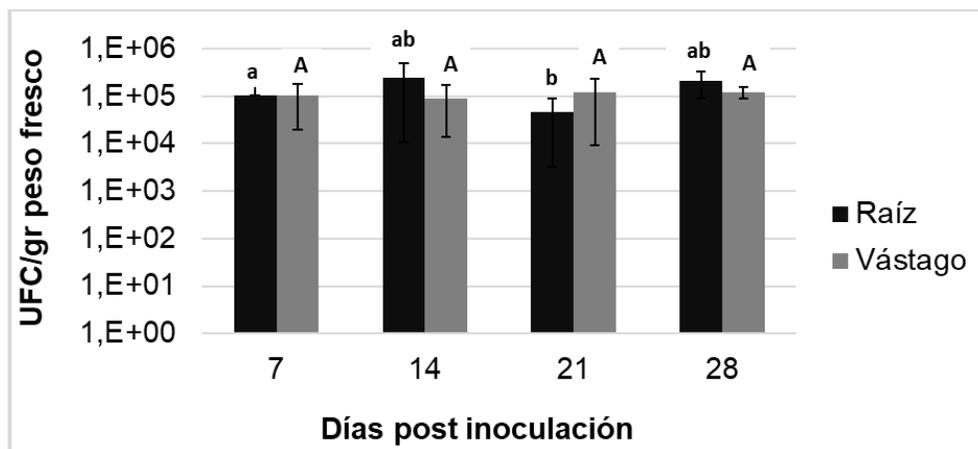


Figura 1. Población epífita de la cepa IBUN 2755-M1 sobre la superficie de plantas de arroz en varios tiempos posinoculación. Las plantas control no presentaron presencia del microorganismo cuando fueron sembradas en agar LB + 100ug/ml de espectinomocina. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia. Letras mayúsculas corresponden a la diferencia en el tiempo para vástago y las minúsculas para raíz.

Las concentraciones del microorganismo como endófito, permanecen constantes en raíz hasta el día 21 a una concentración de 1×10^3 UFC/g.p.f, ya que para el día 28 hay un incremento estadísticamente significativo llegando a una concentración de 4×10^4 UFC/g.p.f. Hay un declive en la población hacia el día 21 donde la colonización disminuye un orden de magnitud, este efecto ya ha sido reportado por Nihorimbere et al. (2012), quienes evaluando la colonización de *B. amyloliquefaciens* S499 en plantas de tomate mostrando que entre el día 13 al día 18 hay un descenso en la población de un orden de magnitud que varía de 3.0×10^6 UFC/g.p.f a 8.1×10^5 UFC/g.p.f. El declive en la población puede deberse a un efecto de establecimiento, donde el organismo busca alcanzar su máxima población de acuerdo a la cantidad de nutrientes presentes (Espinosa-Urgel, Kolter, & Ramos, 2002). En este contexto el establecimiento de un microorganismo está dado por la producción de compuestos que garantizan la colonización y con ello la supervivencia, como exopolisacáridos o lipopéptidos tipo surfactina (Nihorimbere, et al, 2009); como es el caso de la subtilomicina un péptido ribosomal importante en el establecimiento de *B. subtilis* como endófito que permite la evasión de la defensa de la planta y de esta forma la colonización de la cepa de *B. subtilis* Bsn5 en plantas de *A. thaliana* (Deng et al., 2019)

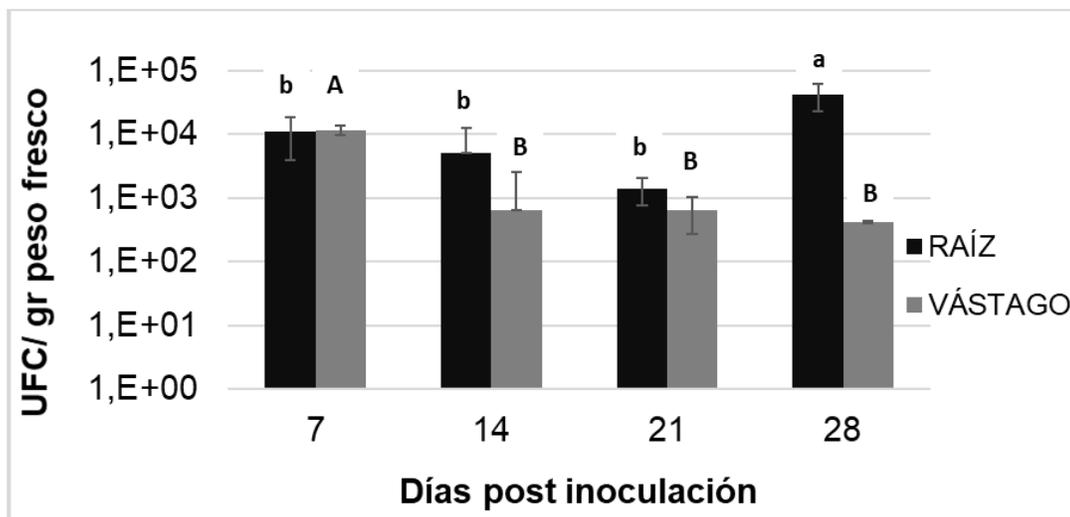


Figura 2. Población endófito de la cepa IBUN 2755 (M1) en plantas de arroz a diferentes tiempos post inoculación. Las plantas control (No inoculadas) no presentaron presencia del microorganismo cuando fueron sembradas en agar LB + 100 ug/ ml de espectinomicina. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia. Letras mayúsculas corresponden a la diferencia en el tiempo para vástago y las minúsculas para raíz.

La cepa IBUN 2755-M1 es capaz de sobrevivir de manera constante como epífita sobre la planta y como endófito durante 28 días bajo condiciones controladas, esto resalta las capacidades de colonización de la cepa, lo cual según expone Salvatierra-Martinez et al. (2018) es un indicador de la habilidad de *Bacillus amyloliquefaciens* como biocontrolador de *Botrytis cinerea* en plantas de tomate.

Para garantizar la diferenciación entre la población endófito de la epífita de la cepa IBUN 2755-M1 considerada como endófito, se realizó control del material desinfectado mediante una impronta sobre agar LB + 100 ug/ ml de espectinomicina evidenciando que no hay crecimiento de la cepa de *Bacillus* sobre la superficie del material vegetal desinfectado (Figura 3B).

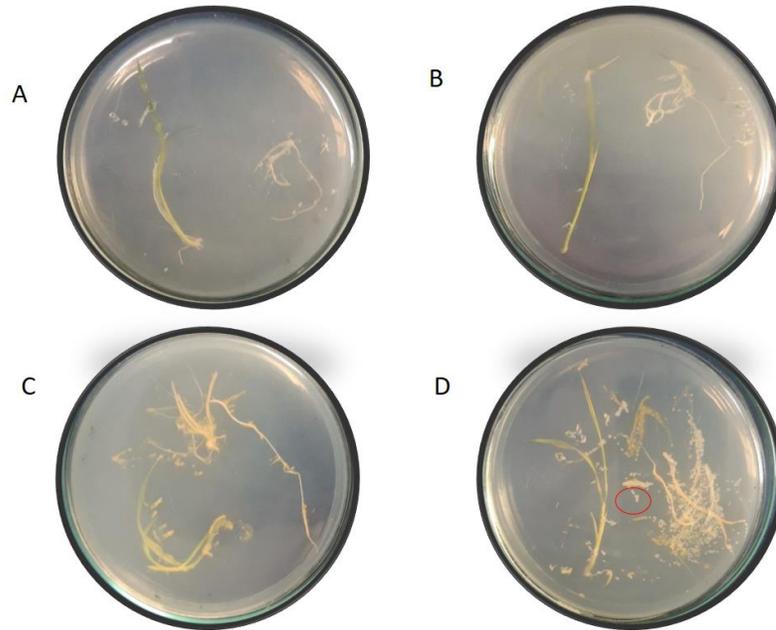


Figura 1. Verificación de la desinfección superficial de las plantas para garantizar conteo de la población endófito de la cepa IBUN 2755-M, a) Plantas control sin inocular con desinfección superficial. b) Plantas inoculadas con M1 con desinfección superficial. c) Plantas control sin inocular sin desinfección superficial. d) Plantas inoculadas con IBUN 275-M1 sin desinfección superficial dentro del círculo rojo se evidencian colonias de 24 horas, blancas, mucosas, pequeñas, similares al morfotipo de la cepa con IBUN2755-M1

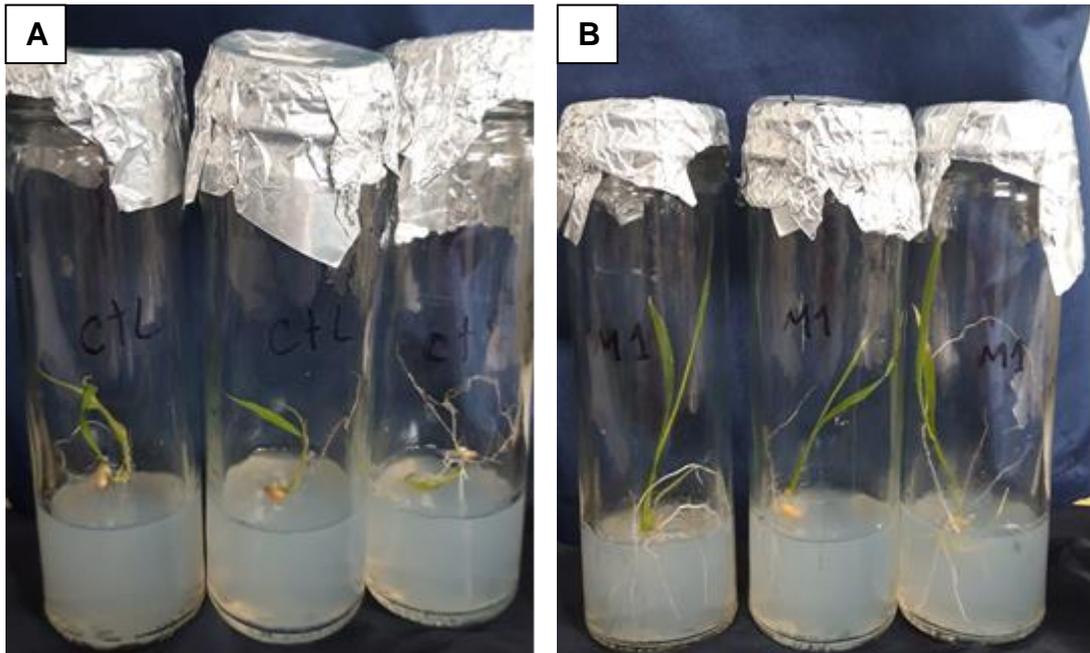


Figura 2. Plantas de 14 días postinoculación correspondientes al ensayo de colonización. A) Plantas control sin inocular, B) Plantas inoculadas con M1.

4.1.2 Colonización de IBUN 2755 en raíces de arroz usando exudados radiculares como fuente de carbono.

Raíces de arroz de plantas crecidas en un sistema hidropónico estéril fueron inoculadas con 1×10^5 UFC/ml de la cepa IBUN 2755, se evaluó su colonización durante los días 7, 14, 21 y 28 usando solo los exudados radiculares de arroz como única fuente de carbono, encontrado que el microorganismo es capaz de colonizar efectivamente la raíz en el día 7 (Figura 4) llegando a una concentración de 1×10^7 UFC/gramo de raíz, para el día 14 la población disminuye a 1×10^6 UFC/gramo de raíz y se mantiene constante hasta el día 28. Resultados similares han sido reportados para *B. amyloliquefaciens* S499 en plantas de pepino donde entre el día 13 y 18 se disminuye un orden de magnitud la población bacteriana (Nihorimbere et al., 2012).

Es conocido que la colonización de los microorganismos depende de los sustratos presentes en los exudados radiculares y de la capacidad del microorganismo para censarlos e ir hacia ellos, tal como es el caso de *B. amyloliquefaciens* BNM39 en plantas de soya (Yaryura et al., 2008). La concentración de los compuestos presentes en los exudados radiculares de plantas es variable tal es el caso en plantas de arroz donde la concentración de amino ácidos y azúcares disminuye a partir del día 14 según los resultados presentados por Bacilio-Jiménez et al., (2003). Esta disminución podría estar involucrada en el decrecimiento de la población, ya que la densidad de la población de microorganismos asociados a la raíz va a depender de la concentración de nutrientes liberados en los exudados radiculares, debido a que los microorganismos tienen la capacidad de reconocerlos y de migrar hacia ellos (Jin et al., 2019). Una vez llegan a la raíz el microorganismo incrementa su población hasta llegar al equilibrio, el cual va a depender de los nutrientes presentes, una vez alcanzado el equilibrio la población excedente de microorganismos que afecten la estabilidad va a desprenderse (Espinosa-Urgel et al., 2002).

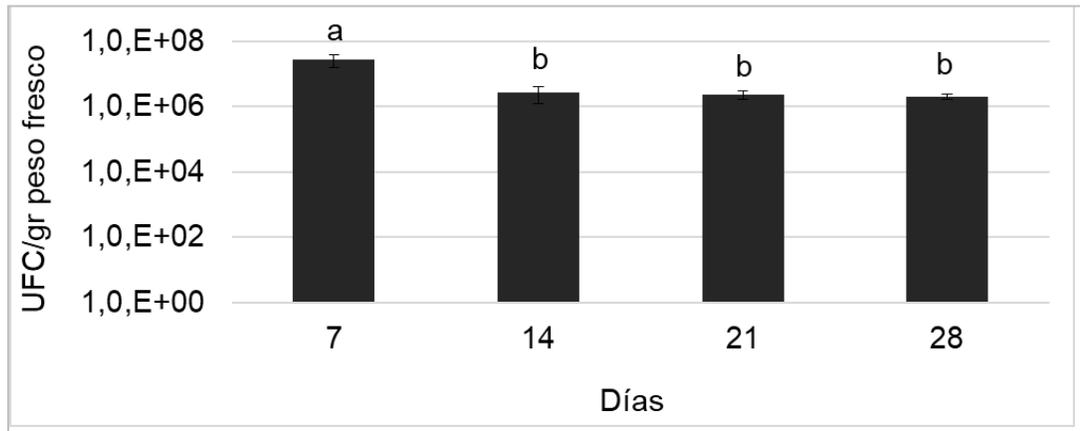


Figura 3. Colonización de IBUN 2755 en raíz de arroz usando los exudados radiculares como única fuente de carbono. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia.

Merece mencionar que los experimentos de colonización fueron realizados igualmente en plantas de arroz variedad Indica-Tadukan, en el laboratorio de la Doctora Pascale B. Beauregard en la universidad de Sherbrooke, en Canadá, mostrando resultados similares (Figura S4).

4.2 Solapamiento de nicho en términos de nutrientes de la cepa biocontroladora IBUN 2755 y la cepa CIAT 3200 de *B. glumae*

4.2.1 CONSUMO DE SUSTRATOS

Unas de las estrategias de control biológico consisten en la competencia por espacio y nutrientes entre el controlador biológico y el patógeno a controlar (Chowdhury et al., 2015). Para que este evento se dé se debe iniciar por identificar si ambas especies poseen lo que se conoce un solapamiento de nicho, el cual consiste en identificar si ambas especies comparten afinidad por un

número específico de sustratos por los cuales pudiesen competir (Lloyd & Allen, 2015). Siendo el nicho en el que van a encontrar ambos microorganismos la rizósfera de arroz, se decidió evaluar un posible solapamiento de nicho por nutrientes entre *B. glumae* e IBUN 2755, con este fin se realizó un ensayo de consumo de fuentes de carbono usando los sustratos presentes en los exudados de radicales de arroz expuestos por Bacilio-Jiménez et al., (2003) ya que los medios empleados Medio mínimo S7 para IBUN 2755 (Yang et al., 2015) y Medio de sales de SPG para *B. glumae* (Tsushima et al 1986) contaban con fuentes de nitrógeno, el objetivo fue determinar si la cepa IBUN 2755 y *B. glumae* podían usar los exudados del arroz como fuente de carbono. Para efectos de este ensayo se considera un resultado positivo aquellos sustratos en los que el microorganismo logra desarrollar una biomasa celular similar a la alcanza en niveles dentro del 50 – 100% de glucosa, entendiéndose como 100% una concentración de 1mM.

A las 24 horas IBUN 2755 es capaz de usar Alanina y Valina; mostrando que hay una preferencia por Alanina como fuente de carbono (Figura 6) y no usa Glicina, Serina, Ácido glucurónico, Arabinosa ni Manosa como fuente de carbono. A las 48 horas se activa el metabolismo por Ácido glucurónico, Arabinosa y Leucina ya que estos son usados a las 48 horas como fuente de carbono (Figura 6). Se conoce que el metabolismo de algunas especies de *Bacillus* es de baja conversión para glucosa como es el caso de *B. subtilis* F4-3 el cual requiere de bajas concentraciones de glucosa y elevadas de extracto de levadura para poder desarrollarse (Tian, et al, 2016) Así mismo, para *B. subtilis* RB50 se ha demostrado que su eficiencia metabólica se reduce en elevadas concentraciones de glucosa mostrando un crecimiento bajo y limitado en donde hay mucho consumo de carbono pero poco aumento de biomasa (Dauner, & Sauer, 2001).

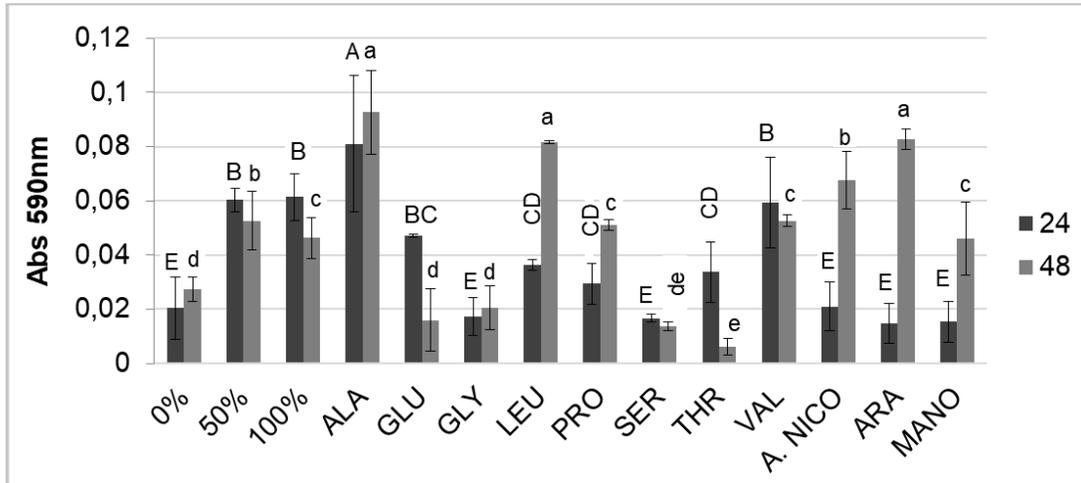


Figura 4. Crecimiento de IBUN 2755 en las fuentes de carbono presentes en los exudados de arroz. Alanina (ALA) Ácido glutámico (GLU), Glicina (GLY), Leucina (LEU), Prolina (PRO), Serina (SER), Threonina (THR), Valina (VAL), Ácido Glucurónico (A. NICO), Arabinosa (ARA), Manosa (MANO). Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan con un 95% de significancia. Letras mayúsculas reflejan las diferencias a las 24 horas, letras minúsculas reflejan diferencias a las 48 horas.

Por otro lado *B. glumae* es capaz de crecer en la mayoría de los sustratos que fueron evaluados como fuente de carbono y su crecimiento se ve revelado tanto a las 24 como a las 48 horas (Figura 7) destacando el uso de Glicina y Manosa a las 24 horas y de Prolina y Alanina a las 48 horas. Naher y colaboradores encontraron que la cepa de *Burkholderia sp.* SB13, es capaz de desarrollarse en medio ricos en glucosa y otros azúcares como fructosa y arabinosa logrando un consumo del 97% del sustrato entre las 24 – 36 horas (Naher, et al, 2008). Así mismo en un estudio de fuentes de carbono metabolizadas por *B. glumae* realizado por Kawanishi et al., (2011), se puede observar que el microorganismos es capaz de usar ácido glutámico, glucosa, serina y prolina como fuentes de carbono, similar a lo obtenido en este estudio.

La diferencia de población bacteriana para los dos microorganismos teniendo en cuenta la absorbancia entre las 24 y las 48 horas puede deberse a la preferencia catabólica por ciertas fuentes de carbono (Wendisch, et al, 2000; Couturier & Rocha, 2006).

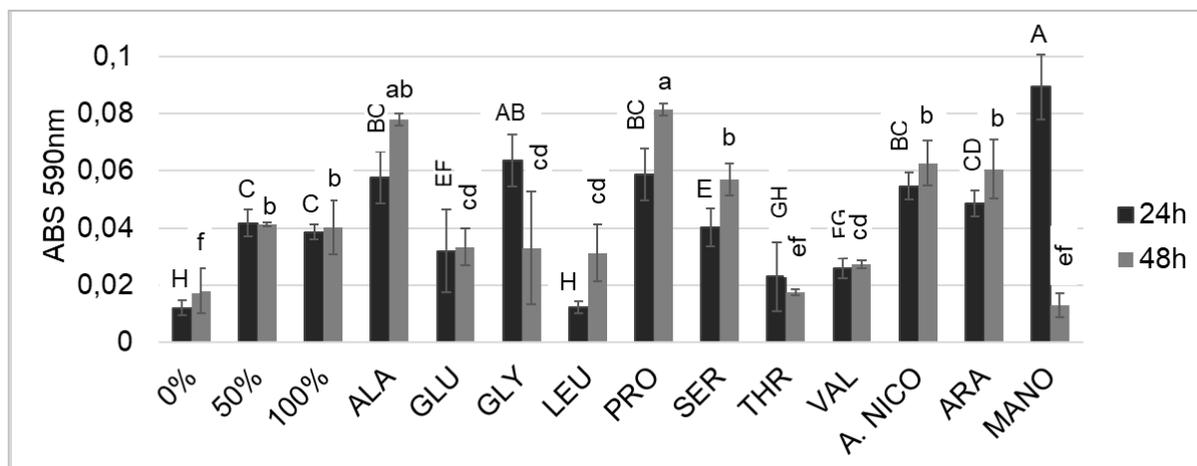


Figura 5. Crecimiento de la cepa CIAT 3200 de *B. glumae* en las fuentes de carbono presentes en los exudados de arroz. Alanina (ALA) Ácido glutámico (GLU), Glicina (GLY), Leucina (LEU), Prolina (PRO), Serina (SER), Threonina (THR), Valina (VAL), Ácido Glucurónico (A. NICO), Arabinosa (ARA), Manosa (MANO) Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de kruskal con un 95% de significancia. Letras mayúsculas reflejan las diferencias a las 24 horas, letras minúsculas reflejan diferencias a las 48 horas.

4.2.2 QUIMIOTAXIS

Con el propósito de establecer si existe solapamiento de nicho entre IBUN 2755 y *B. glumae* CIAT 3200 por los exudados del arroz, se buscó determinar si existe una atracción de ambas cepas hacia los exudados de la raíz y si dicha atracción estaba dada por un compuesto específico dentro de los exudados de arroz, tomando como base el reporte de exudados de esta planta reportados por Bacilio-Jiménez et al., (2003)

Los resultados de quimiotaxis revelan que tanto IBUN 2755 como *B. glumae* CIAT 3200 presentan quimiotaxis hacia los compuestos presentes en los exudados del arroz, ya sean amino ácidos o fuentes de carbono (Figuras 8 y 9). IBUN 2755 presenta una marcada quimiotaxis por Alanina y Serina (Figura 8). Resultados similares han sido previamente reportados para *B. subtilis* (Ordal & Gibson, 1977), sin embargo, la cepa IBUN 2755 no presentó quimiotaxis cuantificable por Leucina (Figura 8a). Este resultado es similar al reportado para *B. subtilis* que

presenta una quimiotaxis limitada para Prolina, Leucina y Asparagina (Yang et al., 2015). Por otra parte, la cepa IBUN 2755 mostró quimiotaxis por todas las fuentes de carbohidratos analizadas, especialmente por Manosa (Figura 9b), resultado similar al reportado para la cepa *B. amyloliquefaciens* SQR9 (Kimani et al., 2016). Respecto a amino ácidos otras cepas de *B. velezensis* han mostrado quimiotaxis por Glicina y Prolina (Jin et al., 2019), también probados en este estudio y que también reflejaron quimiotaxis positiva (Figura 9a)

La composición de los exudados radiculares puede variar dependiendo de diferentes factores como el estado fenológico, las condiciones medio ambientales y la presencia de estrés (Hassan, et al, 2019). La interacción entre la planta y los microorganismos puede estar mediada por los exudados radiculares mediante una respuesta quimioatrayente por parte de los microorganismos, en este sentido se ha demostrado que *B. pumilis* tiene una atracción 5 veces más fuerte sobre otras cepas de *Bacillus* hacia rizósfera de arroz, especialmente por la presencia de aminoácidos y carbohidratos (Bacilio-Jiménez et al., 2003).

Cuando la cepa IBUN 2755 fue expuesta a los exudados radiculares de arroz a los días 7, 14, 21 y 28 después de sembrado, mostró una marcada quimiotaxis por los exudados del día 7, sin embargo, se puede observar una disminución en la quimiotaxis hacia los exudados de los días 14 y 21 (Figura 9a). Esta disminución al día 21 puede corresponder a la disminución en la concentración de los compuestos presentes en los exudados de arroz a partir del día 14 de acuerdo a lo reportado por Bacilio-Jiménez et al., (2003). De forma similar en el mismo trabajo, los autores muestran que al día 28 las concentraciones de los sustratos secretados por la rizósfera aumentan, lo que puede explicar el aumento en la quimiotaxis reflejada como un incremento en el recuento celular presente con la cepa IBUN 2755 al día 28 (Figura 9a)

La quimiotaxis de *B. amyloliquefaciens* hacia exudados radiculares de plantas ha sido previamente reportado en plantas de tomate (Tan et al., 2013). Otras PGPR como *B. plumilis* ha mostrado tener quimiotaxis hacia los exudados de arroz

(Bacilio-Jiménez et al., 2003) y *B. velezensis* ha mostrado quimiotaxis por exudados de maíz (Jin et al., 2019). De acuerdo al estudio realizado por Feng et al., (2018) en *B. amyloliquefaciens* SQR9, la respuesta quimioatrayente corresponde a la unión del sustrato a las proteínas metiladas aceptoras de quimiotaxis (Methyl Acceptor Chemotaxis Proteins (MCP, por sus siglas en inglés), dentro del estudio determinan que las McpA responden a la presencia de ácidos orgánicos, mientras que McpC responde a amino ácidos.

Por otro lado, *B. glumae* presentó una marcada quimiotaxis por todos los compuestos evaluados, reportando pocas diferencias estadísticas entre estos, aunque Prolina y Leucina fueron los amino ácidos hacia los cuales presentó mayor quimiotaxis (Figura 10a) Estos resultados son contrarios al comportamiento de IBUN 2755 (Figura 8a) quien presenta una baja quimiotaxis por Prolina y una quimiotaxis no cuantificable hacia Leucina. De igual manera presentó mayor quimiotaxis por los exudados al día 21 y menor al día 7 después de siembra (Figura 10b).

Los resultados de competencia por los exudados radiculares de arroz entre IBUN 2755 y *B. glumae* muestran que IBUN 2755 no se ve afectada por la presencia de *B. glumae* ya que no hubo diferencias estadísticas entre los recuentos de la cepa sola y los recuentos cuando estaba en presencia del patógeno (Figura 9b), De forma contraria, la quimiotaxis de *B. glumae* sí se ve afectada por la presencia de IBUN 2755 como lo muestran los recuentos en presencia de los exudados a los días 21 y 28 (Figura 11b) donde hay una diferencia estadística entre la quimiotaxis sola y la quimiotaxis en competencia con IBUN2755.

La marcada quimiotaxis de IBUN 2755 hacia Alanina y Serina (Figura 8) puede dar lugar a un solapamiento de nicho nutricional con *B. glumae* por estos dos compuestos particularmente (Hunting et al., 2015; Orgeira, 2015) lo cual también se refleja cuando está en competencia con *B. glumae* en los exudados de los días 21 y 28 después de siembra, así mismo por la disminución de IBUN 2755 en los días 7 y 14 (Figura 11b) en donde la población del patógeno se ve afectada en presencia de IBUN 2755.

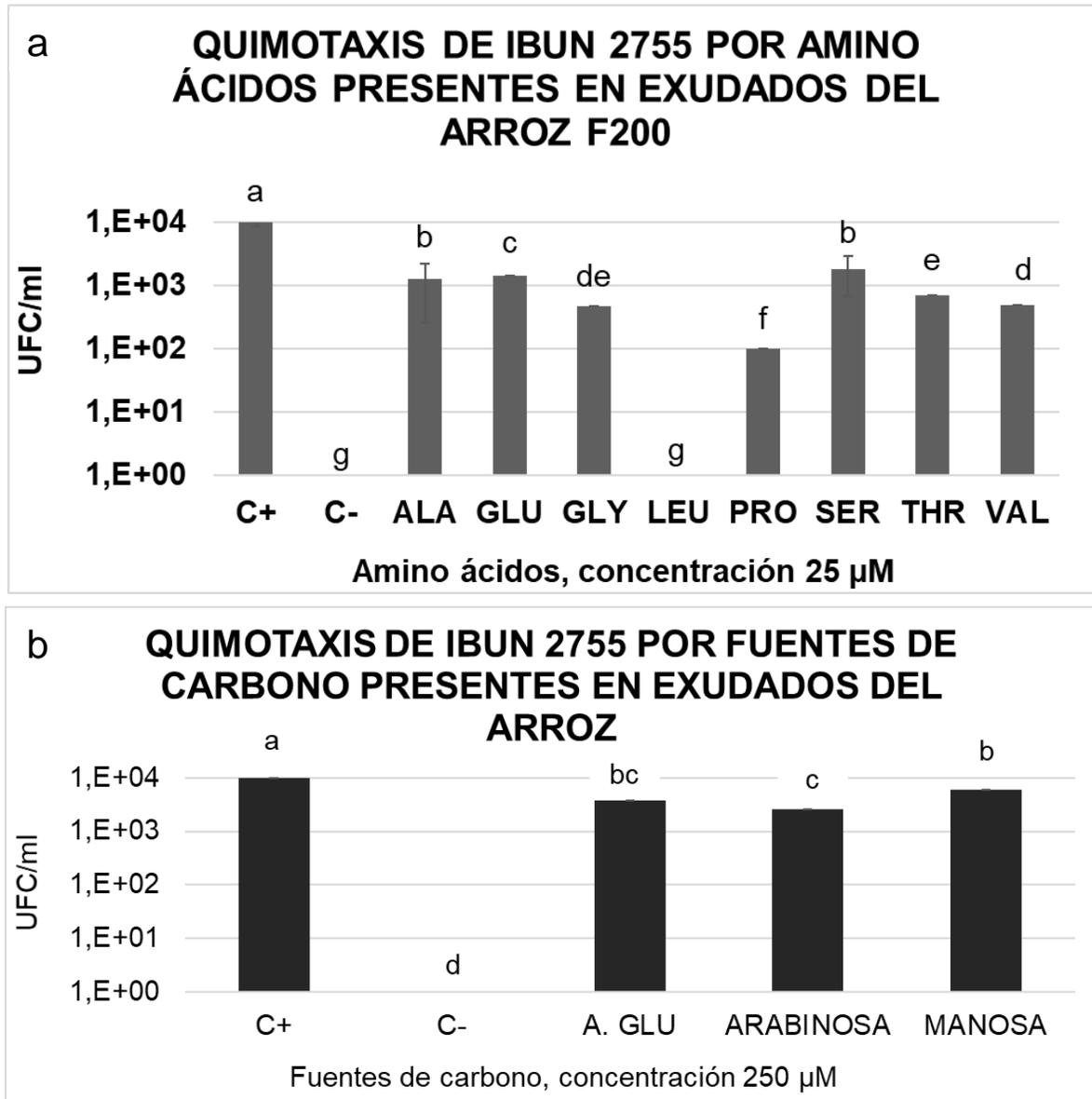


Figura 6. a) Quimiotaxis de IBUN 2755 hacia los amino ácidos presentes en los exudados de arroz como única fuente de carbono. Control positivo (C+) Glucosa 200 μ M, Control negativo (C-) Buffer de quimiotaxis. Alanina (Ala), Ácido glutámico (GLU), Glicina (Gly), Leucina (Leu), Prolina (Pro), Serina (Ser), Treonina (Thr), Valina (Val). b) Quimiotaxis hacia los azúcares presentes en los exudados de arroz como una fuente de carbono. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia

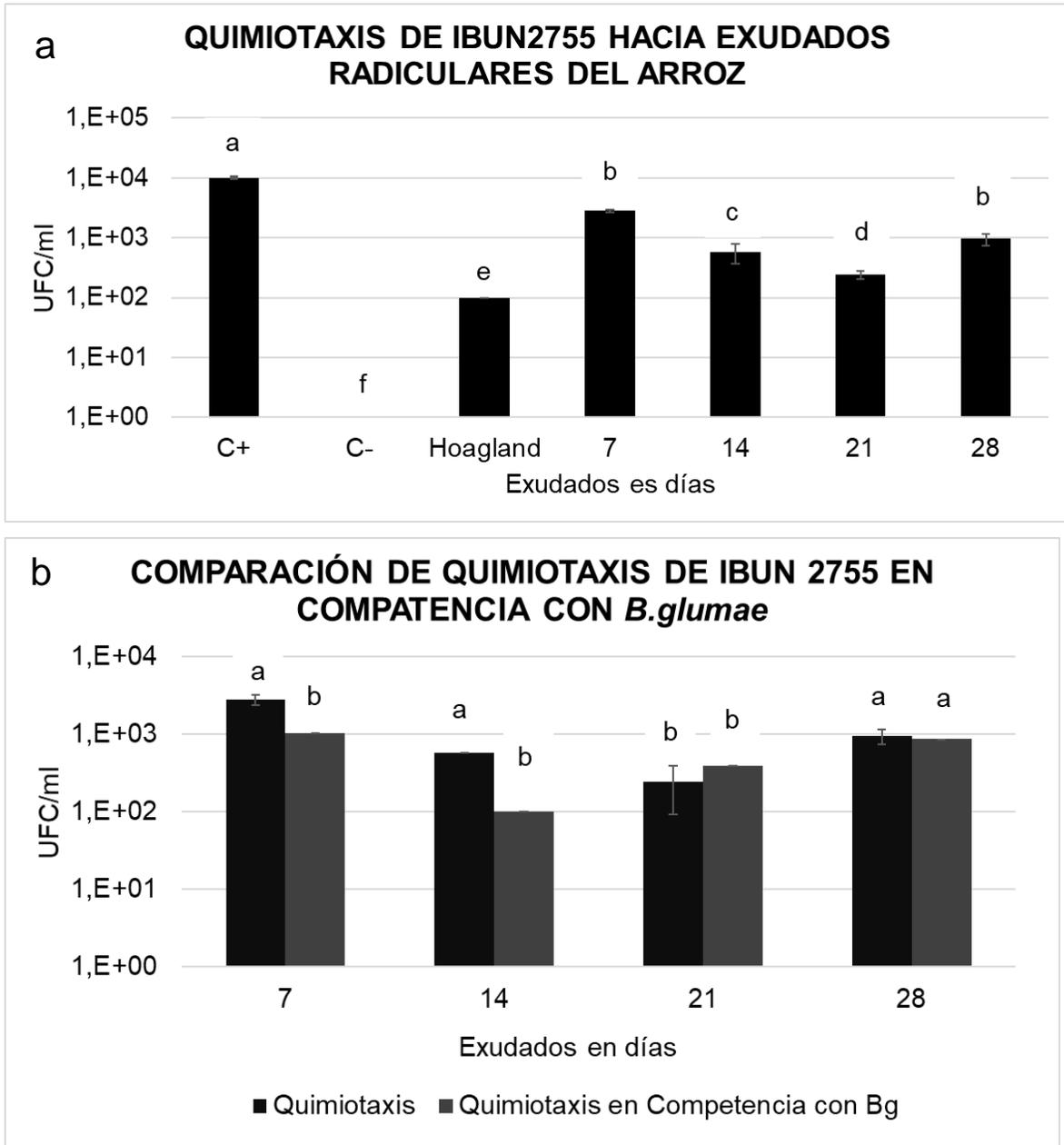


Figura 7. a) Quimiotaxis de IBUN 2755 hacia exudados de arroz extraídos a los 7, 14, 14, 21 y 28 días. Control positivo (C+) Glucosa 250µM, Control Negativo (C-) Buffer de quimiotaxis, Hoagland al 50% usado para el cultivo hidropónico. b) Quimiotaxis por los exudados radiculares del arroz en comparación a la quimiotaxis generada cuando se encontraba en presencia de *B. glumae* (Bg). Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia

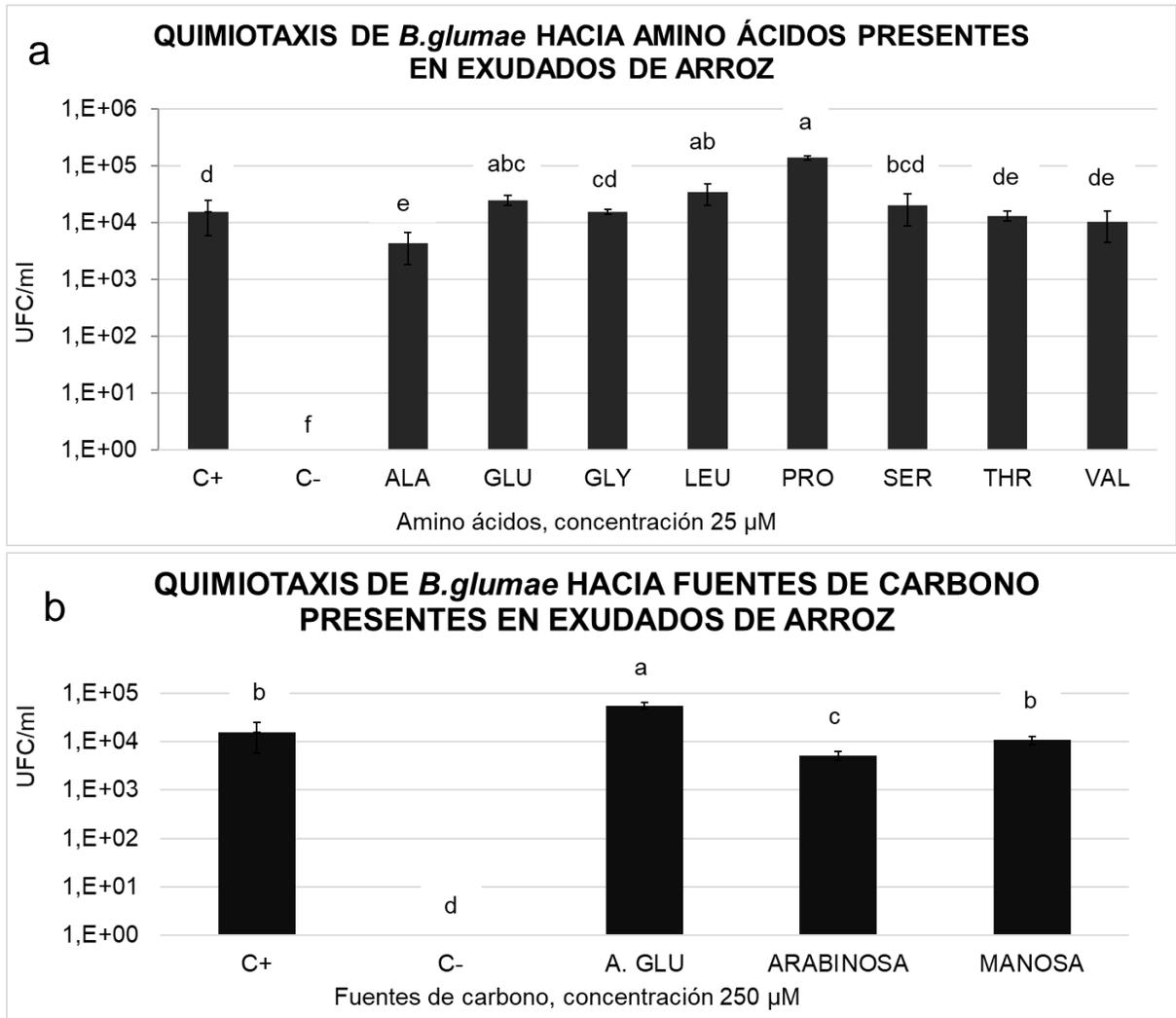


Figura 8. a) Quimiotaxis de *B. glumae* hacia los amino ácidos presentes en los exudados de arroz. Control positivo (C+) Glucosa 200 μ M, Control negativo (C-) Buffer de quimiotaxis. b) Quimiotaxis de *B. glumae* hacia las fuentes de carbono presentes en los exudados de arroz. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia

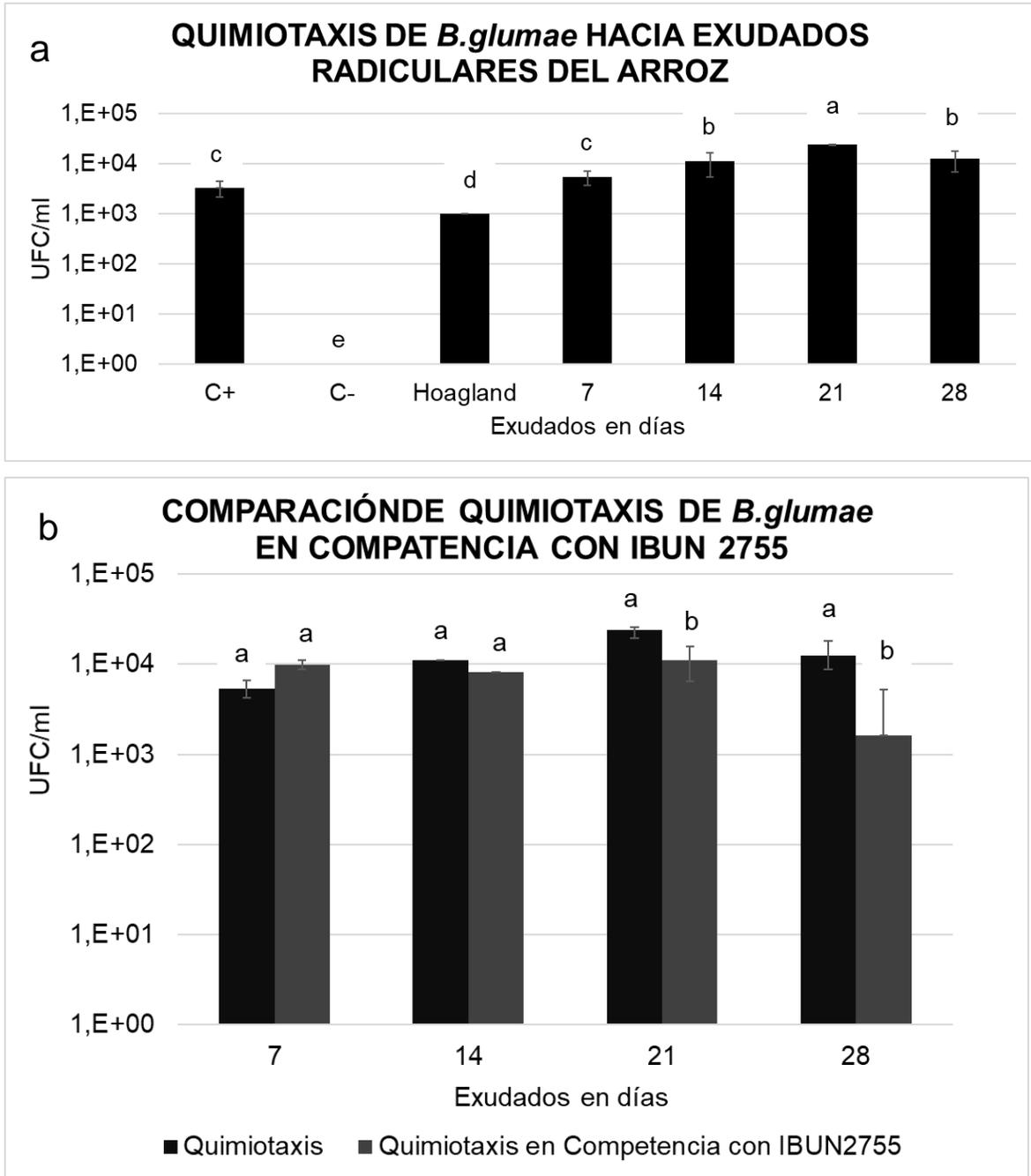


Figura 9. a) Quimiotaxis de *B. glumae* hacia exudados de arroz extraídos a los 7, 14, 21 y 28 días. Control positivo (C+) Glucosa 250µM, Control Negativo (C-) Buffer de quimiotaxis, Hoagland al 50% usado para el cultivo hidropónico. b) Quimiotaxis por los exudados radiculares del arroz en comparación a la quimiotaxis generada cuando se encontraba en presencia de IBUN 2755. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia.

4.2.3 Formación de Biofilm de las cepas IBUN 2755 y *B. glumae* CIAT 3200

Debido a que no existe ningún reporte en la literatura describiendo la capacidad de formación de biofilm de las cepas de la especie de *B. glumae*, la evaluación de biofilm de la cepa CIAY 3200 fue realizada en los medios reportados para *Burkholderia pseudomallei* (Borlee et al., 2017; Mangalea et al., 2017; Oppy et al., 2019) y Bacillus (Beauregard, et al, 2013; Shemesh & Chai, 2013). Para la cepa IBUN 2755 la formación de biofilm se evaluó en medio LB, siendo visible desde las 24 horas, con la aparición de una capa de células sostenidas en una matriz, que muestra las arrugas características de la maduración de la biopelícula (Cairns et al., 2014; Mielich-Süss & Lopez, 2015) (Figura S5 y S6). En medio LB-GM la película es mucho más densa y a las 48 horas llega a su fase final de dispersión como lo descrito por Shemesh & Chai, (2013) en este medio para *B. subtilis*. El medio LB-GM se caracteriza por promover de manera consistente la formación de biopelículas en diferentes especies de Bacillus (Shemesh & Chai, 2013).

B. glumae CIAT 3200, contrario a *B. pseudomallei* (Mangalea et al., 2017) y *B. cepacia* (Murphy & Caraher, 2015) no forma biofilm en medio LB, incluso teniendo en cuenta el trabajo descrito para *B. pseudomallei*, en este estudio se decidió dejar la cepa *B. glumae* CIAT 3200 en incubación durante 14 días adicionales (total 16 días), con el objetivo de verificar si durante este tiempo se formaba la biopelícula, obteniendo que *B. glumae* no es capaz de generar biopelícula durante el tiempo y bajo las condiciones analizadas.

Con los resultados obtenidos podemos considerar que la formación de biofilm por IBUN 2755 respecto a la no formación de biofilm por *B. glumae* puede promover una competencia pasiva, en donde la cepa de *B. velezensis* es capaz de desplazar la cepa de *B. glumae* debido a la formación de biofilm (Schluter, et al, 2015), adicionalmente, durante la formación de biofilm usualmente las cepas de Bacillus secretan compuestos antimicrobianos que pueden alterar la población del organismo competidor (Lasa et al., 2005).

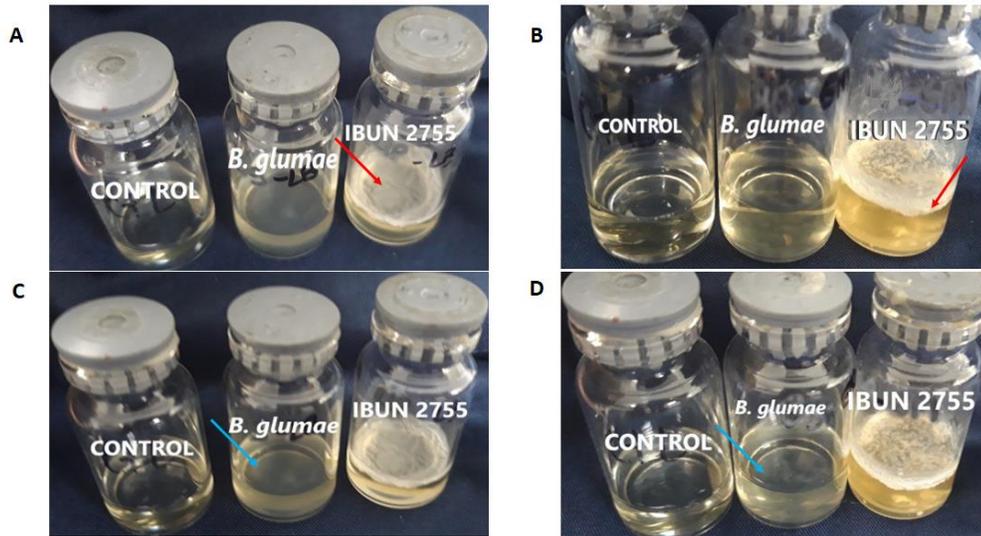


Figura 10. Evaluación de la formación de biofilm en IBUN 2755 y *B. glumae* CIAT 3200 La flecha roja indica la Formación de Biofilm en IBUN 2755. La flecha azul indica que no hay formación de biofilm en *B. glumae* a) 24 horas en medio LB. b) 24 horas en medio LB.GM, c) 48 horas en medio LB, c) 48 horas en medio LB-GM.

4.3 Efecto de la cepa IBUN 2755 sobre la dinámica de la población de *B. glumae* en plantas de arroz a través de los diferentes estados fenológicos bajo condiciones controladas.

Con el objeto de verificar si efectivamente la cepa IBUN 2755, es capaz de controlar o reducir los síntomas de la enfermedad causados por *B. glumae* en plantas de arroz se llevó a cabo un montaje donde ambas cepas se co-inocularon y se realizó el seguimiento por los diferentes estadios fenológicos de la planta. Según la escala de severidad propuesta por Flórez Zapata & Uribe-Vélez, (2011) las plántulas infectadas con *B. glumae* y tratadas con IBUN 2755 reducen los síntomas y la severidad de la enfermedad, llegando a tener similaridad con las

plantas sanas (Figura 13) Resultado similar al obtenido por Pedraza Herrera, (2015) donde IBUN 2755 reduce en 3 unidades el grado de severidad de las plantas infectadas con *B. glumae*. En 2016 Shrestha, et al, (2016) reportaron que diferentes especie de Bacillus, incluido un aislamiento de *B. amyloliquefaciens* tenían actividad contra *R. solani* y *B. glumae* en arroz, características también probadas en IBUN 2755.

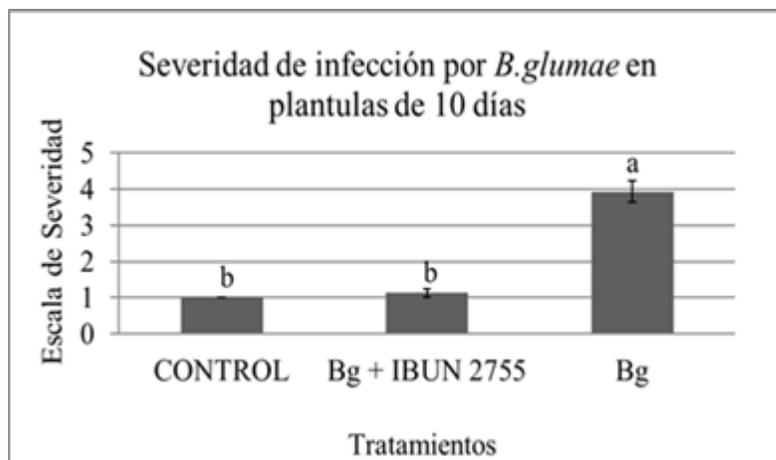


Figura 113. Escala de severidad propuesta por Flórez Zapata & Uribe-Vélez, (2011) plantas asintomáticas de plántulas de arroz de 10 días de crecidas en presencia de *B. glumae* (Bg) y co-inoculadas con *B. glumae* y la cepa de *B. velezcensis* IBUN 2755 (Bg + IBUN 2755). Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia

En los estadios fenológicos analizados se observó que las plantas tratadas con IBUN 2755, a pesar de estar infectadas con *B. glumae* tenían una longitud de vástago y raíz mayor y estadísticamente significativo respecto las plantas control sin inocular y las plantas que sólo presentaban infección con *B. glumae* (Figuras 14 B, C y D) Estos resultados son comparables con las características de promotor de crecimiento vegetal reportadas para *B. amyloliquefaciens* / *B. velezcensis* en plantas de tomate (Abdallah, et al, 2018), tabaco (Wu et al., 2016) y *Bacillus oryzicola* en arroz (Chung et al., 2015).

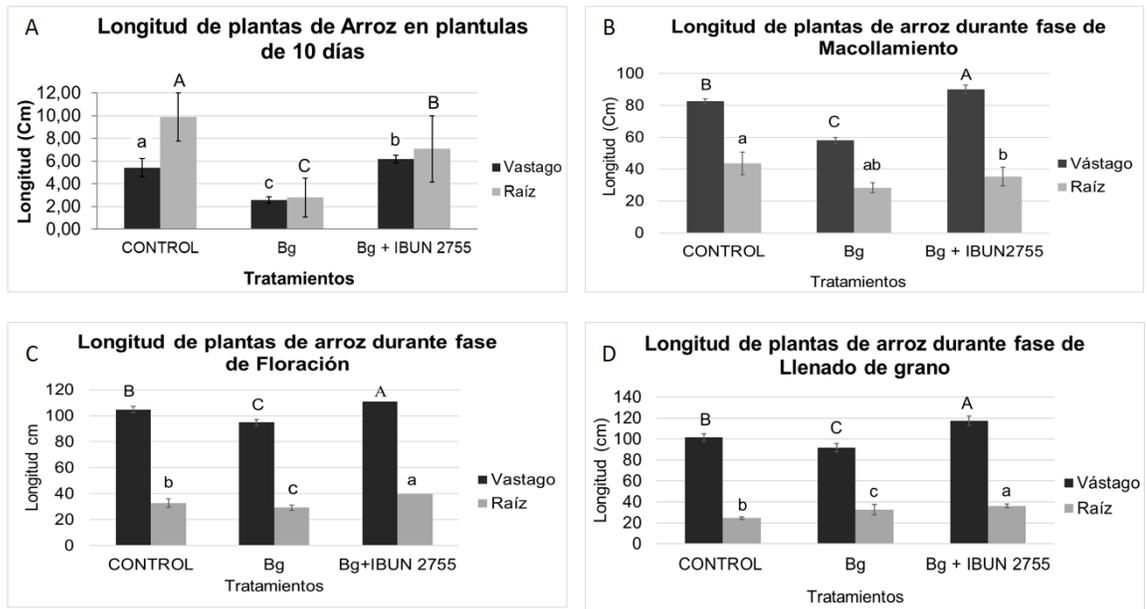


Figura 14. Tamaño de plantas de arroz a lo largo de los estadios fenológicos evaluados con los tratamientos probados. En las gráficas se puede observar que las plantas tratadas con IBUN 2755 alcanzan una longitud mayor que el control sin inocular a pesar de estar infectadas con el patógeno. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia

La cuantificación de la población endófitas de *B. glumae* a lo largo de los estadios fenológicos evaluados de arroz muestra que presencia del patógeno es reducida durante el cultivo en plantas tratadas con IBUN 2755 y que permanece indetectable durante la fase de floración, sin embargo, en plantas sin IBUN 2755 la presencia del patógeno permanece constante en la raíz y en la hoja bandera. Las plantas control sin inocular no mostraron presencia de *B. glumae*. La presencia del patógeno en plantas control de enfermedad (Bg) es evidente a lo largo de los estadios fenológicos evaluados pero su concentración varía de acuerdo al estadio de desarrollo de la planta.

Plantas de 10 días mantienen una concentración del patógeno de 1×10^5 UFC/ml en raíz y de 2×10^6 UFC/ml en vástago (Figura 15a); durante la fase de macollamiento (Figura 15b) la población se mantiene constante en raíz y

disminuye en el vástago. En los siguientes estadios la población del patógeno varía en las diferentes partes de la planta, las concentraciones halladas fueron similares a las reportadas por (Pedraza, Bautista, & Uribe-Vélez, 2018) La disminución en la población del patógeno puede estar relacionada a inducción de resistencia sistémica, la producción de metabolitos secundarios como fengicinas, surfactinas, iturinas (Arguelles-Arias et al., 2009), estos metabolitos tienen características antimicrobianas que han sido probadas contra *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Berić et al., 2012)

En plantas de 10 días hubo una reducción estadísticamente significativa de la población de *B. glumae* en raíz, en las plantas tratadas con IBUN2755. Durante el macollamiento en el vástago hubo una reducción del 100% al hallarse indetectable la presencia de *B. glumae* y una reducción del 10% en raíz (Figura 16b) así mismo durante floración (Figura 15c) los niveles del patógeno fueron indetectables, sin embargo, en el estadio final de llenado de grano, el microorganismo alcanza niveles de detección en raíz y en hoja bandera.

De acuerdo a los resultados presentados en este estudio se puede considerar que la competencia por espacio y nutrientes con un eventual desplazamiento de nicho puede estar involucrada en la reducción de las poblaciones del patógeno y con ellos la disminución de síntomas, debido a que la expresión de los síntomas se da gracias a un sistema de quorum sensing por el patógeno (Kim et al., 2004).

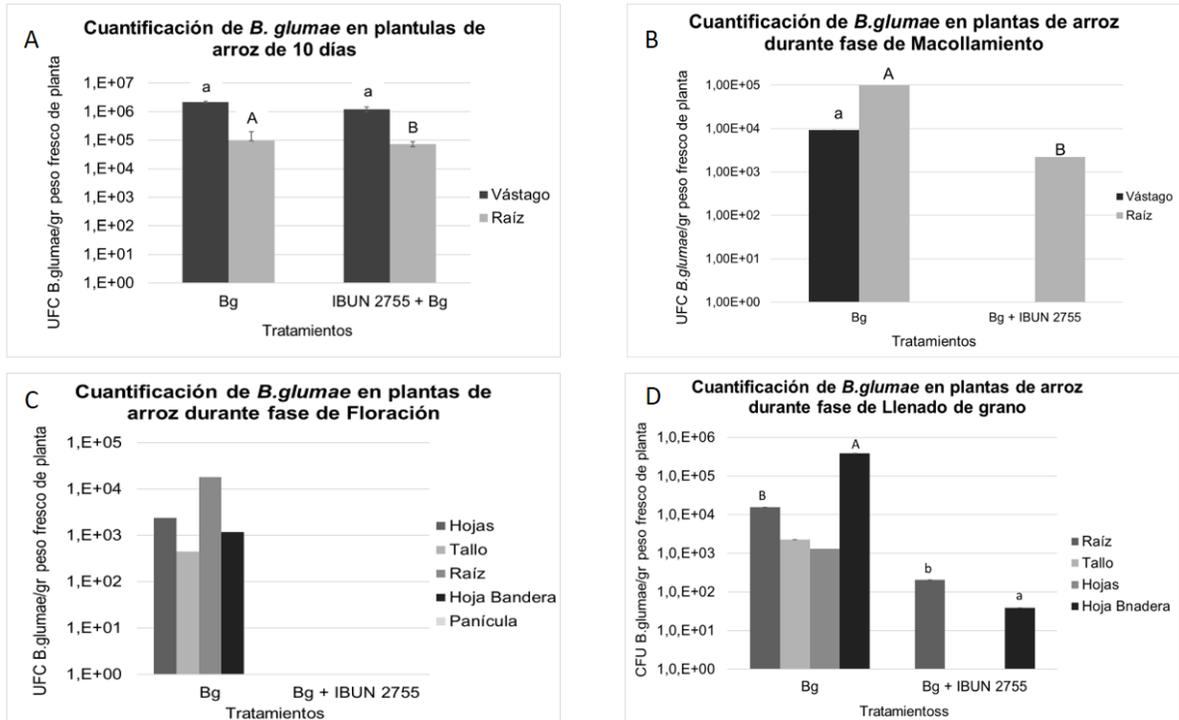


Figura 15. Cuantificación de la población endófitas de *glumae* a lo largo del cultivo de arroz. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas con Test de Duncan a un 95% de significancia

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

IBUN 2755 es capaz de desarrollarse en la superficie y como endófito de plantas de arroz F2000 bajo condiciones controladas hasta el día 28 después de inoculado en semilla. La población endófito permanece constante en 1×10^3 UFC/gr peso fresco, mientras que la colonización superficial se mantiene en 1×10^5 UFC/gr peso fresco durante la fase vegetativa.

La cepa IBUN 2755 es capaz de colonizar las raíces de arroz satisfactoriamente hasta el día 28 bajo las condiciones analizadas.

Tanto IBUN 2755 como *B. glumae* tienen quimiotaxis por los compuestos presentes en los exudados del arroz, y por los exudados radiculares de arroz secretados a los días 7, 14, 21 y 28.

La cepa IBUN 2755 posee una alta capacidad de formar biofilm en los medios de cultivo analizados (LB y LB-GM). Por su parte, *B. glumae* no es capaz de formar biopelícula bajo las condiciones analizadas en este estudio, lo que puede dar lugar a un desplazamiento de nicho espacial por competencia pasiva.

La cepa IBUN 2755 de *B. velezensis* posee capacidad biocontroladora sobre *B. glumae* manifestada por una reducción de la severidad de la enfermedad en estadio de plántula de 10 días, la reducción de la población de *B. glumae* adicionalmente el organismo benéfico presenta un efecto de promoción de crecimiento.

5.2 Recomendaciones

- Desarrollar un sistema de seguimiento para las dos cepas por fluorescencia, fish o PCR en tiempo real que permita cuantificar/observar la co-localización o no de las cepas.
- Detectar y/o cuantificar la presencia de los exudados radiculares de las variedades de arroz colombianas evaluadas en este estudio
- Determinar si genes asociados a la formación de biopelícula son esenciales para la actividad de control biológico de la cepa IBUN 2755 contra *B. glumae* en plantas de arroz
- Evaluar la colonización de la cepa IBUN 2755 después del periodo de tiempo evaluado en este estudio.

6. Material Suplementario

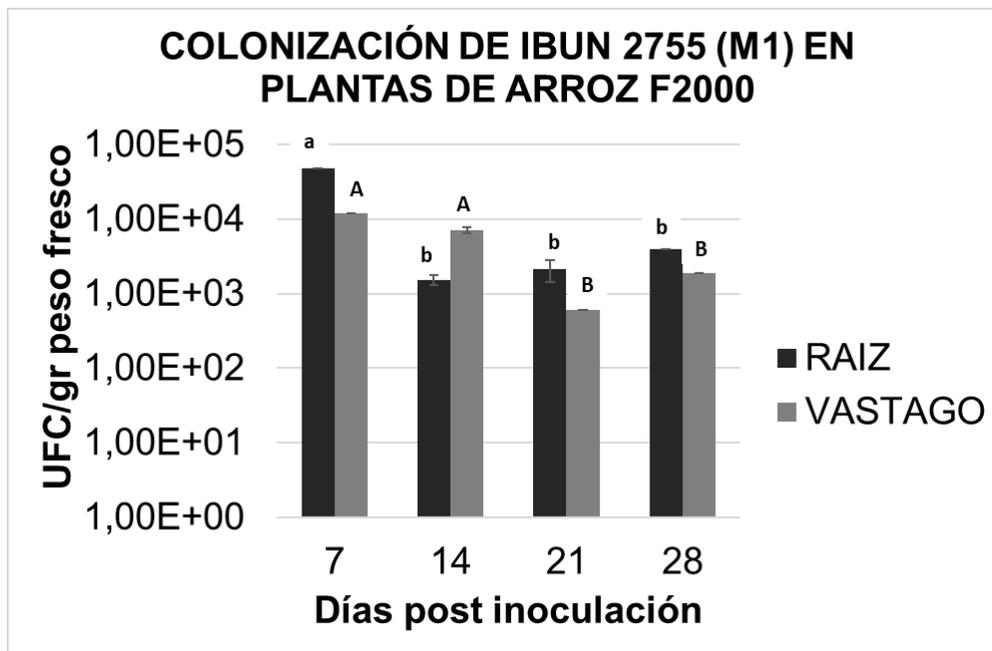


Figura S1. Repetición ensayo de colonización IBUN 2755 (M1) en plantas de arroz como endófito.

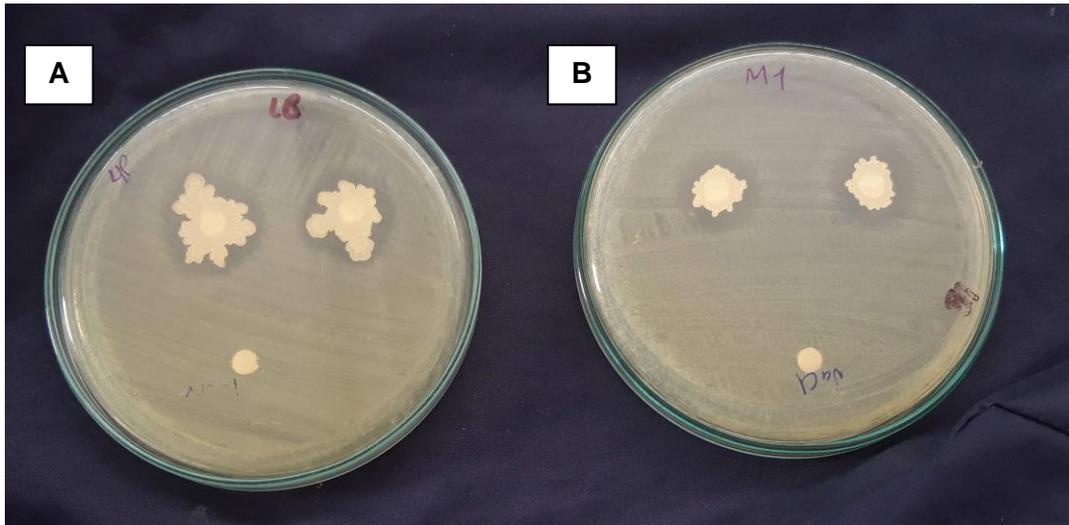


Figura S2. Inhibición *in vitro* de *B. glumae* en agar LB a) IBUN 2755 Wt. b) IBUN 2755-M1

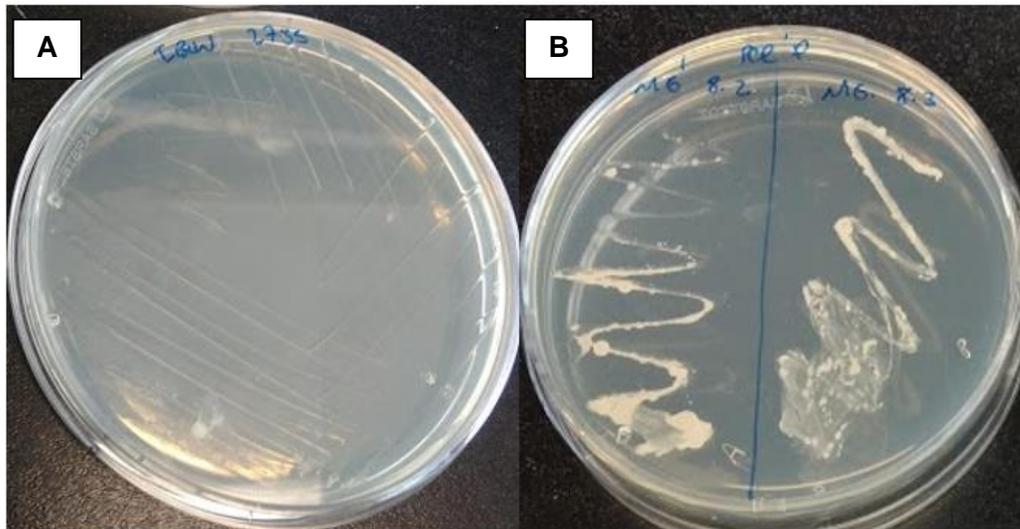


Figura S3. Crecimiento en agar LB + 100µg/ml de espectinomicina. a) IBUN 2755 silvestre no presenta crecimiento en medio con antibiótico, b) crecimiento del mutante espontaneo M1.



Figura S4. Biofilm formado por IBUN 2755 en plantas de arroz de 7 días, variedad Indica – Tadukan facilitadas por la Doctora Olivia Wilkins de la Universidad de Mcgill.

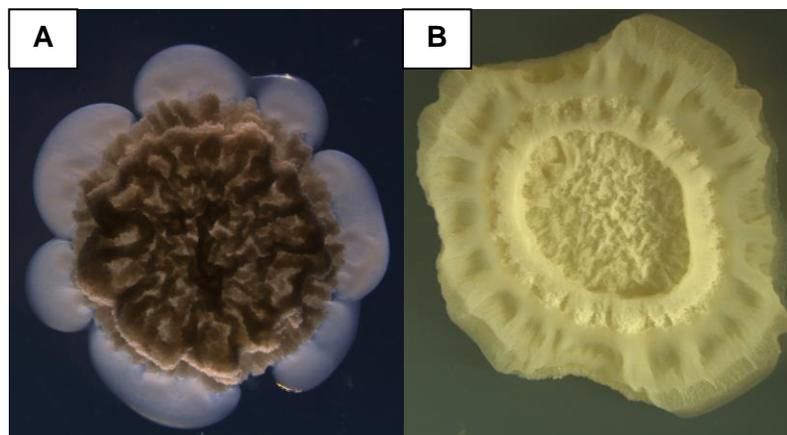


Figura S5. a) Biofilm de IBUN 2755 en agar MSgg. b) Biofilm de IBUN 2755 en agar LB Fotografía tomada con LEICA DFC 3000G en el laboratorio de equipos de la Universidad de Sherbrooke.

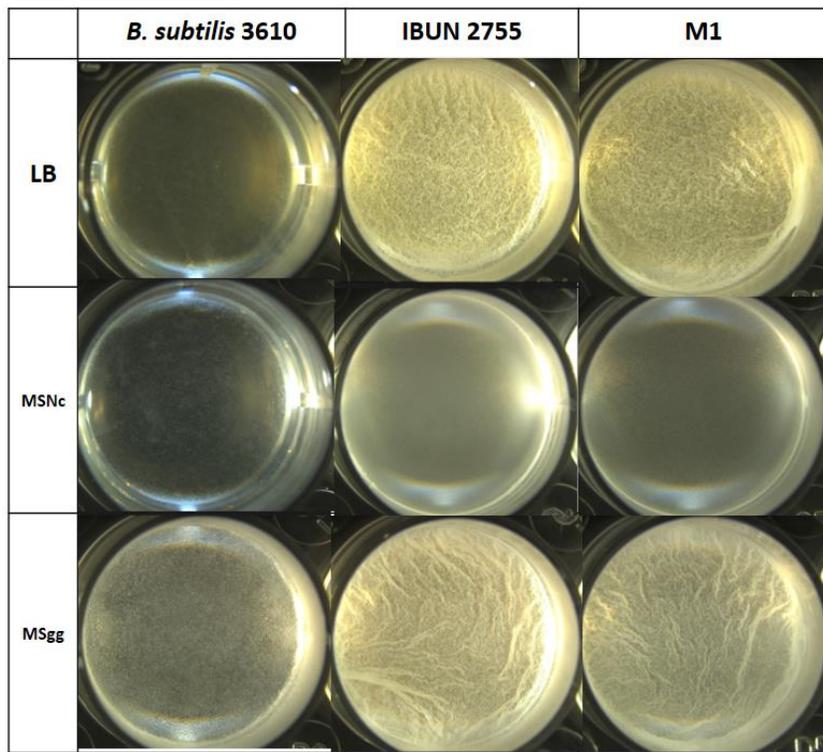


Figura S6. Evaluació de la producció de biopel·lícula per IBUN 2755 e IBUN 2755-M1 en medio LB, MSNc, MSgg a las 24 horas. *B. subtilis* 3610 fue usado como control ya que no es capaz de formar biofilm en medio LB ni en MSNc

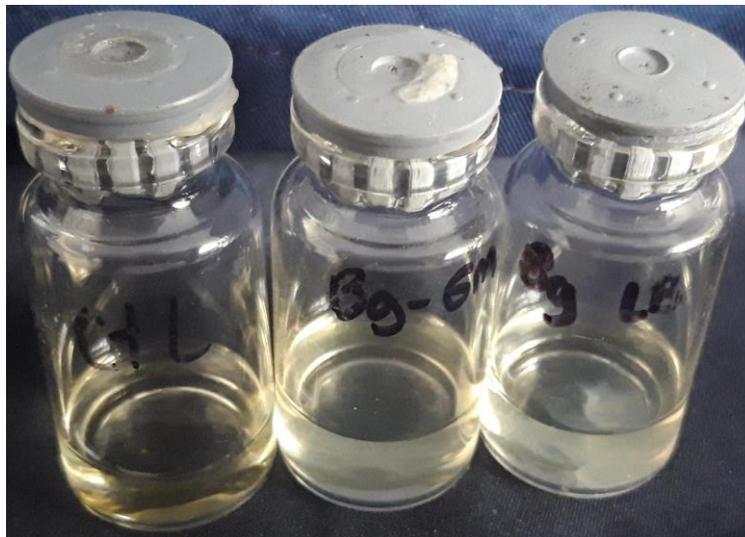


Figura S7. Cultivo de *B. glumae* donde no hay formación de biofilm después de 14 días.

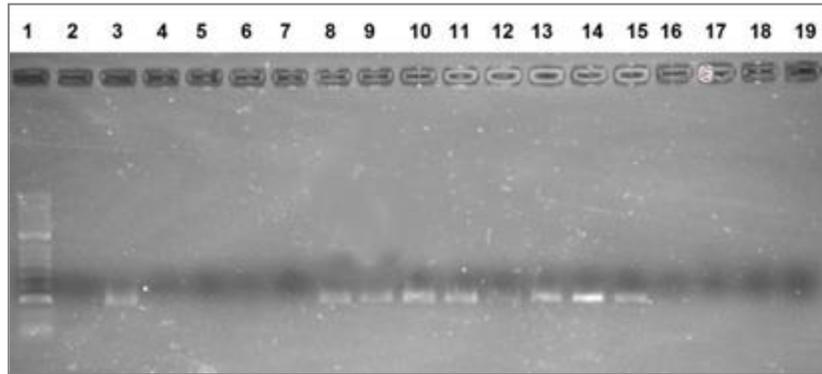


Figura S8. PCR colonias presuntivas de *B. glumae* en medio SPG obtenidas durante macollamiento, se observa amplificación en 240 pb 1Peso Molecular, 2 Blanco, 3. Control Positivo, 4-7 Raíz plantas control, 8-11 Tallo plantas Bg, 12-15 Raíz Plantas, 16-19 Raíz Plantas IBUN 2755 + Bg.

Bibliografía

- Abdallah, D. B., Frikha-Gargouri, O., & Tounsi, S. (2018). Rhizospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* strain 32a. *Biological Control*, 124, 61-67.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial cell factories*, 8(1), 63.
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S., & Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*, 249(2), 271-277.
- Bauer, M. A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2018). Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. *Microbial Cell*, 5(5), 215.
- Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, L., Degrassi, G., Myers, M., Venturi, V., & Fira, D. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. Natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 25-31.

- Blanco Zapata, D. C. (2012). *Evaluación de bacilos aerobios formadores de endosporas (bafes) para el control biológico de Rhizoctonia solani Kuhn en el cultivo de papa criolla (solanum tuberosum Grupo Phureja)*.
- Cairns, L. S., Hogley, L., & Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *B. subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Molecular microbiology*, 93(4), 587-598.
- Castilla, A., Pineda, D., Ospina, J., Echeverry, J., Perafan, R., Sierra, J., & Diaz, A. (2010). *Cambio climático y producción de arroz*. 58(498), 4-11.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., & Oppenheim, A. (1990). Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and soil*, 129(1), 85-92.
- Chowdhury, S. P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., & Grosch, R. (2013). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *Plos one*, 8(7), e68818.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 780.
- Chung, E. J., Hossain, M. T., Khan, A., Kim, K. H., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. (2015). *Bacillus oryzicola* sp. Nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. *The plant pathology journal*, 31(2), 152.
- Couturier, E., & Rocha, E. P. (2006). Replication-associated gene dosage effects shape the genomes of fast-growing bacteria but only for transcription and translation genes. *Molecular microbiology*, 59(5), 1506-1518.

- DANE. (2019, febrero). *Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado (ENAM)*.
http://fedearroz.com.co/new/documentos/2019/encuesta_nacional_arroz_mecanizado.pdf
- Dauner, M., Storni, T., & Sauer, U. (2001). *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7308-7317.
- Deng, Y., Chen, H., Li, C., Xu, J., Qi, Q., Xu, Y., Zhu, Y., Zheng, J., Peng, D., & Ruan, L. (2019). Endophyte *Bacillus subtilis* evade plant defense by producing lantibiotic subtilomycin to mask self-produced flagellin. *Communications biology*, 2(1), 1-12.
- Elshakh, A. S., Anjum, S. I., Qiu, W., Almoneafy, A. A., Li, W., Yang, Z., Cui, Z., Li, B., Sun, G., & Xie, G. (2016). Controlling and defence-related mechanisms of *Bacillus* strains against bacterial leaf blight of rice. *Journal of Phytopathology*, 164(7-8), 534-546.
- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., & Ramos, J.-L. (2002). Root colonization by *Pseudomonas putida*: Love at first sight. *Microbiology*, 148(2), 341-343.
- Fan, B., Chen, X. H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., & Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151(4), 303-311.
- FAO. (2018, abril). *Seguimiento del Mercado del Arroz de la FAO (SMA)*.
<http://www.fao.org/3/I9243ES/i9243es.pdf>
- FEDEARROZ. (2009). *Añubulo bacterial de la panícula*.
http://www.fedearroz.com.co/documentos/2009/Aniublo_bacterial.pdf
- FEDEARROZ. (2019). *Consumo de Arroz en Colombia Desde 2000 hasta 2019 Kg*.
<http://www.fedearroz.com.co/new/consumo.php>

- Fory, P. A., Triplett, L., Ballen, C., Abello, J., Duitama, J., Aricapa, M., Prado, G., Correa, F., Hamilton, J., & Leach, J. (2014). Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. *Phytopathology*, *104*(5), 436-444.
- Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The ecology and evolution of microbial competition. *Trends in microbiology*, *24*(10), 833-845.
- Gómez Ramírez, L. F. (2015). *Desarrollo y aplicación de una estrategia de biofertilización en plantas de arroz (oryza sativa l.) Empleando microorganismos promotores de crecimiento vegetal.*
- Hassan, M. K., McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (2019). The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: A review. *Agriculture*, *9*(7), 142.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(1), 15.
- Hikichi, Y. (1993). Relationship between population dynamics of *Pseudomonas glumae* on rice [*Oryza sativa*] plants and disease severity of bacterial grain rot of rice. *Journal of Pesticide Science (Japan)*.
- Hunting, E. R., Vijver, M. G., van der Geest, H. G., Mulder, C., Kraak, M. H., Breure, A. M., & Admiraal, W. (2015). Resource niche overlap promotes stability of bacterial community metabolism in experimental microcosms. *Frontiers in microbiology*, *6*, 105.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular plant-microbe interactions*, *20*(6), 619-626.

- Jin, Y., Zhu, H., Luo, S., Yang, W., Zhang, L., Li, S., Jin, Q., Cao, Q., Sun, S., & Xiao, M. (2019). Role of Maize Root Exudates in Promotion of Colonization of *Bacillus velezensis* Strain S3-1 in Rhizosphere Soil and Root Tissue. *Current microbiology*, 76(7), 855-862.
- Kawanishi, T., Shiraishi, T., Okano, Y., Sugawara, K., Hashimoto, M., Maejima, K., Komatsu, K., Kakizawa, S., Yamaji, Y., & Hamamoto, H. (2011). New detection systems of bacteria using highly selective media designed by SMART: selective medium-design algorithm restricted by two constraints. *PLoS One*, 6(1), e16512.
- Kim, B. K., Cho, M. S., Kim, M. H., Choi, H. J., Kang, M. J., Shim, H. S., Ahn, T.-Y., Kim, J., & Park, D. S. (2012). Rapid and specific detection of *Burkholderia glumae* in rice seed by real-time Bio-PCR using species-specific primers based on an *rhs* family gene. *Plant disease*, 96(4), 577-580.
- Kim, J., Kim, J., Kang, Y., Jang, J. Y., Jog, G. J., Lim, J. Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T., & Hwang, I. (2004). Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Molecular microbiology*, 54(4), 921-934.
- Kimani, V. N., Chen, L., Liu, Y., Raza, W., Zhang, N., Mungai, L. K., Shen, Q., & Zhang, R. (2016). Characterization of extracellular polymeric substances of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 induced by root exudates of cucumber. *Journal of basic microbiology*, 56(11), 1183-1193.
- Lasa, I., Del Pozo, J., Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). *Biofilms bacterianos e infección*. 28, 163-175.
- Li, L., Wang, L., Liu, L., Hou, Y., Li, Q., & Huang, S. (2016). Infection process of *Burkholderia glumae* before booting stage of rice. *Journal of Phytopathology*, 164(10), 825-832.

- Liu, Y., Zhang, N., Qiu, M., Feng, H., Vivanco, J. M., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection. *FEMS microbiology letters*, 353(1), 49-56.
- Lloyd, D. P., & Allen, R. J. (2015). Competition for space during bacterial colonization of a surface. *Journal of The Royal Society Interface*, 12(110), 20150608.
- Mangalea, M. R., Plumley, B. A., & Borlee, B. R. (2017). Nitrate Sensing and Metabolism Inhibit Biofilm Formation in the Opportunistic Pathogen *Burkholderia pseudomallei* by Reducing the Intracellular Concentration of c-di-GMP. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01353>
- Murphy, M. P., & Caraher, E. (2015). Residence in biofilms allows *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) bacteria to evade the antimicrobial activities of neutrophil-like dHL60 cells. *Pathogens and disease*, 73(8).
- Naher, U., Radziah, O., Halimi, M., Shamsuddin, Z., & Razi, I. (2008). Specific growth rate and carbon sugar consumption of diazotrophs isolated from rice rhizosphere. *Journal of Biological Sciences*, 8(6), 1008-1014.
- Nandakumar, R., Shahjahan, A., Yuan, X., Dickstein, E., Groth, D., Clark, C., Cartwright, R., & Rush, M. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Disease*, 93(9), 896-905.
- Nazar, C. (2007). Biofilms bacterianos:[revisión]. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 67(1), 61-72.
- Niehus, R., Picot, A., Oliveira, N. M., Mitri, S., & Foster, K. R. (2017). The evolution of siderophore production as a competitive trait. *Evolution*, 71(6), 1443-1455.
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant

- beneficial strain B acillus amyloliquefaciens S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 176-191.
- Pedraza Herrera, L. A. (In preparation). *In preparation*.
- Pedraza Herrera, L. A. (2015). *Evaluación de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) de suelos rizosféricos, como agentes de control biológico de Burkholderia glumae*.
- Pedraza, L. A., Bautista, J., & Uribe-Vélez, D. (2018). Seed-born *Burkholderia glumae* Infects Rice Seedling and Maintains Bacterial Population during Vegetative and Reproductive Growth Stage. *The plant pathology journal*, 34(5), 393.
- Pérez, C., & Saavedra, E. (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-RECIA*, 3(1), 111-124.
- Pérez, N., Admetlla, E., & Aguilar, M. (2003). Evaluación de líneas de arroz obtenidas por cultivo in vitro de anteras de híbridos. *Cultivos Tropicales*, 24(2).
- Rafique, M., Hayat, K., Mukhtar, T., Khan, A., Afridi, M., Hussain, T., Sultan, T., Munis, M., Imran, M., & Chaudhary, H. (2015). Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens. *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs. Formatex Research Centre, Spain*, 373-382.
- Salvatierra-Martinez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J., & Stoll, A. (2018). Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity—An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *Journal of Phytopathology*, 166(9), 601-612.
- Schluter, J., Nadell, C. D., Bassler, B. L., & Foster, K. R. (2015). Adhesion as a weapon in microbial competition. *The ISME journal*, 9(1), 139.

- Shemesh, M., & Chai, Y. (2013). A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. *Journal of bacteriology*, 195(12), 2747-2754.
- Shew, A. M., Durand-Morat, A., Nalley, L. L., Zhou, X.-G., Rojas, C., & Thoma, G. (2019). Warming increases Bacterial Panicle Blight (*Burkholderia glumae*) occurrences and impacts on USA rice production. *PloS one*, 14(7).
- Shrestha, B. K., Karki, H. S., Groth, D. E., Jungkhun, N., & Ham, J. H. (2016). Biological control activities of rice-associated *Bacillus* sp. Strains against sheath blight and bacterial panicle blight of rice. *PloS one*, 11(1), e0146764.
- SIC. (2012). *Diagnóstico del mercado del arroz en Colombia (2000-2012)*. Super Intendencia de Industria y Comercio.
http://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/publicaciones/pdf/Arroz2012.pdf
- Stubbendieck, R. M., & Straight, P. D. (2016). Multifaceted interfaces of bacterial competition. *Journal of bacteriology*, 198(16), 2145-2155.
- Team, Rs. (2015). RStudio: Integrated development for R. *RStudio, Inc., Boston, MA URL*
<http://www.rstudio.com>, 42, 14.
- Tian, Y., Fan, Y., Liu, J., Zhao, X., & Chen, W. (2016). Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19, 41-49.
- Tsushima, S. (1996). Epidemiology of bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. *JARQ*, 30(2), 85-89.
- Uematsu, T., Yoshimura, D., Nishiyama, K., Ibaraki, T., & Fuji, H. (1976). Occurrence of bacterial seedling rot in nursery flat, caused by grain rot bacterium *Pseudomonas glumae*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 42(3), 310-312.

- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & development*, 22(7), 945-953.
- Wendisch, V. F., de Graaf, A. A., Sahm, H., & Eikmanns, B. J. (2000). Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: Comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *Journal of Bacteriology*, 182(11), 3088-3096.
- Wu, B., Wang, X., Yang, L., Yang, H., Zeng, H., Qiu, Y., Wang, C., Yu, J., Li, J., & Xu, D. (2016). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* ZM9 on bacterial wilt and rhizosphere microbial communities of tobacco. *Applied soil ecology*, 103, 1-12.
- Xu, Z., Zhang, H., Sun, X., Liu, Y., Yan, W., Xun, W., Shen, Q., & Zhang, R. (2019). *Bacillus velezensis* Wall Teichoic Acids Are Required for Biofilm Formation and Root Colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(5), e02116-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02116-18>
- Yang, Y., M. Pollard, A., Höfler, C., Poschet, G., Wirtz, M., Hell, R., & Sourjik, V. (2015). Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria. *Molecular microbiology*, 96(6), 1272-1282.
- Yaryura, P., León, M., Correa, O., Kerber, N., Pucheu, N., & García, A. (2008). Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. *Current microbiology*, 56(6), 625-632.