

Aislamiento y caracterización de bacterias con potencial antagonístico para el control biológico de *Burkholderia glumae*, en la filósfera del cultivo de arroz en la República de Panamá

Isolation and characterization of bacteria with antagonistic potential for the biological control of *Burkholderia glumae*, in the phyllosphere of rice cultivation in the Republic of Panamá

Rito Herrera¹, Martha de Von Chong²

¹Universidad de Panamá, Panamá; Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá, Panamá; rito.herrera@up.ac.pa; <https://orcid.org/0000-0003-2509-0391>

²Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Coclé, Panamá; martha.chaves@up.ac.pa; <https://orcid.org/0000-0002-1087-4196>

Resumen: Se realizaron muestreos de la filósfera de arroz (variedad GAB 8), en una parcela bajo la modalidad de agricultura orgánica de subsistencia, en Los Alvéos, Coclé, Panamá. Se efectuaron aislamientos de bacterias de la filósfera del arroz, pruebas de enfrentamiento *in vitro* e identificación de los microorganismos bacterias con potencial antagonístico frente al patógeno *Burkholderia glumae* que provoca añublo bacterial de la panícula del arroz. Se aislaron un total de 64 cepas bacterianas epifíticas de las cuales 24 correspondieron a la sección apical de la hoja, 11 de la sección media y 30 de la sección basal de la filósfera, de estas, 21 presentaron antagonismo positivo (halo ≥ 4 mm de diámetro) ante el fitopatógeno *B. glumae*, se identificaron las 10 con el mayor halo de inhibición, correspondiendo al género *Bacillus spp* (se utilizó el sistema API y secuenciación del gen *rpoB*).

Palabras clave: filósfera, bacterias, epifítica, arroz, antagonismo, *Burkholderia*.

Abstract: Samples of the rice (GAB 8 variety) philosopher were carried out in a plot under the modality of subsistence organic agriculture, located in Los Alvéos, Coclé, Panamá. Isolations of bacteria which cause bacterial blight if the rice panicle from the rice phyllosphere, *in vitro* confrontation tests and identification of microorganisms with antagonistic potential against the pathogen *Burkholderia glumae*, were made total of 64 epiphytic bacterial strains were isolated, of which 24 corresponded to the apical section of the leaf, 11 from the middle section and 30 from the basal section of the phyllosphere, of which, 21 presented positive antagonism (halo ≥ 4 mm in diameter) against the phytopathogen *B. glumae*. The 10 bacterial strains with the highest inhibition halo were identified, corresponding to the genus *Bacillus spp* (the API system and *rpoB* gene sequencing were used).

Keywords: phyllosphere, bacteria, epiphytic, rice, antagonism, *Burkholderia*.

1. Introducción

En la República de Panamá la producción promedio de arroz para el año 2015-2016 fue de 282,568 toneladas de arroz en cáscara y se sembraron 92,380 hectáreas (Instituto Nacional de Estadística y Censo, 2016). En este cultivo las enfermedades de

origen microbiano constituyen uno de los factores que inciden en la obtención de bajos rendimientos y calidad de los granos.

Actualmente las medidas de control para los fitopatógenos del arroz se basan, principalmente, en el uso de fungicidas químicos, productos que son tóxicos para animales y plantas, creando resistencia en las cepas del patógeno. Sin embargo, la percepción pública en los últimos años ejerció alta presión sobre los agricultores e investigadores para desarrollar sistemas de producción ambientalmente más amigables y sostenibles (Castro et al., 2015).

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. En este sentido, se ha demostrado que la microbiota epifítica puede defender a las plantas de los agentes patógenos, al ejercer una acción antagónica contra estos; se ha logrado aislar bacterias de las partes aéreas de las plantas con el fin de utilizarlas como control biológico de muchos patógenos (Bellido, 2005).

Los microorganismos endofíticos para ser considerados como agentes potenciales de biocontrol, requieren ciertas características. Entre estas podemos mencionar: que no sea patógeno para plantas, hombres o animales; además, debe tener elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos, después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora presente en la planta y puede que el microorganismo se vea reprimido fácilmente por los demás habitantes de esta; como número dos, debe tener la capacidad de reducir o suprimir eficientemente la población de microorganismos patógenos, por debajo del nivel crítico. Es muy importante, que tenga capacidad abundante de reproducción en condiciones **in vitro** para asegurar su reproducción y conservación a nivel comercial; además, debe ser de aplicación fácil (Hernández y Escalona, 2003).

El control biológico ha incrementado su importancia recientemente ya que disminuye la aplicación de agroquímicos, evitando el deterioro de los suelos y la acumulación de residuos químicos en el ambiente (Pal y Mc Spadden, 2006).

Se ha encontrado que la regulación biológica de patógenos foliares, frecuentemente involucra la aplicación de microorganismos antagonistas sobre la

superficie de la hoja (filoplano o filósfera) y que el éxito de dichos antagonistas depende de su capacidad para establecerse como microbiota epífita (Blakeman y Fokkema, 1982).

Se ha encontrado que especies de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas (BAFEs) de la filósfera de las plantas, como las del género *Bacillus*, pueden llegar a tener gran potencial como controladores biológicos debido a su presencia en diferentes tipos de suelos, su tolerancia a altas temperaturas, su rápido crecimiento en medios líquidos y su capacidad de colonizar su superficie foliar (Pal y McSpadden, 2006).

2. Materiales y métodos

2.1. Colecta de campo

Las plantas en estudio fueron tomadas al azar (muestreo al azar eliminando efecto borde) en una parcela de 10 m² cultivada con la variedad de arroz IDIAP Gab 8, bajo el sistema de agricultura orgánica de subsistencia; no se emplearon agroquímicos durante todo el ciclo del cultivo; la zona está ubicada en la comunidad de Los Alvéos, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, República de Panamá. El sitio de muestreo fue seleccionado para la bioprospección de bacterias debido a que no estaba sometido a los efectos de los agroquímicos.

2.2. Aislamiento de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz (*Oryza sativa*).

Se procedió a separar la filósfera de la zona basal de cada una de las plantas de arroz colectadas durante las tres fases fenológicas evaluadas en el cultivo (vegetativa, floración, maduración). Las hojas (filósfera) de las plantas muestreadas fueron procesadas con el objetivo de aislar bacterias epifíticas. Con estos microorganismos (bacterias epifíticas) se realizaron pruebas de identificación y de antagonismo *in vitro* frente a *B. glumae*.

Se tomaron 7 hojas de cada planta muestreada (hojas libres de lesiones) por fase de cultivo (vegetativa, floración, maduración) se procedió a separar la sección apical, media y basal de las hojas. De cada sección se cortaron segmentos de 2x2 cm, para luego proceder con la desinfección de estos. Para ello, se colocaron bajo agua de grifo durante 5 min eliminando todos los residuos de suelo y otras materias extrañas.

Seguidamente, las secciones se colocaron por separado en bolsas plásticas, agregando 20 ml de agua peptonada y homogenizando durante 1 min a 200 rpm (Stomacher Seward®). Se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) de cada sección

foliar sumergida y homogenizada en peptona (Ávila et al., 2014). De estas diluciones se tomaron alícuotas de 0.7 ml y se esparcieron por agotamiento sobre la superficie del agar tripticasa soya (TSA) con un asa de Drigalski, para el aislamiento de bacterias totales (2 réplicas por dilución), incubándose a 28°C por 72 h (Graciano et al., 2006). Transcurrido el tiempo de la incubación, se realizó el recuento de las colonias bacterianas, y mediante un asa se tomaron 2 colonias por réplica, sembrándolas mediante estrías cruzadas en nuevos platos Petri con TSA para fomentar su crecimiento y garantizar su pureza mediante observaciones macro y microscópicas; una vez corroborada la pureza de las cepas, se transfirieron a tubos inclinados con TSA conservando en el refrigerador a 4°C hasta ser enfrentadas *in vitro* al fitopatógeno *B. glumae*.

2.3. Bioensayo dual de las bacterias aisladas de la filósfera del arroz frente al fitopatógeno *B. glumae*.

Durante los ensayos de aislamiento de microorganismos, se obtuvieron sólo bacterias epifíticas, por lo que los procesos de enfrentamiento *in vitro* ante *B. glumae*, fueron específicos para este tipo de microorganismos de la filósfera del arroz.

Se utilizó el método de difusión en agar sugerido por Cristancho et al., 2009. Las bacterias aisladas de la filósfera, así como la *B. glumae*, fueron revivificadas en matraces de vidrio con 20 ml de agua peptonada durante 24 h a temperatura constante (32°C). Transcurrido este tiempo, se difundió *B. glumae* en TSA líquido (1:10). Luego de solidificado el medio de cultivo con el fitopatógeno, se marcaron líneas sobre el plato Petri para dividirlos en 4 secciones, colocando una gota de 3 µl de una de las bacterias epifíticas aisladas de la filósfera en cada apartado. Se realizaron 3 réplicas del enfrentamiento dual y dos controles, uno de ellos sólo con la bacteria *B. glumae* difusa en TSA y otro con las bacterias aisladas de la hoja. Los ensayos se incubaron durante 24 h a 28°C.

La evaluación se realizó por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de la gota radial (mm), al segundo, quinto y octavo día de montado el ensayo. Se obtuvo el diámetro del halo de inhibición del diámetro de la colonia del posible antagonista. Aquellas bacterias que mostraron halos de inhibición \geq a 4 mm de diámetro en 2 de las 3 réplicas serán consideradas como antagónica positiva ante el fitopatógeno.

2.4. Identificación de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz con capacidad antagónica.

Para la identificación de las cepas bacterianas con actividad antagónica contra *B. glumae*, se partió de la revivificación de la bacteria en estudio en agua peptonada, durante 24 h en un agitador orbital; posteriormente se realizó la tinción diferencial de Gram para proceder con las pruebas bioquímicas API (Biomeriux®, Francia), este es un método rápido que permite la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas, además simplifica la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, porque proveen los reactivos listos para su uso o porque son totalmente automatizables (Benavides, 2007). Se utilizó una galería de API 20E Gram positivas y una de API 50CH Gram negativas para cada bacteria a identificar. Las galerías API se incubaron a 28°C en oscuridad por 72 h. Las observaciones se realizaron a las 24 h, 48 h y 72 h.

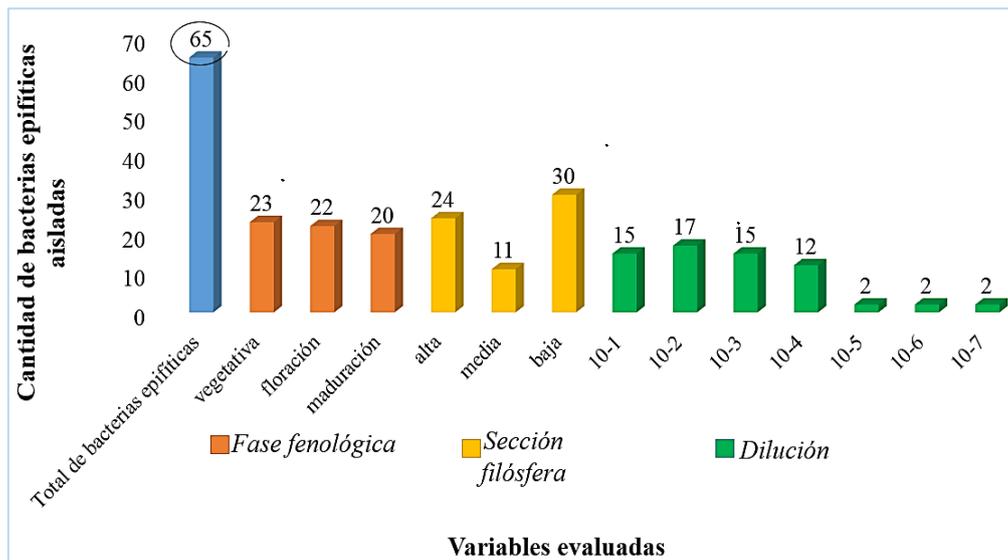
Para la identificación molecular por secuenciación se amplificó por PCR convencional el gen *rpoB*, previa extracción del ADN genómico de la bacteria. Caracterización molecular de los aislamientos. Se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen *rpoB*. La extracción de ADN de las bacterias seleccionadas se realizó con el kit QIAamp® QUIAGEN, a partir de una suspensión bacteriana cultivada en medio Luria Bertani (LB) por 24 horas. La amplificación del gen *rpoB* se realizó mediante el Kit PCR Master Mix (ThermoScientific). Los primers utilizados en la PCR fueron *rpoB1698f* (59-AACATCGGTTTGATCAAC-3) y *rpoB2041r* (59-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3). La PCR se realizó en un termociclador Multigene Optimax de Labnet. El programa para la PCR fue como sigue: denaturación a 94°C por 3 minutos, seguido por 10 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, alineación a 50°C por 1,5 minutos, extensión por 2 minutos a 72°C seguido, por 25 ciclos de denaturación por 1 minuto a 94°C, alineación a 50°C por 1,5 minutos y extensión por 2 minutos a 72°C y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se enviaron para su secuenciación a MacroGen-Korea. Las secuencias obtenidas se limpiaron y ensamblaron en una secuencia consenso que fue alineada con secuencias de la base de datos GenBank del NCBI, mediante la herramienta BLASTn.

3. Resultados

En la prospección de las bacterias epifíticas de la filósfera se aisló un total de 65 bacterias. En la figura 1, se observa la distribución de los aislamientos (número de bacterias) por variable evaluada (Fase fenológica, sección de la hoja y dilución).

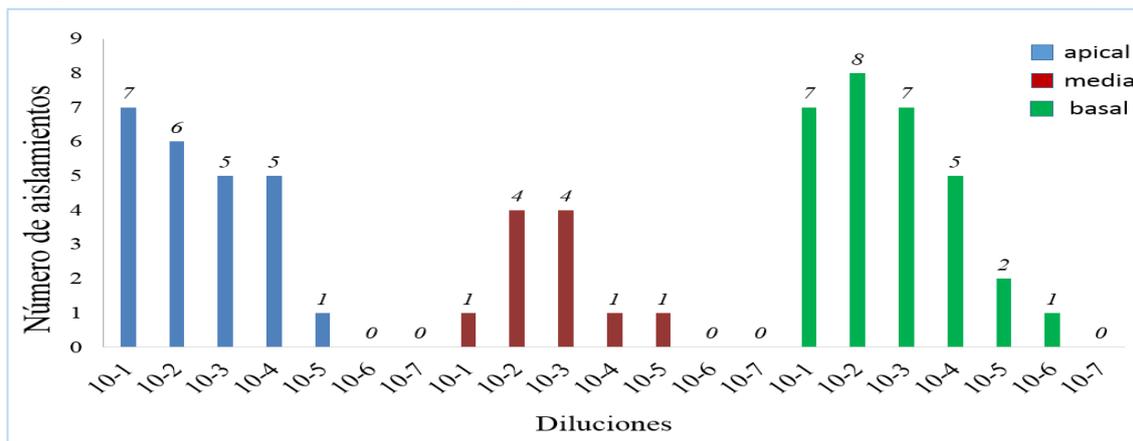
Figura 1. Prospección de bacterias epifíticas de la hoja de arroz, total de bacterias epifíticas, fase fenológica, sección de la filósfera y dilución.

Fuente: elaboración propia.



El análisis de los datos se realizó por medio de pruebas no paramétricas dado que los mismos no presentaron una distribución normal. La figura 2, muestra los resultados totales obtenidos de los aislamientos realizados en 3 secciones de la hoja (apical, media, basal) de *O. sativa* por diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-7}). En la sección basal de la hoja, se registraron más aislamientos (30) en comparación a las demás secciones (dilución 10^{-2}).

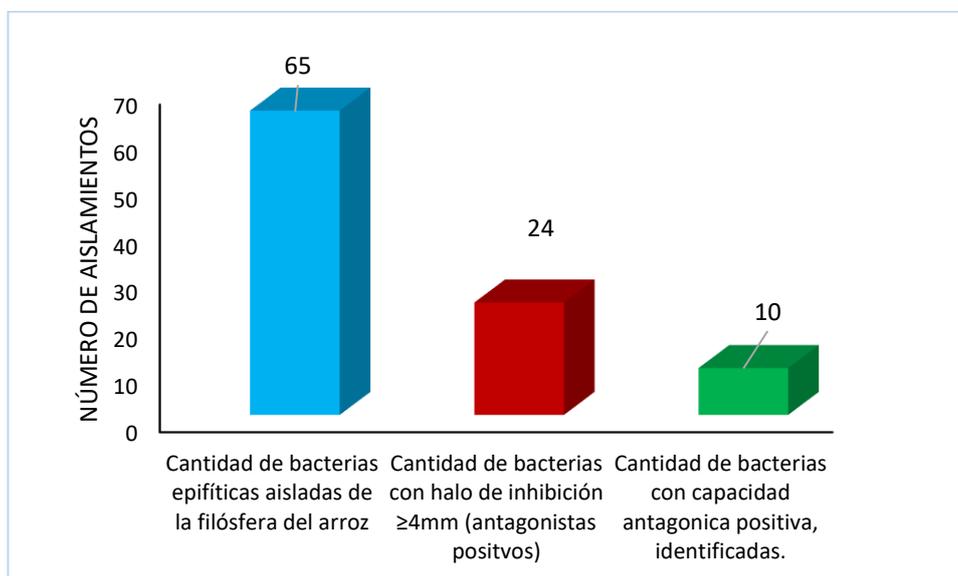
Figura 2. Número de aislamientos registrados en las distintas secciones de la hoja



Fuente: elaboración propia.

De las 65 bacterias epifíticas enfrentadas ante el fitopatógeno *B. glumae*, 24 cepas presentaron halo de inhibición ≥ 4 mm de diámetro, por lo menos en dos de sus 3 réplicas, de estas, se identificaron bioquímicamente las 10 cepas que presentaron mayor potencial antagonista (Figura 3), correspondiendo las 10 al género *Bacillus*.

Figura 3. Cepas bacterianas aisladas de la filósfera del arroz, con diámetros en el halo de inhibición ≥ 4 mm.



Fuente: elaboración propia

Existieron diferencias significativas ($F= 4.966$, g.l.= 2, $p= 0.0086$) (análisis de varianza), entre las cepas evaluadas en cuanto al diámetro del halo de inhibición contra *B. glumae*. Destacando el género *Bacillus* y particularmente la especie *B. subtilis* (Cepa 3) con el mayor diámetro de inhibición promedio, ante el fitopatógeno *B. glumae*. En la

tabla 1 se puede observar que la tendencia de los datos indica que las cepas identificadas con la letra a corresponden a las mejores cepas, seguida por la ab, b y por último la bc (test de medias de Duncan).

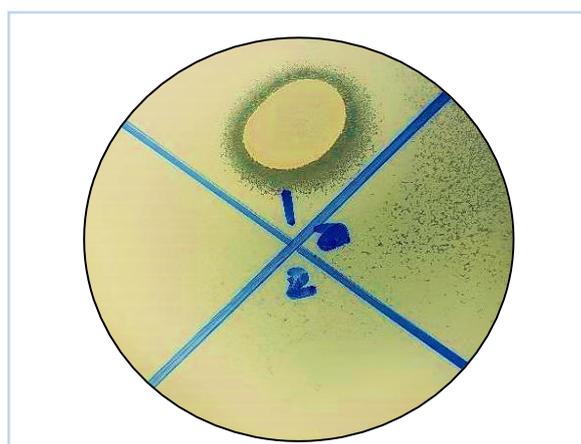
Tabla 1. Valores medios del diámetro del halo de inhibición para el enfrentamiento entre bacterias epifíticas antagonistas frente a *B. glumae* en el cultivo de arroz.

Microorganismo	Etapa	Sección	Dilución	Cepa	Diámetro (mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	vegetativa	Apical	10 ⁻³	cepa 3	14 a
<i>Bacillus subtilis</i>	vegetativa	Apical	10 ⁻³	cepa 10	12 a
<i>Bacillus subtilis</i>	floración	Apical	10 ⁻²	cepa 6	11 a
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	Apical	10 ⁻¹	cepa 8	11 a
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	Basal	10 ⁻¹	cepa 2	10 a
<i>Bacillus licheniformis</i>	vegetativa	Apical	10 ⁻³	cepa 4	9 ab
<i>Bacillus spp</i>	floración	Basal	10 ⁻¹	cepa 9	9 ab
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	Media	10 ⁻³	cepa 7	7 b
<i>Bacillus cereus</i>	vegetativa	Apical	10 ⁻¹	cepa 1	6 bc
<i>Bacillus cereus</i>	vegetativa	Apical	10 ⁻³	cepa 5	6 bc
Promedio					9.5

Fuente: elaboración propia.

En el presente estudio las 10 cepas bacterianas identificadas (antagonistas positivos) superaron los 6 mm, alcanzando un máximo de 14 mm (Cepa 3-*B. subtilis*) Figura 4.

Figura 4. Bacteria epifítica *B. subtilis*, de la sección apical de la hoja, presenta halo de inhibición



Fuente: elaboración propia.

Para considerar el aspecto cuantitativo de la interacción antagónica *bacteria de la filósfera-B. glumae*, se tomaron al azar 2 de las 10 cepas identificadas (bacterias epifíticas de la filósfera del arroz con antagonismo positivo) y se aplicó una prueba de

cinética de crecimiento. Las cepas de la filósfera sometidas a esta prueba corresponden a un *Bacillus spp.* y a un *B. cereus* (tabla 2).

Tabla 2. Cepas seleccionadas para la cinética de crecimiento bacteriano.

Fase Fenológica	Sección de la Filósfera	Dilución	Microorganismo	Código de la cepa	Promedio del halo de inhibición a los 8 días
Floración	Basal	10 ⁻²	<i>Bacillus spp.</i>	FB10 ⁻² 2.1	6
Vegetativa	Apical	10 ⁻¹	<i>B. cereus</i>	BA10 ⁻¹ 2(1)	9

Fuente: elaboración propia.

La cinética de crecimiento permite conocer la velocidad de multiplicación de las células bacterianas aisladas de la rizósfera del arroz en contraste a la cepa de *B. glumae*. Observamos en la tabla 3 y 4 (Datos de absorbancia) que las células de ambas cepas epifíticas de la filósfera del arroz se multiplicaron más rápido que las del patógeno *B. glumae*, durante el periodo evaluado (210 min).

Tabla 3. Datos de la absorbancia *Bacillus spp* vs *B. glumae*

TIEMPO (min)	Absorbancia <i>Bacillus spp</i>	Absorbancia <i>B. glumae</i>
0	0.146	0.111
30	0.201	0.156
60	0.268	0.171
90	0.410	0.271
120	0.615	0.424
150	0.630	0.490
180	0.736	0.608
210	0.912	0.734

Fuente: elaboración propia

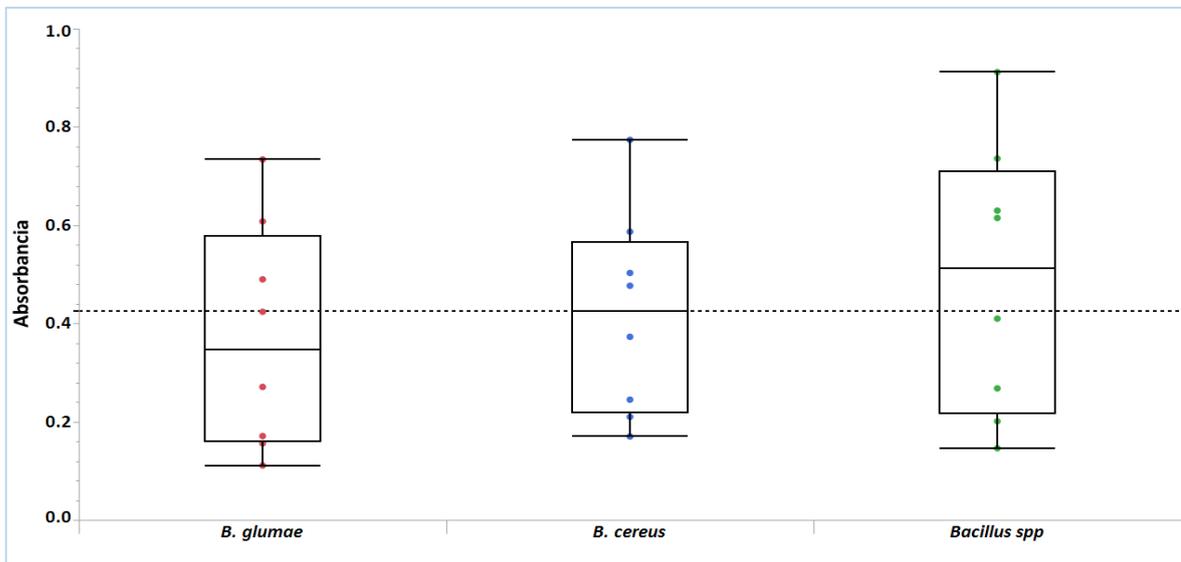
Tabla 4. Datos de la absorbancia Cepa *B. cereus* vs *B. glumae*

TIEMPO (min)	Absorbancia <i>B. cereus</i>	Absorbancia <i>B. glumae</i>
0	0.170	0.111
30	0.210	0.156
60	0.245	0.171
90	0.373	0.271
120	0.477	0.424
150	0.503	0.490
180	0.587	0.608
210	0.774	0.734

Fuente: Elaboración propia

En la figura 5 (análisis de varianza) se observaron diferencias significativas en cuanto al crecimiento (absorbancia) del género *Bacillus* sp en comparación con *B. glumae* y *B. cereus*.

Figura 5. Comparación de absorbancias (crecimiento) entre las cepas *B. glumae*, *B. cereus* y *Bacillus* sp. Análisis de varianza. En línea discontinua se representa las medias.



Fuente: Elaboración propia.

Se presentan a continuación (tabla 6) las salidas de ANOVA, test de Tukey-Kramer y valores correspondientes de p.

Tabla 5. Análisis estadísticos asociados a la absorbancia (crecimiento) en el el tiempo (min) para las cepas *Bacillus* sp, *Bacillus cereus* y *B. glumae*.

ANOVA						
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F	
Especies	2	0.0576386	0.028819	17.4204	0.0002	
TIEMPO (min)	7	1.1796585	0.168523	101.867	<.0001	
Error	14	0.0231607	0.001654			
C. Total	23	1.2604578				

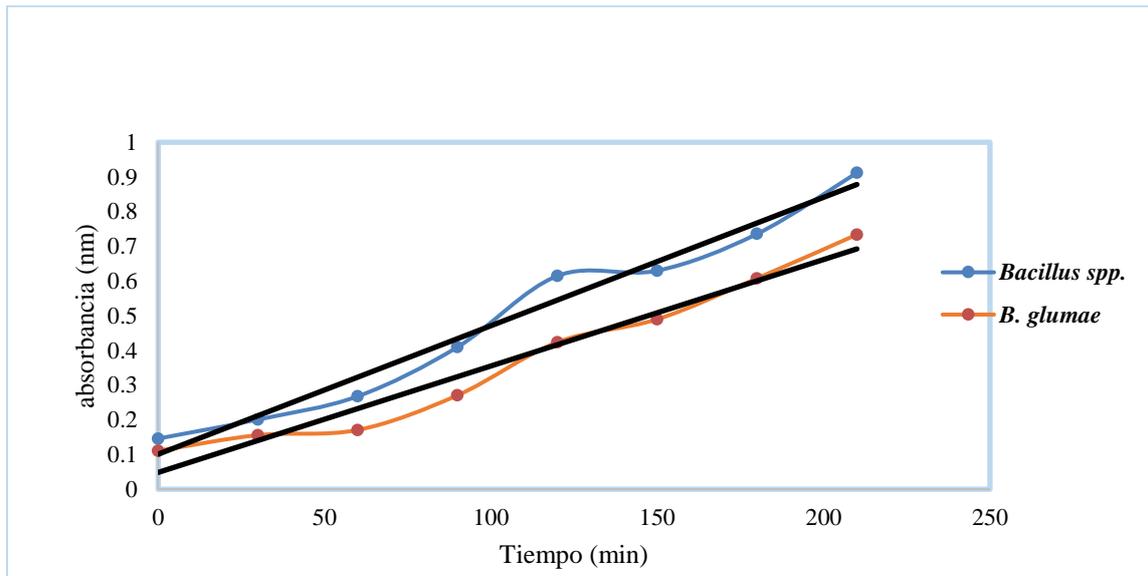
Tukey-Kramer			
Nivel			Media
Bacillus spp	A		0.48975
B. cereus		B	0.417375
B. glumae		B	0.370625

Nivel	- Nivel	Diferencia	Error estándar de la diferencia	Límite de control inferior	Límite de control superior	Valor p
Bacillus spp	B. glumae	0.119125	0.0203368	0.065898	0.1723521	0.0001
Bacillus spp	B. cereus	0.072375	0.0203368	0.019148	0.1256021	0.0083
B. cereus	B. glumae	0.04675	0.0203368	-0.006477	0.0999771	0.0891

Fuente: Elaboración propia

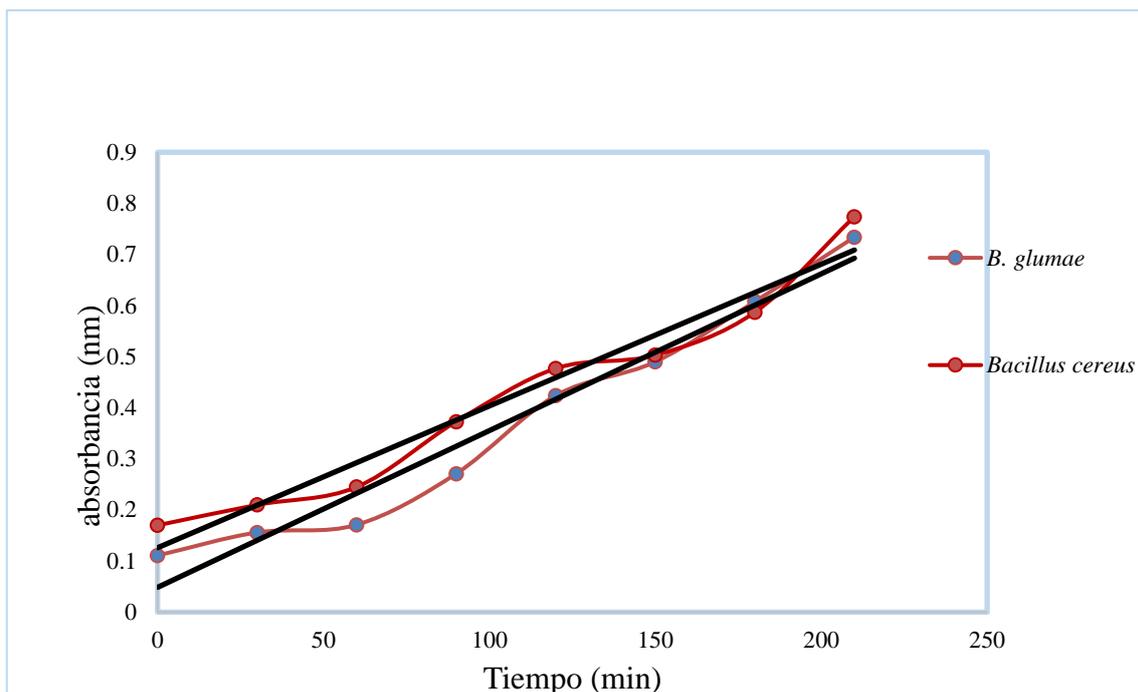
En la figura 6 y 7 se observa la curva de crecimiento de las cepas bacterianas con antagonismo positivo en relación a la curva de crecimiento de *B. glumae*. Fue notoria la diferencia en la velocidad de multiplicación celular de la cepa de *Bacillus spp* en función de la *B. glumae* (Figura 6), a partir de los 60 min de ensayo y continuaba la tendencia a aumentar su crecimiento.

Figura 6. Curva de crecimiento *B. glumae* vs *Bacillus spp*



Fuente: elaboración propia

Por su parte, para la cepa de *Bacillus cereus* se observó un mayor crecimiento en función de *B. glumae* (Figura 7) a partir de los 30 min de ensayo, sin embargo, entre los 150 y 200 min de ensayo el crecimiento de ambas bacterias fue similar, a los 210 min de ensayo la bacteria *B. cereus* incrementa su tasa de multiplicación con tendencia a continuar en fase exponencial superando a *B. glumae*.

Figura 7. Cinética de crecimiento *B. glumae* vs *B. cereus*.

Fuente: elaboración propia

4. Discusión

Los resultados demuestran que el número de aislamientos que se pueden obtener de la filósfera de la planta de arroz están relacionados con la variable sección de la hoja ($F= 4.966$, g.l.= 2, $p= 0.0086$) y la dilución obtenida durante los procesos de muestreo y segregación de la muestra ($F= 5.770$, g.l.= 6, $p< 0.0001$). Lo descrito concuerda con lo manifestado por Okubo et al. (2014) y Sessitsch et al. (2012) quienes señalan que las plantas de arroz representan un hábitat para diversos microorganismos, que colonizan las partes aéreas. El número de aislamientos registrados durante las tres fases fenológicas fue estadísticamente similar ($F= 0.107$, g.l.= 2, $p< 0.8986$). El diseño experimental comparativo es capaz de explicar el 22% de los aislamientos ($R^2_{\text{ajust}}= 0.2246$, $F= 4.5635$, g.l.= 123, $p< 0.0001$). En cuanto a su distribución en la hoja de las plantas de arroz, los aislamientos bacterianos se localizaron principalmente en la base (parte baja) y ápice (parte alta), esto podría guardar relación con las características propias de la filósfera, como un ambiente que está sujeto a continuas variaciones en humedad y temperatura, exposición a la radiación ultravioleta y limitación de nutrientes; por ello estas bacterias deben ser capaces de adaptarse a las fluctuaciones de estos factores abióticos (Sartori et al., 2017), en contraposición a la abundancia de

microorganismos que suele encontrarse en la rizósfera, cuyas características abióticas son más favorables. Por lo tanto, el potencial biológico de los agentes bio controladores de patógenos, requieren una estrategia de supervivencia al estrés ambiental y el mantenimiento de una población umbral en las diferentes superficies de la hoja de arroz.

En relación con el efecto de la radiación ultravioleta (UV-B), frente a un aumento de la radiación UV-B muchos de los cambios observados, tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, son principalmente atribuidos a la orientación de las hojas que tiene cada uno de estos grupos de plantas, lo que finalmente influirá en la capacidad de interceptar este tipo de radiación. Las especies monocotiledóneas como el arroz, que presentan hojas delgadas con orientación vertical interceptan menos la radiación UV-B que las dicotiledóneas por presentar estas hojas anchas y de orientación más bien horizontal, y por lo tanto son más susceptibles al daño (He et al., 1993). Por tal motivo, las plantas monocotiledóneas parecen ser generalmente más tolerantes a niveles elevados de radiación UV-B y se sugiere pudieran favorecer el establecimiento de poblaciones microbianas más abundantes y que pudieran contrarrestar naturalmente a otros microorganismos fitopatógenos.

Así también, muchos microorganismos que viven en la superficie de la hoja están expuestos al efecto de la radiación ultravioleta en parte o todo su ciclo de vida. Para estos microorganismos, la radiación UV impone una intensa selección, ya que a menudo son vulnerables al efecto UV durante los procesos de esporulación, dispersión e infección. El daño en el DNA es uno de los principales efectos observados en algunos hongos y bacterias expuestas a UV, incluyendo patógenos y microorganismos implicados en el proceso de descomposición de la materia orgánica en el suelo (Paul y Gwynn-Jones, 2003). Los daños que provoca la radiación UV-B en el DNA de estos microorganismos genera -vía mutagénesis- cambios en su composición genotípica, los que son heredables, aumentando de esta manera la variación genética en este nivel trófico. Estudios en campo del efecto de la UV en sistemas naturales muestran una reducción sostenida de herbívoros conforme aumenta la radiación UV-B y, por el contrario, la reducción de la radiación UV-B mediante filtros tiende a aumentar la severidad de las enfermedades (Paul, 2000). En este sentido, es importante hacer la distinción entre el efecto directo de la radiación UV-B que afecta la tasa de crecimiento de

microorganismos y el efecto indirecto de la luz ultravioleta que altera la composición química de la planta hospedante, haciéndola más resistente al ataque de distintos patógenos.

Caldera (2011), evaluó 23 cepas bacterianas (sin identificar) contra *B. glumae*, encontrando diámetros del halo de inhibición inferior a 5 mm, mientras que en el presente estudio las 10 cepas bacterianas identificadas (antagonistas positivos) superaron los 6 mm, alcanzando un máximo de 14 mm (Cepa 3-*B. subtilis*).

Las bacterias del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces en los cultivos (Fernández 2001). Otros autores, han reportado la capacidad de miembros del género *Bacillus* de ejercer efecto biocontrolador sobre *P. oryzae* en el cultivo del arroz (Velusamy y Gnanamanickam 2008; Tejera et al., 2011).

Las bacterias esporuladas del género *Bacillus spp* son efectivas para inhibir el desarrollo de hongos entre los que se destacan: *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria solani* (Guillén-Cruz et al., 2005). Ensayos in vitro han demostrado inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani* mediante el uso de especies de *Bacillus* (Blanco, 2012).

La inhibición producida por las cepas evaluadas tiene una relación directa con la actividad competidora por los nutrientes entre el patógeno y la cepa en mención, se deduce entonces que, al presentar una tasa metabólica más elevada, este asimila los nutrientes más rápido, logrando así, un tiempo de duplicación más veloz que el patógeno, generándose metabolitos secundarios que pudieran definir mediante el halo de inhibición, el efecto inhibitorio en el crecimiento del patógeno.

5. Conclusiones

- La densidad de población de los microorganismos aislados, no varían significativamente con la etapa fenológica de la planta, sin embargo, se presentan diferencias entre las distintas secciones de la hoja estudiadas, aislándose una mayor cantidad de bacterias epifíticas en la base y el ápice de la hoja de arroz.
- En este estudio se aislaron principalmente cepas bacterianas epifíticas de la filósfera del arroz, del género *Bacillus* (*Bacillus spp*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) con

capacidad antagónica frente a *B. glumae*. Logrando identificarse dos especies de *Bacillus sp.*

- El género *Bacillus sp* es un buen candidato como biocontrolador frente el patógeno *B. glumae* en las diferentes etapas fenológicas del cultivo de arroz.

Referencias bibliográficas

- Ávila, C., Goretti, R., Lizcano T. (2014). Aislamiento de *Trichoderma sp.*, en las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura de Campoalegre (Huila). *Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura*, 1(1), 15-20. <https://revistas.sena.edu.co/index.php/raaa/article/view/145>
- Bellido, J. (2005). *Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de la cebolla* [Tesis de pregrado, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, Puerto Rico]. <https://scholar.uprm.edu/handle/20.500.11801/1110>
- Benavides, H. (2007). *Propuesta de guía de aplicación de técnicas de microbiología (bacterias y hongos) para ser utilizado en Microbiología General* [Tesis de pregrado, Universidad de El Salvador, El Salvador]. <http://ri.ues.edu.sv/4768/1/16100029.pdf>
- Blakeman, J. P., Fokkema, N. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review Phytopathology*, 20, 167-190. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.001123>
- Blanco-Zapata, D. (2012). *Evaluación de bacilos aerobios formadores de endosporas (Bafes) para el control biológico de Rhizoctonia Solani Kuhn en el cultivo de papa criolla (Solanum tuberosum Grupo Phureja)* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20223>
- Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C., Padrón-Corral, E. y Reyes-Valdés, M. (2006). *Bacillus spp.* como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (2), 105-114. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224204>

- Castro, R., Pesántez, M., Flores, V., Díaz, C., Castro, Li., Alvarado-Capó, Y. (2015). Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 133-138. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-7522015000200007
- Cristancho, J., Zea, S, Agudelo, D. (2009). Actividad Antagónica entre Bacterias Epibióticas Aisladas de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano y su Relación con la Macroepibiosis. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 25-38. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612009000100002
- Graciano, A., Pérez Vargas, J., Anaya Reza, O., Chang Solís, C, Kikey, Membrillo Venegas, I. (2006). Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 41, 1-9. <https://www.redalyc.org/pdf/1816/181620500027.pdf>
- Fernández, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62, 96-100. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6578>
- He, J., Huang, L., Chow, W., Whitecross, M., Anderson, J. (1993). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on rice and pea plants. *Aust J Plant Physiol*, 20 (2), 129-142. https://www.researchgate.net/publication/262958026_Effects_of_Supplementary_Ultraviolet-B_Radiation_on_Rice_and_Pea_Plants
- Hernández, L., Escalona, M. (2003). Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *Revista de Divulgación Científica y Tecnología de la Universidad Veracruzana*, 16 (1), 19-25. <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/5516>
- Instituto Nacional de Estadística y Censo. (2016). *Panamá en Cifras*. https://www.contraloria.gob.pa/INEC/Publicaciones/subcategoria.aspx?IDCATEGORIA=17&ID_SUBCATEGORIA=45&IDIDIOMA=1
- Okubo, T., Ikeda, S., Sasaki, K., Ohshima, K., Hattori, M., Sato, T., Minamisawa, K. (2014). Phylogeny and functions of bacterial communities associated with field-grown rice shoots. *Microbes Environmental*, 29(3), 329-332. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25130883/>

- Pal, K., McSpadden, G. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1-20. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Paul, N., Gwynn-Jones, D. (2003). Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (1), 48-55.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169534702000149>
- Paul, N. (2000). Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. *Environmental Pollution*, 108 (3), 343-355. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00213-4](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00213-4)
- Sartori, M., Nesci, A., García, J., Passone, M., Montemarani, A., Etcheverry, M. (2017). Efficacy of epiphytic bacteria to prevent northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* in maize. *Revista Argentina de Microbiología*, 49 (1), 75-82.
<https://www.elsevier.es/en-revista-revista-argentina-microbiologia-372-resumen-eficacy-epiphytic-bacteria-prevent-northern-S0325754116300980>
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., Van Overbeek, L., Brar, D., Van Elsas, J., Reinhold-Hurek, B. (2012). "Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis." *APS Journal*, 25(1), 28–36.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21970692/>
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M., Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42 (3), 131-138.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
- Velusamy, P., Gnanamanickan, S. (2008). The effect of bacterial secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens of rice. *Soil Biology*, 14, 93-106.
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74543-3_5