



# REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

[www.elsevier.es/ram](http://www.elsevier.es/ram)



ORIGINAL

## Caracterización genética de bacterias endofíticas de arroz (*Oryza sativa* L.) con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae*

Renzo A. Valdez-Nuñez<sup>a</sup>, Winston F. Ríos-Ruiz<sup>a,\*</sup>, Ernesto Ormeño-Orrillo<sup>b</sup>,  
Edson E. Torres-Chávez<sup>c</sup> y Jorge Torres-Delgado<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, San Martín, Perú

<sup>b</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

<sup>c</sup> Programa Nacional de Arroz-Instituto Nacional de Innovación Agraria, Tarapoto, Perú

Recibido el 4 de junio de 2019; aceptado el 20 de diciembre de 2019

### PALABRAS CLAVE

Control biológico;  
Factores de virulencia;  
Añublo bacterial de la panícula de arroz

**Resumen** El objetivo del presente estudio fue aislar y seleccionar bacterias endofíticas de arroz capaces de inhibir al fitopatógeno *Burkholderia glumae* THT, así como caracterizarlas por su genética y bioquímica. También se buscó caracterizar la diversidad genética y los factores de virulencia presentes en cepas de *B. glumae* y de *Burkholderia gladioli*, otro patógeno de arroz, aisladas de campo. Se colectaron plantas de arroz en 4 departamentos del norte de Perú, y tras la desinfección de tejidos se aislaron bacterias endofíticas por cultivo en agar soya tripticasa (30 °C; 48 h) y en medio selectivo (pH 4,5; 41 °C; 72 h). Se evaluó la actividad antimicrobiana frente a *B. glumae* THT, la producción de sideróforos y la resistencia a la toxo flavina, toxina producida por este agente. La identificación molecular se realizó mediante BOX-PCR y secuenciación del gen 16S ARNr. Además, se determinó la producción de enzimas extracelulares y se efectuaron ensayos de motilidad y sensibilidad/resistencia a bactericidas. Se aislaron 189 bacterias endofíticas, de las cuales solo 9 presentaron actividad antimicrobiana contra *B. glumae* THT, sobresaliendo *Burkholderia vietnamiensis* TUR04-01, *B. vietnamiensis* TUR04-03 y *Bacillus aryabhattai* AMH12-02. Estas cepas produjeron sideróforos y al menos el 55,5% fueron resistentes a la toxo flavina. Por otro lado, 17 de las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* aisladas se agruparon en 9 perfiles BOX-PCR, 16 de ellas presentaron similitud con *B. glumae* LMG2196<sup>T</sup> (100%) y una con *B. gladioli* NBRC13700<sup>T</sup> (99,86%). Hubo elevada diversidad de acuerdo al origen geográfico y se encontraron factores de virulencia. En conclusión, se hallaron cepas del género *Bacillus* y *Burkholderia* que podrían ser agentes de biocontrol contra *B. glumae*.

© 2020 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [wrios@unsm.edu.pe](mailto:wrios@unsm.edu.pe) (W.F. Ríos-Ruiz).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.002>

0325-7541/© 2020 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: Valdez-Nuñez RA, et al. Caracterización genética de bacterias endofíticas de arroz (*Oryza sativa* L.) con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae*. Rev Argent Microbiol. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.002>

## KEYWORDS

Biological control;  
Virulence factors;  
Bacterial panicle  
blight of rice

## Genetic characterization of rice endophytic bacteria (*Oryza sativa* L.) with antimicrobial activity against *Burkholderia glumae*

**Abstract** The aim of the present study was to isolate, select and characterize endophytic bacteria in rice inhibiting *Burkholderia glumae* THT as well as to characterize the genetic diversity and virulence factors in strains of *B. glumae* and *Burkholderia gladioli* of rice. Rice plants were collected in 4 departments from the northern region of Peru, isolating endophytic bacteria, after tissue sterilization, at 30 °C (48 h) in Trypticase Soy Agar (TSA), evaluating the antimicrobial activity against *B. glumae* THT, production of siderophores, resistance of toxoflavine and partial sequencing of the 16S rRNA gene. Furthermore, *B. glumae* and *B. gladioli* were isolated in selective medium (pH 4.5) at 41 °C/72 h. Molecular identification was performed using BOX-PCR and sequencing of the 16S rRNA gene, in addition to the production of extracellular enzymes, motility tests and sensitivity/resistance to bactericides. One hundred and eighty nine (189) endophytic bacteria were isolated, and only 9 strains showed antimicrobial activity against *B. glumae* THT, highlighting *Burkholderia vietnamiensis* TUR04-01, *B. vietnamiensis* TUR04-03 and *Bacillus aryabhatai* AMH12-02. The strains produced siderophores and at least 55.5% were resistant to toxoflavin. Additionally, 17 strains were grouped into 9 BOX-PCR profiles, where 16 had similarity with *B. glumae* LMG2196<sup>T</sup> (100%) and 1 with *B. gladioli* NBRC 13700<sup>T</sup> (99.86%). High diversity was found according to geographical origin and virulence factors. In conclusion, strains of the genus *Bacillus* and *Burkholderia* are potential biocontrol agents against *B. glumae*. © 2020 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

El arroz constituye la fuente de hidratos de carbono más importante para la tercera parte de la población mundial; sin embargo, obtener una óptima producción implica la aplicación de fertilizantes, así como el control de plagas y enfermedades<sup>1</sup>. *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli* son considerados los agentes etiológicos del añublo bacterial de la panícula de arroz (ABPA)<sup>26,34</sup>. Esta enfermedad se manifiesta en la etapa de floración y provoca infertilidad, con decoloración y manchado de la gluma en desarrollo debido a la producción de toxoflavina<sup>36</sup>. La enfermedad ha sido reportada por primera vez en Perú en 2013<sup>24</sup>.

El agricultor arrocero no posee un método de control efectivo para el tratamiento del ABPA<sup>26</sup>: a pesar del empleo intensivo de pesticidas, el 50% de la producción puede perderse debido a esta enfermedad<sup>42</sup>. Hasta el momento el único agente químico capaz de controlar la enfermedad es el ácido oxolinico<sup>26</sup>; sin embargo, dicho compuesto está prohibido por las autoridades sanitarias porque constituye un riesgo debido a la generación de resistencia y a la presencia de cepas naturalmente resistentes a este agente químico<sup>28</sup>. A la fecha las estrategias de prevención son las más empleadas.

Los microorganismos asociados al arroz han coevolucionado con su hospedero en virtud de su capacidad para reducir enfermedades en el nicho ecológico compartido empleando diferentes estrategias<sup>26</sup>. Bajo esa perspectiva, el control biológico se ha mostrado prometedor<sup>6,11</sup>. Estrategias basadas en mecanismos biológicos como el *quorum quenching*<sup>20</sup>, la resistencia sistémica inducida<sup>12</sup> y la producción de metabolitos antimicrobianos<sup>50</sup> constituyen las más prometedoras. Shrestha et al.<sup>49</sup> reportaron que cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* fueron capaces de inhibir el

crecimiento de *B. glumae* 336 g-1. La búsqueda de microorganismos que comparten el hábitat con *B. glumae* durante el proceso de desarrollo de la enfermedad se considera de interés, ya que estos podrían servir para controlar el patógeno.

Contar con un cepario de microorganismos con potencial como antagonistas del citado patógeno permitirá disponer de opciones para desarrollar productos biopesticidas, capaces de reducir el uso de agroquímicos perjudiciales para el medioambiente, sobre todo, de antibióticos. Cuando se emplean de manera indiscriminada estos últimos generan resistencia y se transforman en un problema de salud pública. Por otro lado, el uso de biopesticidas contribuiría a reducir los costos de producción, con lo que se elevaría el nivel de competitividad del agricultor.

El objetivo del presente trabajo fue aislar, caracterizar, seleccionar e identificar bacterias endofíticas (BE) de cultivos locales de arroz con actividad antimicrobiana frente a *B. glumae*. Asimismo, se quiso aislar cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* en áreas de cultivo de arroz de la zona norte del Perú y estudiar su diversidad genética y los factores de virulencia presentes. La hipótesis planteada es que los microorganismos endofíticos aislados de cultivos locales de arroz han coevolucionado con las cepas fitopatógenas de *B. glumae* que predominan en dicha región y, por ende, podrían presentar actividad antimicrobiana frente a estas.

## Material y métodos

### Colecta del material vegetal

La colecta de las plantas de arroz sin síntomas de enfermedad se realizó siguiendo la metodología descrita por Baldani et al.<sup>5</sup> y las de plantas con sintomatología de

ABPA de acuerdo con Nandakumar et al.<sup>43</sup>. Se realizaron muestreos en campos de los departamentos de Tumbes, Piura, Amazonas y San Martín entre junio y agosto de 2018 (tabla 1 del material suplementario). Los campos fueron georreferenciados y se colectaron 3 plantas sanas por parcela. Cada planta fue seccionada en raíz, tallo, hojas, espigas y grano; este material fue transportado a 4 °C hasta el laboratorio. Para obtener aislamientos de agentes causales de ABPA los granos con signos de dicha enfermedad fueron colocados en sobres de papel y transportados al laboratorio a temperatura ambiente.

### Aislamiento y conservación de bacterias

Se empleó la metodología descrita por Sun et al.<sup>51</sup> para obtener BE de raíz, hojas y tallos. La confirmación del proceso de desinfección superficial se realizó sembrando una alícuota del último enjuague en TSA (Himedia, India), con incubación a 30 °C por 3 días. Solo las muestras que evidenciaron ausencia de crecimiento bacteriano en dicho medio fueron seleccionadas para el proceso de aislamiento a partir de tejido macerado empleando mortero y pilón estériles. Para aislar bacterias esporuladas y *Burkholderia* se siguió la metodología sugerida por Cottyn et al.<sup>13</sup>. Para el aislamiento de *B. glumae* y *B. gladioli* una alícuota de tejido macerado fue sembrada en el medio selectivo CCNT modificado<sup>33</sup>. La composición de dicho medio fue la siguiente: extracto de levadura 2 g/l, peptona 1 g/l, meso-inositol 4 g/l, cetrímide 10 mg/l, cloranfenicol 10 mg/l, novobiocina 10 mg/l, agar-agar 18 g/l en agua destilada. El pH del medio se ajustó a 4,8 y las placas fueron incubadas a 41 °C durante 4 días. La presencia de un pigmento amarillo fluorescente indicaba la producción de toxoflavina por *B. glumae* y/o *B. gladioli*. Todos los aislamientos fueron conservados a corto y mediano plazo en cuña de agar y en crioviales con glicerol al 30%, respectivamente, con almacenamiento a -30 °C en el último caso.

### Actividad inhibitoria frente a *B. glumae*

La metodología de selección se realizó de acuerdo a lo descrito por Lima et al.<sup>39</sup>, empleando discos de papel de filtro estériles (6 mm), y se llevó a cabo en 2 etapas: 1) selección primaria; y 2) selección secundaria. La primera consistió en la evaluación cualitativa (resultado positivo o negativo) de la actividad inhibitoria del conjunto de BE obtenidas frente a *B. glumae* THT (10 aislamientos BE/placa). *B. glumae* THT fue sembrada en 2 ml de medio Luria Bertani (LB) e incubada a 180 rpm a 30 °C (24 h), para ser luego sembrada (100 µl) en superficie en placas de Petri con medio King B. Las BE fueron sembradas en 2 ml de TSB e incubadas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Con alícuotas de 20 µl de cada BE se impregnaron los discos de papel y estos se distribuyeron sobre una placa de Petri previamente sembrada con *B. glumae* THT. Este material se incubó a 30 °C (72 h). Los aislamientos que generaron un halo de inhibición de al menos 2 mm<sup>2</sup> pasaron a la etapa de selección secundaria, en la que se midió el área de inhibición de *B. glumae* THT (en mm<sup>2</sup>), sembrando una sola cepa de BE/placa. Para la selección secundaria, se empleó la misma metodología de siembra e incubación, tanto para las BE seleccionadas

como para *B. glumae* THT. *B. glumae* THT fue usada como cepa patrón; esta cepa virulenta fue aislada de granos de arroz de la variedad «La Esperanza», con síntomas del ABPA, obtenidos en la región San Martín.

### Amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr en BE con capacidad inhibitoria frente a *B. glumae* THT

Se obtuvieron cultivos líquidos en TSB (24 h, 30 °C, 120 rpm) hasta alcanzar la fase final de crecimiento logarítmico ( $DO_{600} \approx 0,6$ ). Posteriormente, las células fueron recogidas mediante centrifugación ( $13.680 \times g$ , 3 min), a temperatura ambiente. Para la obtención de ADN genómico se utilizó el kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). La integridad del ADN extraído fue evaluada luego de ser sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón Tris borato y tinción con GelRed (Biotium Inc.); la visualización se hizo en un transiluminador UV. Se utilizó como marcador de peso molecular ADN del fago Lambda digerido con la enzima *Hind*III. La cuantificación del ADN se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop, modelo ND1000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El ADN extraído fue almacenado a -20 °C. La identificación de las bacterias aisladas se realizó mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S. El gen fue amplificado mediante PCR usando los cebadores fD1 y rD1<sup>54</sup>. 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 del Sur). Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el servidor EzBioCloud para determinar su afiliación taxonómica.

### Producción de sideróforos

Las cepas de BE seleccionadas fueron sembradas en caldo LB e incubadas a 37 °C, 200 rpm, durante 24 h. Las células fueron cosechadas en fase estacionaria y, empleando medio succinato normal (SM) y medio succinato desferrado (SM-Fe), fueron lavadas y resuspendidas. La concentración de células fue estandarizada ( $DO_{600} = 1,0$ ) y con alícuotas de 100 µl de estas suspensiones se inocularon Erlenmeyers (125 ml) que contenían 9 ml de medio SM o medio SM-Fe (0,1% v/v). Tras 30 horas de incubación a 30 °C y 170 rpm se obtuvo el sobrenadante por centrifugación ( $9.500 \times g$ , 15 min), que se empleó para la cuantificación de sideróforos. La estimación cuantitativa de la producción de sideróforos se realizó a través de la metodología CAS-Shuttle Assay<sup>48</sup>. Se midió a 630 nm la absorbancia de una mezcla de 0,5 ml de sobrenadante y 0,5 ml de reactivo CAS, tomando como absorbancia de referencia aquella correspondiente a 0,5 ml de caldo (SM o SM-Fe) no inoculado + 0,5 ml de reactivo CAS. El porcentaje de unidades de sideróforos fue calculado como  $([Ar-As]/Ar) \times 100$ , donde Ar fue la absorbancia de la referencia y As la de la muestra<sup>48</sup>.

## Resistencia a la toxoflavina

La resistencia a la toxoflavina se evaluó de acuerdo con lo descrito por Choi et al.<sup>11</sup>. Las BE fueron sembradas en 2 ml de caldo LB e incubadas en agitación a 200 rpm y 37 °C (24 h). Se preparó una solución de toxoflavina (SIGMA-Aldrich) en metanol (25 mg/ml), la cual se almacenó en oscuridad a 4 °C. Se prepararon tubos con 2 ml de caldo LB suplementados con 20 µg de toxoflavina/ml, que fueron inoculados a razón de 1% (v/v), además de un tubo control. Todos ellos se incubaron a 37 °C y 180 rpm durante 24 horas. Un incremento en la  $DO_{600\text{ nm}} = 0,2$  en presencia de toxoflavina fue considerado resultado positivo. De la misma manera, se evaluaron 2 concentraciones de toxoflavina mayores: 30 y 40 µg/ml.

## Estimación de la diversidad genética de cepas de *B. glumae*

Las condiciones de crecimiento y extracción de ADN genómico fueron similares a las empleadas con las BE. Para estimar la biodiversidad se generaron perfiles genómicos empleando el cebador BOXA1R, según describen Versalovic et al.<sup>52</sup>. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1,2% preparados en tampón Tris borato. 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 BOX-PCR fue realizado empleando el paquete informático InfoQuest FP (versión 4.5) (Bio Rad), que contiene el algoritmo UPGMA basado en el coeficiente de correlación de Pearson. Todos los aislamientos con un nivel de similitud igual o superior al 90% en sus perfiles genómicos fueron considerados clones de una misma cepa, y se eligió un solo representante para la identificación taxonómica. Se calculó el índice de diversidad a nivel de cepa como el cociente entre el número de cepas y el número total de aislamientos<sup>42</sup>.

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

La caracterización taxonómica se realizó mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S, tal como ya se describió para las BE con capacidad inhibitoria frente a *B. glumae* THT.

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

Se siguió la metodología sugerida por Karki et al.<sup>32</sup>, empleando *B. glumae* cepas THT, A y B3HT como controles positivos y *Rhizobium tropici* CIAT 899 como control negativo. Dichas cepas fueron reactivadas y purificadas en TSA e incubadas a 30 °C (48 h). Las cepas de *B. glumae*, de *B. gladioli* y las empleadas como controles fueron sembradas en 2 ml de caldo TSB, e incubadas a 30 °C y 180 rpm (48 h). Las células fueron lavadas y resuspendidas en una solución de  $MgCl_2$  10 mM estéril mediante 2 centrifugaciones sucesivas (9.500 × g, 5 min) y colocadas en microtubos estériles.

Se ajustó la DO de cada tratamiento a 0,1 ( $5 \times 10^5$  ufc/ml). Para la prueba de maceración de catáfila de cebolla se colocaron 4 catáfilas de la variedad «Criolla» en placas de Petri limpias y la cara interna de estas se inoculó con 5 µl de la suspensión bacteriana, con la punta de una micropipeta. Estas placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas, tras lo cual se midió el área de maceración (en mm<sup>2</sup>) como indicador del potencial fitopatogénico y, por ende, de la virulencia de las cepas. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento, con un diseño experimental completamente aleatorio (DCA).

## Producción de toxoflavina

Se realizó una valoración cualitativa de la producción de toxoflavina por cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* observando el desarrollo de color amarillo por estrías sucesivas en agar King B, con incubación a 37 °C durante 48 horas. Para la valoración se empleó la siguiente escala: –: sin producción de toxoflavina; +: producción baja; ++: producción intermedia; y +++: producción elevada<sup>32</sup>.

## Producción de pigmentos

Se empleó la metodología sugerida por Karki et al.<sup>32</sup>. Las cepas purificadas fueron sembradas por estría en el medio CPG (casaminoácidos, 1,0 g/l; peptona 10,0 g/l; glucosa 10,0 g/l, agar-agar 18,0 g/l) e incubadas a 30 °C durante 14 días.

## Producción de enzimas extracelulares

Para estimar la producción de proteasas se empleó la metodología sugerida por Huber et al.<sup>30</sup> para la de celulasas y poligalacturonasas (pectinasas), la sugerida por Degrassi et al.<sup>14</sup>. Para evaluar la actividad proteasa se empleó agar nutritivo suplementado al momento del servido con 1% de leche descremada, bajo condiciones estériles. Para evaluar la actividad celulasa y poligalacturonasa se empleó agar carboximetilcelulosa (CMC) y agar pectina, respectivamente. Las cepas fueron sembradas en LB e incubadas a 170 rpm a 30 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (24 h). El pellet fue recuperado por centrifugación (9.500 × g, 5 min) y resuspendido en LB, ajustando la concentración celular a una  $DO_{600} = 1,0$ . Se inocularon las placas de cada medio con 5 µl de suspensión bacteriana, y se incubó a 37 °C por 48 horas. Estas actividades se determinaron midiendo el halo de hidrólisis formado alrededor de las colonias, expresado como área de hidrólisis (mm<sup>2</sup>).

## Sensibilidad a agentes bactericidas

Se empleó la metodología sugerida por Kim et al.<sup>34</sup> para evaluar la sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y la de Maeda et al.<sup>40</sup> para determinar la sensibilidad al ácido oxolínico (OA). Las cepas fueron sembradas en caldo LB e incubadas en agitación (200 rpm) a 37 °C durante 24 horas, y luego sembradas en superficie (100 µl) en placas de agar TSA. Se embebieron discos de papel de filtro estériles (6 mm) en solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (Himedia®, India) y se dispusieron sobre las placas de Petri, que se incubaron a 37 °C por

24 horas. Se midió el área de inhibición expresado en mm<sup>2</sup>. Para el ensayo de sensibilidad al OA se emplearon discos embebidos con 0, 10, 50, 100, 250 y 500 µg/ml de OA, que se obtuvieron partiendo de una solución de OA (20% p/v) (Oxilobac®, Colombia). Los discos fueron colocados sobre placas de Petri que contenían agar Müller-Hinton (Merck®, Alemania) previamente sembrado en superficie con las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* en estudio.

### Ensayos de motilidad

Se empleó la metodología sugerida por Kim et al.<sup>34</sup>. Las cepas de *B. glumae* fueron estriadas en agar King B para verificar la pureza del cultivo. Cada cepa fue cosechada y resuspendida en caldo LB a una DO<sub>600</sub> = 1,0. El medio LB fue suplementado al 0,3% de agar para evaluar la capacidad de *swarming*, y al 0,7% agar para evaluar la capacidad *swimming* en cada una de las cepas en estudio. Ambas pruebas fueron valoradas empleando la siguiente escala: —: sin motilidad; +, ++ o +++, según el grado de capacidad *swimming* y *swarming*.

### Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas de actividad inhibitoria, producción de sideróforos y 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, empleando el paquete estadístico InfoStat 2018<sup>15</sup>.

### Resultados y discusión

#### Colecta, recuperación y aislamiento de BE

Las BE brindan una serie de ventajas a la planta; se citan entre las principales el biocontrol de fitopatógenos y la producción de factores de promoción del crecimiento<sup>2,29</sup>. El arroz constituye el modelo de interacción planta-bacteria endófito más estudiado, y se han reportado endófitos en la raíz<sup>12</sup>, las hojas, los tallos y las semillas<sup>9</sup>. En el presente estudio se obtuvieron 189 aislamientos de BE (tabla 1), con mayor recuperación de endófitos de raíz y tallo, tal como reportaron Mbai et al.<sup>41</sup>. Las BE provienen del suelo<sup>7</sup>, pasando transitoriamente como endófitas<sup>17</sup> y, finalmente, solo algunas seleccionadas son transmitidas por el grano<sup>25</sup>.

#### Selección de BE con capacidad inhibitoria contra *B. glumae*

En la selección primaria de las 189 BE obtenidas solo 34 (18,0%) fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. glumae* THT. La inhibición de crecimiento fue variable, con áreas de inhibición desde 2 hasta 451 mm<sup>2</sup> (datos no mostrados).

El control de *B. glumae* ofrece alternativas químicas, culturales y biológicas<sup>26</sup>; este último es un componente

importante en el manejo integrado de la enfermedad<sup>49</sup>. Actualmente destacan el uso de agentes de biocontrol como *Paenibacillus polymyxa* JH2<sup>35</sup>, *Bacillus amyloliquefaciens*<sup>49</sup>, *Bacillus oryzae*<sup>12</sup>, *B. gladioli*<sup>47</sup> y *Streptomyces*<sup>50</sup>, así como la búsqueda metagenómica de enzimas degradadoras de toxoflavina<sup>11</sup>.

En la selección secundaria solo 9 aislamientos (26,5% de los 34 reunidos en la selección primaria y 4,8% sobre los aislamientos totales) fueron confirmados con actividad inhibitoria mayor de 150 mm<sup>2</sup> (tabla 2, figs. 1 A y B). De esos 9 aislamientos 5 fueron endófitos radiculares, 2 caulinares y 2 foliares. No se encontraron BE con capacidad inhibitoria del crecimiento de *B. glumae* THT procedentes de espiga ni de grano.

#### Caracterización genética de las BE seleccionadas

Las BE con actividad inhibitoria del crecimiento de *B. glumae* THT correspondieron a los géneros *Burkholderia* y *Bacillus*, de acuerdo con el análisis filogenético de la secuencia del gen 16S ARNr (tabla 2).

Las cepas TUR04-01 y TUR04-03 presentaron un 99,93% y 99,72% de identidad, respectivamente, con *Burkholderia vietnamiensis* LMG 10929<sup>T</sup>. Por su versatilidad ecológica y habilidad para usar una gran variedad de compuestos como única fuente de carbono y producir metabolitos secundarios, no sorprende que el género *Burkholderia* constituya una alternativa de biocontrol para otros miembros del mismo género<sup>10,47</sup>.

Las cepas SMBH14-02, TUT05-02 y TUR07-04 presentaron un 99,79%, 100% y 99,93% de identidad, respectivamente, con *Bacillus megaterium* NBRC 15308<sup>T</sup>. Las cepas AMH12-02 y SMBR13-04 presentaron un 99,93% y 100% de identidad, respectivamente, con *Bacillus aryabhattai* B8W22<sup>T</sup>. La cepa SMNC17-02 presentó una identidad del 99,76% con *Bacillus subtilis* subsp. *stecoris* D7XPN1<sup>T</sup> y, finalmente, la cepa TUR07-02 fue un 99,78% idéntica a la cepa *Bacillus velezensis* CR-502<sup>T</sup> (tabla 2). El género *Bacillus* tiene un uso potencial en el biocontrol de bacterias fitopatógenas<sup>8,16,45</sup>, debido a la producción de una serie de lipopéptidos antimicrobianos como la iturina y la surfactina, así como la jinggangmicina<sup>46</sup>.

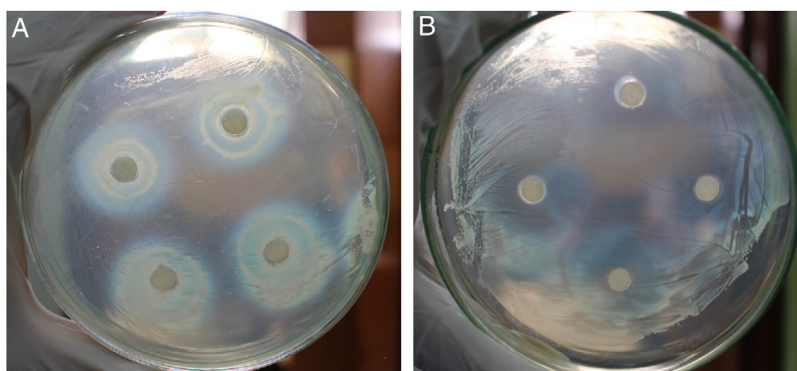
#### Producción de sideróforos por BE seleccionadas

La oxidación del hierro (Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>) se da en presencia de oxígeno y a pH neutro, y la forma oxidada es poco soluble y no disponible para las bacterias; es por ello que la producción de sideróforos constituye una estrategia directa para la nutrición bacteriana en condiciones limitantes de hierro<sup>53</sup>. El 44,4% de las BE antagonistas produjeron sideróforos en medio de cultivo con trazas de Fe<sup>3+</sup>, 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 hierro (tabla 2).

Las cepas de *B. vietnamiensis* TUR04-01 y TUR04-03 produjeron la mayor concentración de sideróforos solubles, tanto en presencia de hierro como en medio desferrado (tabla 2). Se ha reportado que el salicilato, la ornibactina y la maleobactina constituyen los sideróforos más comunes producidos por el género *Burkholderia*<sup>19,23</sup>. El género

**Tabla 1** Distribución de los aislamientos de BE de arroz de acuerdo con el origen y órgano seleccionado

| 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  |       |

**Figura 1** Actividad inhibitoria de *B. vietnamiensis* TUR04-03 (A) y *B. aryabhatai* AMH12-02 (B) contra *B. glumae* THT en medio TSA incubado a 30 °C por 72 horas.

*Bacillus*, a diferencia del género *Burkholderia*, produce sideróforos del tipo catecoles (bacilibactinas), que favorecen el crecimiento de la planta y protegen contra patógenos<sup>4</sup>.

La producción de sideróforos se ha asociado al control de fitopatógenos por limitación del Fe en el medio de cultivo. En nuestro estudio la actividad inhibitoria de las BE 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 ( $r=0,74$ ).

### Resistencia a la toxoflavina por BE seleccionadas

La toxoflavina es una fitotoxina con características antimicrobianas, antifúngicas e incluso herbicidas, que genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en presencia de luz y oxígeno, interrumpiendo la cadena respiratoria del arroz<sup>44</sup>. Se han reportado cepas bacterianas capaces de tolerar hasta 40  $\mu\text{g/ml}$  de toxoflavina, y es suficiente > 3  $\mu\text{g/ml}$  para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*<sup>35</sup>.

Se ha informado de que la cepa JH2 de *P. polymyxa*, aislada de semillas de arroz sanas, presenta el gen *tflA*, que expresa una enzima degradadora de esta fitotoxina<sup>35</sup>. Un estudio de metagenómica de Choi et al.<sup>11</sup> da cuenta del gen *txeA*, que codifica una metaloenzima con actividad degradadora de toxoflavina. A la concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$ , 8 cepas portadoras de dicho gen fueron capaces de tolerar ( $DO_{600} < 0,5$ ) toxoflavina, mientras que *B. aryabhatai* SMBR13-04 fue sensible. Asimismo, *B. subtilis* subsp. *stecoris* SMNCT17-02 fue sensible a 30  $\mu\text{g/ml}$ . Solo el 55,6% fue tolerante a 40  $\mu\text{g/ml}$  de toxoflavina (tabla 2). Sería interesante determinar la posible presencia de los genes *tflA* o *txeA* en

el genoma bacteriano de las cepas endofíticas tolerantes a toxoflavina.

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

Se obtuvieron 17 aislamientos en medio CCNT modificado, 16 de grano y uno de tallo. Las 17 cepas fueron agrupadas en 10 perfiles genómicos BOX diferentes (A, B, C, D1, D2, D3, E1, E2, E3, E4) (tabla 3). Se eligió una cepa representante de cada perfil genómico para posteriores estudios de confirmación filogenética y caracterización de los principales factores de virulencia. La técnica de huella genómica BOX-PCR es ampliamente usada debido a su destacado poder de resolución intercepa, atendiendo a sus diferencias genómicas<sup>13,31</sup>.

En nuestro estudio se observó una diferenciación genómica entre cepas de *B. glumae* acorde con su distribución geográfica. Lee et al.<sup>36</sup> demostraron que cepas de *B. glumae* de diferentes orígenes geográficos presentan rearrreglos genómicos irregulares y esporádicos, sobre todo reordenamientos de elementos genéticos por inversión a gran escala, lo cual permite su adaptación a nuevos ambientes.

La amplificación y secuenciación parcial del gen 16S ARNr de las 10 cepas representativas de cada perfil genómico BOX-PCR detectó similitud entre 9 de ellas (perfiles B, C, D1, D2, D3, E1, E2, E3 y E4) y *B. glumae* LMG2196<sup>T</sup>; la cepa restante (perfil A) la presentó con *B. gladioli* NBRC13700<sup>T</sup>. En nuestro estudio solo un aislamiento fue recuperado de tallo e identificado como *B. glumae*, probablemente debido al estilo de vida endofítico<sup>38</sup>.

**Tabla 2** Caracterización de bacterias endófitas de arroz procedentes de la zona norte del Perú preseleccionadas por su capacidad inhibitoria frente a *Burkholderia glumae* cepa THT

| Cepa       | Área de inhibición del crecimiento de <i>B. glumae</i> THT (mm <sup>2</sup> ) | Producción de sideróforos (%) |                   | Resistencia a la toxo flavina (µg/ml) <sup>a</sup> |    |    | Especie tipo más relacionada. Cepa tipo <sup>(T)</sup>         | Similitud (%) | 16S ARNr (pb) <sup>b</sup> | Número de acceso |
|------------|---|-------------------------------|-------------------|--|----|----|--|---------------|----------------------------|------------------|
|            |   | + Fe <sup>c</sup>             | - Fe <sup>d</sup> | 20   | 30 | 40 |  |               |                            |                  |
| TUR07-04   | 283 (±38) D   | ND                            | ND                | +++  | +  | -  | <i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>(T)</sup>           | 99,93         | 1379                       | MK449441         |
| TUR04-03   | 517 (±16) B   | 86,56 (± 2,59) A              | 97,36 (± 0,24) A  | +++  | +  | +  | <i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG 10929 <sup>(T)</sup>     | 99,93         | 1403                       | MK449433         |
| TUT05-02   | 301 (±7) CD   | ND                            | ND                | +  | +  | +  | <i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>(T)</sup>           | 100,00        | 1403                       | MK449447         |
| TUR07-02   | 254 (±8) D  | ND                            | ND                | +  | +  | +  | <i>Bacillus velezensis</i> CR-502 <sup>(T)</sup>               | 99,78         | 1402                       | MK449448         |
| TUR04-01   | 618 (±25) A   | 25,47 (± 0,69) B              | 95,39 (± 0,52) A  | +++  | +  | +  | <i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG 10929 <sup>(T)</sup>     | 99,72         | 1421                       | MK449435         |
| AMH12-02   | 330 (±13) C   | ND                            | 17,18 (± 2,65) CD | ++   | +  | +  | <i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>(T)</sup>               | 99,93         | 1379                       | MK449446         |
| SMBR13-04  | 158 (±9) E  | 11,10 (± 0,55) C              | 16,00 (± 1,47) D  | -  | -  | -  | <i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 <sup>(T)</sup>               | 100,00        | 1466                       | MK449444         |
| SMBH14-02  | 180 (±5) E  | 18,90 (± 2,80) BC             | 55,84 (± 3,20) B  | +  | +  | -  | <i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>(T)</sup>           | 99,79         | 1438                       | MK449443         |
| SMNCT17-02 | 245 (±9) DE   | ND                            | 24,94 (± 0,24) C  | ++   | -  | -  | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. stecoris D7XPN1 <sup>(T)</sup> | 99,76         | 1437                       | MK449440         |
| CV (%)     | 8,64  | 11,75                         | 8,23              |  |    |    |  |               |                            |                  |

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (test de Tukey; p = 0,05; n = 6).

ND: no detectado.

<sup>a</sup> Ensayo en caldo nutritivo suplementado con 20 µg ml<sup>-1</sup> de toxo flavina.

<sup>b</sup> Longitud en pares de bases de la secuencia del gen 16S ARNr amplificado.

<sup>c</sup> Medio SM normal con trazas de Fe.

<sup>d</sup> Medio SM desferrado.

**Tabla 3** Caracterización de aislamientos de *B. glumae* y *B. gladioli* obtenidos de muestras de grano y tallo de arroz cultivado en cuatro departamentos de la zona norte del Perú

| Perfil BOX | Cepa(s) <sup>a</sup>                      | TOX | PP | Virulencia                                     | Proteasas                              | Celulasas                             | Poligalacturonasa | Especie(s) más relacionada(s) según 16S ARNr   |
|------------|---|-----|----|--|--|---------------------------------------|-------------------|--|
|            |   |     |    | Área de maceración catáfila (mm <sup>2</sup> ) | Área de proteólisis (mm <sup>2</sup> ) | Área de hidrólisis (mm <sup>2</sup> ) |                   |  |
| A          | <b>TUG05-07;</b><br>TUG05-08              | +   | AC | 51,07 (± 0,15) H                               | 31,18 (±0,74) AB                       | 0                                     | -                 | <i>Burkholderia gladioli</i><br>NBRC13700 <sup>T</sup><br><i>Burkholderia glumae</i><br>LMG2196 <sup>T</sup> |
| B          | <b>TUT05-07</b>                           | +++ | SP | 87,08 (± 5,05) GH                              | 26,10 (±0,20) BC                       | 0                                     | +                 |  |
| C          | <b>TUG07-05;</b><br>TUG07-07              | ++  | A  | 72,73 (± 3,65) GH                              | 31,65 (±0,53) A                        | 3,44 (±0,43) BC                       | -                 |  |
| D1         | <b>TUG07-08</b>                           | ++  | A  | 180,37 (±8,87) CDE                             | 27,90 (±0,37) ABC                      | 2,41 (±0,38) CD                       | +                 |  |
| D2         | <b>TUG07-09</b>                           | +   | A  | 157,41 (±2,27) DEF                             | 27,88 (±0,47) ABC                      | 2,35 (±0,27) CD                       | -                 |  |
| D3         | <b>TUG07-11;</b><br>AMG08-02              | +   | MA | 127,5 (±12,00) EFG                             | 24,94 (±0,88) C                        | 1,57 (±0,11) D                        | +                 |  |
| E1         | <b>AMG09-01;</b><br>AMG09-02;<br>AMG09-09 | ++  | SP | 230,4 (±12,56) BC                              | 32,02 (±1,67) A                        | 0                                     | -                 |  |
| E2         | <b>AMG12-06</b>                           | +   | A  | 38,2 (±7,43) H                                 | 13,68 (±0,92) E                        | 0                                     | +                 |  |
| E3         | <b>SMNCG18-05;</b><br>SMNCG18-07          | +   | MA | 375,58 (±1,80) A                               | 28,86 (±1,22) ABC                      | 6,55 (±0,33) A                        | +                 |  |
| E4         | <b>SMNCG18-06;</b><br>SMNCG18-08          | +   | MA | 244,69 (±5,20) B                               | 19,48 (±0,97) G                        | 4,35 (±0,34) B                        | -                 |  |
| E5         | <b>B3HT</b>                               | +   | SP | 148,86 (±7,49) DEF                             | 8,18 (±0,75) F                         | 0                                     | -                 |  |
| ND         | <b>A</b>                                  | +   | SP | 109,85 (±2,99) FG                              | 31,93 (±1,47) A                        | 0                                     | -                 |  |
| ND         | <b>THT</b>                                | ++  | A  | 187,96 (±4,02) BCD                             | 29,17 (±1,22) ABC                      | 0                                     | -                 |  |
|            | CV (%)                                    |     |    | 20,06  | 6,8                                    | 23,52                                 |                   |  |

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (test de Tukey; p=0,05).

<sup>a</sup> Código de cepa representante de perfil BOX-PCR en negrita; TOX (producción de toxoflavina): ausente (-), mínimo (+), intermedia (++) y abundante (+++); PP (producción de pigmentos): azul (A), marrón en los bordes y azul en el centro (MA), sin producción de pigmentos (SP), bordes color crema y amarillo (AC); *Burkholderia glumae* B3HT (MK027360); *Burkholderia glumae* A (MK027361); *Burkholderia glumae* THT (MK027359).



## Caracterización de los factores de virulencia de las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*

La producción de toxoflavina fue superior en la cepa *B. glumae* TUT05-07 (tabla 3). La toxoflavina es producida tanto por *B. glumae* como por *B. gladioli* bajo el control del regulador transcripcional ToxR del operón *toxABCDE*<sup>22</sup>, y constituye el principal factor de virulencia, aunque se ha reportado que la virulencia es menor en *B. gladioli*<sup>31,36</sup>.

Los pigmentos desempeñan un rol importante en la adaptación ecológica de los microorganismos, asociados a la protección frente a las radiaciones o a la exacerbación de los factores de virulencia<sup>32</sup>. Dos cepas nativas y 2 cepas patrón de *B. glumae* no produjeron pigmentos visibles ni en colonias ni difusibles al medio. Se detectó producción de un pigmento azul en 4 cepas nativas y en la cepa patrón *B. glumae* THT. Tres cepas nativas y una cepa patrón produjeron pigmento azul, pero los bordes fueron marrones (tabla 3). Karki et al.<sup>31</sup> reportaron que cepas de *B. glumae* produjeron pigmentos con propiedades antimicrobianas y que, además, incrementaron la tolerancia a luz UV, y se postula que dichos pigmentos pueden ser utilizados para sobrevivir en condiciones oligotróficas o de estrés<sup>27,32</sup>.

El ensayo de virulencia en catáfila de cebolla mostró que la cepa *B. glumae* SMNCG18-05 produjo la mayor área de maceración, mientras que la menor la produjo *B. glumae* AMG12-06 (tabla 3). Karki et al.<sup>31</sup> informaron de que existe una correlación directa entre el ensayo de maceración de catáfila de cebolla y la prueba de infectividad en panículas de arroz<sup>31</sup>, por lo que la primera constituye una prueba rápida y de menor costo para determinar la virulencia de cepas de *B. glumae*. Nosotros no observamos correlación entre los niveles de maceración de catáfila de cebolla y la producción de toxoflavina ( $r = -0,05$ ). Aunque la producción de toxoflavina en *B. glumae* está a menudo asociada a un fenotipo virulento, no es condición suficiente para provocar enfermedad, según postulan Karki et al.<sup>32</sup>.

En relación con las enzimas extracelulares que pueden ayudar en los procesos de colonización e infección se encuentran proteasas, celulasas y poligalacturonasas (pectinasas). El 80% de las cepas presentaron actividad proteasa un 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 3). La producción de proteasas extracelulares en el género *Burkholderia* es muy común<sup>56</sup>. Esta actividad puede cobrar importancia en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando se requieren polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos, que pueden ser liberados a partir de la hidrólisis de las proteínas del tejido vegetal<sup>3</sup>. Lelis et al.<sup>37</sup> comunicaron que la metaloproteasa codificada por el gen *prtA* constituye un factor de virulencia de *B. glumae*.

El 53,3% de las cepas demostró actividad celulolítica; la máxima actividad se detectó en la cepa *B. glumae* SMNCG18-05 (tabla 3). En otros patógenos las celulasas hidrolizan la pared celular de la planta huésped y desempeñan un papel importante y sinérgico en la patogénesis, junto con otras enzimas hidrolíticas. Hasta el momento no se ha reportado actividad celulolítica en *B. glumae* y *B. gladioli*; sin embargo, se infiere de estos hallazgos que las celulasas producidas podrían tener un rol sinérgico en la virulencia<sup>53</sup>.

Prueba de ello es la correlación obtenida entre la maceración de catáfila y la producción de celulasas ( $r = 0,61$ ).

Finalmente, se hallaron 5 cepas de *B. glumae* con actividad poligalacturonasa evaluada cualitativamente (tabla 3). Se ha propuesto que la actividad poligalacturonasa en bacterias fitopatógenas ayudaría a obtener nutrientes de la pared celular cuando la enfermedad se encuentra en un estado avanzado<sup>14</sup>. *B. glumae* expresa 2 isoformas de endopoligalacturonasas (*pehA* y *pehB*)<sup>49</sup> y la actividad enzimática depende principalmente de la densidad celular, la fuente de carbono y los productos de descomposición de los polímeros de pectina<sup>26</sup>. No se ha informado actividad poligalacturonasa en *B. gladioli*<sup>18</sup>. Por otro lado, el 58,3% no presentó actividad, probablemente debido a la carencia de los citados genes, o a una actividad débil debido a la expresión del gen *pehB* solamente bajo condiciones *in vitro*. No se encontró una correlación entre la virulencia y la actividad poligalacturonasa. Degrassi et al.<sup>14</sup> reportaron que cepas mutantes de *B. glumae* (*pehA*<sup>-</sup> y *pehB*<sup>-</sup>) presentaron similar virulencia que las cepas originales en panículas de arroz.

La cepa *B. glumae* SMNCG18-05 presentó la mayor sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la cepa *B. glumae* TUT05-07 fue la más resistente (tabla 4). La tolerancia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se asocia con la presencia y efectividad de las enzimas catalasa y peroxidasa para superar el estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La catalasa permite la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evitando el daño oxidativo en las células microbianas. Curiosamente, la correlación entre actividad celulolítica y sensibilidad al peróxido de hidrógeno fue elevada ( $r = 0,80$ ), es decir, una mayor actividad endoglucanasa (endo-1,4-β-glucanasas), celobiohidrolasa (exo-1,4-β-glucanasas) y β-glucosidasa<sup>46</sup>, por alguna circunstancia, está relacionada con una menor actividad catalasa y/o peroxidasa en las cepas de *B. glumae*.

La hipótesis de una actividad celulolítica superior dependiente de una menor resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría explicar esta elevada correlación. Forsberg et al.<sup>21</sup> informaron de la presencia de monooxigenasas líticas de polisacáridos dependientes de cobre en actinobacterias, que requieren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para clivar polisacáridos como la celulosa. Si bien no ha sido reportada en patógenos de plantas, se recomienda la búsqueda de esta actividad enzimática específica para comprobar dicha hipótesis.

Al menos 7 cepas (46,7%) presentaron resistencia a 10 μg/ml de OA; la sensibilidad a este antibiótico fue variable y mayor en *B. glumae* AMG12-06. Al aumentar la concentración, la mayoría de las cepas se mostraron más o menos sensibles. Solo *B. gladioli* TUG05-07 puede ser considerada como altamente resistente (tabla 4).

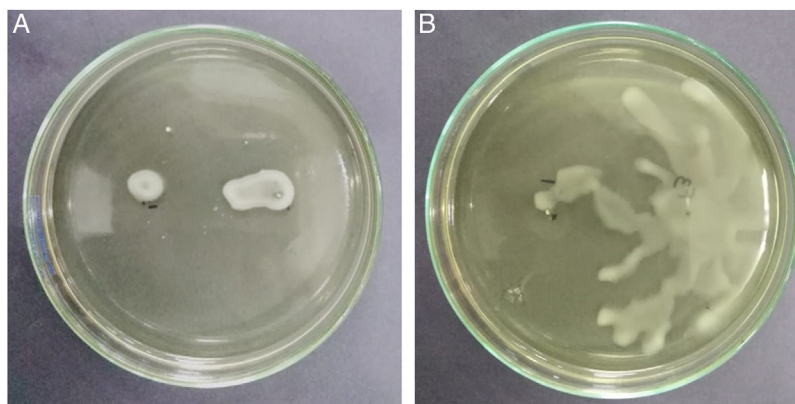
La resistencia intrínseca a los antibióticos es un indicativo de adaptación ecológica al ambiente, y en la mayoría de los casos refleja uso inadecuado de antibióticos<sup>30</sup>. Se ha reportado una fácil generación de resistencia en aislamientos de *B. glumae*, asociada a las sustituciones Ser83Arg y Ser83Ile en GyrA<sup>40</sup>. En Perú han existido reportes de uso indebido de OA mediante aplicaciones clandestinas desde 2013, las cuales podrían influir en la generación de cepas resistentes.

La motilidad tipo swimming y swarming desempeña un papel fundamental en el comportamiento social y virulento de *B. glumae*<sup>26</sup>. El movimiento a través de un líquido empleando flagelos se denomina swimming, y cuando el movimiento ocurre sobre una superficie, como

**Tabla 4** Factores de virulencia en cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* obtenidas de grano y tallo de arroz cultivado en 4 departamentos de la zona Norte del Perú

| Cepa                        | Sensibilidad al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Sensibilidad al ácido oxolínico (µg/ml) |                     | Área de inhibición (mm <sup>2</sup> ) | Ensayos de motilidad |          |
|-----------------------------|---|---|---------------------|---------------------------------------|----------------------|----------|
|                             | Área de inhibición (mm <sup>2</sup> )         | 10                                      | 50                  | 100                                   | Swimming             | Swarming |
| <i>B. glumae</i> TUG07-08   | 120,40 (±9,00) B                              | 64,45 (±1,54) BC                        | 210,26 (±31,27) ABC | 248,53 (±31,27) A                     | -                    | ++       |
| <i>B. glumae</i> TUG07-09   | 102,10 (±1,10) BC                             | 0                                       | 154,53 (±6,77) BC   | 179,45 (±8,50) ABCD                   | -                    | ++       |
| <i>B. glumae</i> TUG07-11   | 68,90 (±4,80) CDE                             | 0                                       | 172,30 (±8,80) ABC  | 185,74 (±8,80) ABC                    | +++                  | +        |
| <i>B. glumae</i> SMNCG18-06 | 108,50 (±6,70) B                              | 37,90 (±1,10) CD                        | 166,54 (±22,38) BC  | 202,14 (±22,38) ABC                   | +++                  | ++       |
| <i>B. glumae</i> B3HT       | 60,20 (±2,90) DEF                             | 0                                       | 124,89 (±5,98) BCD  | 134,93 (±5,98) BCD                    | -                    | -        |
| <i>B. glumae</i> THT        | 33,70 (±2,20) EF                              | 38,62 (±4,46) CD                        | 183,49 (±13,51) ABC | 207,96 (±13,51) ABC                   | +++                  | ++       |
| <i>B. gladioli</i> TUG05-07 | 40,90 (±5,60) EF                              | 0                                       | 0                   | 0                                     | -                    | ++       |
| <i>B. glumae</i> TUT05-07   | 29,2 (±3,10) F                                | 0                                       | 57,56 (±5,20) DE    | 113,70 (±8,18) CDE                    | ++                   | ++       |
| <i>B. glumae</i> TUG07-05   | 95,6 (±9,40) BCD                              | 0                                       | 1,64 (±0,52) E      | 66,89 (±2,07) DE                      | +                    | +        |
| <i>B. glumae</i> AMG09-01   | 100,00 (±5,10) BC                             | 0                                       | 179,46 (±8,13) AB   | 210,26 (±31,28) ABCD                  | -                    | +        |
| <i>B. glumae</i> AMG12-06   | 62,60 (±11,00) DEF                            | 105,43 (±22,07) A                       | 238,72 (±32,39) A   | 253,30 (±21,98) AB                    | +                    | ++       |
| <i>B. glumae</i> SMNCG18-05 | 164,10 (±9,20) A                              | 93,28 (±13,98) AB                       | 207,34 (±9,86) AB   | 222,79 (±13,17) AB                    | +                    | +        |
| <i>B. glumae</i> A          | 37,50 (±5,90) EF                              | 70,98 (±3,86) ABC                       | 173,33 (±10,32) ABC | 232,21 (±12,08) AB                    | +                    | ++       |
| CV (%)                      | 15,04   | 36,45                                   | 19,77               | 22,60                                 |                      |          |

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (test de Tukey; p=0,05; n=6).



**Figura 2** Diferentes niveles de swimming en *B. glumae* TUG07-09 (A) y *B. glumae* TUG07-11 (B) creciendo en LB suplementado con 0,5% agar.

una biopelícula, se denomina swarming<sup>34</sup>. Las cepas con mayor capacidad de swimming correspondieron a *B. glumae* TUG07-11, SMNCG18-06 y THT; por el contrario, la actividad estuvo ausente en *B. gladioli* TUG05-07, probablemente porque carece de flagelos y, por ende, tiene menor capacidad invasiva (figs. 2 A y B).

Se observó una correlación débil positiva ( $r=0,20$ ) y negativa ( $r=-0,22$ ) entre la virulencia, el swimming y el swarming, respectivamente. La motilidad es uno de los factores de virulencia cruciales para *B. glumae*<sup>34</sup>.

En conclusión, encontramos que cepas nativas de 3 especies de *Bacillus*, además de *B. vietnamiensis*, son endófitos con actividad inhibitoria contra *B. glumae* THT bajo condiciones *in vitro*, con características relacionadas con el biocontrol. Asimismo, este constituye el primer reporte sobre la diversidad genética y el estudio de los principales factores de virulencia de cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* aisladas en Perú. La gran variabilidad genética encontrada entre las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* y la diversa expresión de factores de virulencia nos demuestra la elevada adaptabilidad de estos patógenos al medio ambiente. Es preciso lograr una mejor comprensión de la enfermedad para poder diseñar estrategias de control de estas enfermedades empleando agentes microbianos.

## Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto-Perú, con resolución n.º 296-2018-UNSM/CU-R/NLU; Red Agromicrobios-Universidad Nacional Agraria La Molina-Perú.

## Conflicto de intereses

Los autores han declarado que no presentan ningún conflicto de intereses existentes.

## Agradecimientos

A los bachilleres Luz E. Valdiviezo Saavedra, Jean C. Rodríguez Peralta y Rony Castro Tuanama por el apoyo en los trabajos de caracterización genética.

## Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ram.2019.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.002)

## Bibliografía

1. Adhikari S, Pudasaini R, Bhattarai S, Khadka A, Shrestha J. Farmers' knowledge and perception on major insect pests of rice and their management practices in Lamjung district, Nepal. *RRJoAST*. 2018;7:1–6.
2. Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol Res*. 2019;221:36–49.
3. Ali J, Sharma DC, Bano A, Gupta A, Sharma S, Bajpai P, Pathak N. Exploiting microbial enzymes for augmenting crop production. En: Kuddus M, editor. *Enzymes in food biotechnology*. London: Academic Press; 2019. p. 503–19.
4. Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb Cell Fact*. 2009;8:63.
5. Baldani JI, Reis VM, Videira SS, Boddey LH, Baldani VLD. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: A practical guide for microbiologists. *Plant Soil*. 2014;384:413–31.
6. Barraza Z, Bravo A, Pérez-Cordero A. *Pseudomonas aeruginosa* productora de metabolito con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae*. *Rev Colombiana Cienc Anim-RECIA*. 2014;114–21.
7. Berg G, Zachow C, Grosch R, Smalla K. Endophytes - a source for biological control agents. En: Schneider C, Leifert C, Feldmann F, editores. *Endophytes for plant protection: The state of the art*. Berlin: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig; 2013. p. 160.
8. Berić T, Kojić M, Stanković S, Topisirović L, Degrassi G, Myers M, Fira D. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol Biotech*. 2012;50:25–31.
9. Bertani I, Abbruscato P, Piffanelli P, Subramoni S, Venturi V. Rice bacterial endophytes: Isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environ Microbiol Rep*. 2016;8:388–98.
10. Chen L, Shi H, Heng J, Wang D, Bian K. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the

- peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiol Res.* 2019;218:41–8.
11. Choi JE, Nguyen CM, Lee B, Park JH, Oh JY, Choi JS, Song JK. Isolation and characterization of a novel metagenomic enzyme capable of degrading bacterial phytotoxin toxoflavin. *PLOS ONE.* 2018;13:e0183893.
  12. Chung EJ, Hossain MT, Khan A, Kim KH, Jeon CO, Chung YR. *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. *Plant Pathol J.* 2015;31:152.
  13. Cottyn B, Regalado E, Lanoot B, de Cleene M, Mew TW, Swings J. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathol.* 2001;91:282–92.
  14. Degrassi G, Devescovi G, Kim J, Hwang I, Venturi V. Identification, characterization and regulation of two secreted polygalacturonases of the emerging rice pathogen *Burkholderia glumae*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;65:251–62.
  15. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [consultado Abr 2019]. Disponible en: URL <http://www.infostat.com.ar>.
  16. Durairaj K, Velmurugan P, Park JH, Chang WS, Park YJ, Senthilkumar P, Oh BT. 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 Microbiol Lett.* 2017;364:225.
  17. Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S<ET AL>. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:E911–20.
  18. Elshafie HS, Racioppi R, Bufo SA, Camele I. *In vitro* study of biological activity of four strains of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* and identification of their bioactive metabolites using GC–MS. *Saudi J Biol Sci.* 2017;24:295–301.
  19. Esmaeel Q, Pupin M, Kieu NP, Chataigné G, Béchet M, Derauel J<ET AL>. *Burkholderia* genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis. *Microbiology Open.* 2016;5: 512–26.
  20. Fetzner S. Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol.* 2015;201:2–14.
  21. Forsberg Z, Bissaro B, Gullesen J, Dalhus B, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VG. Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monooxygenase functionality. *J Biol Chem.* 2018;293:1397–412.
  22. Fory PA, Triplett L, Ballen C, Abello JF, Duitama J, Aricapa MG, Tohme J. Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. *Phytopathol.* 2014;104:436–44.
  23. Franke J, Ishida K, Hertweck C. Plasticity of the malleobactin pathway and its impact on siderophore action in human pathogenic bacteria. *Chem Eur J.* 2015;21:8010–4.
  24. Garrido M. Morfología del agente causal “Añublo bacterial de la panícula del arroz” *Burkholderia glumae*. Bloc informativo. Tumbes. 2013.
  25. Gholamalizadeh R, Khodakaramian G, Ebadi AA, Khoshkdam M. Identification of predominant epiphytic and endophytic bacterial isolates in rice seeds effective for enhancement of seed germination and plant growth. *Iran Agric Res.* 2019; 37:2.
  26. Ham JH, Melanson RA, Rush MC. *Burkholderia glumae*: Next major pathogen of rice? *Mol Plant Pathol.* 2011;12:329–39.
  27. Han JW, Kim JD, Lee JM, Ham JH, Lee D, Kim BS. Structural elucidation and antimicrobial activity of new phencomycin derivatives isolated from *Burkholderia glumae* strain 411gr-6. *J Antibiot (Tokyo).* 2014;67:721.
  28. Hikichi Y, Tsujiguchi K, Maeda Y, Okuno T. Development of increased oxolinic acid-resistance in *Burkholderia glumae*. *J Gen Plant Pathol.* 2001;67:58–62.
  29. Hong CE, Park JM. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: Current state-of-the-art. *Plant Biotechnol Rep.* 2016;10:353–7.
  30. Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Eberl L. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology.* 2001;147:2517–28.
  31. Karki HS, Shrestha BK, Han JW, Groth DE, Barphagha IK, Rush MC, Ham JH. Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. *PLOS ONE.* 2012;7:e45376.
  32. Karki HS, Ham JH. The roles of the shikimate pathway genes, *aroA* and *aroB*, in virulence, growth and UV tolerance of *Burkholderia glumae* strain 411gr6. *Mol Plant Pathol.* 2014;15:940–7.
  33. Kawaradani M, Okada K, Kusakari SI. New selective medium for isolation of *Burkholderia glumae* from rice seeds. *J Gen Plant Pathol.* 2000;66:234–7.
  34. Kim J, Manna M, Kim N, Lee C, Kim J, Park J, Seo YS. The roles of two *hfq* genes in the virulence and stress resistance of *Burkholderia glumae*. *Plant Pathol J.* 2018;34:412.
  35. Koh S, Kim H, Kim J, Goo E, Kim YJ, Choi O, Hwang I. A novel light-dependent selection marker system in plants. *Plant Biotechnol J.* 2011;9:348–58.
  36. Lee HH, Park J, Kim J, Park I, Seo YS. Understanding the direction of evolution in *Burkholderia glumae* through comparative genomics. *Curr Genet.* 2016;62:115–23.
  37. Lelis T, Peng J, Barphagha I, Chen R, Ham JH. The virulence function and regulation of the metalloprotease gene *prtA* in the plant-pathogenic bacterium *Burkholderia glumae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2019;32:841–52.
  38. Li L, Wang L, Liu LM, Hou YX, Li QQ, Huang SW. Infection process of *Burkholderia glumae* before booting stage of rice. *J Phytopathol.* 2016;164:825–32.
  39. Lima JVL, Martins SCS, de Siqueira KA, Soares MA, Martins CM. Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. *Afr J Biotechnol.* 2017;16:499–507.
  40. Maeda Y, Kiba A, Ohnishi K, Hikichi Y. 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.* 2004;70:5613–20.
  41. Mbai FN, Magiri EN, Matiru VN, Nganga J, Nyambati VCS. Isolation and characterization of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan Basmati rice. *Am Int J Contemp Res.* 2013;3:25–40.
  42. Mizobuchi R, Fukuoka S, Tsushima S, Yano M, Sato H. QTLs for resistance to major rice diseases exacerbated by global warming: Brown spot, bacterial seedling rot, and bacterial grain rot. *Rice (NY).* 2016;9:23.
  43. Nandakumar R, Shahjahan AKM, Yuan XL, Dickstein ER, Groth DE, Clark CA, Rush MC. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Dis.* 2009;93:896–905.
  44. Naughton LM, An SQ, Hwang I, Chou SH, He YQ, Tang JL. Functional and genomic insights into the pathogenesis of *Burkholderia* species to rice. *Environ Microbiol.* 2016;18:780–90.
  45. Peng D, Li S, Wang J, Chen C, Zhou M. Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ18 and jinggangmycin. *Pest Manag Sci.* 2014;70:258–63.
  46. Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia TDLR, Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *Int Microbiol.* 2002;5:53–63.

47. Riera-Ruiz C, Castro-Lara J, Jimenez-Feijóo MI, Cevallos-Cevallos JM. Interactions of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* in symptom development in rice seeds and seedlings. *Can J Plant Pathol.* 2018;40:347–57.
48. Sayyed RZ, Badgajar MD, Sonawane HM, Mhaske MM, Chincholkar SB. Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. *Indian J Microbiol.* 2005;4:484–90.
49. Shrestha BK, Karki HS, Groth DE, Jungkhun N, Ham JH. Biological control activities of rice-associated *Bacillus* sp. strains against sheath blight and bacterial panicle blight of rice. *PLoS One.* 2016;11:e0146764.
50. Suárez Moreno ZR, Vinchira-Villarraga DM, Vergara-Morales DI, Castellanos L, Ramos FA, Guarnaccia C, Moreno-Sarmiento N. Plant-growth promotion and biocontrol properties of three *Streptomyces* spp. isolates to control bacterial rice pathogens. *Front Microbiol.* 2019;10:290.
51. Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecol.* 2008;55:415–24.
52. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth Mol Cell Biol.* 1994;5:25–40.
53. Vial L, Groleau MC, Dekimpe V, Deziel E. *Burkholderia* diversity and versatility: An inventory of the extracellular products. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17:1407–29.
54. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173:697–703.