

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**  
**CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2018**



**INFORME DE INVESTIGACIÓN**

**Selección de microorganismos endofíticos de arroz (*Oryza sativa* L.) con actividad inhibitoria "in vitro" frente a *Burkholderia glumae* en la zona norte del Perú**

**AUTORES:**

**Blgo. Dr. Winston Franz Ríos Ruíz (Coordinador)**

**Blgo. Dr. Jorge Torres Delgado**

**Blgo. Mblgo. M. Sc. Renzo Alfredo Valdez Nuñez**

**COLABORADORES:**

**Blgo. Dr. Ernesto Aldo Ormeño Orrillo**

**Ing. Edson Esmith Torres Chávez**

**Egre. Agron. Rony Castro Tuanama**

**Tarapoto - Perú**

**2019**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**  
**CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2018**



**INFORME DE INVESTIGACIÓN**

**Selección de microorganismos endofíticos de arroz (*Oryza sativa* L.) con actividad inhibitoria “in vitro” frente a *Burkholderia glumae* en la zona norte del Perú**

**AUTORES:**

**Blgo. Dr. Winston Franz Ríos Ruiz (Coordinador)**  
**Blgo. Dr. Jorge Torres Delgado**  
**Blgo. Mblgo. M. Sc. Renzo Alfredo Valdez Nuñez**

**COLABORADORES:**

**Blgo. Dr. Ernesto Aldo Ormeño Orrillo**  
**Ing. Edson Esmith Torres Chávez**  
**Egre. Agron. Rony Castro Tuanama**

**Tarapoto - Perú**  
**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**

**CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2018**



**INFORME DE INVESTIGACIÓN**

**Selección de microorganismos endofíticos de arroz (*Oryza sativa* L.) con actividad inhibitoria “in vitro” frente a *Burkholderia glumae* en la zona norte del Perú**

**AUTORES**

**Blgo. Dr. Winston Franz Ríos Ruiz (Coordinador)**  
**Blgo. Dr. Jorge Torres Delgado**  
**Blgo. Mblgo. M.Sc. Renzo Alfredo Valdez Nuñez**

**COLABORADORES**

**Blgo, Dr. Ernesto Aldo Ormeño Orrillo**  
**Ing. Edson Esmith Torres Chávez**  
**Egre. Agron. Rony Castro Tuanama**

**Tarapoto, Perú**

**2019**

## Declaratoria de Autenticidad

**Winston Franz Ríos Ruíz**, con DNI N° 01120961, **Jorge Torres Delgado**, con DNI N° 01146224 y **Renzo Alfredo Valdez Nuñez**, con DNI N° 43614216, Docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, Autores del Informe de Investigación titulado: **Selección de microorganismos endofíticos de arroz (*Oryza sativa* L.) con actividad inhibitoria “in vitro” frente a *Burkholderia glumae* en la zona norte del Perú.**

Declaramos bajo juramento que:



1. El Informe de Investigación presentado es de nuestra autoría.
2. Respetamos las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, el Informe de Investigación no ha sido plagiado ni total ni parcialmente.
3. El Informe de Investigación no ha sido auto plagiado; es decir, no ha sido publicado ni presentado anteriormente.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en el Informe de Investigación se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De considerar que el trabajo cuenta con una falta grave, como el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagio (al no citar la información con sus autores), plagio (al presentar información de otros trabajos como propios), falsificación (al presentar la información e ideas de otras personas de forma falsa), entre otros, asumimos las consecuencias y sanciones que de nuestra acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto.

Tarapoto, 10 de abril de 2019.



**Winston Franz Ríos  
Ruíz**  
DNI N° 01120961



**Jorge Torres Delgado**  
DNI N° 01146224



**Renzo Alfredo Valdez  
Nuñez**  
DNI N° 43614216

**Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.**

**1. Datos del autor:**

Apellidos y nombres: <i>DLOS RUIZ WINSTON FIDANZ</i>	
Código de alumno :	Teléfono: <i>978955820</i>
Correo electrónico : <i>WRUIZ@unsm.edu.pe</i>	DNI: <i>01120961</i>

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

**2. Datos Académicos**

Facultad de: <i>CIENCIAS AGRARIAS</i>
Escuela Profesional de: <i>AGRONOMIA</i>

**3. Tipo de trabajo de investigación**

Tesis	( )	Trabajo de investigación	(X)
Trabajo de suficiencia profesional	( )		

**4. Datos del Trabajo de investigación**

Título: <i>SELECCION DE MICROORGANISMOS ENDOFITICOS DE ARROZ (Oryza sativa L.) CON ACTIVIDAD INHIBITORA "IN VITRO" FRENTE A Burkholderia glumae EN LA ZONA NORTE DEL PERU.</i>
Año de publicación:

**5. Tipo de Acceso al documento**


Acceso público *	(X)	Embargo	( )
Acceso restringido **	( )		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:


**6. Originalidad del archivo digital.**

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

*WR*  


## 7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12º del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI "Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA".



Firma del Autor



## 8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM - T.

Fecha de recepción del documento:

13 / 09 / 2019



Firma del Responsable de Repositorio  
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso  
Abierto de la UNSM - T.

\***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

\*\* **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

**Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.**

**1. Datos del autor:**

Apellidos y nombres:	TORRES DELGADO JORGE	
Código de alumno :		Teléfono: 942401250
Correo electrónico :	jtorred@gmail.com	DNI: 01146224

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

**2. Datos Académicos**

Facultad de:	Ciencias de la Salud
Escuela Profesional de:	Enfermería

**3. Tipo de trabajo de investigación**

Tesis	( )	Trabajo de investigación	(X)
Trabajo de suficiencia profesional	( )		

**4. Datos del Trabajo de investigación**

Título:	SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE ARROZ (ORYZA SATIVA L.) CON ACTIVIDAD INHIBITORIA "IN VITRO" FRENTE A Burkholderia glumae EN LA ZONA NORTE DEL PERÚ.
Año de publicación:	

**5. Tipo de Acceso al documento**

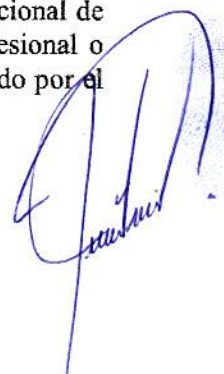
Acceso público *	( )	Embargo	( )
Acceso restringido **	( )		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:


**6. Originalidad del archivo digital.**

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.





## 7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12º del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI “**Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA**”.

  
.....  
Firma del Autor

## 8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

13 / 09 / 2019



.....  
Firma del Responsable de Repositorio  
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso  
Abierto de la UNSM – T.

\***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

\*\* **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

**Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.**

**1. Datos del autor:**

Apellidos y nombres: VALDEZ NUÑEZ RENZO ALFREDO
Código de alumno : _____ Teléfono: 991151342
Correo electrónico : revanu@unsm.edu.pe DNI: 43614216

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

**2. Datos Académicos**

Facultad de: CIENCIAS AGRARIAS
Escuela Profesional de: AGRONOMIA

**3. Tipo de trabajo de investigación**

Tesis ( ) Trabajo de investigación (X)
Trabajo de suficiencia profesional ( )

**4. Datos del Trabajo de investigación**

Título: SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS DE ARROZ (ORYZA SATIVA L.) CON ACTIVIDAD INHIBITORIA "IN VITRO" FRENTE A <i>Butkholderia glumae</i> EN LA ZONA NOROCCIDENTAL DEL PERÚ.
Año de publicación: _____

**5. Tipo de Acceso al documento**

Acceso público * (X) Embargo ( )
Acceso restringido ** ( )

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:


**6. Originalidad del archivo digital.**

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

Valdez Nuñez Renzo Alfredo



## 7. Otorgamiento de una licencia **CREATIVE COMMONS**

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12º del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI **“Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA”.**

  
.....  
Firma del Autor



## 8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

13 / 09 / 2019



.....  
Firma del Responsable de Repositorio  
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso  
Abierto de la UNSM – T.

**\*Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

**\*\* Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

## Dedicatoria

A mi esposa Beatriz, y a mis hijos Natalie y Franz, quienes son motivo de superación en mi vida.

Winston Franz Ríos Ruiz

A mi familia, por su amor y cariño.

Jorge Torres Delgado

A mi esposa Grissel y a mi hija Mabel por su apoyo incondicional, el cual recibo cada segundo de mi vida.

Renzo Alfredo Valdez Nuñez

## **Agradecimiento**

A la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto (UNSM-T), a través del Instituto de Investigación y Desarrollo por el aporte financiero para el desarrollo de la presente investigación con Resolución N° 296-2018-UNSM/CU-R/NLU.

Al equipo de investigación del laboratorio de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui” de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNSM-T.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA, por las facilidades brindadas en la toma de muestras de plantas de cultivo de arroz en las diferentes zonas de colecta (Tumbes, Piura, Lambayeque, Amazonas y San Martín).

Al Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por la realización de los análisis moleculares de las muestras de bacterias.

Al Departamento de Patología y Fisiología Vegetal de la Universidad Estatal de Louisiana, USA, en la persona del Dr. Jong Hyun Ham, por las facilidades brindadas durante nuestra capacitación realizada en dicha Universidad.

A todas y cada una de las personas que hicieron posible la ejecución del presente trabajo.

## Índice General

Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento .....	v
Índice General.....	vi
Índice de Tablas.....	viii
Índice de Figuras .....	ix
Resumen .....	x
Abstract.....	xi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
2.1. Colecta de material vegetal sano y enfermo .....	6
2.2. Aislamiento de microorganismos .....	7
2.3. Conservación de microorganismos.....	8
2.4. Caracterización de bacterias endófitas.....	8
2.4.1. Actividad inhibitoria frente a <i>Burkholderia glumae</i> cepa THT. ....	8
2.4.2. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA en bacterias endófitas con capacidad inhibitoria a <i>B. glumae</i> THT. ....	9
2.5. Caracterización de cepas de <i>Burkholderia glumae</i> .....	9
2.5.1. Estimación de la diversidad genética de cepas de <i>Burkholderia glumae</i> ... ..	9
2.5.2. Amplificación y secuenciación parcial del gen 16S rRNA de cepas representantes de <i>B. glumae</i> . ....	10
2.6. Evaluación de principales factores de virulencia en cepas de <i>B. glumae</i> .....	10
2.6.1. Evaluación de la virulencia de cepas de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> . ....	10
2.7. Análisis estadístico .....	13
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14

3.1. Colecta de material vegetal.....	14
3.2. Aislamiento y conservación de endófitos bacterianos.....	14
3.3. Selección primaria y secundaria de endófitos bacterianos con capacidad inhibitoria contra <i>Burkholderia glumae</i> THT.....	16
3.4. Caracterización morfológica, bioquímica y determinación filogenética de endófitos bacterianos seleccionados en base al gen 16S rRNA: .....	21
3.5. Producción de sideróforos por endófitos bacterianos seleccionados.....	22
3.6. Degradación de Toxoflavina por endófitos bacterianos seleccionados.....	26
3.7. Aislamiento, diversidad genética e identificación de cepas nativas de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .....	27
3.8. Caracterización y evaluación de los factores de virulencia de cepas nativas de <i>Burkholderia glumae</i> y <i>Burkholderia gladioli</i> nativas .....	30
CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES .....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	44

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Procedencia de las muestras, locación geográfica y variedad de arroz muestreadas de la zona norte del Perú.....</i>	6
<b>Tabla 2</b> <i>Distribución de acuerdo al origen de las muestras de arroz y el tipo de órgano seleccionado para el aislamiento de bacterias endofíticas de arroz.....</i>	15
<b>Tabla 3</b> <i>Búsqueda primaria de cepas con actividad inhibitoria contra Burkholderia glumae THT.....</i>	17
<b>Tabla 4</b> <i>Características de inhibición de crecimiento sobre Burkholderia glumae cepa THT, por 9 bacterias endofíticas de arroz procedentes de zonas de cultivo en la zona norte del Perú.....</i>	20
<b>Tabla 5</b> <i>Origen, procedencia, características microscópicas y bioquímicas de cepas de endófitos bacterianos de arroz con capacidad antagonista contra Burkholderia glumae THT.....</i>	23
<b>Tabla 6</b> <i>Porcentajes de similitud de secuencias del gen 16S rRNA con cepas tipo de diferentes géneros usando el programa EZ-Biocloud. ....</i>	24
<b>Tabla 7</b> <i>Características de producción de sideróforos y degradación de toxoflavina sobre Burkholderia glumae cepa THT por 9 bacterias endofíticas de arroz procedente de zonas de cultivo en la zona norte del Perú.....</i>	25
<b>Tabla 8</b> <i>Diversidad genética de aislamientos de Burkholderia glumae y Burkholderia gladioli a partir de muestras de grano y tallo de arroz cultivado en cuatro departamentos de la zona norte del Perú.....</i>	29
<b>Tabla 9</b> <i>Caracterización de cepas de B. glumae y B. gladioli aisladas de grano y tallo de diferentes variedades de arroz creciendo en suelos de la zona del norte del Perú.....</i>	33
<b>Tabla 10</b> <i>Factores de virulencia en cepas de B. glumae y B. gladioli nativas.....</i>	40



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Área de inhibición (cm <sup>2</sup> ) del crecimiento de <i>Burkholderia glumae</i> THT en medio TSA a 48 horas de crecimiento .....	18
<b>Figura 2.</b> Efecto inhibitorio de cepas de bacterias endofíticas contra <i>Burkholderia glumae</i> THT .....	18
<b>Figura 3.</b> Actividad inhibitoria de cepas de bacterias endofíticas contra <i>Burkholderia glumae</i> THT en medio TSA incubado a 30°C por 72 horas .....	20
<b>Figura 4.</b> A) Producción de sideróforos en medio desferrado, Cepa TUT07-02 con capacidad de producir sideróforos ((izquierda) a comparación de la cepa AMH12-02 (derecha) que no produce sideróforos. B) producción de sideróforos en medio con trazas de Fe .....	26
<b>Figura 5.</b> Área de maceración (mm <sup>2</sup> ) de catáfila de cebolla inoculada con cepas del género <i>Burkholderia</i> aisladas de granos y tallos de diferentes variedades de arroz cultivadas en la zona norte del Perú.....	36
<b>Figura 6.</b> Catáfilas de cebolla mostrando diferentes niveles de maceración del tejido debido a la inoculación con cepas de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> aisladas de la zona norte del Perú y cepas control de <i>B. glumae</i> , después de 48 h de incubación a 30°C.....	37
<b>Figura 7.</b> Actividades enzimáticas extracelulares como factores de virulencia de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> . Actividad proteasa, piligalacturonasa y celulasa.....	38
<b>Figura 8.</b> Diferentes niveles de sensibilidad de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% W/V) en cepas de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .....	39
<b>Figura 9.</b> Diferentes niveles de swimming en cepas nativas de <i>B. glumae</i> , creciendo en agar LB suplementado con 0,5% agar .....	41

## Resumen

El arroz es el cereal más importante para más del 50% de la población mundial, sin embargo las enfermedades pueden limitar su producción. El añublo bacterial de la panícula, es una de las enfermedades con mayor vigilancia en el cultivo de arroz, debido a los cambios climáticos que exacerbaban su incidencia. El agente etiológico de la enfermedad, se atribuye a *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*. El presente estudio, tuvo como objetivo seleccionar controladores biológicos contra *B. glumae* THT, a partir de la microbiota endofítica del cultivo de arroz. Para ello, se realizaron colectas de 7 cultivares de arroz en los departamentos de Tumbes, Piura, Amazonas y San Martín. Las muestras de arroz fueron procesadas para aislamiento de grupos funcionales asociados a control biológico (*Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*). Las cepas de bacterias endofíticas fueron seleccionadas para evaluar la inhibición de crecimiento contra la cepa *B. glumae* THT. Cada cepa fue identificada empleando el gen 16S rRNA y por su capacidad de producir sideróforos así como degradar toxoflavina. En paralelo se realizaron aislamientos de *B. glumae* en medio selectivo CCNT, para luego estudiar su diversidad genética empleando la técnica BOX-PCR e identificar cepas representativas por el gen 16S rRNA, finalmente se evaluó la producción de enzimas extracelulares, ensayos de motilidad y sensibilidad/resistencia a agentes bactericidas, como factores de virulencia. De un total de 189 bacterias endofíticas, solo 9 inhibieron el crecimiento de *B. glumae* THT, las cuales pertenecieron a los géneros *Bacillus* y *Burkholderia*. Las cepas *Burkholderia vietnamiensis* TUR04-01, TUR04-03 y *Bacillus aryabhatai* AMH12-02, presentaron una mayor inhibición de crecimiento contra *B. glumae* THT. La producción de sideróforos estuvo en el rango de 16.00 - 97.36% unidades de sideróforos y al menos el 55.5% degradó toxoflavina hasta una concentración de 40 µg ml<sup>-1</sup>. Por otro lado, se obtuvieron 16 aislamientos de *B. glumae* y 1 de *B. gladioli*, agrupados en 9 perfiles BOX-PCR. Estas cepas fueron altamente diversas de acuerdo a su origen geográfico y presentaron diversidad en la expresión de virulencia en catáfila de cebolla, producción de enzimas extracelulares y sensibilidad/resistencia al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y ácido oxalónico (OA). Se concluye que cepas del género *Bacillus* y *Burkholderia* pueden ser consideradas como potenciales agentes biocontrol para el añublo bacterial de la panícula.

**Palabras clave:** Control biológico, Factores de virulencia, Añublo bacterial.

## Abstract

Rice is the most important cereal for more than 50% of the world population, however diseases can limit its production. Bacterial blight of the panicle, is one of the diseases with greater vigilance in rice cultivation, due to climatic changes that exacerbate its incidence. The etiological agent of the disease is attributed to *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli*. The objective of the present study was to select biological controllers against *B. glumae* THT, from the endophytic microbiota of rice cultivation. For this, collections of 7 rice cultivars were carried out in the departments of Tumbes, Piura, Amazonas and San Martín. The rice samples were processed for isolation of functional groups associated with biological control (*Bacillus*, *Pseudomonas* and *Burkholderia*). Strains of endophytic bacteria were selected to evaluate growth inhibition against the *B. glumae* THT strain. Each strain was identified using the 16S rRNA gene and for its ability to produce siderophores as well as to degrade toxoflavin. In parallel, isolates of *B. glumae* were made in selective CCNT medium, to then study their genetic diversity using the BOX-PCR technique and identify representative strains by the 16S rRNA gene. Extracellular enzyme production, motility and sensitivity assays were finally evaluated. / resistance to bactericidal agents, as virulence factors. Of a total of 189 endophytic bacteria, only 9 inhibited the growth of *B. glumae* THT, which belonged to the genera *Bacillus* and *Burkholderia*. Strains *Burkholderia vietnamiensis* TUR04-01, TUR04-03 and *Bacillus aryabhatai* AMH12-02, showed a greater inhibition of growth against *B. glumae* THT. The production of siderophores was in the range of 16.00 - 97.36% units of siderophores and at least 55.5% degraded toxoflavin up to a concentration of 40 µg ml<sup>-1</sup>. On the other hand, 16 isolates of *B. glumae* and 1 of *B. gladioli* were obtained, grouped into 9 BOX-PCR profiles. These strains were highly diverse according to their geographical origin and presented diversity in the expression of virulence in onion cathilla, production of extracellular enzymes and sensitivity / resistance to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and oxolinic acid (OA). It is concluded that strains of the genus *Bacillus* and *Burkholderia* can be considered as potential biocontrol agents for bacterial blight of the panicle.

**Keywords:** Biological control, Virulence factors, Bacterial blight.



## Introducción

El cultivo de arroz constituye una de las actividades económicas más importantes en la región San Martín, debido a que es una fuente importante de puestos de trabajo y del Producto Bruto Interno (PBI) de la región. Obtener una óptima producción implica la aplicación de fertilizantes, adecuadas prácticas culturales y el control de plagas y enfermedades. El agricultor arrocero no posee un método de control efectivo para el tratamiento del añublo bacterial de la panícula ocasionado por *B. glumae*. Las pérdidas de rendimiento sobrepasan el 50% de la producción, y ocasionan un uso excesivo de pesticidas. Hasta el momento el único agente químico capaz de controlar la enfermedad es el ácido oxolínico, prohibido por las autoridades sanitarias, constituyendo un peligro debido a la generación de resistencias y a la presencia de cepas naturalmente resistentes a este agente químico. Los microorganismos asociados al arroz han coevolucionado con la capacidad de emplear diferentes estrategias para delimitar enfermedades en el mismo nicho ecológico. En el presente trabajo se estudió la microbiota asociada a cultivares de arroz locales, con proyección a la generación de biopesticidas que permitan reducir costos económicos, ambientales y sociales al agricultor de la región San Martín.

A la fecha se desconoce un método efectivo para controlar el añublo bacterial ocasionado por *B. glumae*, por lo que la prevención juega un papel importante en evitar el desarrollo de la misma (Zhou-qi et al. 2016). El control biológico se ha mostrado prometedor, varios estudios han demostrado que existen microorganismos que pueden suprimir el desarrollo de la enfermedad a través de estrategias como la degradación de toxinas (Toxoflavina). De acuerdo a la epidemiología de la enfermedad, *B. glumae* es considerado un patógeno de semilla (Cho et al. 2007). Este patógeno infecta semillas e invade la plúmula a través de los estomas y heridas, proliferando en los espacios intercelulares del parénquima durante la germinación de las semillas (Zhu et al. 2010). La proliferación de *B. glumae* en las plúmulas conduce a la producción de toxinas, como la toxoflavina, resultando en la pudrición de la plántula de arroz (Zhou-qi et al. 2016). La búsqueda de microorganismos capaces de producir enzimas que ocasionan QQ, puede ser considerada una estrategia para prevenir el añublo bacterial de la panícula (Fetzner 2015).

Shrestha et al. (2016), reportaron que cepas de *Bacillus amyloliquefasciens*, fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. glumae* 336 gr<sup>-1</sup> y bajo condiciones de campo esta cepa redujo el índice de severidad de 6,5 (control) a 4. La búsqueda de microorganismos que co-existan en el mismo hábitat que *B. glumae* durante el proceso de evolución de la enfermedad ha permitido deducir una estrategia adecuada para controlar el patógeno. La frecuencia de aislamientos naturales con la capacidad de desarrollar estas estrategias, es muy baja (Cho et al. 2007), por lo que es necesario realizar la búsqueda en diferentes estadios de la planta (Semilla, plántula y etapa reproductiva).

Contar con un cepario de microorganismos con potencial antagonista debidamente identificado, permitirá en futuras investigaciones realizar trabajos a nivel de invernadero y de campo con el objetivo de validar un producto biopesticida, que permita reducir el uso de agroquímicos perjudiciales para el medioambiente, sobretodo el uso de antibióticos, que al ser usado de manera indiscriminada producen cepas resistentes a las quinolonas, agravando el problema y constituyendo un problema de salud pública; por otro lado se reducirían los costos de producción, permitiendo al productor arrocero reducir las mermas de rendimiento, y elevar el nivel de competitividad, ya que contará con una estrategia biotecnológica, amigable con el suelo.

El objetivo del presente trabajo fue aislar y seleccionar microorganismos endofíticos de cultivares locales de arroz con actividad inhibitoria sobre *B. glumae* en áreas de cultivo de la zona norte del Perú. La hipótesis propuesta se plantea desde la perspectiva de que los microorganismos endofíticos aislados de cultivares locales de arroz han coevolucionado con sus respectivos antagonistas y presentan actividad inhibitoria “in vitro” frente a cepas nativas de *B. glumae* aisladas de la zona norte del Perú.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

*Burkholderia glumae* se considera el más importante patógeno del cultivo de arroz, ocasionando la enfermedad del añublo bacterial de la panícula (Ham et al. 2011; Zhou-qi et al. 2016; Kim et al. 2018), se manifiesta en la etapa de floración, provocando esterilización, decoloración y manchado de la gluma en desarrollo, otros efectos es el vaneamiento y el raquis de la hoja bandera de color verde (SENASA, 2015). La enfermedad fue reportada por primera vez en Perú, en el departamento de Tumbes el año 2013, por el fitopatólogo investigador Miguel Garrido Rondoy (Garrido 2013). A la fecha las estrategias de prevención se enfocan en el manejo integrado del cultivo de arroz (Dosis menores de fertilización, época de siembra, densidades y control químico), en relación al mejoramiento genético es limitado, sin embargo se conocen líneas tolerantes a la enfermedad, pero no resistentes. Según los trabajos realizados al momento, el control químico es ineficiente cuando no se aplican las actividades preventivas apropiadas (Comunicación personal, 2018).

Martínez-Guevara (2016), evaluó el efecto de dos productos químicos Green Star y Oxilobac en una campaña de arroz variedad INIA-509 “La Esperanza” en el distrito de Juan Guerra-San Martín. Se determinó el tratamiento más eficiente para el control de *B. glumae*, el cual resultó ser más efectivo el tratamiento de 0,5 L/ha de Green Star en almácigo + 1 L/ha de Green Star en máximo macollamiento + 0,5 L/ha en embuchamiento en comparación con el tratamiento testigo, alcanzando valores superiores en relación al porcentaje de incidencia de la bacteria en el cultivo de arroz evaluado a los 120 días, 0,44% vs 0,29%, respectivamente. Hubo una reducción del 34% en la incidencia de la enfermedad.

Ríos-Ruiz et al. (2016), aislaron y seleccionaron cepas de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de cultivares de arroz de la región San Martín, las mismas que posteriormente fueron identificadas y evaluadas en condiciones de invernadero y de campo en el distrito de Juan Guerra. Los autores evaluaron un consorcio bacteriano nativo formado por *Burkholderia ubonensis*, *Citrobacter bitternis* y *Burkholderia vietnamiensis* en el aumento de la productividad y rendimiento del cultivo de arroz variedad INIA-509 “La Esperanza”, aunque directamente no se determinó el efecto biopesticida, los tratamientos no inoculados alcanzaron un nivel de incidencia de 0,24%

frente a los tratamientos inoculados (0,07%), alcanzando una reducción de la incidencia del 70,83%. La cepa de *B. ubonensis* fue testada por su capacidad antibacteriana contra *B. glumae* en el laboratorio de Microbiología Agrícola, demostrando una ligera actividad antimicrobiana (Comunicación personal). La explicación a estos resultados positivos podría tratarse de la inducción de la resistencia sistémica, tal como lo demostró Chung et al. (2015) con cepas de *Bacillus oryzicola*. Con respecto al aislamiento de microorganismos con capacidad antagonista, Alviz et al. (2017), reportó el aislamiento de bacterias endófitas con actividad inhibitoria “in vitro” contra *B. glumae*. Barraza et al. (2017), reportó la actividad antimicrobiana “in vitro” de bacterias endófitas asociadas a *Azadirachta indica* contra *B. glumae*, siendo la cepa F3N4 *Pseudomona aeruginosa*, la que mostró un 50% de inhibición del crecimiento.

En el Laboratorio de Microbiología Agrícola, que desde el año 2015 realiza el servicio de aislamiento e identificación de *B. glumae* en muestras de arroz, en conjunto con el departamento de fitopatología bacteriana de la Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal del SENASA, se ha identificado hasta el momento las siguientes cepas de *B. glumae* 4D, 5E, 6F, A, B3, THT, B2g, B3g y B3HT. La identificación se ha realizado mediante pruebas serológicas usando el kit serológico DAS-ELISA para detección de *B. glumae*, mediante PCR-Real time, empleando sondas específicas para *B. glumae* y *B. gladioli*, además se determinó el potencial fitopatogénico por tres metodologías diferentes, en hojas de tabaco, en hojas de plántulas de arroz, y en catáfila de cebolla. Además en el 2017, en alianza con la empresa privada se realizó la siguiente investigación: Efecto de diferentes concentraciones de dos productos químicos SinbactCu ® y Geomycin ®, en la inhibición de *B. glumae* bajo condiciones in vitro. El tratamiento de semillas con Geomycin® a 1 y 2 ppm, permitió una inhibición del 58 y 75% de *B. glumae* en semillas de arroz, respectivamente, frente al 97% del tratamiento control con ácido oxolínico. Sin embargo, no se observó ningún efecto inhibitorio del Geomycin ® sobre *B. glumae* 5E. El tratamiento de semillas con SinbactCu ® a 1 y 2 ppm, permitió una inhibición del 75 y 88% de *B. glumae* en semillas de arroz, respectivamente, frente al 97% del tratamiento control con ácido oxolínico. Se observó un efecto inhibitorio de SinbactCu ® a 1500 ppm.

La selección de microorganismos capaces de reducir la severidad del añublo bacterial, permitirá desarrollar un paquete tecnológico de manejo integrado de la enfermedad, permitiendo al agricultor arrocero reducir costos en el empleo de pesticidas

y evitar pérdidas por la enfermedad. Ello traerá como consecuencia una menor contaminación ambiental e incidencia de enfermedades producidas por ellos.



## CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Colecta de material vegetal sano y enfermo

La colecta de las plantas de arroz con ausencia de síntomas de enfermedad fue de acuerdo a Baldani et al (2014) y de plantas con sintomatología de añublo bacterial de la panícula de acuerdo a Nandakumar et al (2009).

Se realizaron muestreos en campos de los departamentos de Tumbes, Piura, Amazonas y San Martín (Tabla 1).

**Tabla 1**

*Procedencia de las muestras, locación geográfica y variedad de arroz muestreadas de la zona norte del Perú.*

Código de muestreo	Sector	Distrito	Locación geográfica			Variedad de arroz	Periodo vegetativo
			L.S	L.O	m.s.n.m		
<b>Piura</b>							
P01	Los frutales	Carretera sullana-talara	04° 28,677	080° 22,036	48	La puntilla	120
P02	La huaca		04° 51,202	080° 44,214	48		
P03	La cuchilla		04° 51,293	080° 44,168	48		
<b>Tumbes</b>							
T04	La noria, margen izquierda del río tumbes	San juan de la virgen	03° 35,133	080° 28,436	5	Tinajones	69
T05,t06	Ee. Los cedros		03° 36,832	080° 31,963	8	La puntilla	128
T07	Las brujas, margen derecha del río tumbes		03° 38,747	080° 25,484	5	La esperanza	90
<b>Amazonas</b>							
Am08	Peca palacios	Bagua capital	05° 40,977'	078° 30,114'	400	La esperanza	100
Am09	Peca palacios		05° 41,001'	078° 29,255'	405	Santa barbara	
Am09	Peca palacios		05° 40,977'	078° 30,114'	400	Fortaleza	
Am09	Peca palacios		05° 40,910'	078° 29,468'	416	Inia	
Am10			05° 39,900'	078° 31,710'	395	Feron	
Am11	Huarangopampa	05° 39,900'	078° 31,710'	395	Fortaleza	La esperanza	
Am12		05° 39,900'	078° 31,710'	395			
<b>San Martín</b>							
Sm13		Bellavista	07° 02,159'	076° 31,032'	233	La esperanza	120
Sm14	Santa catalina		07° 01,695'	076° 31,349'	234	La esperanza	56
Sm14			07° 01,940'	076° 31,252'	234	Feron	120
Sm15	San hilarion	Bellavista	06° 59,823'	076° 26,175'	221	Feron	100
Sm15			06° 59,920'	076° 25,873'	221		60
Sm16		Nueva cajamarca	05°56,356'	077°22,232'	875	La esperanza	100
Sm17	La unión		05°56,243'	077°22,265'	870		
Sm18			05°56,921'	077°22,291'	880		

Los campos fueron seleccionados de acuerdo a la producción, incidencia de enfermedad, uso de fertilizantes y xenobióticos, después fueron geo referenciados y se procedió a tomar 3 plantas saludables del interior del campo. La planta fue retirada completamente y seccionada en Raíz, Tallo, hojas y espigas, cada muestra fue conservada y transportada a 4°C al laboratorio de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui” en la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto. Cada muestra fue codificada de la siguiente manera: Departamento-Provincia-Sector-variedad del cultivo-parte de la planta-número consecutivo. Para el caso de campos con incidencia de añublo bacterial de la panícula, las espigas y granos afectados fueron colocados en sobres de papel, correctamente identificados.

## 2.2. Aislamiento de microorganismos

Para bacterias endofíticas se siguió la metodología descrita por Sun et al. (2008) para endófitos de raíz, hojas y tallos. El material vegetal fue lavado con agua corriente, sumergidas en alcohol etílico 70° GL por 3 minutos y luego lavadas con solución de hipoclorito de sodio al 2,5% por 5 minutos, enjuagadas en alcohol 70° GL por 30 s, y finalmente enjuagadas 5 veces en agua destilada estéril, para confirmar el proceso satisfactorio de esterilización, se sembró una alícuota de la última agua de enjuague en TSA y fue incubado a 30°C por 3 días. Solo las muestras que evidenciaron ausencia de contaminantes fueron tomadas en cuenta para el proceso de aislamiento. Las muestras esterilizadas en superficie fueron maceradas empleando mortero y pistilo estériles.

Se realizó el aislamiento por grupos funcionales: Para el caso de *Bacillus*, el extracto de tejidos fue recogido en tubos estériles y sometido a tratamiento térmico a 70°C por 10 minutos, inmediatamente fue sometido a choque térmico en un baño de agua helada por 10 minutos y diluido hasta 10<sup>-6</sup> e inoculado en agar TSA, luego incubados a 28°C por 72 horas (Ji et al. 2014). Para *Burkholderia* y *Pseudomona*, el extracto fue diluido hasta 10<sup>-4</sup> e inoculado en Agar King B (Barraza et al. 2017). Para actinobacterias las muestras fueron sembradas en Agar Caseinato Dextrosa (Teixeira et al. 2007). Para el aislamiento de microorganismos endófitos de semillas se siguió la metodología sugerida por Cottyn et al. (2001). 10 g de semillas fueron esterilizadas en superficie y trituradas como en el procedimiento mencionado líneas arriba. Las diluciones de los extractos fueron sembradas en medio TSA. Para el aislamiento de *B. glumae*, la metodología seguida será de acuerdo a Cottyn et al. (2001), los granos esterilizados en superficie, así como los extractos obtenidos fueron sembrados en el

medio selectivo modificado CCNT (Kawaradani et al. 2000). El medio selectivo CCNT fue modificado para el presente estudio de acuerdo a la siguiente composición, Extracto de Levadura, 2 g L<sup>-1</sup>; Peptona, 1 g L<sup>-1</sup>; Meso-inositol, 4 g L<sup>-1</sup>; Cetrimide, 10 mg L<sup>-1</sup>; Cloranfenicol, 10 mg L<sup>-1</sup>; Novobiocina, 10 mg L<sup>-1</sup>; Agar, 18 g L<sup>-1</sup>; Agua destilada, 1000 ml. El pH del medio se ajustó a 4.8 y las placas fueron incubadas a 41°C durante 4 días. La aparición de colonias alrededor de los granos de arroz, con aparición de un pigmento amarillo fluorescente, que indicaría la presencia de toxoflavina, es un indicativo positivo de la presencia de *B. glumae* y/o *B. gladioli*.

### **2.3. Conservación de microorganismos**

Todos los aislamientos presuntivos de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*, fueron estriados y purificados en agar Soya Triptona (TSA), para las actinobacterias fue el Agar Caseinato Dextrosa (ACD). Todas las cepas fueron conservadas a corto y mediano plazo, en Cuña de agar y en crioviales conteniendo glicerol al 30% y almacenadas a -30°C, respectivamente.

### **2.4. Caracterización de bacterias endófitas**

#### **2.4.1. Actividad inhibitoria frente a *Burkholderia glumae* cepa THT.**

El proceso de selección se realizó en dos etapas, la primera denominada búsqueda primaria, el cual consistió en evaluar la capacidad inhibitoria de muchas cepas contra el patógeno, seleccionando aquellas que producían un halo de inhibición. Aquellas cepas positivas fueron evaluadas en una segunda etapa de selección, denominada búsqueda secundaria, el cual consistió en ensayar las cepas de microorganismos con repeticiones para evaluar el tamaño del halo de inhibición. En ambos casos se empleó la metodología sugerida por Lima et al. (2017), empleando discos de papel de filtro. Las cepas de bacterias endofíticas fueron estriadas en Agar TSA, para verificar la pureza del cultivo. Por otro lado, las cepas de *B. glumae* THT, aislada de campos de la región San Martín, identificada y depositada en el cepario del Laboratorio. La cepa indicadora fue sembrada (100 µL) en superficie en placas de Petri conteniendo medio King B. Cada colonia fue sembrada en 2 ml de medio líquido LB, e incubada a 180 rpm a 30°C por 48 horas. Una alícuota de 20 µL de medio LB correspondiente a cada bacteria endofítica fue colocada alrededor de una placa de Petri conteniendo la cepa de *B. glumae* THT y fueron incubadas a 30°C por 72 horas. Las cepas que mostraron un halo de inhibición, al menos < 2 mm, fueron seleccionadas para

la segunda fase. Para la búsqueda secundaria, cada cepa que mostró actividad inhibitoria de crecimiento contra *B. glumae* THT, fueron adsorbidos en disco de papel de filtro estéril (6 mm) y se procedió a incubar bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Los ensayos fueron realizados en cuadruplicado, de tal modo que la disposición de las cepas bacterianas endofíticas fuera alterada de tal forma para eliminar interferencias entre las cepas y en la producción de sustancias antimicrobianas.

#### **2.4.2. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA en bacterias endófitas con capacidad inhibitoria a *B. glumae* THT.**

La identificación taxonómica se realizó mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA. El gen fue amplificado mediante PCR usando los cebadores fD1 y rD1 (Weisburg et al. 1991). La especificidad de la amplificación fue verificada visualizando los productos de PCR en un transiluminador UV luego de separarlos por electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñirlos con GelRed (Biotium Inc.). Los productos de PCR fueron secuenciados con la tecnología Sanger como servicio externo en la compañía Macrogen (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el servidor EzBioCloud para determinar su afiliación taxonómica (Yoon et al. 2017).

### **2.5. Caracterización de cepas de *Burkholderia glumae***

#### **2.5.1. Estimación de la diversidad genética de cepas de *Burkholderia glumae*.**

Las cepas de *Burkholderia* fueron sembradas en TSB incubándose a 30 °C y en agitación a 120 rpm el tiempo necesario (24 h) hasta alcanzar la fase final de crecimiento logarítmico (DO600 de ~ 0,6). Posteriormente, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 12 000 rpm x 3 minutos, a temperatura ambiente. Para la obtención de ADN genómico se utilizó un kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN extraído fue evaluada y visualizada en un transiluminador UV luego de ser sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón Tris Borato (TBE) y tinción con GelRed (Biotium Inc.). Se utilizó como marcador de peso molecular ADN del fago Lambda digerido con la enzima HindII. La cuantificación del ADN se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop, modelo ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). El ADN extraído fue almacenado a -20°C. Para estimar la biodiversidad se generarán perfiles genómicos empleando los cebadores BOX (Averiguar cuáles son los primers), según describe de De Bruijn (1992). Los productos de PCR se separarán en geles de agarosa al 1,2 % preparados en

tampón TBE. La electroforesis fue realizada empleando una corriente continua de 60 V y los geles fueron fotografiados bajo luz UV. Como marcador de tamaño molecular se utilizó una escalera de fragmentos de ADN de 100 pb a 10 kb. El análisis comparativo de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante REP-PCR fue realizado empleando el paquete informático InfoQuest FP (Versión 4.5) (Bio Rad), que contiene el algoritmo UPGMA basado en el coeficiente de Pearson. Todos los aislamientos con un nivel de similitud igual o superior a 90% en sus perfiles genómicos fueron considerados clonas de una misma cepa y se eligió un solo representante para la identificación taxonómica. Se calculará el índice de diversidad a nivel de cepa ( $H_c$ ) como el cociente entre el número de cepas y el número total de aislamientos.

### **2.5.2. Amplificación y secuenciación parcial del gen 16S rRNA de cepas representantes de *B. glumae*.**

La identificación taxonómica se realizó mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA, tal como se describió líneas arriba para las bacterias endófitas con capacidad inhibitoria a *B. glumae* THT.

## **2.6. Evaluación de principales factores de virulencia en cepas de *B. glumae***

### **2.6.1. Evaluación de la virulencia de cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*.**

Se seguirá la metodología sugerida por Karki et al (2012). Se emplearán las siguientes cepas control: *B. glumae* THT (control positivo), *Rhizobium tropici* CIAT 899 (control negativo), además de las cepas presuntivas de ser *B. glumae*. Las cepas de bacterias aisladas de granos y otros tejidos vegetales, creciendo en medio CCNT modificado, con producción de toxoflavina alrededor de las colonias, fueron criterios que permitieron seleccionar el cepario. Las cepas fueron reactivadas, reestriadas y purificadas en TSA e incubadas a 30°C por 48 horas. Una colonia representativa de cada cepa fue sembrada en un tubo tapa rosca conteniendo 2 ml de caldo Soya Tripton (TSB), y fueron incubadas en agitación a 30°C por 48 horas. Los inóculos fueron lavados mediante 2 centrifugaciones sucesivas a 10000 rpm por 5 minutos. Cada cepa fue colocada en microtubos estériles para este procedimiento. Los sobrenadantes son desechados y los pellets bacterianos fueron resuspendidos hasta tres veces en una solución de Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ ) 10mM estéril (Tomar 1 ml de solución de  $MgCl_2$  1.0 M en 99 ml de agua destilada). Se midió la Densidad óptica de cada uno de los tratamientos con células lavadas, y fueron estandarizados todos los inóculos a una

población de  $5 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> (D.O<sub>600 nm</sub> = 0.1). Para la prueba de maceración de catáfila de cebolla, se escogió la variedad “criolla” donde las catáfilas fueron colocadas en placas de Petri limpias a razón de cuatro catáfilas por cepa. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio (DCA), donde un tratamiento control positivo fue la cepa de *B. glumae* THT y como control negativo la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT 899, ambas depositadas en el cepario de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui”. Las catáfilas fueron inoculadas por la cara interna de la misma, empleando 5 µL de suspensión bacteriana, utilizando la punta de una micropipeta (1-10 µL). Las placas de Petri conteniendo las catáfilas fueron incubadas a 30°C por espacio de 48 horas. La virulencia de cada una de las cepas, fue determinada al medir el área macerada de las cuatro catáfilas (mm). Para evaluar el potencial fitopatogénico, se midió el área de maceración (mm<sup>2</sup>).

#### **2.6.1.1. Producción de Toxoflavina.**

Se realizó una valoración cualitativa de la intensidad del color amarillo producida por las cepas de *B. glumae* sembradas por estrías sucesivas en medio de cultivo Agar King B e incubados a 37°C durante 48 horas. Ambas pruebas fueron valoradas empleando la siguiente escala: -: Sin producción de toxoflavina, +: Baja producción, ++: Intermedia producción y +++: Elevada producción (Karki et al. 2012).

#### **2.6.1.2. Producción de pigmentos.**

Se empleó la metodología sugerida por Karki et al (2012). El cepario de presuntas *B. glumae* fue sembrado en Agar King B, para verificar la pureza del cultivo. Las cepas de *B. glumae* fueron sembradas de acuerdo a la figura 1, en el medio CPG (Casaminoácidos, 1,0 g; Peptona 10,0 g; glucosa 10,0 g; Agar 18.0 g), y serán incubadas a 30°C por 14 días. Los pigmentos pueden ser amarillo-verdosos, azules, púrpuras y marrones.

#### **2.6.1.3. Producción de enzimas extracelulares.**

Para la producción de proteasas se empleó la metodología sugerida por Kim et al (2018), para celulasas la metodología sugerida por Mateos et al (1992) y para poligalacturonasas (pectinasas) la metodología sugerida por Degrassi et al (2008). Las cepas de *B. glumae* fueron estriadas en medio Agar TSA para verificar la pureza del cultivo. Las cepas nativas de *B. glumae* fueron sembradas en caldo LB a 37°C e incubadas en shaker a 200 rpm. 1 ml de cultivo de *B. glumae* cultivado overnight fue

lavado con medio LB fresco empleando una micro centrifuga, luego se resuspendió la suspensión bacteriana hasta realizar una suspensión de concentración final 1.0 ( $DO_{600}$  nm). El medio de cultivo para la actividad proteasa fue el agar nutritivo suplementado al momento del servido con aproximadamente 1% de leche descremada, bajo condiciones estériles. Para la actividad celulasa y poligalacturonasa se empleó el Agar Carboximetilcelulosa (CMC) y el Agar Pectina, respectivamente. Se sembraron 5  $\mu$ L de suspensión bacteriana en las placas de cada medio y fueron incubadas a 37°C por 48 horas. La actividad proteasa, celulasa y poligalacturonasa se determinó midiendo el halo de hidrolisis formado alrededor de las colonias, expresado como superficie de hidrólisis ( $mm^2$ ).

#### **2.6.1.4. Sensibilidad a agentes bactericidas.**

Se empleó la metodología sugerida por Kim et al (2018) para el ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y Maeda et al (2004b) para el ensayo de sensibilidad al ácido oxolínico (OA). Las cepas de *B. glumae* fueron estriadas en medio Agar King B para verificar la pureza del cultivo. Las cepas fueron sembradas en caldo LB a 37°C e incubadas en shaker rotando a 200 rpm. Cada cepa fue cosechada, lavada y resuspendida (100  $\mu$ L) empleando medio LB. Discos estériles fueron embebidos en solución al 30% de  $H_2O_2$ , colocándose sobre la placa de Petri creciendo cada cepa de *B. glumae*. Las placas tratadas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Las zonas de inhibición reflejando la sensibilidad bacteriana fueron medidas y se expresó como área de inhibición ( $mm^2$ ). Para el ensayo de sensibilidad al OA, se emplearon discos embebidos con 0, 10, 50, 100, 250 y 500  $\mu$ g  $ml^{-1}$  a partir de una suspensión de OA (20% W/V), los cuales fueron colocados sobre una placa de agar Müller-Hinton sembrada en superficie con cada cepa de *B. glumae*.

#### **2.6.1.5. Ensayos de motilidad.**

Se empleó la metodología sugerida por Kim et al (2018). Las cepas de *B. glumae* fueron estriadas en medio Agar King B para verificar la pureza del cultivo. Las cepas fueron sembradas en caldo LB a 37°C e incubadas en shaker rotando a 200 rpm. Cada cepa fue cosechada, lavada y resuspendida (100  $\mu$ L) empleando medio LB. El agar LB suplementado al 0.3% de agar fue empleado para evaluar la capacidad de Swarming y al 0.7% agar para evaluar la capacidad Swimming de cada una de las cepas de *B. glumae*. Ambas pruebas fueron valoradas empleando la siguiente escala: -: Sin motilidad, +, ++ o +++: Grado de capacidad Swimming y/o Swarming.

## **2.7. Análisis estadístico**

Los datos resultantes de actividad inhibitoria, producción de sideróforos y evaluación de la virulencia fueron evaluados mediante el test de normalidad Anderson-Darling y verificación de la Homocedasticidad. Cumpliendo ambos requisitos se procedió a realizar el ANOVA paramétrico, usando el test de Tukey al 95% como test de comparaciones múltiples, con el objetivo de ver diferencias significativas entre tratamientos..



## **CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Colecta de material vegetal**

Se realizaron colectas de plantas procedentes de Piura (3), Tumbes (4), Amazonas (7) y San Martín (8), todas principales zonas arroceras del norte del país. Las muestras colectadas fueron plantas enteras, las que fueron segmentadas en raíz, tallo, espigas, hojas y granos, inmediatamente fueron separadas y almacenadas a 4°C para su transporte y procesamiento en el Laboratorio de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui”, Facultad de Ciencias Agrarias, UNSM-T. Las muestras fueron identificadas de acuerdo a las iniciales de la zona para la posterior codificación de las cepas. Pudo constatarse que la variedad “La Esperanza”, representó el 36,4% de las muestras obtenidas, y con excepción de Piura, se cultiva en los demás departamentos. Seguido de la variedad “La Puntilla”, que representa el 22,7%, y solo colectada en la región costa norte (Piura y Tumbes). La variedad “Feron” es también muy apreciada por los agricultores arroceros, sin embargo en nuestro estudio solo representó el 18,2% de las colectas, otras variedades puntuales fueron muestreadas de la zona de colecta. Debido a que la microbiota de las plantas varía de acuerdo a su etapa vegetativa, las muestras variaron en su etapa vegetativa desde los 56 a los 128 días (desde macollamiento hasta llenado de granos) (Ver tabla 1).

### **3.2. Aislamiento y conservación de endófitos bacterianos**

Los endófitos son microorganismos capaces de colonizar el tejido interno de la planta sin ocasionar efectos perjudiciales al huésped (Schulz y Boyle 2006; Eljounaidi et al. 2016; Afzal et al. 2019). Las bacterias endófitas brindan una serie de ventajas a la planta, siendo las principales: El biocontrol de fitopatógenos y la producción de factores de promoción del crecimiento (Hong y Park 2016). El arroz, constituye el modelo más estudiado para la interacción planta - bacteria endófitas (Bacilio-Jiménez et al. 2001; Mano y Morisaki et al. 2008). Se ha reportado bacterias endófitas en los tejidos de arroz a nivel de raíz (Etesami et al. 2014; Chung et al. 2015), hojas (Mano et al. 2007), tallos (Elbeltagy et al. 2000, 2001; Bertani et al. 2016) y semillas (Elbeltagy et al. 2001; Verma et al. 2001; Okunishi et al. 2005; Walitang et al. 2017). Los endófitos bacterianos en arroz pueden ser catalogados como patógenos humanos (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006), bacterias con potencial patogénico (Singh et al. 2013;

Prasertsincharoen et al. 2015), hasta ambientalmente seguras como los rizobios (Piromyou et al. 2015).

Se obtuvieron 189 cepas de bacterias endófitas. La mayor cantidad de cepas fueron recuperadas de la región San Martín (36,0%) y tan solo 14,8% fueron recuperados de la región Piura. De acuerdo al tipo de órgano de la planta de arroz, los endófitos radiculares fueron los más abundantes (33,9%), seguido del tallo (26,5%) y hojas (19,0%), inclusive el grano (14,3%) (Tabla 2). La composición de la flora endofítica en el arroz está influenciada por el tipo de órgano, la variedad, la etapa vegetativa del cultivo y las condiciones edafoclimáticas (Mano et al. 2007). En el presente estudio, la recuperación de verdaderos endófitos de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Actinobacteria* fue mayor en la raíz y en el tallo, tal como lo reportaron Mbai et al (2013). Las bacterias endófitas provienen del suelo (Berg et al. 2013), pasando transitoriamente como endófitas (Edwards et al. 2015), y finalmente solo algunas seleccionadas son transmitidas a nivel de grano (Gholamalizadeh et al. 2019).

**Tabla 2**

*Distribución de acuerdo al origen de las muestras de arroz y el tipo de órgano seleccionado para el aislamiento de bacterias endofíticas de arroz.*

Departamento	Raíz	Hoja	Tallo	Panícula	Grano	Total
Piura	14	0	10	4	0	28
Tumbes	19	6	9	8	4	46
Amazonas	11	11	17	0	8	47
San Martín	20	19	14	0	15	68
Subtotal	64	36	50	12	27	189
%	33,9	19,0	26,5	6,5	14,3	

La mayor proporción de recuperación de bacterias endófitas de raíz y tallo, se fundamenta en la diversidad y disponibilidad de nutrientes: La diversidad de nutrientes, puede explicarse en los fotosintatos derivados del proceso fotosintético, que en plantas como el arroz, hasta un 29% de los metabolitos producto de la fotosíntesis son derivados de los exudados radiculares (Lynch y Whipps 1990). Bacilio-Jiménez et al (2003), reportó una diversidad de aminoácidos y carbohidratos son responsables de las respuestas quimiotácticas responsables de la colonización endofítica de *Corynebacterium flavescentes* y *Bacillus pumilus* en arroz. Así mismo, la proporción de bacterias endófitas en diferentes etapas del cultivo, puede explicarse de acuerdo al perfil de exudados radiculares, el cual es diferente en cada etapa del cultivo de arroz (Yuan et al. 2016). Aulakh et al (2001), demostró que la producción de exudados radiculares

incrementó desde la etapa vegetativa hasta antes de la floración, y decreció durante la madurez.

Por otro lado la disponibilidad de nutrientes, ya que se ha reportado que los endófitos bacterianos son capaces de colonizar el córtex atravesando la endodermis en el tejido vascular, allí residen en los espacios intercelulares (apoplasto) y el sistema vascular (Mano et al. 2008). El apoplasto representa el espacio por fuera de la membrana plasmática, que incluye la pared celular y está involucrado en el transporte e intercambio de solutos, metabolitos y proteínas entre las células y los tejidos, siendo el nicho preferido por las bacterias endófitas (Romero et al. 2019). Es a través del sistema vascular, donde las bacterias endófitas se dispersan de manera sistémica en la parte aérea, colonizando flores, panículas y granos (Reinhold-Hurek et al. 2007).

El carácter endofítico de las bacterias en estudio fue asumido mediante la prueba de desinfección de las partes vegetales, debido a que una vez realizado el proceso de desinfección se inoculó el diluyente del último enjuague, y solo aquellas placas con ausencia de contaminación, fueron empleadas para el aislamiento de endófitos. Todas las cepas fueron conservadas a corto y mediano plazo, empleando el método de la cuña de agar y criopreservación en glicerol al 30% a  $-25 \pm 5$  °C. Para ser considerado un “verdadero” endófito, Reinhold-Hurek and Hurek (1998), recomendaron, no solamente el aislamiento a partir de superficies esterilizadas, también la evidencia de colonización a través de microscopía de fluorescencia o Laser Confocal (Verma et al. 2004; Sánchez-López et al. 2018). Cuando no se cumple este último criterio, las bacterias pasan a denominarse “endófitos putativos” (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006).

### **3.3. Selección primaria y secundaria de endófitos bacterianos con capacidad inhibitoria contra *Burkholderia glumae* THT**

En la selección primaria, solo 34 de los 189 endófitos bacterianos (18,0%) fueron evaluados por su capacidad de inhibir el crecimiento de *B. glumae* THT. La inhibición de crecimiento fue variable desde 0,01 – 4,51 como área de inhibición (cm<sup>2</sup>). El 41,2% de las cepas con actividad inhibitoria contra *B. glumae* THT fueron aisladas de Tumbes, seguidos del 35,5% de cepas procedentes de San Martín. La cepa AMH12-02 procedente de Amazonas fue la cepa que mostró una mayor área de inhibición de crecimiento. Finalmente las cepas procedentes de Piura, mostraron una actividad mínima (Tabla 3, Figura 1 y Figura 2).

**Tabla 3**

*Búsqueda primaria de cepas con actividad inhibitoria contra Burkholderia glumae THT.*

<b>Cepa de bacteria endofítica</b>	<b>Área de inhibición (cm<sup>2</sup>)*</b>	<b>Cepa de bacteria endofítica</b>	<b>Área de inhibición (cm<sup>2</sup>)*</b>
PIR01-11	0,28	AMH12-02	4,51
PIR01-12	0,27	AMR09-09	3,2
PIT01-03	0,25	AMR09-06	3,2
TUR04-04	4,27	AMR09-07	2,67
TUR04-01	3,86	AMH09-02	0,26
TUR04-03	3,14	SMBR13-04	2,52
TUT05-02	2,89	SMBH14-02	2,5
TUR07-04	2,83	SMNCT17-02	2,34
TUR07-08	2,69	SMNCT17-03	1,36
TUR05-02	2,43	SMNCH17-07	1,2
TUCCNT04-06	1,41	SMNCR18-03	0,78
TUR07-02	1,4	SMNCH16-06	0,71
TUT07-02	0,93	SMNCT18-03	0,6
TUCCNT06-01	0,59	SMBR15-04	0,51
TUH05-02	0,26	SMBH14-03	0,4
TUH05-03	0,2	SMNCH17-04	0,32
TUG06-01	0,01	SMNCG17-01	0,02

\* Medición del halo a partir de una sola medición.

La cepa *B. glumae* THT fue aislada de la variedad “La Esperanza” presentando síntomas del añublo bacterial de la panícula creciendo en la Banda de Shilcayo, San Martín y presenta gran virulencia tanto en catáfila de cebolla como en inoculación experimental en arroz, razones por la cual fue considerada como cepa patrón. El añublo bacterial de la panícula, constituye una enfermedad de gran relevancia en el cultivo de arroz, no solo por su capacidad de mermar el rendimiento hasta en un 75% en campos severamente infestados (Ham et al. 2011), también debido a que es considerado un patógeno transmitido por semilla (Hikichi et al. 1993a), pero sobre todo por el potencial de incrementarse bajo el escenario del calentamiento global debido a que los rangos de temperatura óptimas para el crecimiento de este patógeno son relativamente altos (Mizobuchi et al. 2016).

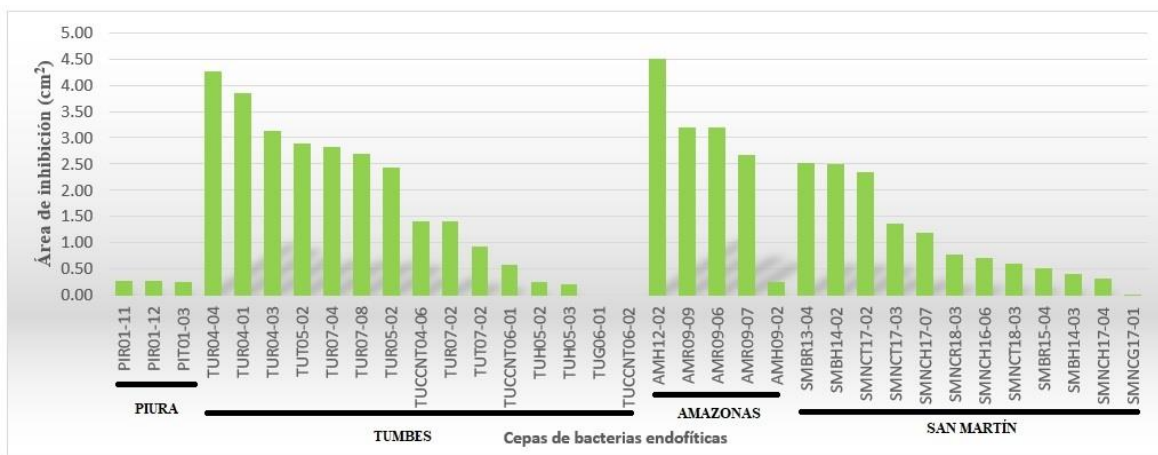


Figura 1. Área de inhibición (cm<sup>2</sup>) del crecimiento de *Burkholderia glumae* THT en medio TSA a 48 horas de crecimiento

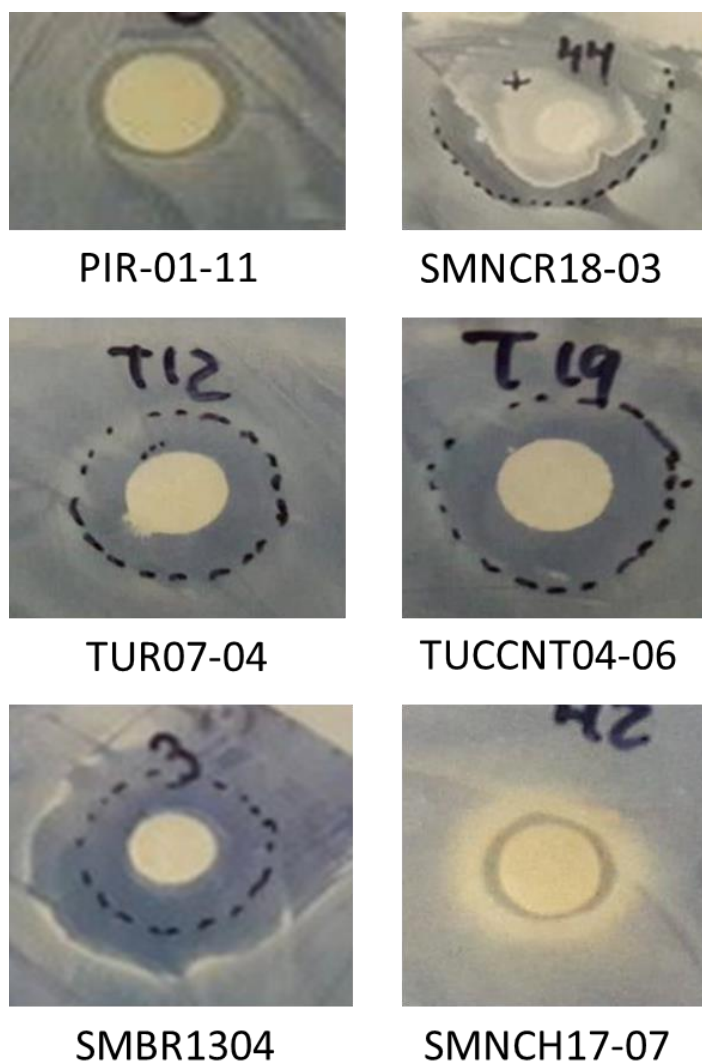


Figura 2. Efecto inhibitorio de cepas de bacterias endofíticas contra *Burkholderia glumae* THT

Las alternativas de control contra *B. glumae*, van desde el control químico, control cultural y el control biológico (Ham et al. 2011). Dentro de las alternativas de

control químico, el antibiótico derivado de la quinolina, el ácido oxolínico ha resultado ser efectivo (Hikichi 1993b, Hikichi et al. 1995), sin embargo se encuentra prohibido en países como EE.UU, inclusive se ha reportado niveles de resistencia entre cepas de *B. glumae* (Hikichi et al. 2001; Maeda et al. 2004a y b, 2007a y b). El control cultural empleado para reducir la incidencia de la enfermedad van desde el manejo adecuado del cultivo en el periodo de siembra, evitando que el momento de la floración y llenado de grano se produzca en época de lluvia, elevada humedad atmosférica y temperatura, así como baja radiación solar (SENASA 2015), así mismo hacer un uso eficiente del nitrógeno (NUE) reduce los niveles de incidencia de la enfermedad (Torres-Chávez et al. 2019 Comunicación personal), e incluso el tratamiento térmico de semillas a 65°C durante 6 días (Betancur 2011). El uso de variedades resistentes a *B. glumae*, también constituye una opción viable para los fitomejoradores del cultivo (Ham et al. 2011; Mizobuchi et al. 2018; Shrestha et al. 2018).

El control biológico contra *B. glumae* es una opción interesante para el manejo del añublo bacterial de la panícula, a comparación de las alternativas arriba mencionadas, complementa el manejo integrado de la enfermedad (Betancur 2011; Shrestha et al. 2016). Las estrategias biológicas empleadas para reducir el crecimiento e incidencia de la enfermedad por *B. glumae* han ido desde el uso de bacteriófagos específicos (Adachi et al. 2012), *Paenibacillus polimixa* JH2 productora de enzima degradadora de Toxoflavina (Jung et al. 2011; Koh et al. 2011), búsqueda metagenómica de enzimas degradadoras de toxoflavina (Choi et al. 2018), *Bacillus amyloliquefasciens* (Shrestha et al. 2016), *Bacillus oryzicola* (Chung et al. 2015), Quorum quenching a través de *Burkholderia* sp KJ006 endófito de raíz transformada para la interrupción del Quorum Sensing mediante la producción de N-acyl homoserine lactonasa (Cho et al. 2007), empleo de cepas avirulentas de *Burkholderia* (Furuya et al. 1991; Miyagawa y Takaya 2000) y empleo de bacteria predatora *Bdellovibrio bacteriovorus* (Song 2004). Recientemente, Riera-Ruiz et al (2018), reportó que *Burkholderia gladioli* presenta efecto inhibitorio contra *B. glumae*, sin embargo deberá investigarse los potenciales metabolitos involucrados en la supresión de *B. glumae*, debido al potencial fitopatogénico de *B. gladioli*. Suárez-Moreno et al (2019), reportó que *Streptomyces* cepa A20 fue capaz de inhibir el crecimiento “in vitro” de distintas cepas de *B. glumae* en Colombia.

En la selección secundaria, solo 9 cepas con respecto a los 34 endófitos bacterianos procedentes de la selección primaria (26,5%) y a las cepas totales aisladas

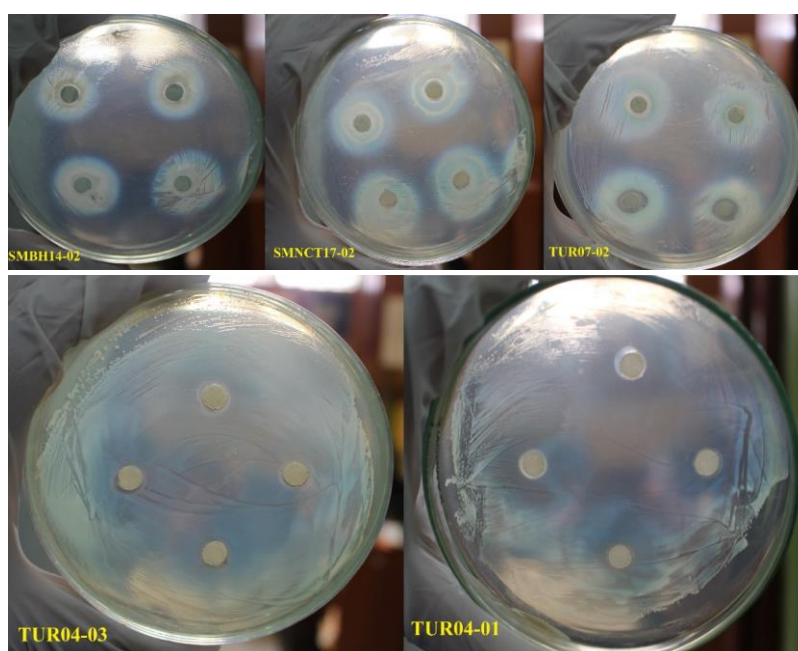
(4,8%), fueron confirmadas con una actividad inhibitoria mayor a 150 mm<sup>2</sup> (Tabla 4, Figura 3). Solo 5 cepas (55,6%) fueron procedentes de Tumbes, 3 cepas de San Martín (33,3%) y solo 1 (11,1%) cepa procedente de Amazonas. El 55,6% (5) de las cepas fueron endófitos radicales, el 22,2% (2) procedieron del tallo, al igual que los procedentes de hoja. No se reportan endófitos con capacidad inhibitoria del crecimiento contra *B. glumae* THT procedentes de espiga ni de grano, probablemente debido a que la composición y diversidad de bacterias antagonistas son específicas de cada microambiente en la planta (Berg et al. 2013).

**Tabla 4**

*Características de inhibición de crecimiento sobre Burkholderia glumae cepa THT, por 9 bacterias endófitas de arroz procedentes de zonas de cultivo en la zona norte del Perú.*

Bacteria endófitas de arroz	Área de inhibición de crecimiento (mm <sup>2</sup> )
<i>Bacillus megaterium</i> TUR07-04	283 (± 38) D
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> TUR04-03	517 (± 16) B
<i>Bacillus megaterium</i> TUT05-02	301 (± 7) CD
<i>Bacillus velezensis</i> TUR07-02	254 (± 8) D
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> TUR04-01	618 (± 25) A
<i>Bacillus aryabhatai</i> AMH12-02	330 (± 13) C
<i>Bacillus aryabhatai</i> SMBR13-04	158 (± 9) E
<i>Bacillus megaterium</i> SMBH14-02	180 (± 5) E
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stecoris</i> SMNCT17-02	245 (± 9) DE
<b>CV (%)</b>	<b>8,64</b>

Promedio y error estándar (n=6) seguido por la misma letra no son significativos al 5% de probabilidad por el test Tukey.



**Figura 3.** Actividad inhibitoria de cepas de bacterias endofíticas contra *Burkholderia glumae* THT en medio TSA incubado a 30°C por 72 horas

Con respecto a la variedad de origen de las cepas endófitas, se puede observar que el 55,6% de las cepas procedieron de la variedad “La Esperanza”, mientras que solo el 22,2% de las cepas provinieron de la variedad “Tinajones”, finalmente de las variedades “La puntilla” y “Feron”, fueron obtenidas 1 cepa, respectivamente.

#### **3.4. Caracterización morfocolonial, bioquímica y determinación filogenética de endófitos bacterianos seleccionados en base al gen 16S rRNA**

Los endófitos bacterianos con actividad inhibitoria de crecimiento contra *B. glumae* THT corresponden a los géneros *Burkholderia* y *Bacillus*, de acuerdo al análisis filogenético de la secuencia completa del gen 16S rRNA (Tabla 5 y Tabla 6). Son variados los reportes donde se resalta la importancia de seleccionar bacterias endófitas como excelente candidatos para agentes de biocontrol (Chen et al. 2019).

Las cepas TUR04-01 y TUR04-03 presentaron un 99,93 y 99,72% de similitud respectivamente y afiliación taxonómica con *B. vietnamiensis* LMG 10929<sup>T</sup>. Por su versatilidad ecológica, habilidad de usar una gran variedad de compuestos como única fuente de carbono y de producción de metabolitos secundarios, no sorprende que el género *Burkholderia* constituya una alternativa de biocontrol para otros miembros del mismo género (Parke y Gurian-Sherman 2001; Riera-Ruiz et al. 2018) e incluso de la misma especie (Furuya et al. 1991; Miyagawa y Takaya 2000), por lo que *B. vietnamiensis* presenta potencial de biocontrol contra fitopatógenos (Zhang et al. 2012).

Las cepas SMBH14-02, TUT05-02, TUR07-04, presentaron un 99,79, 100 y 99,93% de similitud respectivamente y afiliadas taxonómicamente con *Bacillus megaterium* NBRC 15308<sup>T</sup>. Las cepas AMH12-02 y SMBR13-04, presentaron un 99,93 y 100% de similitud, respectivamente y afiliadas taxonómicamente con *Bacillus aryabhatai* B8W22<sup>T</sup>. La cepa SMNC17-02, presentó una afiliación taxonómica con *Bacillus subtilis* subsp. *stecoris* D7XPN1<sup>T</sup> en un 99,76%, y finalmente la cepa TUR07-02 un 99,78% similar a la cepa *Bacillus velezensis* CR-502<sup>T</sup> (Tabla 5 y Tabla 6).

El género *Bacillus* tiene un uso potencial en el biocontrol de bacterias fitopatógenas, produciendo una serie de lipopéptidos como la iturina y la surfactina, así como otros más particulares como la jinggangmicina (Peng et al. 2014). Berić et al. (2012), Reportó que la cepa de *Bacillus subtilis* SS12,9 presentó actividad inhibitoria contra *B. glumae*. *B. subtilis* ha sido ampliamente reportado como controlador biológico de bacterias fitopatógenas (Peng et al. 2014; Xie et al. 2018), en otro estudio Durairaj et al (2017) reportó que *Bacillus stratosphericus*, inhibió el crecimiento de *B. glumae*



después de haber enriquecido el medio de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono.

### **3.5. Producción de sideróforos por endófitos bacterianos seleccionados**

La oxidación del hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ ) se da en presencia de oxígeno y a pH neutro, siendo poco viable para las bacterias, es por ello que la producción de sideróforos constituye una estrategia directa para la nutrición bacteriana en condiciones limitantes de Fe (Vial et al. 2007). El 44,4% de los endófitos bacterianos produjeron sideróforos en medio de cultivo con trazas de  $\text{Fe}^{3+}$ , mientras que el 66,7% produjeron sideróforos en medio desferrado. Todas las cepas incrementaron la producción de sideróforos cuando en el medio líquido hubo privación del  $\text{Fe}^{3+}$ .

Las cepas de *B. vietnamiensis* TUR04-01 y TUR04-03, produjeron la mayor concentración de sideróforos solubles, tanto en condiciones de  $\text{Fe}^{3+}$  como en medio desferrado (Tabla 7 y Figura 4). Se ha reportado que el Salicilato, la ornibactina y la maleobactina constituyen los sideróforos más comunes producidos por el género *Burkholderia* (Franke et al. 2015), así Darling et al (1998), reportó que el 87% de los aislamientos de *B. vietnamiensis* presentaron producción de Ornibactina. Es posible que las cepas de *B. vietnamiensis* TUR04-01 y TUR04-03 que produjeron una mayor cantidad de sideróforos, produzcan uno o más tipos de sideróforos, sobretodo en condiciones limitantes de  $\text{Fe}^{3+}$ , debido a que la afinidad por el Fe es variable (Esmaeel et al. 2016).

**Tabla 5**

*Origen, procedencia, características microscópicas y bioquímicas de cepas de endófitos bacterianos de arroz con capacidad antagonista contra Burkholderia glumae THT.*

Cepa de bacteria endófito de arroz	Órgano de origen	Origen geográfico	Variedad	Especie más relacionado a la cepa tipo*	Características microscópicas				Características bioquímicas		Código NCBI
					Gram	Esporas	Forma	Agrupación	Utilización de citrato	Fermentación de la Glucosa	
<b>TUR04-03</b>	Raíz	La Noria, San Juan de la Virgen, Tumbes	Tinajones	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	-	-	CB	I	+	+	MK449433
<b>TUR04-01</b>				<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	-	-	CB	I	+	+	MK449435
<b>TUT05-02</b>	Tallo	Los Cedros, San Juan de la Virgen, Tumbes	La puntilla	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	B	I	-	+	MK449447
<b>TUR07-04</b>	Raíz	Las Brujas, San Juan de la Virgen, Tumbes	La Esperanza	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	B	I	-	+	MK449448
<b>TUR07-02</b>				<i>Bacillus velezensis</i>	+	+	B	I	-	+	MK449441
<b>AMH12-02</b>	Hoja	Huarangopampa, Bagua Capital, Amazonas	La Esperanza	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	+	B	I	-	+	MK449446
<b>SMBR13-04</b>	Raíz	Santa Catalina, Bellavista, San Martín	La Esperanza	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	+	CB	I	+	+	MK449444
<b>SMBH14-02</b>	Hoja	Martín	Feron	<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	B	I	-	+	MK449443
<b>SMNCT17-02</b>	Tallo	La unión, Nuevo Cajamarca, San Martín	La Esperanza	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stecoris</i>	+	+	B	I	-	+	MK449440

\*Identificación mediante la comparación del gen 16S rRNA. **Forma:** Cocobacilo (CB); Bacilo (B). **Agrupación: Individual: (I)**

**Tabla 6**

Porcentajes de similitud de secuencias del gen 16S rRNA con cepas tipo de diferentes géneros usando el programa EZ-Biocloud.

Cepa	Especies tipo más relacionada. Cepa tipo <sup>(T)</sup>	Similitud %	Pares de bases	Microfotografía
SMNCT17-02	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stecoris</i> D7XPN1 <sup>(T)</sup>	99,76	1437	
TUR07-02	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502 <sup>(T)</sup>	99,78	1402	
SMBH14-02	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>(T)</sup>	99,79	1438	
AMH12-02	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>(T)</sup>	99,93	1379	
TUT05-02	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>(T)</sup>	100	1403	
TUR07-04	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>(T)</sup>	99,93	1379	
TUR04-03	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG 10929 <sup>(T)</sup>	99,93	1403	
TUR04-01	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG 10929 <sup>(T)</sup>	99,72	1421	
SMBR13-04	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>(T)</sup>	100	1466	

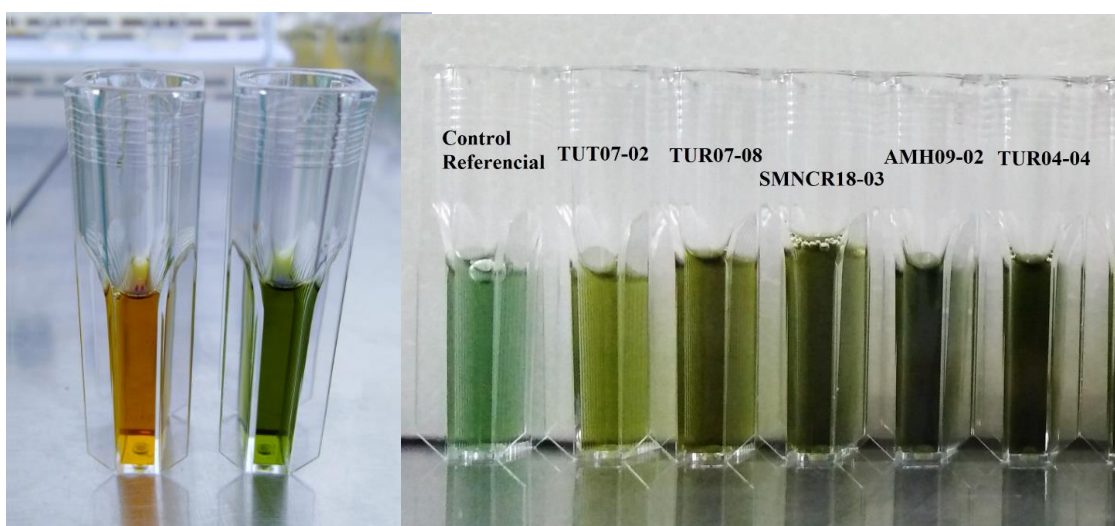
**Tabla 7**

Características de producción de sideróforos y degradación de toxoflavina sobre *Burkholderia glumae* cepa THT por 9 bacterias endófitas de arroz procedente de zonas de cultivo en la zona norte del Perú.

Bacteria endófitas de arroz	Producción de sideróforos (%)		Degradación de Toxoflavina		
	+ Fe <sup>a</sup>	- Fe <sup>b</sup>	*20 µg ml <sup>-1</sup>	**30 µg ml <sup>-1</sup>	**40 µg ml <sup>-1</sup>
<i>Bacillus megaterium</i> TUR07-04	ND	ND	+++	+	-
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> TUR04-03	86,56 (± 2,59) A	97,36 (± 0,24) A	+++	+	+
<i>Bacillus megaterium</i> TUT05-02	ND	ND	+	+	+
<i>Bacillus velezensis</i> TUR07-02	ND	ND	+	+	+
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> TUR04-01	25,47 (± 0,69) B	95,39 (± 0,52) A	+++	+	+
<i>Bacillus aryabhatai</i> AMH12-02	ND	17,18 (± 2,65) CD	++	+	+
<i>Bacillus aryabhatai</i> SMBR13-04	11,10 (± 0,55) C	16,00 (± 1,47) D	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> SMBH14-02	18,90 (± 2,80) BC	55,84 (± 3,20) B	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>stecoris</i> SMNCT17-02	ND	24,94 (± 0,24) C	++	-	-
<b>CV (%)</b>	11,75	8,23			

Promedio y error estándar (n=6) seguido por la misma letra no son significativos al 5% de probabilidad por el test Tukey. ND: No detectado. <sup>a</sup> Medio SM normal con trazas de Fe. <sup>b</sup> Medio SM desferrado. \* Ensayo en caldo nutritivo suplementado con 20 µg ml<sup>-1</sup> de Toxoflavina. \*\* Ensayo realizado en Agar nutritivo suplementado con dosis crecientes de Toxoflavina.

El género *Bacillus*, a diferencia del género *Burkholderia*, produce sideróforos del tipo catecoles (Bacilibactinas) (Rizzi et al. 2019). Este tipo de sideróforo, además de favorecer el crecimiento de la planta, contribuye a proteger a la planta contra infecciones fitopatogénicas por acomplejamiento de Fe haciéndolo menos viable a los patógenos (Arguelles-Arias et al. 2009). Por el contrario, las cepas de *Bacillus velezensis* TUR07-02 y dos de las cepas de *B. megaterium* TUT05-02 y TUR07-04, no evidenciaron producción de sideróforos por el método CAS-Shuttle Assay. Las cepas mostraron crecimiento en los medios de cultivo ensayados, por lo que es probable que otros tipos de sideróforos sean producidos, y no sean cuantificados por el CAS-Shuttle Assay (Schwyn y Neilands 1987).



**Figura 4.** A) Producción de sideróforos en medio desferrado, Cepa TUT07-02 con capacidad de producir sideróforos ((izquierda) a comparación de la cepa AMH12-02 (derecha) que no produce sideróforos. B) producción de sideróforos en medio con trazas de Fe

La producción de sideróforos se ha asociado al control de fitopatógenos por limitación del Fe en el medio de cultivo (Ahmad et al. 2008), aunque algunos reportes dicen lo contrario (Pineda-Mendoza et al 2019). En nuestro estudio, la actividad inhibitoria de las bacterias endófitas contra *B. glumae* THT estuvo correlacionada de manera positiva con la producción de sideróforos en condiciones normales de Fe ( $r=0,58$ ) así como en ausencia de Fe ( $r=0,74$ ), sin embargo es necesario confirmar la participación de sideróforos en la actividad inhibitoria de *B. glumae* THT, realizando el ensayo de actividad inhibitoria bajo condiciones de ausencia de Fe.

### 3.6. Degradación de Toxoflavina por endófitos bacterianos seleccionados

La Toxoflavina, es una fitotoxina con características antimicrobianas, antifúngicas e incluso herbicidas, el mecanismo de acción consiste en la generación de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la presencia de luz y oxígeno, debido a que funciona como un transportador de electrones activo entre el NADH y el oxígeno (Naughton et al. 2016), esto explicaría la sintomatología del añublo bacterial de la panícula.

La degradación de toxoflavina constituye una estrategia de selección para la búsqueda de controladores biológicos contra *B. glumae* (Jung et al. 2011), es así que existen reportes, aunque escasos, de bacterias capaces de expresar enzimas que degradan toxoflavina a concentraciones superiores a 40 µg ml<sup>-1</sup> (Koh et al. 2011), teniendo en cuenta que concentraciones menores a 3 µg ml<sup>-1</sup> inhiben por completo el crecimiento de *Escherichia coli* (Latuasan y Berends 1961).

La degradación de la toxoflavina fue evidenciado a través del crecimiento de los endófitos bacterianos en tres concentraciones de la fitotoxina. Se describe por primera vez la degradación de toxoflavina por el género *Burkholderia* y *Bacillus*. Antes había sido reportado que *Paenibacillus polymixa* cepa JH2, aislada de semillas de arroz saludables presentan el gen *tflA* que expresa una enzima degradadora de fitotoxina (Koh et al. 2011; Jung et al. 2011), Más reciente, Choi et al (2018), empleando la metagenómica como una estrategia de búsqueda de nuevas enzimas degradadoras de toxoflavina, reportó la existencia del gen *txeA*, el cual expresa una metaloenzima con actividad neutralizante de toxoflavina.

A la concentración de 20 µg ml<sup>-1</sup>, todas las cepas en mayor o menor intensidad fueron capaces de sobrepasar una D.O<sub>600 nm</sub> de 0,5, con excepción de la cepa *Bacillus aryabhatai* SMBR13-04. A la concentración de 30 µg ml<sup>-1</sup>, la cepa SMNCT17-02 no fue capaz de expresar crecimiento, y tan solo el 55.6% expresó crecimiento a 40 µg ml<sup>-1</sup> de toxoflavina (Tabla 6). Será importante confirmar estos estudios a través de la amplificación de los genes *tflA* y *txeA* en el genoma bacteriano de nuestras cepas endófitas.

### **3.7. Aislamiento, diversidad genética e identificación de cepas nativas de *B. glumae* y *B. gladioli***

Se aislaron 17 cepas con características a *B. glumae*, 16 a partir de granos de arroz y un aislamiento de tallo, en medio CCNT modificado. La presencia de *B. glumae* siempre se asocia a los granos (Cottyn et al. 2001; Zhu et al. 2008; González y Santamaría 2014), que es la estructura vegetal donde normalmente se asocia la enfermedad del añublo bacterial de la panícula, sin embargo en nuestro estudio, un aislamiento fue recuperado de tallo. Se conoce que *B. glumae* presenta un estilo de vida

endofítico y es posible encontrarlo en el interior del tejido vascular y en poblaciones de  $10^4$  a  $10^6$  ufc  $g^{-1}$  a nivel de tallo (Li et al. 2016).

El 47,1% de las cepas fueron aisladas de campos de Tumbes, el 29,4% fueron procedentes de Amazonas, y solo el 23,5% procedieron de San Martín (Tabla 8). El mismo autor confirmó diferencias en la distribución geográfica de ambas especies, *B. glumae* fue reportada en todos los estados muestreados, mientras que *B. gladioli* solo fue reportada en 5 estados, de manera similar en nuestro estudio *B. gladioli* solo es reportada en muestras de Tumbes, mientras que *B. glumae* fue reportada en Tumbes, Amazonas y San Martín, con excepción de Piura.

Las 17 cepas fueron agrupadas en 10 perfiles genómicos BOX diferentes, los cuales fueron denominados: A, B, C, D1, D2, D3, E1, E2, E3, E4 y E5. El perfil genómico E5 correspondió a la cepa patrón de *B. glumae* B3HT (Tabla 8). Se escogieron cepas representantes de cada perfil genómico para posteriores estudios de confirmación filogenética y caracterización de los principales factores de virulencia en las cepas nativas. El empleo de la técnica de huella genómica BOX-PCR, es ampliamente usado en varios estudios, debido a su amplio poder de resolución intercepa atendiendo a sus diferencias genómicas (Cottyn et al. 2001; Karki et al. 2012; Galvis y Carrillo 2015). Galvis y Carrillo (2015), estudiaron la diversidad genética de 41 aislados de *B. glumae* mediante BOX-PCR, agrupándolos en 4 perfiles BOX diferentes.

En nuestro estudio, fue posible observar una diferenciación genómica entre cepas de acuerdo a su distribución geográfica, las cepas de Tumbes presentaron diferencias genómicas diferentes a las cepas de Amazonas y San Martín. Este patrón ha sido reportado por autores como Galvis y Carrillo (2015), quienes observaron que los aislamientos de *B. glumae* provenientes del Zulia fueron agrupados en un mismo perfil BOX. Karki et al (2012) reveló que el análisis BOX-PCR de cepas de *B. glumae* aisladas del sur de Estados Unidos presentaron variaciones en su estructura genómica los cuales correspondieron a diferencias fenotípicas y origen geográfico.

Las diferencias genómicas entre las cepas de Tumbes y las cepas de Amazonas-San Martín, podrían explicarse por el efecto de las condiciones edafoclimáticas, las cuales tienen un efecto sobre la composición genética de las bacterias, perdiendo o ganando genes involucrados en la adaptación al nuevo ambiente a colonizar. Esta condición es debido a que *B. glumae* presenta ciertas características: a) Genoma grande (5.81 a 7.89 Mpb) b) Capacidad de infectar otros huéspedes, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Lee et al. 2016). Francis et al (2013), comparó el genoma de una

cepa altamente virulenta 336gr-1 aislada de Louisiana, Estados Unidos, con el genoma de la cepa BGR1 aislada de Korea. Ellos reportaron que ambas cepas presentaron regiones genómicas únicas presente en solo una de las dos cepas, relacionadas con la adaptación al ambiente (elementos móviles) y defensa contra virus (genes relacionados con fagos), pero con mínima variación en genes de conocida y potencial virulencia. Lee et al (2016) demostró que cepas de diferentes orígenes geográficos, como *B. glumae* PG1, presentaron un gran número de rearrreglos genómicos irregulares y esporádicos. En el caso de las cepas *B. glumae* BGR1 y LMG 2196 se evidenció el reordenamiento de elementos genéticos por inversión a gran escala concentrados en el cromosoma 2.

**Tabla 8**

*Diversidad genética de aislamientos de Burkholderia glumae y Burkholderia gladioli a partir de muestras de grano y tallo de arroz cultivado en cuatro departamentos de la zona norte del Perú.*

<b>Perfil BOX</b>	<b>Cepa(s)</b>	<b>Especie(s) más relacionada(s) según 16S rRNA</b>
A	<b>TUG05-07; TUG05-08</b>	<i>Burkholderia gladioli</i>
B	<b>TUT05-07</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
C	<b>TUG07-05; TUG07-07</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
D1	<b>TUG07-08</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
D2	<b>TUG07-09</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
D3	<b>TUG07-11; AMG08-02</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
E1	<b>AMG09-01; AMG09-02; AMG09-09</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
E2	<b>AMG12-06</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
E3	<b>SMNCG18-05; SMNCG18-07</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
E4	<b>SMNCG18-06; SMNCG18-08</b>	<i>Burkholderia glumae</i>
E5	<b>B3HT</b>	<i>Burkholderia glumae</i> B3HT

La amplificación y secuenciación parcial del gen 16S rRNA de las 9 cepas representantes de cada perfil genómico BOX-PCR, permitió identificar una similitud con *B. glumae* en los perfiles genómicos B, C, D1, D2, D3, E1, E2, E3 y E4; y de *B. gladioli* en el perfil genómico A. En nuestro estudio se reporta una mayor frecuencia de aislamiento de *B. glumae* que de *B. gladioli*. De manera similar, Cottyn et al. (2001) en un estudio de prospección de las poblaciones bacterianas asociadas con semillas de arroz en Filipinas, reportó que solo 7 cepas (2%) de un total de 428 aislamientos, correspondieron a 5 cepas de *B. glumae* y 2 cepas de *B. gladioli*. Por el contrario, Riera-Ruiz et al (2018) reportó una mayor frecuencia de aislamientos de *B. gladioli* en campos de arroz en Ecuador.



### 3.8. Caracterización y evaluación de los factores de virulencia de cepas nativas de *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli* nativas

El 70% de las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*, fueron aisladas de granos de la variedad “La Esperanza”, confirmando la susceptibilidad de esta variedad al complejo *Burkholderia*. Otras cepas fueron recuperadas de variedades como: “Santa Bárbara” y “La Puntilla”. Estas variedades, sobretodo “La Esperanza”, han sido reportadas como susceptibles al añublo bacterial de la panícula, por el contrario la variedad INIA 507 “La Conquista” ha demostrado ser resistente a la infección por *B. glumae* (Edson Torres Chávez, Comunicación personal). Se han reportado varios niveles de susceptibilidad y resistencia a la enfermedad (Ham et al. 2011; Mizobuchi et al. 2018). La susceptibilidad de las variedades peruanas podría clasificarse como “alta”, aunque presentan progenitores de cultivares tipo *indica* que presentan resistencia “media” a “fuerte”, es necesario en el futuro introducir genes posible de resistencia desde la variedad INIA 507 “La Conquista”.

La caracterización bioquímica de cepas de *B. glumae* son importantes para su identificación (Zhu et al. 2008). En nuestro estudio, todas las cepas fueron capaces de utilizar el citrato como única fuente de Carbono (Agar Citrato de Simmons) y fermentar la glucosa (Agar Lisina Fierro) (Tabla 9).

La producción de toxoflavina se realizó en medio King B incubado a 37°C, siendo la cepa de *B. glumae* TUT05-07, la mayor productora de fitotoxina (Tabla 9). La toxoflavina es producida tanto por *B. glumae* y *B. gladioli* y es una de las principales factores de virulencia, aunque se reporta que la producción de toxoflavina es menor en *B. gladioli*. (Lee et al. 2016). En nuestro estudio, todas las cepas produjeron toxoflavina en menor o mayor grado, ya que le permite atacar a las células huéspedes de acuerdo a su nivel población en los sitios de infección (Chen et al. 2012) y además se encuentra correlacionada directamente con fenotipos virulentos en arroz (Karki et al. 2012). La producción de mayor o menor cantidad de toxoflavina se debe a la expresión de genes codificados en el operón de biosíntesis *toxABCDE*, el cual está bajo control del regulador transcripcional de ToxR (Suzuki et al. 2004; Fory et al. 2014).

Los pigmentos juegan un rol importante en la adaptación ecológica de los microorganismos, desde protección a las radiaciones, hasta exacerbación de los factores de virulencia (Karki et al 2014). La producción de otros pigmentos diferentes a la toxoflavina, e incluso a la melanina y a los ramnolípidos ha sido descrito por varios autores (Karki et al. 2012; 2014). Las cepas de *B. glumae* AMG09-01 (Perfil Box E1) y

TUT05-07 (Perfil BOX B), así como las cepas patrón *B. glumae* A y B3HT, no produjeron pigmentos visibles ni en las colonias ni difusibles al medio. Un pigmento que fue desde el azul oscuro hasta un azul claro fue producido por las cepas de *B. glumae* TUG07-05 (Perfil Box C), TUG07-08 (Perfil Box D1), TUG07-09 (Perfil Box D2), AMG12-06 (Perfil Box E2), así como la cepa patrón *B. glumae* THT. Una variación del pigmento anterior, azul con bordes marrones fue producida por las cepas de *B. glumae* TUG07-11 (Perfil Box D3), SMNCG1805 (Perfil Box E3), SMNCG1806 (Perfil Box E4), así como la cepa patrón *B. glumae* B2G. Finalmente la cepa *B. gladioli* TUG05-07 (Perfil Box A), produjo un pigmento que se observó como bordes cremas amarillentos alrededor de la colonia (Tabla 9). Karki et al (2012), reportó que cepas virulentas y avirulentas de *B. glumae* produjeron pigmentos diferentes colores: Marrón (Sustancias desconocidas), Verde amarillo (Difusible al medio) y púrpura (Solo en las colonias). El pigmento azul descrito en este estudio, podrían constituir una nueva molécula con importantes aplicaciones biotecnológicas, así lo demostró Han et al (2014), aislando y purificando un nuevo derivado fencomicina que presentó actividad antimicrobiana contra varios fitopatógenos. Además, Karki et al (2014) demostró que la producción de pigmentos dependiente de la vía Shikimato contribuye a la tolerancia de *B. glumae* a la luz UV, así como para su supervivencia en condiciones oligotróficas.

Al estudiar la correlación entre producción de pigmentos y producción de toxoflavina, encontramos que las cepas no productoras de pigmentos *B. glumae* TUT05-07 (D), presentan la mayor producción de toxoflavina. En este primer grupo Las cepas productoras de pigmento azul, el cual va desde un azul oscuro a más claro, produjeron toxoflavina fue de baja a intermedia. Así mismo, las cepas productoras de pigmento marrón oscuro produjeron bajos niveles de toxoflavina. Se ha demostrado que la producción de estos pigmentos es independiente de la producción de toxoflavina (Karki et al 2014), por lo que es posible que ambos tengan acción sinérgica sobre la virulencia de las cepas en el cultivo de arroz.

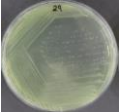
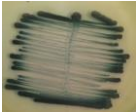

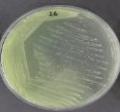
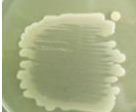
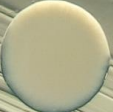

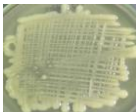
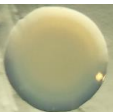
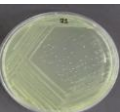
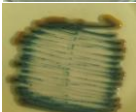

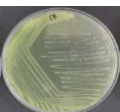
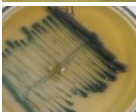

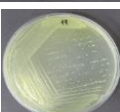


El ensayo de virulencia en catáfila de Cebolla muestra que la cepa *B. glumae* TUG07-09 alcanzó la mayor área de maceración (103,82 mm<sup>2</sup>) y la cepa TUG07-05 presentó la menor área de maceración del tejido de la catáfila de Cebolla (22.99 mm<sup>2</sup>). Existe una correlación directa del ensayo de maceración de catáfila de cebolla, con la prueba de infectividad en panículas de arroz (Karki et al. 2012), por lo que puede observarse que las cepas presentaron una diversa capacidad de virulencia (Tabla 9, Figura 5 y 6). No se observó correlación entre los nivel de maceración de la catáfila de

cebolla y la producción de toxo flavina, debido a que la cepa *B. glumae* TUG07-09, reportada como altamente virulenta presenta una baja producción de toxo flavina en medio King B. Por el contrario, la segunda cepa más virulenta de *B. glumae* TUT05-07, si presentó una elevada producción de toxo flavina. Karki et al (2014), reportó que la producción de toxo flavina no siempre se encuentra asociado a un fenotipo virulento de *B. glumae*.

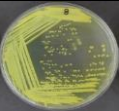


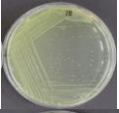
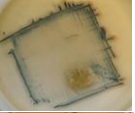


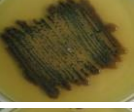
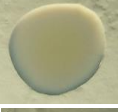
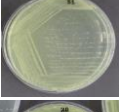

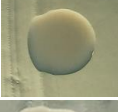
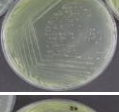


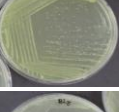

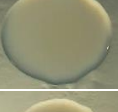
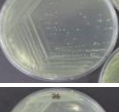
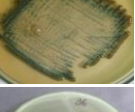
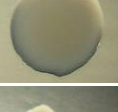



En relación a las enzimas extracelulares que pueden ayudar en el proceso de colonización se encuentran las proteasas, las celulasas y las poligalacturonasas (pectinasas).

**Tabla 9**

Caracterización de cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* aisladas de grado y tallo de diferentes variedades de arroz creciendo en suelos de la zona del norte del Perú.

Código de cepa	Origen geográfico	Variedad	Especie mas relacionado a la cepa tipo*	PER FIL BOX-PCR	Características bioquímicas		Características de virulencia			Detalle de colonia		
					Uso del citrato	Fermentación de la Glucosa	Producción de Toxoflavina	Producción de pigmentos	AMC			
AMG12-06	Huarangopampa, Bagua Capital, Amazonas	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	E2	+	+	+		A		46.10 (± 8.40)	
AMG09-01	Peca Palacios, Bagua Capital, Amazonas	Santa Barbara	<i>Burkholderia glumae</i>	E1	+	+	++		SP		51.65 (± 5.50)	
TUT05-07	Los Cedros, San Juan de la Virgen, Tumbes	La puntilla	<i>Burkholderia glumae</i>	B	+	+	+++		SP		91.18 (± 14.10)	
TUG07-11	Las Brujas, San Juan de la Virgen, Tumbes	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	D3	+	+	+		MA		85.70 (± 18.08)	
TUG07-08	Las Brujas, San Juan de la Virgen, Tumbes	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	D1	+	+	++		A		56.52 (± 11.34)	
TUG07-09	Las Brujas, San Juan de la Virgen, Tumbes	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	D2	+	+	+		A		103.82 (± 7.92)	

**Características microscópicas:** Todas las cepas presentaron reacción Gram negativa, forma cocobacilar y agrupación individual; **Producción de toxoflavina:** Ausente (-), Mínimo (+), Intermedia (++) y Abundante (+++); **Producción de pigmentos:** Azul (A), Marrón en los bordes y azul en el centro (MA), Sin producción de pigmentos (SP), Bordes cremas y amarillos (AC); **AMC:** Área de maceración de catáfila cebolla (mm<sup>2</sup>)

Código de cepa	Origen geográfico	Variedad	Especie mas relacionado a la cepa tipo*	PER FIL BOX-PCR	Características bioquímicas		Características de virulencia			Detalle de colonia		
					Uso del citrato	Fermentación de la Glucosa	Producción de Toxoflavina	Producción de pigmentos	AMC			
TUG05-07	Los Cedros, San Juan de la Virgen, Tumbes	La puntilla	<i>Burkholderia gladioli</i>	A	+	+	+		AC		32.44 (± 2.93)	
TUG07-05	Las Brujas, San Juan de la Virgen, Tumbes	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	C	+	+	++		A		22.99 (± 11.18)	
SMNCG1806	La unión, Nuevo Cajamarca	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	E4	+	+	+		MA		68.52 (± 8.85)	
SMNCG18-05	La unión, Nuevo Cajamarca	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	E3	+	+	+		MA		26.20 (± 7.45)	
A	Cumbazillo, Tarapoto, San Martín	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	ND	+	+	+		SP		68.87 (± 2.92)	
THT	Banda de Shilcayo, San Martín	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	ND	+	+	++		A		80.61 (± 12.67)	
B2G	Biavo, Huallaga, Bellavista, San Martín	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	ND	+	+	+		MA		26.22 (± 4.46)	
B3HT	Biavo, Huallaga, Bellavista, San Martín	La Esperanza	<i>Burkholderia glumae</i>	E5	+	+	+		SP		33.94 (± 0.60)	

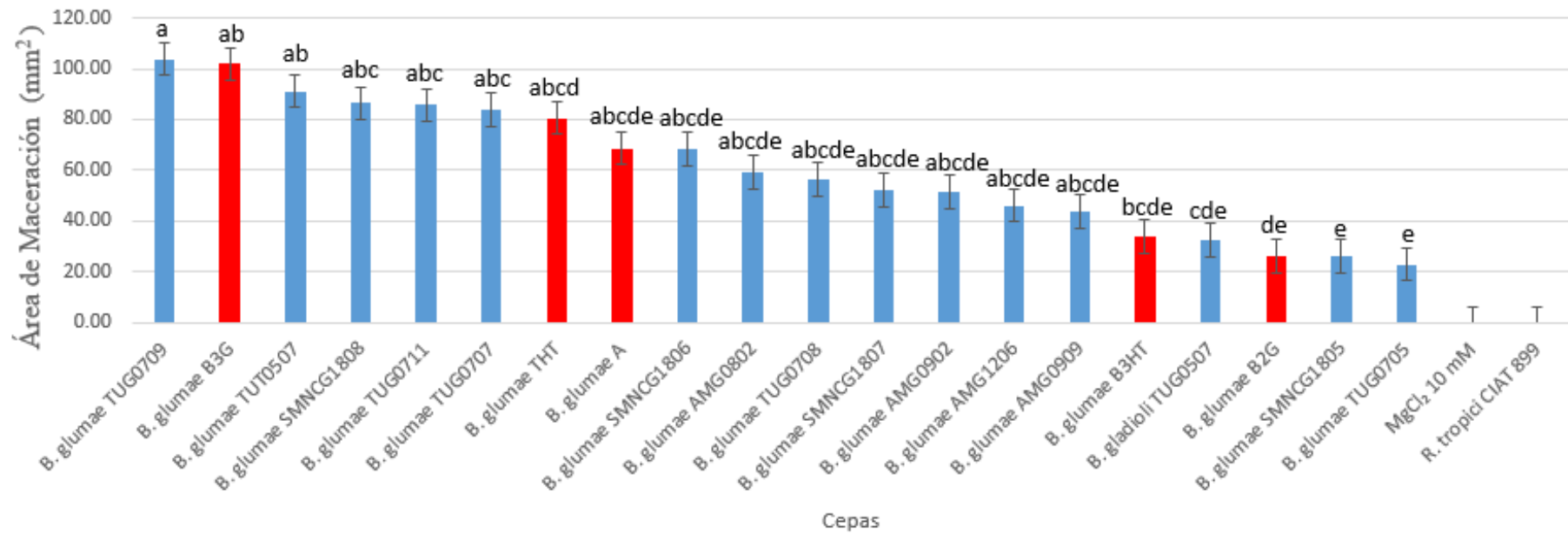
**Características microscópicas:** Todas las cepas presentaron reacción Gram negativa, forma cocobacilar y agrupación individual; **Producción de toxoflavina:** Ausente (-), Mínimo (+), Intermedia (++) y Abundante (+++); **Producción de pigmentos:** Azul (A), Marrón en los bordes y azul en el centro (MA), Sin producción de pigmentos (SP), Bordes cremas y amarillos (AC); **AMC:** Área de maceración de catáfila cebolla (mm<sup>2</sup>)

Con respecto a la actividad proteasa: El 80% de las cepas presentaron actividad 1 día después de la siembra, sin embargo todas las cepas mostraron actividad proteasa en mayor o menor grado después de 3 días de incubación (Tabla 10). La producción de proteasas extracelulares en el género *Burkholderia* es muy común (Vial et al. 2007), y se ha involucrado como factor de virulencia en algunas especies del género (Kooi et al. 2006). No existió diferencia significativa entre cepas con relación a la producción de proteasas.

Con respecto a la actividad celulasa, solo el 53,3% demostró actividad celulolítica, siendo estadísticamente superior la cepa *B. glumae* SMNCG18-05 (Tabla 9). Las celulasas hidrolizan la pared celular de la planta huésped, jugando un rol importante y sinérgico en la patogénesis junto con otras enzimas hidrolíticas (Toth et al. 2003; Gonzalez et al. 2007). Según los antecedentes bibliográficos, hasta el momento no se ha reportado la actividad celulolítica en la especie *B. glumae* y *B. gladioli*, sin embargo se infiere que si las celulasas son producidas ellas jugarían un rol sinérgico potencial en la virulencia (Vial et al. 2007). En el presente estudio se encontró una correlación negativa débil entre la producción de celulasas y la maceración de catáfila de cebolla ( $r = -0,12$ ), esto probablemente porque la maceración de catáfila de cebolla se debe principalmente a la producción de poligalacturonasas (Degrassi et al. 2008; Karki et al. 2012).

Finalmente, la actividad poligalacturonasa solo fue reportada de manera cualitativa en las cepas *B. glumae* TUG07-08, TUG07-11, TUT05-07, AMG12-06 y SMNCG18-05 (Figura 7, Tabla 10). En el presente trabajo se estudió la correlación entre la actividad proteasa y poligalacturonasa con la virulencia en catáfila de cebolla, aunque ambas presentaron una correlación directa mínima bajo condiciones “in vitro” ( $r = 0,13$ ), la expresión de los factores de virulencia “in planta” son diferentes. La expresión de los factores de virulencia en catáfila de cebolla difieren enormemente a los factores de virulencia expresados en arroz (Karki et al. 2012).

Se estudió también el grado de sensibilidad de las cepas a dos agentes bactericidas reconocidos, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el ácido oxolínico (OA) (Tabla 9). La tolerancia al  $H_2O_2$  se asocia a la presencia y efectividad de la enzima catalasa y/o peroxidasa para superar el estrés oxidativo por  $H_2O_2$ . (Smirnoff y Arnaud 2019).



**Figura 5.** Área de maceración (mm<sup>2</sup>) de catáfila de cebolla inoculada con cepas del género Burkholderia aisladas de granos y tallos de diferentes variedades de arroz cultivadas en la zona norte del Perú



**Figura 6.** Catáfilas de cebolla mostrando diferentes niveles de maceración del tejido debido a la inoculación con cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* aisladas de la zona norte del Perú y cepas control de *B. glumae*, después de 48 h de incubación a 30°C



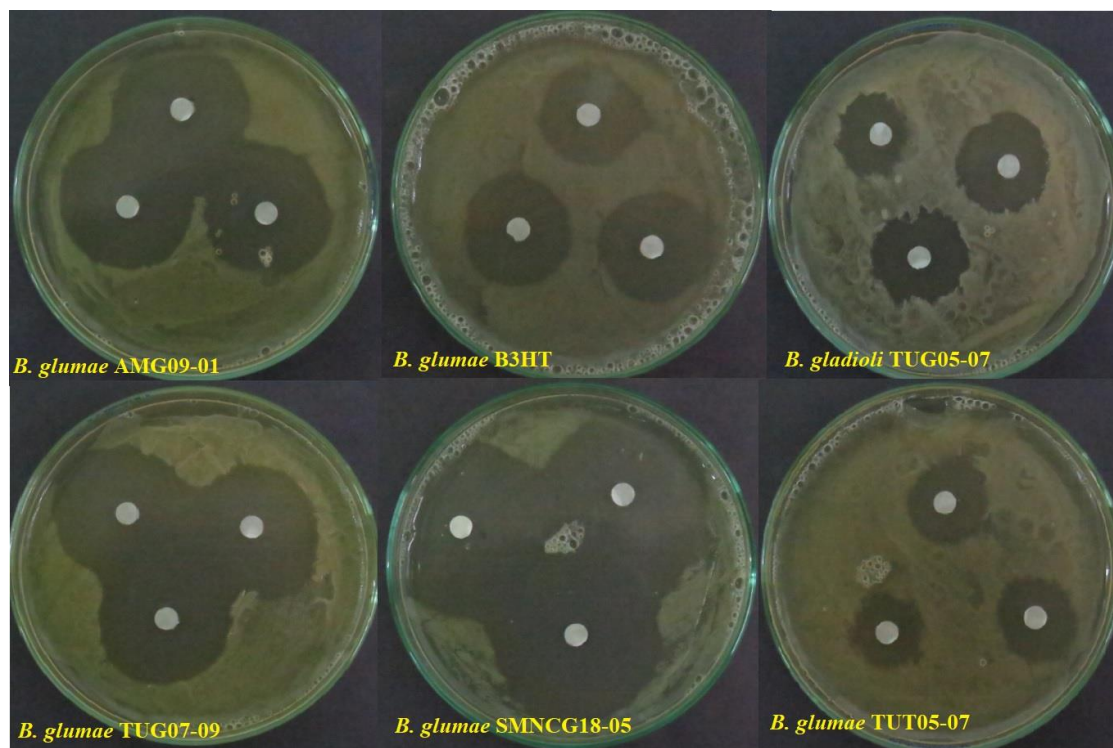


**Figura 7.** Actividades enzimáticas extracelulares como factores de virulencia de *B. glumae* y *B. gladioli*. Actividad proteasa, pilgalacturonasa y celulasa

La catalasa permite la destoxificación del  $H_2O_2$  para evitar el daño oxidativo en la células microbianas, por lo que una mayor tolerancia al  $H_2O_2$  permitiría una mayor capacidad de sobrevivir bajo condiciones aeróbicas oxidantes del medio ambiente y de las defensas de la planta (Tondo et al. 2016). Kim et al (2018) reportó que la sensibilidad al estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  se encuentra regulado por el gen *hfq1*, un regulador transcripcional tipo chaperona de ARN y reporto que la cepa virulenta *B. glumae* BGR1, presenta una menor sensibilidad al  $H_2O_2$ . Con respecto al OA, es un antimicrobiano derivado de las quinolonas, que ha resultado ser uno de los pocos efectivos para el control de *B. glumae*, sin embargo el reporte de la aparición de cepas resistentes, ha ocasionado su retiro y prohibición. En la presente investigación reportamos que de manera significativa, la cepa *B. glumae* SMNCG18-05 fue la más sensible al peróxido de hidrógeno, por el contrario la cepa *B. glumae* TUT05-07 presento elevada tolerancia a este producto (Figura 8) Curiosamente la correlación entre actividad celulolítica y sensibilidad al peróxido de hidrógeno fue elevada ( $r=0.80$ ), se recomienda hacer más estudios para investigar qué factores influyen en esta interacción.

Con respecto a la sensibilidad al OA, al menos 7 cepas (46,7%) presentaron resistencia a  $10 \mu g ml^{-1}$  de OA, y la sensibilidad fue variable siendo mayor en *B. glumae* AMG12-06. Solo *B. gladioli* TUG05-07, fue capaz de resistir elevadas concentraciones de OA, por lo que según la escala de Maeda et al. (2004b), esta cepa deberá ser considerada como altamente resistente. Se recomienda realizar un ensayo de sensibilidad en el rango de 10 a  $50 \mu g ml^{-1}$  de OA, para detectar diferentes niveles de sensibilidad en ese rango. La resistencia intrínseca a los antibióticos, es un indicativo de adaptación ecológica al ambiente (Kaur y Peterson 2018). Se ha demostrado que la aplicación de OA en campos de Japón, incrementó la frecuencia de aislamientos de *B. glumae* en granos de arroz resistentes al mencionado antibiótico (Hikichi et al. 2001).

Por ello en países como Estados Unidos y el continente asiático, ha prohibido su uso como alternativa de control químico (Ham et al. 2011; Zhou-qi et al. 2016), debido a la fácil generación de resistencia el cual se ha asociado a la sustitución del aminoácido Ser83Arg por Ser83Ile en GyrA son asociados a resistencia moderada a alta en aislamientos de *B. glumae* en campo (Maeda et al. 2004a). En nuestro país, han existido reportes de uso de OA mediante aplicaciones clandestinas, los cuales podrían influenciar en la generación de resistencia.

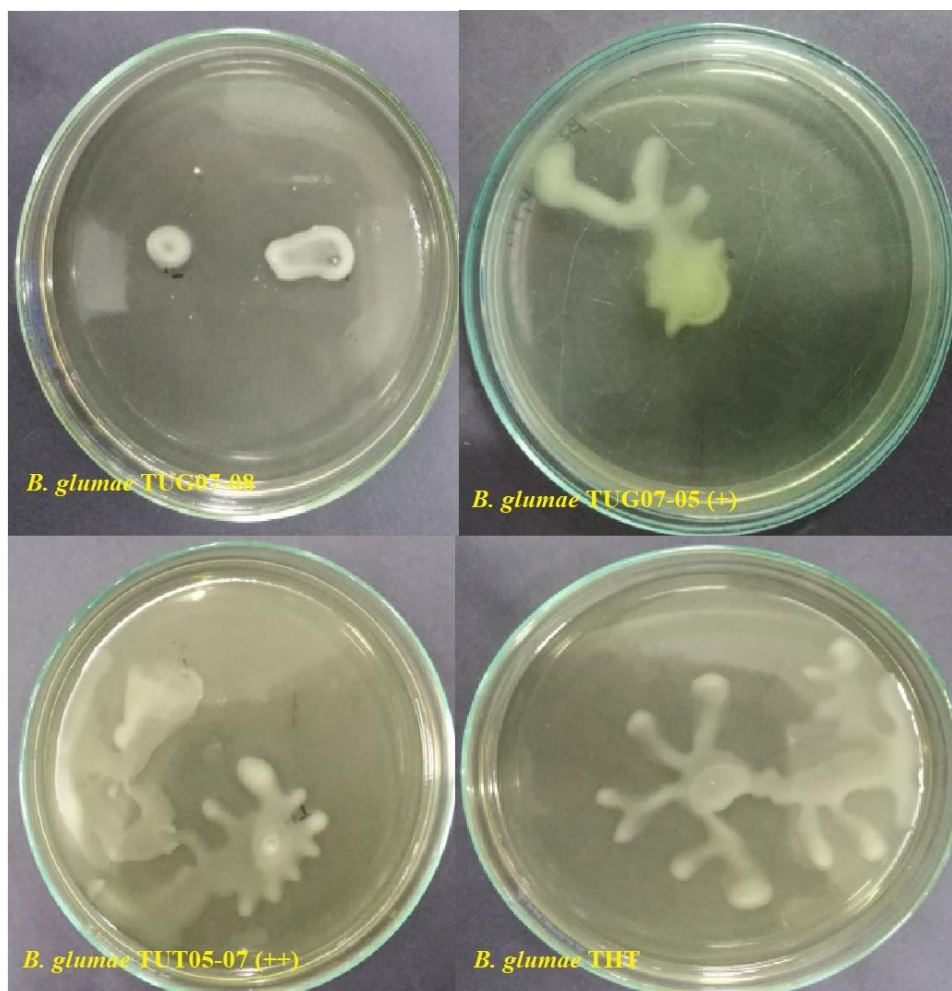


**Figura 8.** Diferentes niveles de sensibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% W/V) en cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*

**Tabla 10**Factores de virulencia en cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* nativas.

Cepa	Proteasas	Celulasas	Poligalac turonasa	Sensibilidad al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sensibilidad al ácido oxolínico (µg ml <sup>-1</sup> )			Ensayos de motilidad	
	Área de proteolisis	Área de		Área de inhibición	10	50	100	Swim	Swar
	(mm <sup>2</sup> )	hidrólisis (mm <sup>2</sup> )		(mm <sup>2</sup> )				ming	ming
<i>B. glumae</i> TUG07-08 (F1)	27,90 (± 0,37) ABC	2,41 (± 0,38) CD	+	12,04 (± 0,90) B	64,45 (± 1,54) BC	210,26 (± 31,27) ABC	248,53 (± 31,27) A	-	++
<i>B. glumae</i> TUG07-09 (F2)	27,88 (± 0,47) ABC	2,35 (± 0,27) CD	-	10,21 (± 0,11) BC	0	154,53 (± 6,77) BC	179,45 (± 8,50) ABCD	-	++
<i>B. glumae</i> TUG07-11 (F3)	24,94 (± 0,88) C	1,57 (± 0,11) D	+	6,89 (± 0,48) CDE	0	172,30 (± 8,80) ABC	185,74 (± 8,80) ABC	+++	+
<i>B. glumae</i> SMNCG18-06 (G4)	19,48 (± 0,97) G	4,35 (± 0,34) B	-	10,85 (± 0,67) B	37,90 (± 1,10) CD	166,54 (± 22,38) BC	202,14 (± 22,38) ABC	+++	++
<i>B. glumae</i> B3HT (G5)	8,18 (± 0,75) F	0	-	6,02 (± 0,29) DEF	0	124,89 (± 5,98) BCD	134,93 (± 5,98) BCD	-	-
<i>B. glumae</i> THT	29,17 (± 1,22) ABC	0	-	3,37 (± 0,22) EF	38,62 (± 4,46) CD	183,49 (± 13,51) ABC	207,96 (± 13,51) ABC	+++	++
<i>B. gladioli</i> TUG05-07 (A2)	31,18 (± 0,74) AB	0	-	4,09 (± 0,56) EF	0	0	0	-	++
<i>B. glumae</i> TUT05-07 (D)	26,10 (± 0,20) BC	0	+	2,92 (± 0,31) F	0	57,56 (± 5,20) DE	113,70 (± 8,18) CDE	++	++
<i>B. glumae</i> TUG07-05 (E)	31,65 (± 0,53) A	3,44 (± 0,43) BC	-	9,56 (± 0,94) BCD	0	1,64 (± 0,52) E	66,89 (± 2,07) DE	+	+
<i>B. glumae</i> AMG09-01 (G1)	32,02 (± 1,67) A	0	-	10,00 (± 0,51) BC	0	179,46 (± 8,13) AB	210,26 (± 31,28) ABCD	-	+
<i>B. glumae</i> AMG12-06 (G2)	13,68 (± 0,92) E	0	+	6,26 (± 1,10) DEF	105,43 (± 22,07) A	238,72 (± 32,39) A	253,30 (± 21,98) AB	+	++
<i>B. glumae</i> SMNCG18-05 (G3)	28,86 (± 1,22) ABC	6,55 (± 0,33) A	+	16,41 (± 0,92) A	93,28 (± 13,98) AB	207,34 (± 9,86) AB	222,79 (± 13,17) AB	+	+
<i>B. glumae</i> A	31,93 (± 1,47) A	0	-	3,75 (± 0,59) EF	70,98 (± 3,86) ABC	173,33 (± 10,32) ABC	232,21 (± 12,08) AB	+	++
<i>B. glumae</i> B2g	26,77 (± 1,17) ABC	4,45 (± 0,11) B	-	5,49 (± 0,66) EF	43,15 (± 9,72) DEF	116,06 (± 29,97) CD	197,70 (± 14,31) ABC	++	+++
<i>B. glumae</i> B3g	31,12 (± 1,02) AB	4,66 (± 0,64) B	-	5,82 (± 0,52) EF	76,13 (± 2,02) ABC	148,63 (± 5,14) BC	205,14 (± 47,03) ABC	+++	+++
CV (%)	6.8	23.52		15.04	36.45	19.77	22.6		

Los ensayos de motilidad, como el Swimming y Swarming, juegan un papel fundamental en el comportamiento social y la virulencia de *B. glumae* (Ham et al. 2011; Nickzad et al. 2015). El movimiento a través de un líquido empleando flagelos se denomina Swimming (Kim et al. 2018) y sobre una superficie como una biopelícula se denomina Swarming (Nickzad et al. 2015) Las cepas con mayor capacidad de Swimming corresponden a *B. glumae* TUG07-11, SMNCG18-06, THT y B3g, por el contrario la actividad estuvo ausente en las cepas *B. glumae* TUG07-08, TUG07-09, AMG09-01 y *B. gladioli* TUG05-07, probablemente porque carecen de flagelos y por ende presentarían menor capacidad invasiva (Figura 10). En el presente estudio se encontró una correlación positiva entre motilidad Swimming y virulencia en catáfila de cebolla ( $r=0,33$ ). La movilidad tipo Swarming, fue superior en la cepa patrón B2g y B3g, siendo variables en el resto de las cepas (Tabla 10), también se encontró una correlación positiva con la virulencia en catáfila de cebolla ( $r=0,21$ ).



**Figura 9.** Diferentes niveles de swimming en cepas nativas de *B. glumae*, creciendo en agar LB suplementado con 0,5% de agar

## CONCLUSIONES

El potencial de la microbiota endofítica en el cultivo de arroz para la búsqueda y selección de microorganismos con actividad inhibitoria de *B. glumae* ha sido comprobada en este estudio. *Bacillus* y *Burkholderia* son los principales géneros con actividad inhibitoria de *B. glumae* THT bajo condiciones “in vitro”, las cuales además muestran características relacionadas al biocontrol como la producción de sideróforos y degradación de toxoflavina. Así mismo, el estudio del fitopatógeno es de suma importancia para comprender la ecología y los mecanismos de virulencia. A la fecha, constituye el primer reporte en el país, sobre la diversidad fenotípica, bioquímica y genética de cepas de *B. glumae* aisladas de diferentes zonas arroceras del Perú, así como del estudio de sus principales factores de virulencia. Se reporta que existe una elevada variabilidad genética entre cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* mostrando similitudes a nivel geográfico, así como en la producción de la fitotoxina toxoflavina, producción de pigmentos que permitirían una mayor adaptación ecológica de las cepas al medio ambiente, así como producción de enzimas extracelulares que permitirían una mejor colonización al cultivo de arroz.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda en los próximos trabajos conocer mejor la interacción bacteria endofítica *Bacillus* y/o *Burkholderia* contra *B. glumae* y *B. gladioli* a nivel de planta, Así también, comprender la naturaleza de los principales metabolitos involucrados en la inhibición del crecimiento de las diferentes cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*. Finalmente conocer más sobre los aspectos de virulencia y genómicos de las cepas peruanas de *B. glumae* y *B. gladioli*, para comprender la adaptabilidad y evolución del fitopatógeno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adachi N, Tsukamoto S, Inoue Y, Azegami K. (2012). Control of bacterial seedling rot and seedling blight of rice by bacteriophage. *Plant disease*, 96: 1033-1036.
- Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*. 221: 221: 36-49.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res*. 163: 173-181.
- Alviz L, Pérez A, Pérez-Cordero A. (2017) Efecto inhibitorio de compuestos tipo metabolitos de bacterias endófitas contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Burkholderia glumae*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 18-25.
- 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: 63.
- Aulakh MS, Wassmann R, Bueno C, Kreuzwieser J, Rennenberg H. (2001). Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Biology*, 3: 139-148.
- Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, del Valle MV, Pérez A, Zepeda A, Zenteno E. (2001). Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 167-172.
- 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: 271-277.
- Baldani JI, Reis VM, Videira SS, Boddey LH, Baldani VLD. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil*, 384: 413-431.
- Barraza Z, Bravo A, Pérez-Cordero A. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* productora de metabolito con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 114-121.
- Berg G, Zachow C, Grosch R, Smalla K. (2013) Endophytes - a source for Biological control agents. In: Schneider C, Leifert C, Feldmann F (Eds), *Endophytes for plant protection: the state of the art*. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, ISBN: 978-3-941261-11-2.
- Berić T, Kojić M, Stanković S, Topisirović L, Degrassi G, Myers M, 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: 25-31.
- Bertani I, Abbruscato P, Piffanelli P, Subramoni S, Venturi V. (2016). Rice bacterial endophytes: isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environmental Microbiology Reports*, 8: 388-398.
- Betancur LG. (2011) Manejo Integrado del añublo bacterial de la panícula del arroz (*Oryza sativa* L.) causado por *Burkholderia glumae* Kurita & Tabei: Una revisión. *Agron* 19: 79-90.
- De Bruijn FJ. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2180-2187.
- Chen R, Barphagha IK, Karki HS, Ham JH. (2012). Dissection of quorum-sensing genes in *Burkholderia glumae* reveals non-canonical regulation and the new regulatory gene *tofM* for toxoflavin production. *PLoS One*, 7: 52150.
- Chen L, Shi H, Heng J, Wang D, Bian K. (2019). Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiological research*, 218: 41-48.
- Cho HS, Park SY, Ryu CM, Kim JF, Kim JG, Park SH. (2007) Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. *FEMS microbiology ecology* 60: 14-23.
- Choi JE, Nguyen CM, Lee B, Park J H, Oh JY, Choi JS, Song JK. (2018). Isolation and characterization of a novel metagenomic enzyme capable of degrading bacterial phytotoxin toxoflavin. *PloS one*, 13: e0183893
- Chung EJ, Hossain MT, Khan A, Kim KH, Jeon CO, Chung YR. (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: 152.
- Cottyn B, Regalado E, Lanoot B, De Cleene M, Mew TW, Swings J. (2001) Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology* 91: 282–292.
- Darling P, Chan M, Cox AD, Sokol PA. (1998). Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. *Infection and immunity*, 66: 874-877.
- Degrassi G, Devescovi G, Kim J, Hwang I, Venturi V. (2008). Identification, characterization and regulation of two secreted polygalacturonases of the emerging rice pathogen *Burkholderia glumae*. *FEMS microbiology ecology*, 65: 251-262.
- Durairaj K, Velmurugan P, Park JH, Chang WS, Park YJ, Senthilkumar P, Oh BT. (2017). Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens



acting through both induced plant resistance and direct antagonism. *FEMS microbiology letters*, 364: fnx225.

- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Sundaresan V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: E911-E920.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Suzuki H, Sato T, Sato YI, Morisaki H, Minamisawa K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil science and plant nutrition*, 46: 617-629.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Minamisawa K. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5285-5293.
- Eljounaidi K, Lee SK, Bae H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control*, 103: 62-68.
- Esmaeel Q, Pupin M, Kieu NP, Chataigné G, Béchet M, Deravel J, Leclère V. (2016). *Burkholderia* genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis. *Microbiology Open*, 5: 512-526.
- Etesami H, Mirsyed Hosseini H, Alikhani HA. (2014). In planta selection of plant growth promoting endophytic bacteria for rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of soil science and plant nutrition*, 14: 491-503.
- Fory PA, Triplett L, Ballen C, Abello JF, Duitama J, Aricapa MG, Tohme J. (2014). Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. *Phytopathology*, 104: 436-444.
- Francis F, Kim J, Ramaraj T, Farmer A, Rush MC, Ham JH. (2013). Comparative genomic analysis of two *Burkholderia glumae* strains from different geographic origins reveals a high degree of plasticity in genome structure associated with genomic islands. *Molecular genetics and genomics*, 288: 195-203.
- Franke J, Ishida K, Hertweck C. (2015). Plasticity of the malleobactin pathway and its impact on siderophore action in human pathogenic bacteria. *Chem. Eur. J.* 21:8010–8014.
- Furuya N, Okamoto T, Kori Y, Matsuyama N, Wakimoto S. (1991). Control of bacterial seedling rot of rice by avirulent strains of *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 57: 371-376
- Galvis F, Carrillo M. (2015). Identificación y Caracterización Molecular de Aislados de *Burkholderia glumae*: Agente Causante del Añublo Bacterial en el Cultivo de Arroz. *Información tecnológica*, 26: 33-40.
- Garrido M. (2013) Morfología del agente causal “Añublo bacterial de la panícula del arroz” *Burkholderia glumae*. Bloc informativo. Tumbes. 5 p

- Gholamalizadeh R, Khodakaramian G, Ebadi AA, Khoshkdaman M. (2019). Identification of predominant epiphytic and endophytic bacterial isolates in rice seeds effective for enhancement of seed germination and plant growth. *Iran Agricultural Research* 37(2).
- Gonzalez CF, Venturi V, Engledow AS. (2007). The phytopathogenic *Burkholderia*. *Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics*, 1: 153-176.
- González AQ, Santamaría FG. (2014). *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25: 371-381.
- Ham JH, Melanson RA, Rush MC. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?. *Molecular plant pathology*, 12: 329-339.
- Han JW, Kim JD, Lee JM, Ham JH, Lee D, Kim BS. (2014). Structural elucidation and antimicrobial activity of new phencomycin derivatives isolated from *Burkholderia glumae* strain 411gr-6. *The Journal of antibiotics*, 67: 721.
- Hikichi Y, Okuno K, Furusawa I. (1993a) Immunofluorescent antibody technique for detecting *Pseudomonas glumae* on rice plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59: 477-480.
- Hikichi Y. (1993b). Mode of Action of Oxolinic Acid against Bacterial Seedling Rot of Rice Caused by *Pseudomonas glumae*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 59(4), 441-446.
- Hikichi Y, Okuno T, Furusawa I. (1995). Mode of Action of Oxolinic Acid against Bacterial Seedling Rot of Rice Caused by *Pseudomonas glumae*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 61: 134-136.
- Hikichi Y, Tsujiguchi K, Maeda Y, Okuno T. (2001). Development of increased oxolinic acid-resistance in *Burkholderia glumae*. *Journal of General Plant Pathology*, 67: 58-62.
- Hong CE, Park JM. (2016). Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art. *Plant Biotechnology Reports*, 10: 353-357.
- Ji SH, Gururani MA, Chun SC (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological research*, 169: 83-98.
- Jung WS, Lee J, Kim MI, Ma J, Nagamatsu T, Goo E, Rhee S. (2011). Structural and functional analysis of phytotoxin toxoflavin-degrading enzyme. *PLoS One*, 6(7).
- Karki HS, Shrestha BK, Han JW, Groth DE, Barphagha IK, Rush MC, Ham JH. (2012). Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. *PLoS One*, 7(9): e45376.
- Karki HS, Ham JH. (2014). The roles of the shikimate pathway genes, *aroA* and *aroB*, in virulence, growth and UV tolerance of *Burkholderia glumae* strain 411gr- 6. *Molecular plant pathology*, 15: 940-947.

- Kaur P, Peterson E. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2928.
- Kawaradani M, Okada K, Kusakari SI. (2000). New selective medium for isolation of *Burkholderia glumae* from rice seeds. *Journal of General Plant Pathology*, 66: 234-237.
- Kim J, Mannaa M, Kim N, Lee C, Kim J, Park J, Seo YS. (2018). The Roles of Two hfq Genes in the Virulence and Stress Resistance of *Burkholderia glumae*. *The plant pathology journal*, 34: 412.
- Koh S, Kim H, Kim J, Goo E, Kim Y J, Choi O, Hwang I. (2011). A novel light-dependent selection marker system in plants. *Plant biotechnology journal*, 9: 348-358.
- Kooi C, Subsin B, Chen R, Pohorelic B, Sokol PA. (2006). *Burkholderia cenocepacia* ZmpB is a broad specificity zinc metalloprotease involved in virulence. *Infect. Immun.* 74: 4083-4093.
- Latuasan HE, Berends W. (1961) On the origin of the toxicity of toxoflavin. *Biochim Biophys Acta.* 30: 502-508.
- Lee HH, Park J, Kim J, Park I, Seo YS. (2016). Understanding the direction of evolution in *Burkholderia glumae* through comparative genomics. *Current genetics*, 62: 115-123.
- Li L, Wang L, Liu LM, Hou YX, Li QQ, Huang SW. (2016). Infection process of *Burkholderia glumae* before booting stage of rice. *Journal of Phytopathology*, 164: 825-832.
- Lima JVL, Martins SCS, de Siqueira KA, Soares MA, Martins CM. (2017). Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. *African Journal of Biotechnology*, 16: 499-507.
- Lynch JM, Whipps JM. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and soil*, 129: 1-10.
- Maeda Y, Kiba A, Ohnishi K, Hikichi Y. (2004a). Implications of amino acid substitutions in GyrA at position 83 in terms of oxolinic acid resistance in field isolates of *Burkholderia glumae*, a causal agent of bacterial seedling rot and grain rot of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5613-5620.
- Maeda Y, Kiba A, Ohnishi K, Hikichi Y. (2004b). New method to detect oxolinic acid-resistant *Burkholderia glumae* infesting rice seeds using a mismatch amplification mutation assay polymerase chain reaction. *Journal of General Plant Pathology*, 70: 215-217.
- Maeda Y, Horita M, Shinohara H, Kiba A, Ohnishi K, Tsushima S, Hikichi Y. (2007a). Analysis of sources of oxolinic acid-resistant field strains of *Burkholderia glumae* based on rep-PCR analysis and nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD*. *Journal of General Plant Pathology*, 73: 46-52.

- Maeda Y, Kiba A, Ohnishi K, Hikichi Y. (2007b). Amino acid substitutions in *GyrA* of *Burkholderia glumae* are implicated in not only oxolinic acid resistance but also fitness on rice plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1114-1119.
- Mano H, Tanaka F, Nakamura C, Kaga H, Morisaki H. (2007). Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*, 22: 175-185.
- Mano H, Morisaki H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes and environments*, 23: 109-117.
- Martínez Guevara N. (2016). Control de *Burkholderia glumae* en el cultivo de Arroz (*Oryza sativa* L.) utilizando 02 productos de acción Bactericida, en la EEA El Porvenir–San Martín. Tesis para obtener el grado académico profesional de Ingeniero agrónomo, UNSM-Tarapoto.
- Mateos PF, Jimenez-Zurdo JI, Chen J, Squartini AS, Haack SK, Martinez-Molina E, Dazzo FB. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1816-1822.
- Mbai FN, Magiri EN, Matiru VN, Nganga J, Nyambati VCS. (2013). Isolation and characterization of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan Basmati rice. *Am Int J Contemp Res*, 3: 25-40.
- Miyagawa H, Takaya S. (2000). Biological control of bacterial grain rot of rice by avirulent strain of *Burkholderia gladioli*. *Bull. Chugoku Nat. Agr. Expt. Sta.* 21:1–21.
- Mizobuchi R, Fukuoka S, Tsushima S, Yano M, Sato H. (2016) QTLs for resistance to major rice diseases exacerbated by global warming: brown spot, bacterial seedling rot, and bacterial grain rot. *Rice*, 9: 23.
- Mizobuchi R, Fukuoka S, Tsuiki C, Tsushima S, Sato H. (2018). Evaluation of major Japanese rice cultivars for resistance to bacterial grain rot caused by *Burkholderia glumae* and identification of standard cultivars for resistance. *Breeding science*, 18018.
- Nandakumar R, Shahjahan AKM, Yuan XL, Dickstein ER, Groth DE, Clark CA, Rush MC. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Disease*, 93: 896-905.
- Naughton LM, An SQ, Hwang I, Chou SH, He YQ, Tang JL. (2016) Functional and genomic insights into the pathogenesis of *Burkholderia* species to rice. *Environ Microbiol.* 18: 780-790.
- Nickzad A, Lépine F, Déziel E. (2015). Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids. *PLoS One*, 10: e0128509.
- Okunishi S, Sako K, Mano, H, Imamura A, Morisaki H. (2005). Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). *Microbes and Environments*, 20: 168-177.

- Parke JL, Gurian-Sherman D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annual review of phytopathology, 39: 225-258.
- Peng D, Li S, Wang J, Chen C, Zhou M. (2014). Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ- 18 and jinggangmycin. Pest management science, 70: 258-263.
- Pineda-Mendoza DY, González-Mancilla A, Almaraz JJ, Rodríguez-Guzmán MP, García-Barradas O, Argumedo-Delira R. (2019). Characterization of the antifungal activity of three rhizobacterial strains against *Rhizoctonia solani*. Spanish Journal of Agricultural Research, 16: 1011.
- Piromyong P, Greetatorn T, Teamtisong K, Okubo T, Shinoda R, Nuntakij A, Teamroong N. (2015). Preferential association of endophytic bradyrhizobia with different rice cultivars and its implications for rice endophyte evolution. Appl. Environ. Microbiol., 81: 3049-3061.
- Prasertsincharoen N, Constantinoiu C, Gardiner C, Warner J, Elliman J. (2015). Effects of colonization of the roots of domestic rice (*Oryza sativa* L. cv. Amaroo) by *Burkholderia pseudomallei*. Appl. Environ. Microbiol., 81: 4368-4375.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T. (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends in microbiology, 6(4): 139-144.
- Reinhold-Hurek B, Krause A, Leyser B, Miché L, Hurek T. (2007) The Rice Apoplast as a Habitat for Endophytic N<sub>2</sub>-Fixing Bacteria. In: Sattelmacher B., Horst W.J. (eds) The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions. Springer, Dordrecht.
- Riera-Ruiz C, Castro-Lara J, Jimenez-Feijoó MI, Cevallos-Cevallos JM. (2018). Interactions of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* in symptom development in rice seeds and seedlings. Canadian Journal of Plant Pathology, 40: 347-357.
- Ríos-Ruiz WF. (2016). Aislamiento de bacterias rizosféricas diazotróficas de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) con potencial biotecnológico en la región de San Martín. Disponible en: <http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/UNSM/285>
- Rizzi A, Roy S, Bellenger JP, Beauregard PB. (2019). Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol., 85: e02439-18.
- Romero FM, Rossi FR, Gárriz A, Carrasco P, Ruíz OA. (2019). A Bacterial Endophyte from Apoplast Fluids Protects Canola Plants from Different Phytopathogens via Antibiosis and Induction of Host Resistance. Phytopathology, PHYTO-07.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular plant-microbe interactions, 19: 827-837.
- Sánchez-López A, Pintelon I, Stevens V, Imperato V, Timmermans JP, González-Chávez C, Thijs S. (2018). Seed endophyte microbiome of *Crotalaria pumila* unpeeled: Identification of plant-beneficial methylobacteria. International journal of molecular sciences, 19: 291.

- Sayed RZ, Badgujar MD, Sonawane HM, Mhaske MM, Chincholkar SB. (2005). Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. *Indian Journal of Biotechnology* 4: 484-490.
- Schulz B, Boyle C. (2006). What are endophytes? In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (eds) *Microbial Root Endophytes*. Soil Biology, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg
- Schwyn B, Neilands JB. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* 160: 47-56.
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad Agraria (2015). Comunicándonos: Boletín informativo SENASA. Edición N° 02. Disponible en: [https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2015/02/Bolet%C3%ADn\\_SENASA\\_02-2015.pdf](https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2015/02/Bolet%C3%ADn_SENASA_02-2015.pdf).
- Shrestha BK, Karki HS, Groth DE, Jungkhun N, Ham JH. (2016) Biological control activities of rice-associated *Bacillus* sp. strains against sheath blight and bacterial panicle blight of rice. *PLoS one*, 11: e0146764.
- Shrestha B, Oh DH, Dassanayake M, Ham JH. (2018). Analysis of Genome Sequence Variations Among Three US Rice Varieties Showing Differential Quantitative Disease Resistance to Bacterial Panicle Blight and Sheath Blight. *Int J Genom Data Min.* 2018: 1-11.
- Singh RK, Malik N, Singh S. (2013). Improved nutrient use efficiency increases plant growth of rice with the use of IAA-overproducing strains of endophytic *Burkholderia cepacia* strain RRE25. *Microbial ecology*, 66: 375-384.
- Smirnoff N, Arnaud D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist* 221: 1197-1214.
- Song WY. (2004). Identification and characterization of *Bdellovibrio bacteriovorus*, a predator of *Burkholderia glumae*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 14: 48-55.
- Suarez Moreno ZR, Vinchira-Villarraga DM, Vergara-Morales DI, Castellanos L, Ramos FA, Guarnaccia C, Moreno-Sarmiento N. (2019). Plant-growth promotion and biocontrol properties of three *Streptomyces* spp. isolates to control bacterial rice pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 10: 290.
- Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W. (2008). Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial ecology*, 55: 415-424.
- Suzuki F, Sawada H, Azegami K, Tsuchiya K. (2004). Molecular characterization of the tox operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 97-107.
- Teixeira MA, de Melo IS, Vieira RF, Costa FEC, Harakava R. (2007). Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 43-49.

- Tondo ML, Delprato ML, Kraiselburd I, Zenoff MVF, Farías ME, Orellano EG. (2016). *KatG*, the bifunctional catalase of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, responds to hydrogen peroxide and contributes to epiphytic survival on citrus leaves. *PLoS one*, 11(3), e0151657.
- Toth IK, Bell KS, Holeva MC, Birch PR. (2003). Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular plant pathology*, 4: 17-30.
- Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91: 127-141.
- Verma SC, Singh A, Chowdhury SP, Tripathi AK. (2004). Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology letters*, 26: 425-429.
- Vial L, Groleau MC, Dekimpe V, Deziel E. (2007). *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17: 1407-1429.
- Walitang DI, Kim K, Madhaiyan M, Kim YK, Kang Y, Sa T. (2017). Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC microbiology*, 17: 209.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703.
- Xie S, Zang H, Wu H, Uddin Rajer F, Gao X. (2018). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular plant pathology*, 19: 49-58.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H Chun J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 67: 1613-1617.
- Yuan H, Zhu Z, Liu S, Ge T, Jing H, Li B, Kuzyakov Y. (2016). Microbial utilization of rice root exudates: <sup>13</sup>C labeling and PLFA composition. *Biology and Fertility of Soils*, 52: 615-627.
- Zhang X, Huang Y, Harvey PR, Ren Y, Zhang G, Zhou H, Yang H. (2012). Enhancing plant disease suppression by *Burkholderia vietnamiensis* through chromosomal integration of *Bacillus subtilis* chitinase gene *chi113*. *Biotechnology letters*, 34: 287-293.
- Zhou-qi C, Bo ZHU, Guan-lin X, Bin L, Shi-wen H. (2016). Research status and prospect of *Burkholderia glumae*, the pathogen causing bacterial panicle blight. *Rice Science*, 23: 111-118.
- Zhu B, Lou MM, Huai Y, Xie GL, Luo JY, Xu LH. (2008). Isolation and identification of *Burkholderia glumae* from symptomless rice seeds. *Rice Science*, 15: 145-149.

Zhu J, Mo J, Zhu S, Zhao W, Peng Z, Liu H, Zhong W. (2010). Duplex PCR-DHPLC for detection of *Burkholderia glumae*. Acta Phytopathologica Sinica 40: 449-455.