

Evaluación de las cepas *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 sobre cuatro hongos patógenos de arroz

Luisa María Valencia Riascos

Asesor:

I.A. Msc Juan José Arroyave Toro

Co-Asesora:

Dr. Valeska Villegas Escobar

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

Departamento de Ciencias

Universidad EAFIT

Febrero 2019

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mi madre, por ser el motor que me impulsa a seguir adelante
y la mayor alegría de mi vida.

Agradecimientos

A Dios por acompañarme en todo momento y haberme dado todas las bendiciones que hay en mi vida.

A mi asesor Juan José Arroyave y a mi co-asesora Valeska Villegas por toda su paciencia, ayuda y asesoramiento que hicieron posible la culminación de este proyecto.

A mi familia y amigos por acompañarme y motivarme durante todo mi proceso de formación universitaria.

A la Universidad EAFIT por el conocimiento y los espacios de aprendizaje brindados.

Este trabajo fue posible gracias a los contratos 166 y 139 suscritos con el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial en las categorías "Contrato de acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados de la Investigación Científica" y "Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados con fines Comerciales", respectivamente.

Resumen

El arroz (*Oryza sativa*) es un cultivo de gran importancia a nivel mundial, puesto que además de ser la principal fuente de alimento para la mitad de la población humana y tener un alto valor nutricional, también representa la mayor fuente de ingresos en muchos países en desarrollo. Sin embargo, este cultivo es susceptible a sufrir pérdidas en su producción debido a condiciones climáticas adversas, plagas, enfermedades, entre otros.

En el presente trabajo se muestran los resultados de una investigación con cuatro hongos fitopatógenos de arroz *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, y *Gaeumannomyces graminis* y las cepas de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 (*Bs15*) y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 (*Ba959*) como alternativa para su control. Se utilizaron las células a nivel *in vitro* de *Bs15*, *Ba959* y su combinación (*B15-959*) para evaluar el efecto antagónico, mostrando un mayor efecto inhibitorio la cepa *Ba959* o la combinación de ambas en *H. oryzae*, *R. solani* y *G. graminis*; mientras que el hongo *P. oryzae* mostró una inhibición igual para todos los tratamientos. También se evaluó el Sobrenadante Libre de Células (SLC) de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959* creciendo sumergido en medio D, óptimo para la producción de lipopéptidos; aquí los tratamientos *Ba959* y *B15-959* presentaron mayor porcentaje de inhibición para los hongos *H. oryzae*, *R. solani* y *G. graminis*. Para el ensayo *in vivo* se evaluó el efecto de las células y los SLCs en el peso seco de la raíz, brote y porcentaje del tamaño de la lesión de *G. graminis* en plantas de arroz. El tratamiento de sobrenadante *B15-959* mostró diferencias significativas en el peso del brote, que fue similar al del control absoluto, con plantas sanas, y el porcentaje de tamaño de la lesión, que fue el menor de todos los tratamientos.

Tabla de Contenidos

Introducción	1
Marco Teórico.....	3
Generalidades del arroz (<i>Oryza sativa</i>).....	3
Hongos patógenos que afectan el cultivo de arroz.....	5
Tizón del Arroz – <i>Pyricularia oryzae</i>	5
Helmintosporosis o mancha parda - <i>Helminthosporium oryzae</i>	7
Añublo de la vaina – <i>Rhizoctonia solani</i>	9
Mancha naranja o mal del pie – <i>Gaeumannomyces graminis</i>	11
Control biológico de enfermedades en plantas	13
Familia surfactina.....	14
Familia iturina.....	15
Familia fengicina	15
Justificación	17
Objetivos.....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos específicos	18
Metodología	19
Microorganismos utilizados y activación	19
Evaluación del antagonismo de <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i>	20
Evaluación del sobrenadante libre de células de <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i>	21
Purificación de lipopéptidos de <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i>	22
Evaluación de las células y sobrenadantes de <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i> sobre el hongo <i>G. graminis</i> (pruebas en invernadero)	23
Análisis estadístico.....	24
Resultados.....	26
¿Hay diferencia en la inhibición de los cuatro hongos tratados con las células de <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i> ?	26
¿Hay diferencia en la inhibición de los cuatro hongos con los sobrenadantes de <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i> ?	28
¿Hay diferencia en la producción de lipopéptidos de <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i> al crecer en medio D?.....	29
¿Hay diferencia en el peso del brote y la raíz de plantas de arroz infectadas con <i>G. graminis</i> al ser tratadas con <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i> ?.....	30
¿Hay diferencia en el porcentaje de área enferma de plantas de arroz infectadas con <i>G. graminis</i> al ser tratadas con <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i> ?.....	36
Discusión.....	37
Conclusiones.....	41
Perspectivas a futuro	42
Lista de referencias	43

Lista de tablas

Tabla 1. Microorganismos utilizados para las pruebas.	20
Tabla 2. Tratamientos utilizados en los ensayos de invernadero.	23
Tabla 3. Cantidad de lipopéptidos producidos en cada cultivo.	30

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Pyricularia oryzae</i> y lesiones en hojas de arroz provocadas por <i>Pyricularia oryzae</i>	6
Figura 2. Ciclo de infección de <i>Helminthosporium oryzae</i> y lesiones en hojas provocadas por el hongo	8
Figura 3. Lesiones en arroz provocadas por <i>Rhizoctonia solani</i> y ciclo de vida del hongo .	10
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Gaeumannomyces graminis</i> y lesiones provocadas por el hongo en los tallos	12
Figura 5. Estructura de los compuestos pertenecientes a las familias surfactina, iturina y fengicina.....	15
Figura 6. Montajes para las pruebas de antagonismo con la circunferencia de <i>Bs15</i> (A) y el sobrenadante de <i>Ba959</i> (B) sobre <i>P. oryzae</i>	21
Figura 7. Plantas de arroz en el invernadero.....	25
Figura 8. Ensayo de antagonismo para <i>P. oryzae</i> . Control (A), células de <i>Ba959</i> (B) y células de <i>Bs15</i> (C).	27
Figura 9. Porcentaje de inhibición de <i>Bs15</i> , <i>B15-959</i> y <i>Ba959</i> sobre <i>P. oryzae</i> , <i>H. oryzae</i> , <i>R. solnai</i> y <i>G. graminis</i> a nivel <i>in vitro</i>	27
Figura 10. Ensayo de antagonismo con SLC de <i>Bs15</i> , <i>Ba959</i> y <i>B15-959</i> para <i>G. graminis</i> comparando el control (A), el tratamiento <i>Bs15</i> (B), el tratamiento <i>Ba959</i> (C) y el tratamiento <i>B15-959</i> (D).....	28
Figura 11. Porcentaje de inhibición de los SLCs de <i>Bs15</i> , <i>B15-959</i> y <i>Ba959</i> sobre <i>P. oryzae</i> , <i>H. oryzae</i> , <i>R. solani</i> y <i>G. graminis</i> a nivel <i>in vitro</i>	29
Figura 12. Plantas de arroz A) Control absoluto durante la última semana del ensayo. B) Control con hongo durante la segunda semana del ensayo. C) Control con hongo durante la última semana del ensayo	31
Figura 13. Planta del tratamiento de células de <i>Bs15</i> ; planta del tratamiento de células de <i>B15-959</i>	32
Figura 14. Comparación entre las plantas del control absoluto (A), el tratamiento de sobrenadante de <i>B15-959</i> (B) y el control negativo (C)	33
Figura 15. Peso seco de la raíz de plantas de arroz infectadas artificialmente con <i>G. graminis</i> . Ensayo 1 en invernadero.....	34
Figura 16. Peso seco del brote de plantas de arroz infectadas artificialmente con <i>G. graminis</i> . Ensayo 1 en invernadero.....	34
Figura 17. Peso seco de la raíz de plantas de arroz infectadas artificialmente con <i>G. graminis</i> . Ensayo 2 en invernadero.....	35
Figura 18. Peso seco del brote de plantas de arroz infectadas artificialmente con <i>G. graminis</i> . Ensayo 2 en invernadero.....	35
Figura 19. Área enferma de las plantas de arroz infectadas con <i>G. graminis</i> . Ensayo 2 en invernadero.	36

Introducción

La importancia del arroz como cultivo comprende desde lo económico hasta lo social y cultural, puesto que este alimento es consumido por más de la mitad de la población mundial y a su alrededor se han desarrollado culturas, dietas y la economía de muchos países en desarrollo (Gnanamanickam, 2009c), como China, India e Indonesia, que son los principales productores de este alimento (FAO, 2018b). Al igual que muchos otros cultivos, el arroz se encuentra a la merced de variadas condiciones ambientales y fisiológicas que lo afectan y lo vuelven susceptible a cerca de 50 enfermedades causadas por hongos, bacterias, parásitos (nematodos) y virus (Mew & Gonzales, 2002). Entre estos, algunos de los que generan mayor preocupación tanto en Colombia como en el resto de países productores son *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Gaeumannomyces graminis*, causantes de las enfermedades conocidas como tizón del arroz, mancha parda o helmintosporosis, añublo de la vaina de arroz y mancha naranja o mal del pie, respectivamente; puesto que en condiciones propicias para el desarrollo de sus respectivas enfermedades pueden llegar a acabar con el 50% del cultivo (Gnanamanickam, 2009b; Jatoi et al., 2016; Lee & Rush, 1983).

Estos microorganismos producen diferentes tipos de lesiones en diferentes partes de la planta y en cualquiera de sus estadios de desarrollo, además de presentar una amplia distribución que hace más difícil su control. Generalmente las estrategias para el manejo de estas enfermedades se basan en fungicidas químicos como triciclazol, propiconazol o validamicina que, aunque resultan efectivos, su uso excesivo termina por crear resistencia en los organismos patógenos, además de generar residuos indeseados que afectan la salud y el medio ambiente

(Khalili et al., 2012), motivo por el cual muchos de ellos ya han sido prohibidos en varios países (The Commission of the European Communities, 2002).

Como alternativas para el manejo de estas enfermedades, algunas investigaciones se han centrado en microorganismos que produzcan metabolitos secundarios con actividad contra hongos fitopatógenos. Los metabolitos secundarios son compuestos que no son esenciales para el crecimiento normal de un organismo pero cuentan con funciones adaptativas sirviendo como compuestos de defensa o señalización en interacciones ecológicas (Osbourn, 2010). Aunque se ha encontrado evidencia de la formación de estas moléculas en los genomas de ciertas especies de arqueas, la producción de metabolitos secundarios se ha estudiado de forma más detallada en plantas y bacterias (S. Wang & Lu, 2017), y su alta variabilidad les permite ser utilizados como armas competitivas contra bacterias, hongos, plantas e insectos, como agentes de simbiosis, hormonas sexuales o incluso efectores de diferenciación (Demain & Fang, 2000).

Entre los organismos que producen metabolitos secundarios, las especies del género *Bacillus*, principalmente *Bacillus subtilis*, y *Pseudomonas* han demostrado un gran potencial antifúngico y se han convertido en el centro de interés para desarrollar una nueva forma de control de enfermedades en cultivos (Raaijmakers et al., 2010).

Marco Teórico

Generalidades del arroz (*Oryza sativa*)

El arroz (*Oryza sativa*) se considera una planta anual semiacuática en climas templados y subtropicales, aunque en climas tropicales puede sobrevivir como perenne; su ciclo de vida se puede dividir en dos etapas: la fase vegetativa, que incluye los estadios de germinación, plántula y macollamiento; y la fase reproductiva, con el inicio del primordio floral y la panícula (Olmos, 2007). Cuando están maduras, las plantas poseen un tallo principal con cierta cantidad de macollos, los cuales pueden desarrollar su propio sistema de raíces y ser independientes del brote original, la altura de las plantas puede variar de 0.4 m a 1 m y el número de macollos puede variar de 3 a 15 aunque no todos son fértiles (Olmos, 2007). El periodo de maduración de los granos de arroz varía entre 15-40 días dependiendo de la temperatura y es el momento en el que el grano incrementa su tamaño y peso acumulando almidón y azúcares, aunque pueden presentarse diferencias en cuanto a los ciclos de crecimiento y desarrollo dependiendo de la variedad que se siembre, sobretodo en la duración de la fase vegetativa (Olmos, 2007).

El arroz es un cultivo con una gran relevancia a nivel mundial, debido a que cerca del 50% de las calorías consumidas por la población humana provienen del trigo, el maíz y el arroz, y es este último el que proporciona el 21% de energía y el 15% de proteína para los seres humanos (Gnanamanickam, 2009c); sin embargo no todo el arroz producido se utiliza para alimentar a la población humana, puesto que según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), entre 2016 y 2017 de las 501.2 millones de toneladas de arroz producidas, 400.6 se utilizaron para alimentación humana y 17.8 para alimentación de animales (FAO, 2018b). La importancia nutricional del arroz es otro factor importante a la hora

de considerarlo como un alimento necesario para garantizar la seguridad alimentaria, puesto que este es rico en carbohidratos y es una buena fuente de vitaminas del complejo B; una porción de 300 g de arroz diario suple del 2-5% de la ingesta recomendada de calcio, folato y hierro; del 9-17% de tiamina (Vitamina B1), riboflavina (Vitamina B2) y niacina (Vitamina B3); y el 21% de zinc (Kennedy, Burlingame, & Nguyen, n.d.).

Históricamente el arroz empezó a cultivarse hace aproximadamente 6.500 años en los valles del sur y sureste de Asia (Gnanamanickam, 2009c), donde actualmente se cultiva cerca del 90% de arroz consumido en el mundo, con China, India e Indonesia como los mayores productores de la región (FAO, 2018b); en América se produce el 5%, el 4% en África, y el 1% en el resto del mundo (Federación Nacional de Arroceros (FEDEARROZ), 2018a). A excepción de Canadá, el arroz es un cultivo que está presente en todos los países del continente americano, donde Brasil, Estados Unidos, Colombia, Perú, Argentina, Ecuador y Uruguay son los mayores productores de grano por área, mientras que los mayores consumidores de este alimento son Cuba (72 kg), Costa Rica (53 kg), Panamá (60 kg), República Dominicana (50 kg), Ecuador (47 kg), Haití (47 kg), Perú (45 kg) y Brasil (43 kg). En Colombia, el arroz es el tercer producto agrícola en extensión cultivado después del café y el maíz, con 595.375 hectáreas sembradas durante el año 2017 (Federación Nacional de Arroceros (FEDEARROZ), 2018b), y de acuerdo con el último Censo Nacional Arrocero, realizado en 2016, es posible distinguir cinco zonas arroceras en el territorio: Centro, Llanos orientales, Bajo Cauca, Costa norte y Santanderes, dentro de las cuales los departamentos de Casanare, Tolima y Meta fueron los que tuvieron una mayor participación en la producción de ese año con 28.6%, 23.5% y 13.8%, respectivamente (Federación Nacional de Arroceros (FEDEARROZ), 2017).

Por todo lo mencionado anteriormente el arroz es uno de los cereales de mayor importancia para mantener la seguridad alimentaria. La FAO estima que a nivel mundial 40 países, de los cuales 31 están en África, necesitan ayuda externa para suplir sus necesidades de alimentación y cita como responsables de esta situación factores como: 1) un déficit en la producción o suministro de alimentos por la pérdida de cosechas o desastres naturales; 2) falta de acceso por parte de la población debido a ingresos muy bajos o precios de alimentos excesivamente altos; y 3) conflictos internos que provocan la afluencia de desplazados o refugiados a zonas que no pueden suplir sus necesidades alimentarias (FAO, 2018a). A estas pérdidas de cultivos debido a condiciones sociales o de carácter abiótico se suman aquellas provocadas por animales, malas hierbas y patógenos que, se estima, son responsables de entre el 20% y 40% de pérdidas en la producción agrícola global (Ficke et al., 2012). El arroz no es la excepción, ya que este puede ser susceptible al ataque de varias plagas y hongos patógenos entre los cuales se encuentran *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Gaeumannomyces graminis*.

Hongos patógenos que afectan el cultivo de arroz

Tizón del Arroz – *Pyricularia oryzae*

El hongo *Pyricularia oryzae* (forma sexual *Magnaporthe oryzae*) provoca la enfermedad más común del arroz y una de las que genera más pérdidas de este cultivo, conocida como “tizón del arroz” (Talbot, 2003); la enfermedad se encuentra reportada en cerca de 85 países y pueden presentarse pérdidas de hasta 50% de los cultivos (Gnanamanickam, 2009b). Este hongo ascomiceto es considerado hemibiotrófico puesto que, durante la etapa inicial de infección necesita de tejido vivo para posteriormente necrosar el tejido vegetal en el que se encuentra, pero

continúa alimentándose de él para sobrevivir y reproducirse (Talbot, 2003). La actividad patógena producida por el hongo provoca en la planta unas lesiones características en forma elipsoidal y de colores que van desde el verde claro hasta el verde oscuro con bordes café, dichas manchas se observan después de los 5 o 7 días de la inoculación y se pueden encontrar a lo largo de las hojas y el tallo, e incluso en las raíces (Ribot et al., 2008).

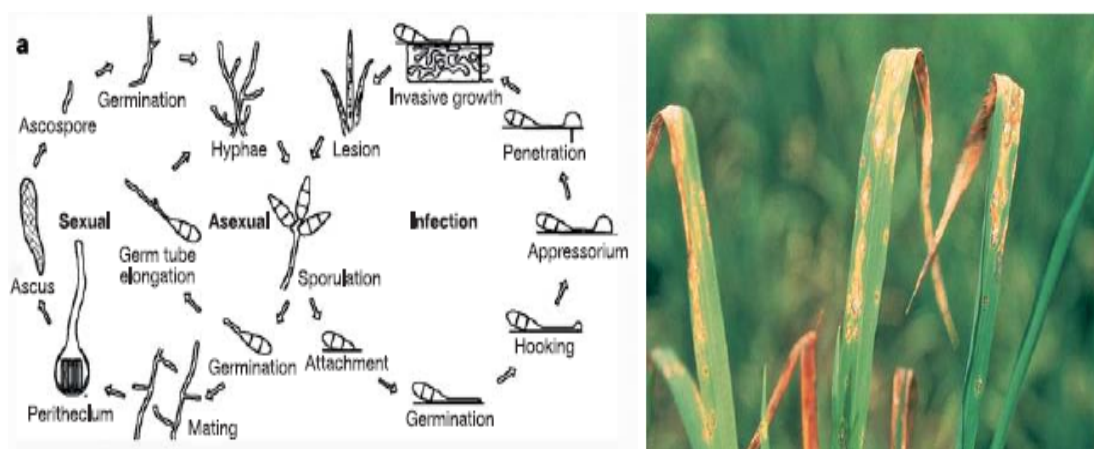


Figura 1. Ciclo de vida de *Pyricularia oryzae* (Dean et al., 2005); lesiones en hojas de arroz provocadas por *Pyricularia oryzae* (Agrios, 2005).

El ciclo de infección de *Pyricularia oryzae* empieza cuando una de sus esporas se adhiere a la superficie de la hoja de arroz y seguidamente forma una célula especializada para la infección llamada apresorio, la cual facilita su acceso al tejido vegetal provocando una gran presión de turgencia en la célula infectada (Dean et al., 2005). Una vez ha penetrado el tejido del hospedero, el hongo desarrolla hifas que se esparcen por el interior de la célula y posteriormente alcanzan las células vecinas (Ribot et al., 2008), este proceso de infección dura tan solo 24 horas (Gupta & Chattoo, 2007) y durante este tiempo la planta activa mecanismos de defensa regulados por genes aún no identificados; sin embargo, se desconoce las causas precisas de por qué dichos mecanismos terminan fallando (Ribot et al., 2008)

Actualmente, el tratamiento principal para la enfermedad del tizón de arroz es el control químico, que implica el uso de fungicidas, como triciclazol, fenoxanil, probenazole; o antibióticos como blastidina o kasugamicina; sin embargo este método químico de control no siempre es ideal, puesto que puede traer consecuencias negativas para el ambiente y la salud humana, además de promover el surgimiento de cepas resistentes debido a su uso constante (Gnanamanickam, 2009b). También se ha evaluado la posibilidad de usar otros organismos como control biológico, entre los cuales destacan especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* (Gnanamanickam, 2009a).

Helmintosporosis o mancha parda - *Helminthosporium oryzae*

Un hongo ascomiceto que genera gran preocupación es *Helminthosporium oryzae* (syn. *Bipolaris oryzae*, forma sexual *Cochliobolus miyabeanus*) (Mycobank, 2016a), que provoca la enfermedad conocida como Helmintosporosis o mancha parda, considerada como la enfermedad más devastadora para el arroz en el mundo, debido a que éste microorganismo fue el responsable de la pérdida de producción durante los años 1942-1943 en la región de Bengala, India en un episodio conocido como la “Gran hambruna de Bengala”; cerca de 2 millones de personas murieron debido a la escasez de alimento (Padmanabhan, 1973). *H. oryzae* puede provocar entre el 7- 45% de pérdidas en los cultivos de arroz (Jatoi et al., 2016), puesto que causa infección en cualquiera de las etapas de crecimiento de la planta y está presente en todas las áreas donde se cultiva este cereal en el mundo (Khalili et al., 2012), aunque ocurre principalmente en ambientes donde el suministro de agua es escaso y hay desequilibrio en los nutrientes del suelo, especialmente nitrógeno (Barnwal et al., 2013); estas condiciones ambientales también favorecen otras enfermedades, como la del añublo de la vaina de arroz provocada por *Rhizoctonia solani*

(Ou, 1985) y el tizón del arroz, provocada por *Pyricularia oryzae* (Savary et al., 1997).

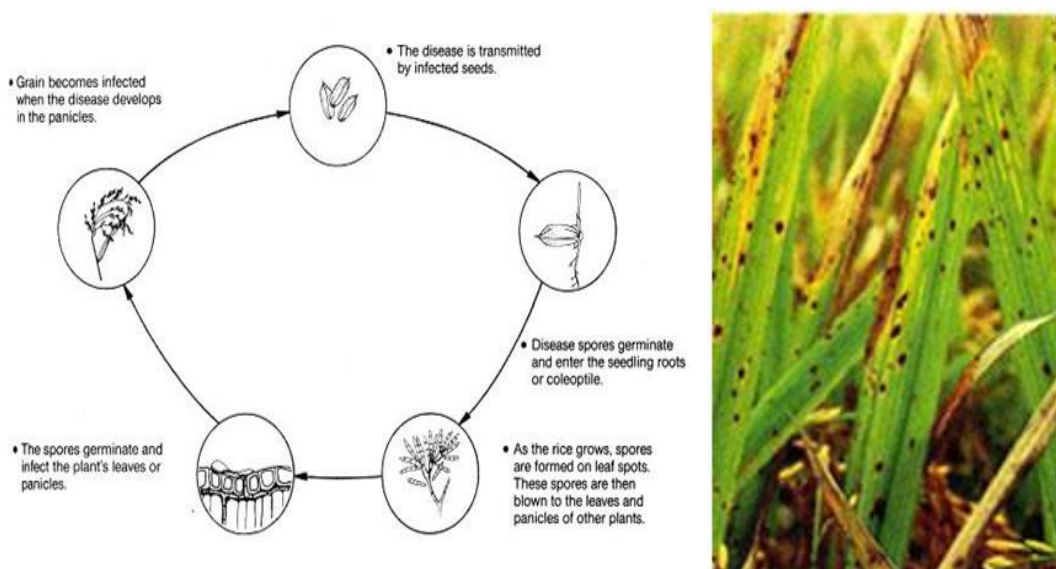


Figura 2. Ciclo de infección de *Helminthosporium oryzae* y lesiones en hojas provocadas por el hongo (Development of e-courses for B. Sc Agriculture, n.d.)

La helmintosporosis puede aparecer en diferentes partes de la planta como el coleóptilo, las hojas y las vainas foliares; en las hojas la enfermedad se reconoce por la presencia de manchas café con centro gris o blanco de forma cilíndrica u ovalada y usualmente con halo amarillo, aunque las manchas más jóvenes son pequeñas, circulares y de color café oscuro o con tonalidades púrpura (Sunder et al., 2014). El hongo produce micelio inter e intracelular de color café grisáceo o café oscuro en los tejidos afectados, aunque cuando se cultiva en laboratorio su color puede ser gris o negro y se ha reportado que puede producir fitotoxinas como ergosterol y cochliobolin (Sunder et al., 2014), estas fitotoxinas pueden ser específicas para cada huésped y se encargan de suprimir el mecanismo de defensa en la planta al interferir en la producción de fenoles (Vidhyasekaran et al., 1986).

Para el tratamiento de la helmintosporosis se ha comprobado que existen muchos fungicidas que funcionan bien contra la enfermedad como el hexaconazol y el propiconazol, los cuales demuestran ser más efectivos rociándose en las hojas y no como tratamiento para las semillas o las raíces (Sunder et al., 2014). En cuanto al control biológico como tratamiento alternativo, especies de *Pseudomonas* y *Trichoderma* han demostrado ser eficaces para suprimir la enfermedad a través de micoparasitismo o compitiendo por nutrientes con el hongo, además mejoran la inmunidad de la planta (Khalili et al., 2012; Singh et al., 2005); las especies de *Bacillus* también han demostrado inhibición para el crecimiento de *H. oryzae* además de ser promotoras del crecimiento en plantas (Saechow et al., 2018).

Añublo de la vaina – *Rhizoctonia solani*

El hongo basidiomiceto *Rhizoctonia solani* (Mycobank, 2016c) es el causante de la enfermedad conocida como “añublo de la vaina de arroz”, considerada también como una de las enfermedades más importantes de este cultivo (Ou, 1985), puesto que las pérdidas atribuidas a esta enfermedad están entre el 4% y el 50% (Lee & Rush, 1983).

Este patógeno habita en el suelo y se presenta como un conjunto de cepas que varían en su morfología y virulencia, lo que le permite tener un amplio rango de hospederos entre los que se encuentran plantas pertenecientes a 32 familias y 188 géneros (Gangopadhyay & Chakrabarti, 1982) muchas de ellas con importancia comercial como la cebada, lechuga, tomate, sorgo, maíz, entre otros (Chen et al., 2012). En el caso del arroz, cuando hay condiciones favorables para la enfermedad, el micelio se esparce por el suelo y continúa creciendo dentro del tejido vegetal desde la base de la planta (propagación vertical) y puede llegar al resto del cultivo a través de las hojas cuando hay contacto de follaje enfermo con follaje sano (propagación horizontal) (Kozaka,

1961; Rabindran & Vidhyasekaran, 1996); los síntomas de la enfermedad empiezan como lesiones en las hojas más bajas con forma ovalada o elíptica de color gris verdoso con un ancho de 0.5 cm y largo de 1-2.5 cm, en estados avanzados de la infección las lesiones se decoloran y tienen un borde café irregular (Persaud et al., 2019).

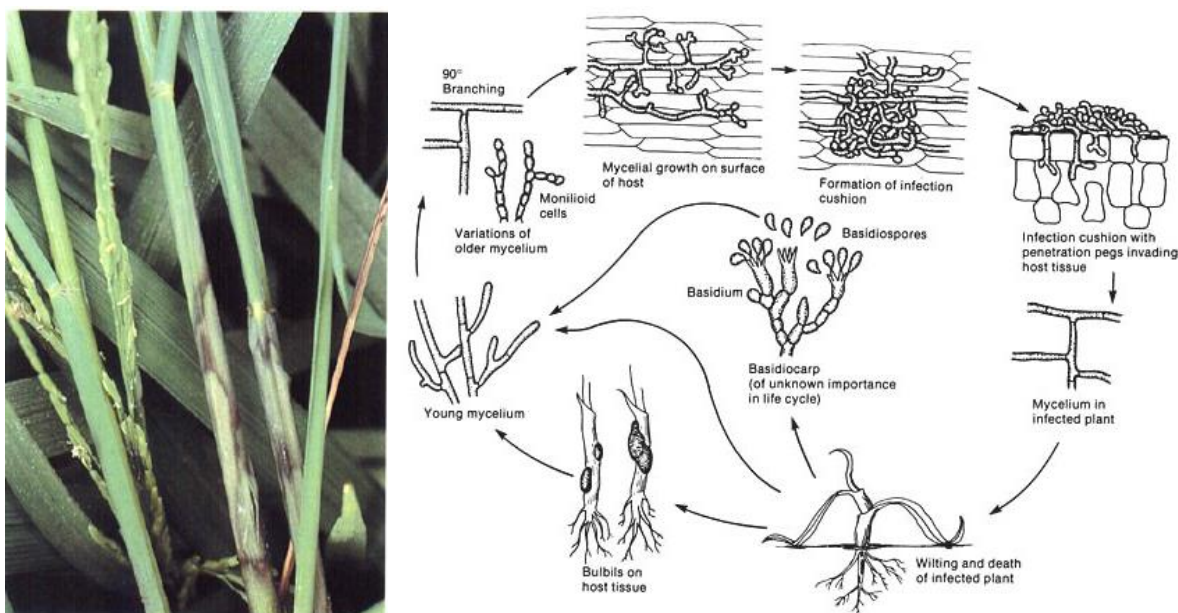


Figura 3. Lesiones en arroz provocadas por *Rhizoctonia solani* (Lee & Rush, 1983) y ciclo de vida del hongo (The American Phytopathological Society, 2006)

El control de esta enfermedad es difícil debido a su alta variabilidad genética (Guleria et al., 2007; Yugander et al., 2014) y a la capacidad que tiene *R. solani* de sobrevivir en forma de esclerocios en el suelo por largos periodos de tiempo entre una temporada de cosecha y otra (Taheri & Tarighi, 2010). Hasta la fecha se ha encontrado que la mayoría de cultivos de arroz plantados en el mundo son susceptibles a este patógeno y el control químico con fungicidas es una medida importante para su manejo (Prasad & Eizenga, 2008). En China, por ejemplo, el fungicida más utilizado es Jinggaomycin que tiene como ingrediente activo la validamicina producida por *Streptomyces hygroscopicus* (Chen et al., 2012), sin embargo, en algunas

provincias de este país se ha reportado resistencia de *R. solani* a este compuesto (C. Zhang et al., 2009), y la Unión Europea ha prohibido el uso de validamicina debido a su posible efecto dañino para la salud y el medio ambiente (The Commission of the European Communities, 2002).

Alternativas para el control químico de *R. solani* incluyen fungicidas SDHI (Inhibidores de succinato deshidrogenasa) como thifluzamide, carboxin, benodanil, flutolanil, entre otros (Chen et al., 2012); y en cuanto al control biológico se han realizado ensayos utilizando extractos de plantas, fungicidas de nueva generación como Antracol, Nativo, Cyclpos, y especies de *Bacillus* (Persaud et al., 2019) u hongos micoparásitos como los pertenecientes al género *Trichoderma* (Agrios, 2005).

Mancha naranja o mal del pie – *Gaeumannomyces graminis*

La enfermedad conocida como mancha naranja o “mal del pie” es causada por el hongo ascomiceto *Gaeumannomyces graminis* (Mycobank, 2016b) y fue reportada por primera vez en algunos estados de Brasil durante la temporada de crecimiento de 1997-1998 (Prabhu & Filippi, 2002). Existen cuatro variedades de esta especie de hongo que atacan diferentes hospederos: *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, el cual provoca enfermedades en trigo y cebada, *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* que ataca la avena, *Gaeumannomyces graminis* var. *maydis*, cuyo hospedero es el maíz y *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* que afecta al arroz (Freeman & Ward, 2004; Peixoto et al., 2013), las cuatro variedades se pueden diferenciar morfológicamente por el tamaño de sus ascosporas e hifopodios (Mathre, 1992). Aunque las tres variedades generan pérdidas en los cultivos mencionados, curiosamente, la mayoría de la información disponible sobre la biología del género *Gaeumannomyces*, las características de las enfermedades que produce y su control se han reportado mayoritariamente para la variedad *tritici*

(Prabhu & Filippi, 2002), y en el caso de la variedad *graminis*, su importancia como agente causal de pérdidas del cultivo de arroz normalmente se pasa por alto, y estas se atribuyen a *Rhizoctonia solani* (añublo de la vaina) y *Sarocladium oryzae* (pudrición de la vaina del arroz) (Peixoto et al., 2013).

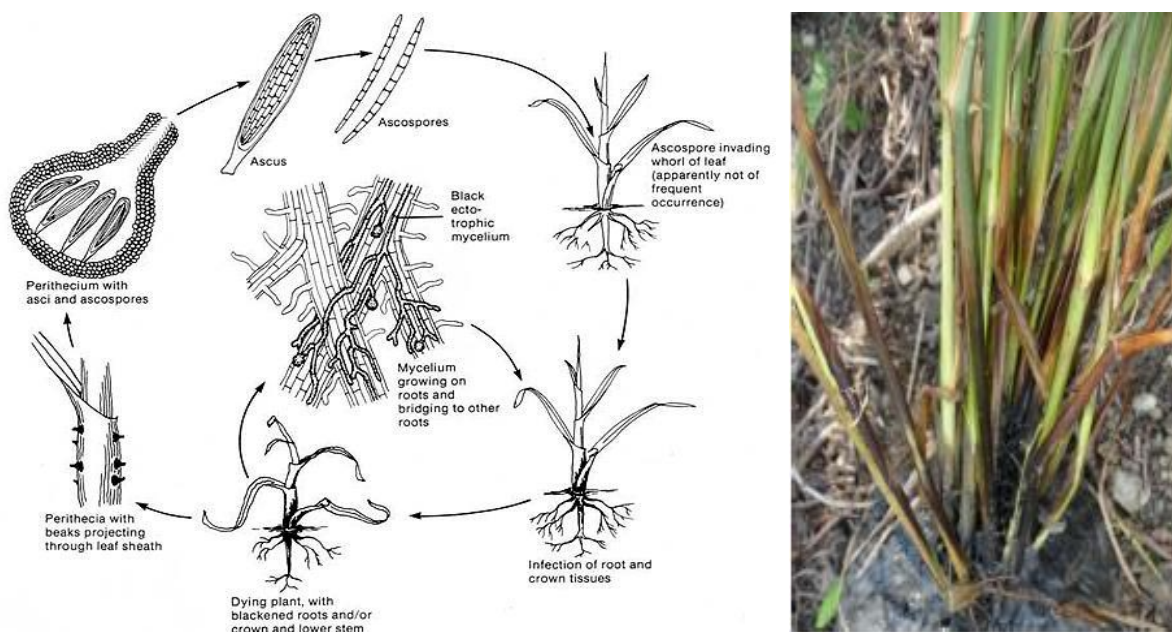


Figura 4. Ciclo de vida de *Gaeumannomyces graminis* (Vukson - Van Beek, 2010). Lesiones provocadas por el hongo en los tallos (Vivas & Intriago Mendoza, 2012)

Los síntomas del mal del pie se reconocen al principio como lesiones de café oscuro o negras en la base de la vaina, y las raíces se tornan de color oscuro debido a la intensa necrosis en el tejido causada por la infección del hongo (Prabhu & Filippi, 2002). *G. graminis* coloniza las raíces del arroz produciendo dos tipos de hifas conocidas como hifas corredoras e hifas infecciosas; las hifas corredoras son café, septadas, de paredes gruesas y a menudo crecen en la superficie de las raíces, mientras que las hifas infecciosas tienen paredes celulares delgadas y crecen al interior del tejido del hospedero (Peixoto et al., 2013). Se ha encontrado que la

virulencia de *G. graminis* está asociada a la producción de melanina-DHN en las paredes celulares de sus hifas (Frederick et al., 1999), este tipo de pigmentos ofrece protección contra el estrés ambiental como la radiación UV y los mecanismos de defensa de la planta, además la melanina es requerida para mantener la presión de turgencia necesaria para penetrar las células del hospedero (Kubo & Furusawa, 1991).

Para controlar la enfermedad de “mal del pie” normalmente se recurre a fungicidas a base de Cyproconazole y Propiconazole (Corporación Arrocería Nacional, 2013), y como alternativa de control biológico se han utilizado especies de *Pseudomonas* (M. Yang et al., 2011), y *Trichoderma* (Tirado Ospina & Higuera Acosta, 2018).

Control biológico de enfermedades en plantas

El exceso de fungicidas y otros compuestos químicos puede traer consecuencias negativas para la salud y el ambiente, por lo que el uso de bio-pesticidas con microorganismos benéficos se considera uno de los métodos más prometedores para el manejo de enfermedades en cultivos (Ongena & Jacques, 2007). Las especies de *Bacillus* son reconocidas por producir metabolitos secundarios que son objeto de estudios químicos debido a su gran variabilidad y las oportunidades que ofrecen para inhibir microorganismos patógenos, entre estos compuestos destacan los lipopéptidos, que confieren ventaja a las bacterias en diferentes nichos ecológicos, al permitir a las bacterias una mejor utilización de sustratos hidrofóbicos específicos como el almidón, o hidrocarburos como hexadecano, octano, antraceno, pireno, entre otros (Mukherjee & Das, 2005).

Los lipopéptidos cuentan con variadas funciones biológicas debido a su capacidad de irrumpir en la estructura de la membrana celular; entre estas funciones se encuentra

principalmente la actividad anti-fúngica propiciada por las altas concentraciones de estos compuestos; la actividad antiviral que se ha demostrado contra virus como *el virus del bosque Semliki*, *el virus del Herpes simple*, *el virus de la estomatitis vesicular*, entre otros; e incluso aplicaciones médicas gracias a su actividad anti-inflamatoria y anti-tumoral (Zhao et al., 2017)(Zhao et al., 2017).

De manera particular la especie *Bacillus subtilis*, que se encuentra relacionada muy cercanamente con la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, es una de las especies más estudiadas debido a sus lipopéptidos (Sansinenea & Ortiz, 2011). Estos compuestos están formados por una cadena lipídica que puede estar unida a un oligopéptido cíclico o de cadena corta (Raaijmakers et al., 2010) pueden clasificarse en tres familias teniendo en cuenta su tipo y secuencia de residuos de aminoácidos, el tipo de ciclación y la longitud y ramificación de la cadena de ácidos grasos (Ongena & Jacques, 2007).

Familia surfactina

Los compuestos miembros de esta familia son heptapéptidos interconectados que forman la estructura cíclica de un anillo de lactona (Peypoux et al., 1999), que pueden clasificarse a su vez en Surfactinas A, B y C de acuerdo a las diferencias en sus secuencias de aminoácidos (Rodrigues et al., 2006). Debido a su naturaleza anfifílica pueden anclarse a las paredes de la membrana celular e intervenir en su integridad al crear poros cuando se encuentra en altas concentraciones, lo que les confiere actividad hemolítica, antibacterial y antiviral (Ongena & Jacques, 2007). Algunos estudios han demostrado que las surfactinas son necesarias para la colonización de las bacterias en las raíces de las plantas (Bais, 2004).

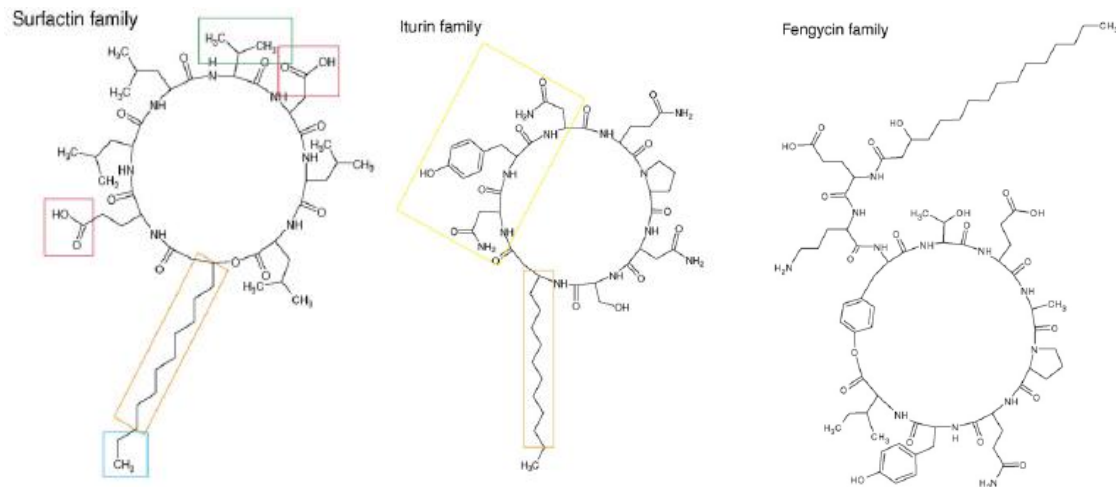


Figura 5. Estructura de los compuestos pertenecientes a las familias surfactina, iturina y fengicina (Ongena & Jacques, 2007)

Familia iturina

Los compuestos de esta familia son heptapéptidos con cadenas de 14 a 17 carbonos; y las seis variantes principales dentro de esta familia son Iturina A y C, bacillomycin D, F y L y mycosubtilin (Raaijmakers et al., 2010). Aunque tienen fuerte actividad hemolítica, se diferencian de las surfactinas al demostrar una fuerte actividad antifúngica *in vitro* contra un amplio rango de patógenos, poca actividad antibacteriana y nada de actividad antiviral (Moyne et al., 2011). El mecanismo para la actividad antifúngica está en la perturbación osmótica debido a la formación de poros conductores de iones (Aranda et al., 2005). La iturina A ha demostrado ser eficaz para controlar patógenos del suelo como *R. solani* (Asaka & Shoda, 1996), además de ser el único tipo de lipopéptido producido por todas las cepas de *Bacillus* (Ahimou et al., 2000).

Familia fengicina

Estas moléculas son lipodecapéptidos con un anillo de lactona y cadenas de 14 a 18 carbonos que pueden ser saturadas o insaturadas; las dos variantes de fengicinas son Fengicina A

y B, también llamadas “Plipastatins” (Raaijmakers et al., 2010), aunque recientemente se descubrió otra variante nombrada como Fengicina C (Villegas-Escobar et al., 2013). Las fengicinas tienen menos actividad hemolítica que las iturinas y surfactinas, pero mantienen una fuerte actividad antifúngica, especialmente contra hongos filamentosos (Koumoutsis et al., 2004); su mecanismo de acción no es tan bien conocido, pero se sabe que también pueden intervenir en la membrana celular alterando su estructura y permeabilidad (Deleu et al., 2005). Estos compuestos han demostrado ser efectivos contra hongos patógenos como *Fusarium graminearum* (J. Wang et al., 2007), *Botrytis cinerea* (Toure, Ongena, Jacques, Guiro, & Thonart, 2004) y *Podosphaera fusca* (Romero et al., 2007). Las fengicinas, al igual que las surfactinas pueden interactuar con las células vegetales promoviendo una respuesta inmune (Ongena & Jacques, 2007) que se ha comprobado en muchos cultivos como tomate y frijol (Ongena et al., 2007).

A pesar de su inmenso potencial para aplicaciones comerciales, ambientales y terapéuticas el uso de estos compuestos es limitado debido a su alto costo de producción (Das et al., 2008), por lo que varias estrategias como el diseño de biorreactores, optimización de medios de cultivo, y el uso de desechos agroindustriales como materia prima para la fermentación se han utilizado para tratar de mejorar la producción de este tipo de compuestos (Sansinenea & Ortiz, 2011).

Justificación

Las plantas en general contribuyen al 80% de la dieta de los seres humanos (FAO, 2017), por lo que son necesarias para la seguridad alimentaria; esta puede entenderse como el acceso continuo a comida nutritiva, segura, accesible y suficiente para todas las personas que permita llevar una vida activa y saludable; sin embargo, las plagas y enfermedades representan una amenaza para este objetivo, puesto que pueden dañar los cultivos y, en consecuencia reducir la disponibilidad y el acceso a la comida, incrementando también su costo (FAO, 2017).

Aunque se siguen diversas estrategias para el manejo de enfermedades en plantas, el uso continuo e indiscriminado de químicos provoca consecuencias indeseadas como la acumulación de residuos tóxicos, el desarrollo de la resistencia en los patógenos a los fungicidas utilizados, contaminación ambiental, amenazas a la salud de humanos y animales y un aumento en la inversión para la protección del ambiente (Khalili et al., 2012). Es por este motivo que el control biológico se ha convertido en una alternativa amigable con el ambiente, de larga duración y efectiva para el manejo de enfermedades de plantas (Saechow et al., 2018), siendo las especies del género *Bacillus* las que se consideran entre las más adecuadas para usarse como agentes de control biológico por su capacidad de sintetizar compuestos como iturinas, surfactinas y fengicinas, las cuales demuestran actividad antifúngica y antibacteriana contra diversos fitopatógenos (Alvarez et al., 2011).

Investigar acerca del potencial de microorganismos como *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* para reducir el crecimiento de los hongos patógenos más dañinos para el cultivo de arroz es un acercamiento para lograr el objetivo de la seguridad alimentaria sin perjudicar el ambiente con exceso de químicos dañinos.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad inhibitoria de las cepas *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 contra los patógenos de arroz *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Gaeumannomyces graminis*, mediante ensayos de antagonismo *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos específicos

- Evaluar la acción individual de las cepas *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 a nivel *in vitro* sobre el crecimiento de los hongos patógenos de arroz, mediante ensayos de antagonismo con el fin de determinar su potencial inhibitorio.
- Evaluar la acción individual de las cepas *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 en tejido vegetal sobre uno de los patógenos de arroz aislados que hayan mostrado susceptibilidad a la bacteria.
- Evaluar la acción conjunta de las cepas *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 a nivel *in vitro* e *in vivo*.

Metodología

Microorganismos utilizados y activación

Las cepas bacterianas utilizadas para la evaluación se mantuvieron conservadas en TSB + 20% glicerol a una temperatura de -80°C. Las cepas *Bacillus subtilis* EACB-0015 (*Bs15*) y *Bacillus amyloliquefaciens* EACB-0959 (*Ba959*), se activaron en medio TSA (Agar trípico de soya, Thermo Scientific™, U.S.A) 50% y posteriormente se dejaron creciendo por 48 horas a una temperatura de 30°C, previo a cualquier prueba.

Los hongos patógenos de arroz utilizados en este estudio *P. oryzae*, *H. oryzae* y *G. graminis* fueron facilitados por el laboratorio de sanidad vegetal de la empresa Ecoflora Agro S.A.S. El hongo *R. solani* EAHP-002 hace parte de la colección de la universidad EAFIT. Los hongos fueron conservados en papel filtro a una temperatura de 4°C y activados en medio PDA (Papa dextrosa agar, Thermo Scientific™, U.S.A).

La identificación molecular de los hongos se realizó por medio de la secuenciación de la región 5.8S-ITS según la metodología reportada por Tapia-Tussell et al. (2008). Brevemente la extracción del ADN se realizó con el Kit comercial Ultraclean® (Mo-Bio), siguiendo las instrucciones del fabricante y la PCR se realizó con los primers universales ITS1 e ITS4 con un volumen de la reacción total de 50 µL, los cuales contenían 25 ng del ADN genómico, 1x del buffer de PCR, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1 µM de cada primer y 1U de la Taq polimerasa. La amplificación del ADN se hizo en un termociclador T100 (BioRad, U.S.A) y el programa consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por un minuto, seguido de 30 ciclos en las siguientes condiciones: 60s a 94°C, 2min a 58°C, 60s a 72°C y por último una fase final de extensión de 5 min a 72°C. Los productos de la PCR (4 µL) fueron separados por medio de una

electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La secuenciación de ADN se hizo con los dos primers utilizados (ITS1 e ITS4) y los productos de la PCR fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc. Corea.

Tabla 1. Microorganismos utilizados para las pruebas.

<i>Microorganismo</i>	<i>Cepa</i>	<i>Planta donde fue aislado</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	EACB-0015	Banano
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EACB-0959	Banano
<i>Pyricularia oryzae</i>	ECO-001	Arroz
<i>Helminthosporium oryzae</i>	ECO-002	Arroz
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	ECO-003	Arroz
<i>Rhizoctonia solani</i>	EAHP-002	Papa

Evaluación del antagonismo de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959*

Bs15 y *Ba959* fueron inoculadas en PDA formando una circunferencia (\emptyset : 6 cm) en cajas Petri (\emptyset : 9 cm). Luego discos de los diferentes hongos (\emptyset : 5 mm) se pusieron en el centro de la circunferencia y fueron incubados a 22°C. Para la impresión de las circunferencias bacterianas se utilizaron cajas Petri de (\emptyset : 6 cm) impregnadas de *Bs15*, *Ba959* o la combinación de ambas *B15-959* (Figura 6A). Cada tratamiento contó con 3 réplicas y el porcentaje de inhibición se calculó cuando el control (cada uno de los hongos patógenos creciendo en ausencia de las bacterias) alcanzó el diámetro (\emptyset : 6 cm):

$$\% I = \frac{D.C - D.T}{D.C} \times 100$$

Donde:

% I= Porcentaje de inhibición

D. C = Diámetro de control

D. T = Diámetro de tratamiento

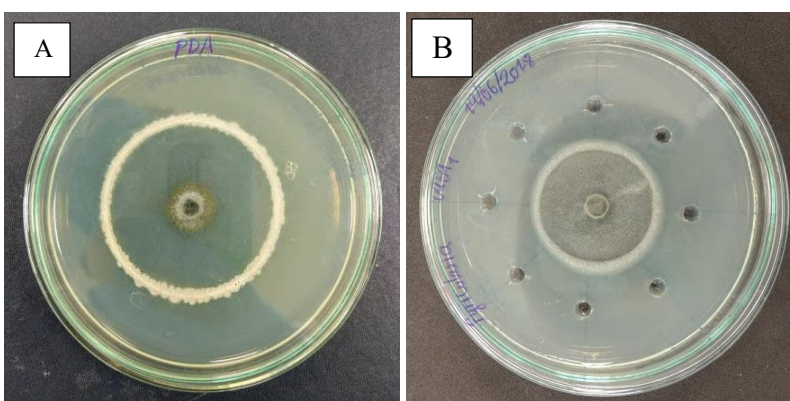


Figura 6. Montajes para las pruebas de antagonismo con la circunferencia de *Bs15* (A) y el sobrenadante de *Ba959* (B) sobre *P. oryzae*.

Evaluación del sobrenadante libre de células de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959*

En segunda instancia se evaluó la actividad de los metabolitos producidos por las bacterias; para esto se prepararon tres tratamientos en medio líquido: el primero con la cepa de *Bs15*, el segundo con la cepa de *Ba959* y el tercero con la combinación *B15-959* de ambas bacterias. Para la inoculación en medio líquido a la cepa *Bs15* se le hizo un choque térmico a 80°C por 20 minutos, con el fin de reducir la probabilidad de que aparezca una morfología que no corresponde a la de esta cepa.

Las bacterias fueron inoculadas en medio D, compuesto de 0.042 g/L $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.031 g/L $CaCl_2$, 0.5 g/L KH_2PO_4 , 1.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 33 g/L extracto de levadura, 32 g/L

glucosa, 4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L K_2HPO_4 (Mosquera et al., 2014) durante cinco días a 150 RPM en una temperatura de 30°C; para verificar el estado de los cultivos se hacía una prueba de contaminación con un rayado en TSA 50%, corroborando que sólo estuvieran presentes las morfologías de las bacterias *Bs15* y *Ba959*.

Para determinar la densidad celular en los cultivos se utilizó la metodología de diluciones seriadas, y para la obtención del SLC, los cultivos se centrifugaron en tubos eppendorf de 2 ml a 14000 RPM durante 10 minutos. Posteriormente los sobrenadantes fueron filtrados a través de una membrana de poro 0.2 μm ,

Los SLCs de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959* fueron dispuestos en 8 pozos de (\varnothing : 5 mm), cada uno con 80 μl . Los pozos se ubicaron formando una circunferencia de (\varnothing : 6 cm) (Figura 6B) y en el centro un disco (\varnothing : 5 mm) de cada hongo. Cada tratamiento contó con 3 réplicas y el porcentaje de inhibición se calculó cuando el control (cada uno de los hongos patógenos creciendo en pozos sin el tratamiento) alcanzó el diámetro (\varnothing : 6 cm). Para el cálculo de % inhibición se utilizó la misma ecuación que en la metodología anterior.

Purificación de lipopéptidos de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959*

Para la purificación de los lipopéptidos de *Bs15*, *Ba959* y su combinación se siguió la metodología de (Villegas-Escobar et al., 2013). Al medio D descrito anteriormente se le adicionó 4% de amberlita (p/v) 24 horas después de inoculado con *Bs15*, *Ba959* o *B15-959*; los metabolitos absorbidos fueron recuperados en 200 mL de metanol. Después de la elución fueron evaporados (50 psig, 50°C) y ajustados en agua a una concentración de 37mg/mL. La suspensión fue pasada por una fase sólida de C18 cartridge (Agilent®, 10 g) y sucesivamente se hicieron eluciones en un gradiente de 80 mL de metanol/agua. Los gradientes consistieron en 0%, 50% y

100%. La fracción correspondiente al 100% fue evaporada (50 psig, 50°C), y se pesó la cantidad de compuestos totales producidos por cada uno de los tratamientos.

Evaluación de las células y sobrenadantes de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959* sobre el hongo *G. graminis* (pruebas en invernadero)

Para cumplir con el segundo objetivo se prepararon los siguientes tratamientos:

Tabla 2. Tratamientos utilizados en los ensayos de invernadero.

<i>Tratamientos</i>	<i>Detalle</i>	<i>Inoculación de hongo</i>
Control Absoluto	Agua	(-)
Control Negativo	Agua	(+)
Células <i>Bs15</i>	Densidad celular de $2,8 \times 10^8$ UFC/ml	(+)
Células <i>Ba959</i>	Densidad celular de $3,8 \times 10^8$ UFC/ml	(+)
Células <i>B15-959</i>	Densidad celular de $2,5 \times 10^8$ UFC/ml	(+)
	<i>(Ba959=84% - Bs15=16%)</i>	
Sobrenadante <i>Bs15</i>	Proveniente de un cultivo con densidad celular de $2,8 \times 10^8$ UFC/ml	(+)
Sobrenadante <i>Ba959</i>	Proveniente de un cultivo con densidad celular de $3,8 \times 10^8$ UFC/ml	(+)
Sobrenadante <i>B15-959</i>	Proveniente de un cultivo con densidad celular de $2,5 \times 10^8$ UFC/ml <i>(Ba959=84% - Bs15=16%)</i>	(+)

Las semillas de arroz fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito al 1% y lavadas con agua estéril, luego se sumergieron en un volumen de 4 ml de cada tratamiento por 2 horas

(Tabla 2). Los tratamientos con los sobrenadantes de las células no fueron filtrados como en el caso de los sobrenadantes usados en los ensayos *in vitro*.

Paralelamente se prepararon macetas con 500 gramos de suelo previamente esterilizado y en cada una se depositaron entre 15-20 semillas de arroz, cada una acompañada de un disco (\emptyset : 5 mm) del hongo *Gaeumannomyces graminis*, excepto en el caso del control absoluto. Se hicieron dos ensayos en invernadero y para el segundo ensayo se realizó un paso adicional de acuerdo a la metodología de L. Yang et al. (2015) que consistió en regar el suelo de las macetas con un volumen de 50 ml del respectivo tratamiento una semana después de haber sembrado las semillas, esto con la finalidad de saber si una aplicación adicional de los tratamientos provocaba diferencias en el desarrollo de la enfermedad en las plantas. Cada tratamiento contó con tres réplicas, y las macetas se ubicaron sobre una estera en el invernadero de la Universidad EAFIT donde contaban con alta humedad y riego periódico (Figura 7), y se les hizo un seguimiento cada semana para corroborar el avance de la enfermedad.

Pasado un mes se sacaron las plantas de sus macetas, se lavaron las raíces con ayuda de un ultrasonido y se midieron las siguientes variables: longitud de la lesión, peso seco del brote y peso seco de la raíz; para medir estas últimas dos variables las plantas se secaron durante dos días en un horno a 60°C.

Análisis estadístico

Los ensayos se hicieron mediante un diseño completamente al azar y se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% verificando que se cumplieran los supuestos de normalidad por medio de las pruebas de Shapiro Wilk y homogeneidad de varianzas de Levene. Para determinar las diferencias entre medias se utilizó la

prueba de la mínima diferencia significativa (MDS) con un nivel de confianza del 95%. Para el procesamiento de los datos se usó el programa estadístico R studio versión 3.0.1. con los paquetes “car”, “lattice” y “Agricolae” (R Core Team, 2016).



Figura 7. Plantas de arroz en el invernadero. Cada maceta corresponde a una de las réplicas de todos los tratamientos y controles

Resultados

¿Hay diferencia en la inhibición de los cuatro hongos tratados con las células de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959*?

Para los ensayos realizados con la biomasa bacteriana se observó que hubo inhibición para todos los hongos, como se ejemplifica en la Figura 8 donde a simple vista el tratamiento con células de *Ba959* (Figura 8B) muestra una mayor reducción en el diámetro del hongo *P. oryzae* comparado con el control (Figura 8A) y el tratamiento de *Bs15* (Figura 8C).

En la Figura 9 se representan gráficamente los resultados del análisis estadístico de los datos de las mediciones del diámetro de cada hongo, donde las letras en cada una de las barras hacen referencia a los grupos definidos en base a la diferencia estadística. Los resultados obtenidos con los tratamientos de células de *Bs15*, *Ba959* y la combinación *B15-959* mostraron altos porcentajes de inhibición para los cuatro hongos evaluados, pero en mayor medida para los hongos *H. oryzae* y *P. oryzae* en los cuales se presentó una inhibición de entre el 70% y el 80%, que varió de acuerdo a los tratamientos utilizados, en el caso de *H. oryzae* el tratamiento que mostró mayor inhibición fue la combinación *B15-959*, seguida por el tratamiento de las células de *Ba959* solas; en cuanto a *P. oryzae*, todos los tratamientos mostraron un porcentaje de inhibición similar. Para los hongos *G. graminis* y *R. solani* hubo una inhibición menor, del 60% y 50% respectivamente, siendo el tratamiento de la combinación *B15-959* el que demostró una mayor inhibición para *R. solani*, y el tratamiento de *Ba959* el mejor contra *G. graminis*.

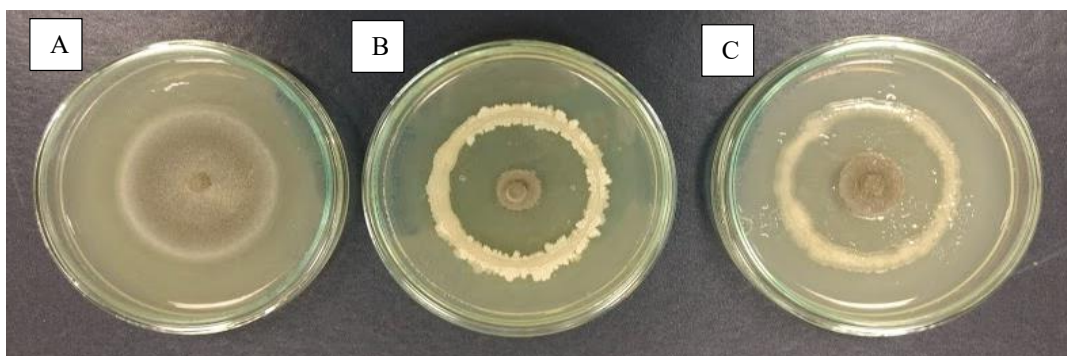


Figura 8. Ensayo de antagonismo para *P. oryzae*. Control (A), células de Ba959 (B) y células de Bs15 (C).

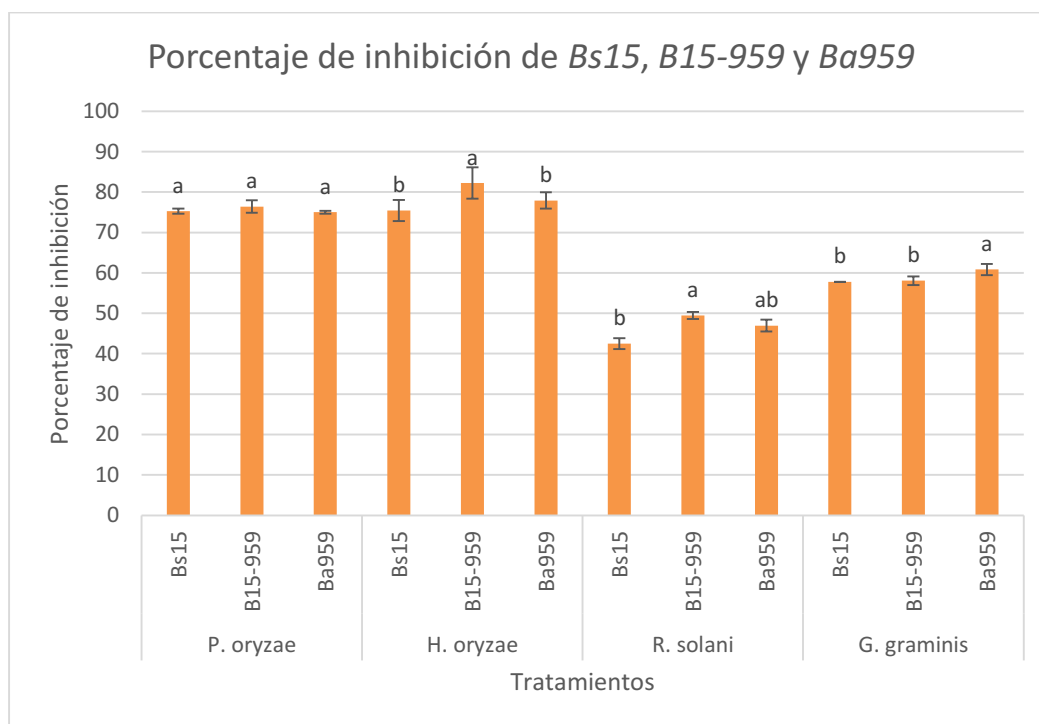


Figura 9. Porcentaje de inhibición de Bs15, B15-959 y Ba959 sobre *P. oryzae*, *H. oryzae*, *R. solani* y *G. graminis* a nivel *in vitro*. ANOVA $p = 5.928657e-18$. Medias de las barras sin diferencias estadísticas se denotan con las mismas letras de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa. MDS $p < 0.05$.

¿Hay diferencia en la inhibición de los cuatro hongos con los sobrenadantes de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959*?

Para los ensayos con sobrenadante se encontró que todos los hongos fueron inhibidos por el SLC de los tres tratamientos (*Bs15*, *Ba959* y *B15-959*), como se ejemplifica en la Figura 10 donde se muestra la acción de los tratamientos sobre *G. graminis*. Para el caso de estos tratamientos el porcentaje de inhibición más alto se presentó en los hongos *G. graminis* y *H. oryzae* con un 60% y un 40% de inhibición respectivamente, siendo el sobrenadante de la combinación y el sobrenadante de *Ba959* los que demostraron una mayor inhibición en ambos casos. Para *P. oryzae* y *R. solani* los porcentajes de inhibición fueron los más bajos, con el tratamiento de *Ba959* siendo el más alto de estos, mostrando una inhibición de entre el 20% y el 30% (Figura 11).

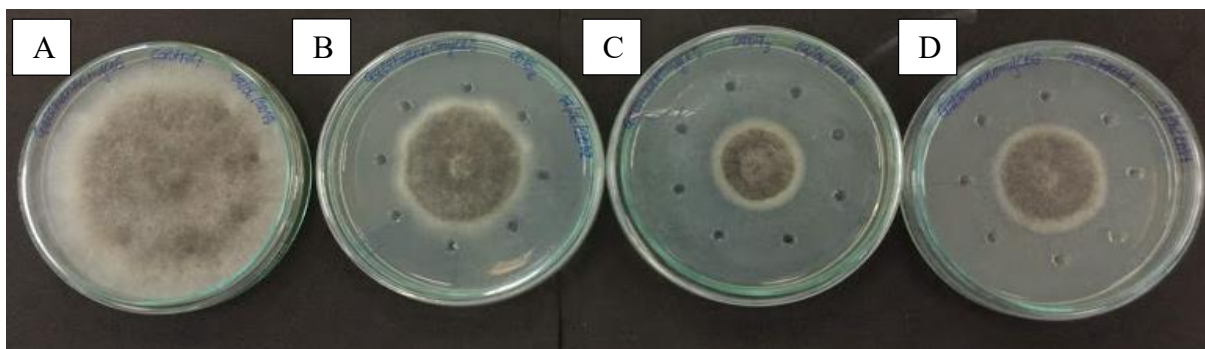


Figura 10. Ensayo de antagonismo con SLC de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959*. Ensayo para *G. graminis* comparando el control (A), el tratamiento *Bs15* (B), el tratamiento *Ba959* (C) y el tratamiento *B15-959* (D).

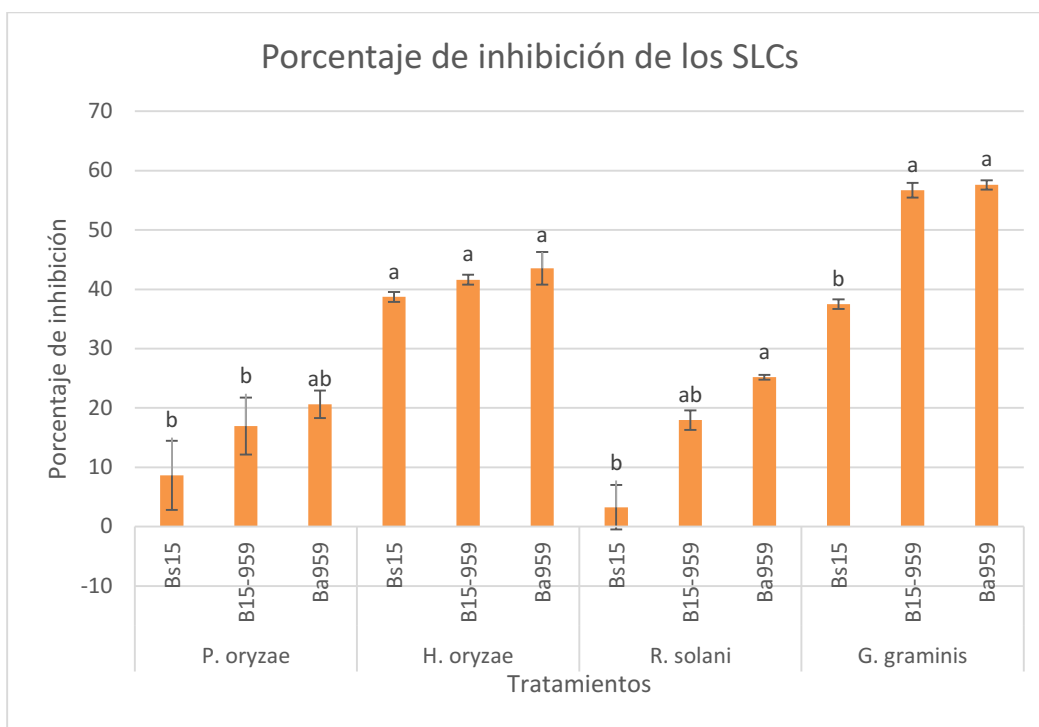


Figura 11. Porcentaje de inhibición de los SLCs de Bs15, B15-959 y Ba959 sobre *P. oryzae*, *H. oryzae*, *R. solani* y *G. graminis* a nivel *in vitro*. ANOVA $p = 5.601711e-13$. Medias de las barras sin diferencias estadísticas se denotan con las mismas letras de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa. MDS $p < 0.05$.

¿Hay diferencia en la producción de lipopéptidos de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959* al crecer en medio D?

Al pesar los lipopéptidos producidos en cada cultivo (*Bs15*, *Ba959* y *B15-959*) se encontró que el que producía una mayor cantidad era *B15-959* con 92.7 mg, seguido del cultivo de *Ba959* que produjo 79.7 mg; la menor cantidad de lipopéptidos se registró para el cultivo *Bs15* con 29.1 mg (Tabla 3).

Tabla 3. Cantidad de lipopéptidos producidos en cada cultivo.

<i>Cultivo</i>	<i>Peso (mg)</i>
<i>Bs15</i>	29.1
<i>Ba959</i>	79.7
<i>B15-959</i>	92.7

¿Hay diferencia en el peso del brote y la raíz de plantas de arroz infectadas con *G. graminis* al ser tratadas con *Bs15*, *Ba959* y *B15-959*?

Como se mencionó anteriormente, los ensayos fueron monitoreados cada semana para visualizar el avance de la enfermedad, la cual se pudo observar a partir de la segunda semana y se manifestó con manchas de color negro en los tallos de las plantas, que fueron expandiéndose por las hojas y hacia el final del ensayo pasaron a tener una coloración naranja, lo que concuerda con los signos de la enfermedad de “mal del pie” causada por *Gaeumannomyces graminis*. En la Figura 12 se puede observar un contraste entre las plantas del control absoluto (Figura 12A) que no presentan lesiones y las plantas del control negativo con las manchas descritas (Figura 12B, 12C).



Figura 12. Plantas de arroz A) Control absoluto durante la última semana del ensayo, ninguna presenta lesiones. B) Control con hongo durante la segunda semana del ensayo, donde se observa al menos cuatro plantas con manchas negras en la base del tallo. C) Control con hongo durante la última semana del ensayo, donde todas las plantas presentan lesiones de color negro o naranja a lo largo del tallo.

Tanto en el ensayo 1, donde sólo las semillas se sometieron a los tratamientos, como en el ensayo 2 donde se realizó el riego de 50 ml de cada tratamiento una semana después de haber sembrado las semillas, hubo una incidencia del 100%, es decir, todas las plantas en presencia del

hongo sufrieron la enfermedad; la longitud de las lesiones en cada planta era variable llegando en algunos casos a extenderse rápidamente por el tejido, limitando el crecimiento de las plantas (Figura 13). Sin embargo, en el caso del tratamiento con sobrenadante de *B15-959* es posible observar que las plantas sometidas a este tratamiento presentan similitudes con el control absoluto que contrastan con las plantas del control negativo (Figura 14).



Figura 13. Planta del tratamiento de células de Bs15; planta del tratamiento de células de B15-959.



Figura 14. Comparación entre las plantas del control absoluto (A), el tratamiento de sobrenadante de B15-959 (B) y el control negativo (C)

Los datos de peso seco tanto de las raíces como de los brotes fueron analizados en R. Los resultados para el primer ensayo de invernadero se muestran gráficamente en las Figuras 15 y 16, donde es posible observar que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos y el control negativo, lo que motivó a realizar el segundo ensayo con el paso adicional de aplicación de los tratamientos en las macetas; los resultados de este ensayo se muestran en las Figuras 17 y 18, donde es posible observar que en el caso del peso seco del brote (Figura 18) el único tratamiento que presentó un peso de brote similar al del control absoluto, que no estaba infectado con el hongo, fue el tratamiento de sobrenadante de *B15-959*.

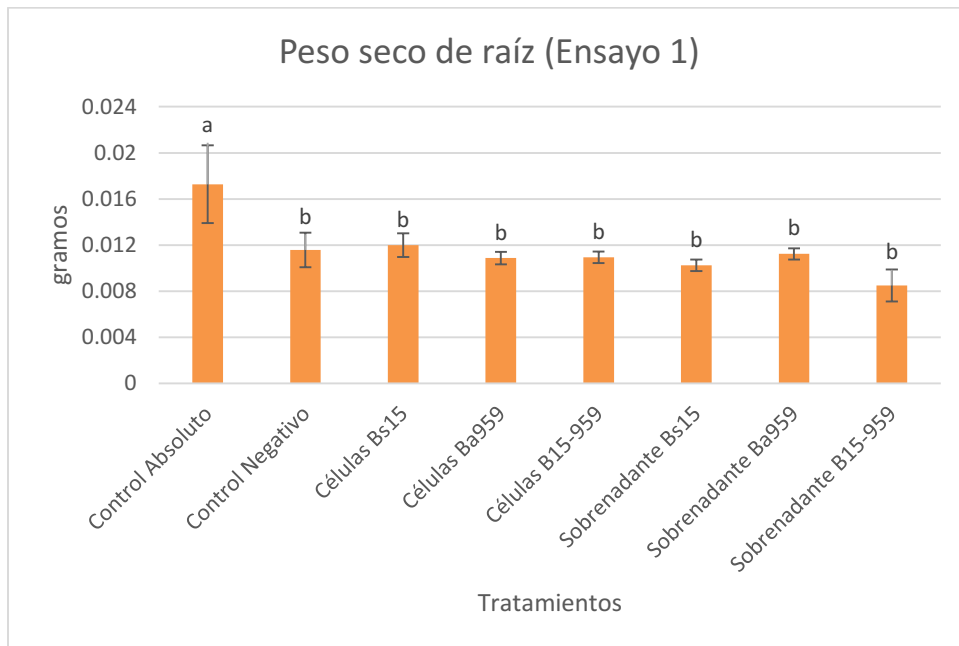


Figura 15. Peso seco de la raíz de plantas de arroz infectadas artificialmente con *G. graminis*. ANOVA $p = 0.03604983$ Medias de las barras sin diferencias estadísticas se denotan con las mismas letras de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa. MDS $p < 0.05$. Ensayo 1 en invernadero.

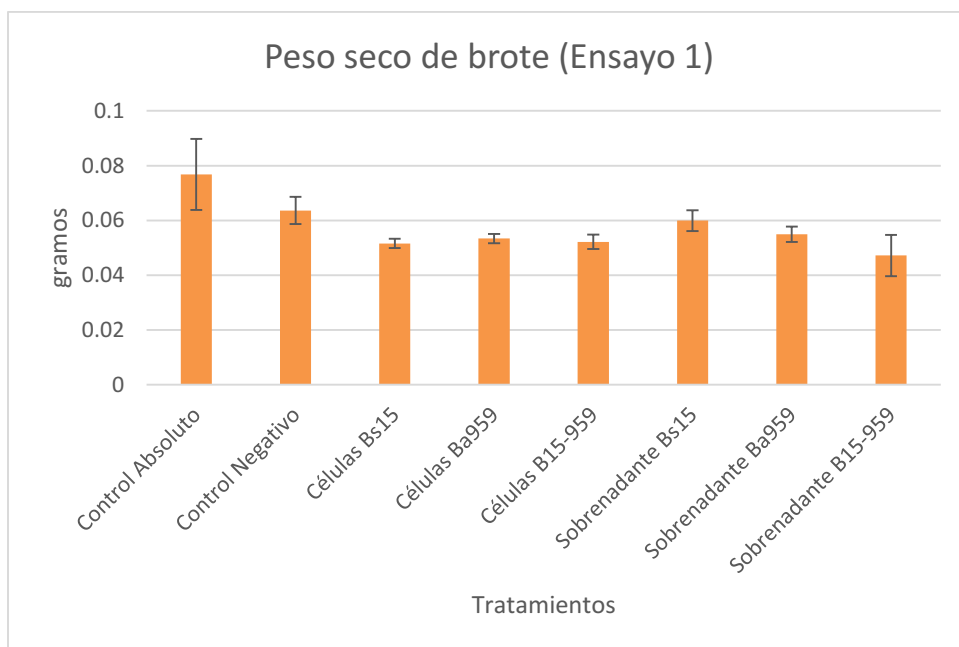


Figura 16. Peso seco del brote de plantas de arroz infectadas artificialmente con *G. graminis*. ANOVA $p = 0.0647902$. Ensayo 1 en invernadero.

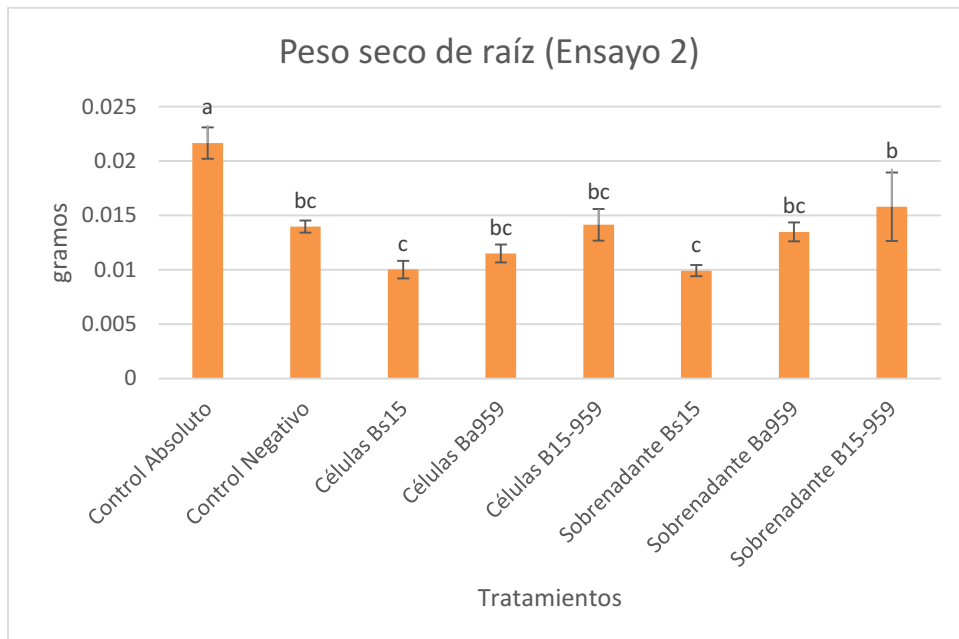


Figura 17. Peso seco de la raíz de plantas de arroz infectadas artificialmente con *G. graminis*. ANOVA $p = 0.0007161314$. Medias de las barras sin diferencias estadísticas se denotan con las mismas letras de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa. MDS $p < 0.05$. Ensayo 2 en invernadero.

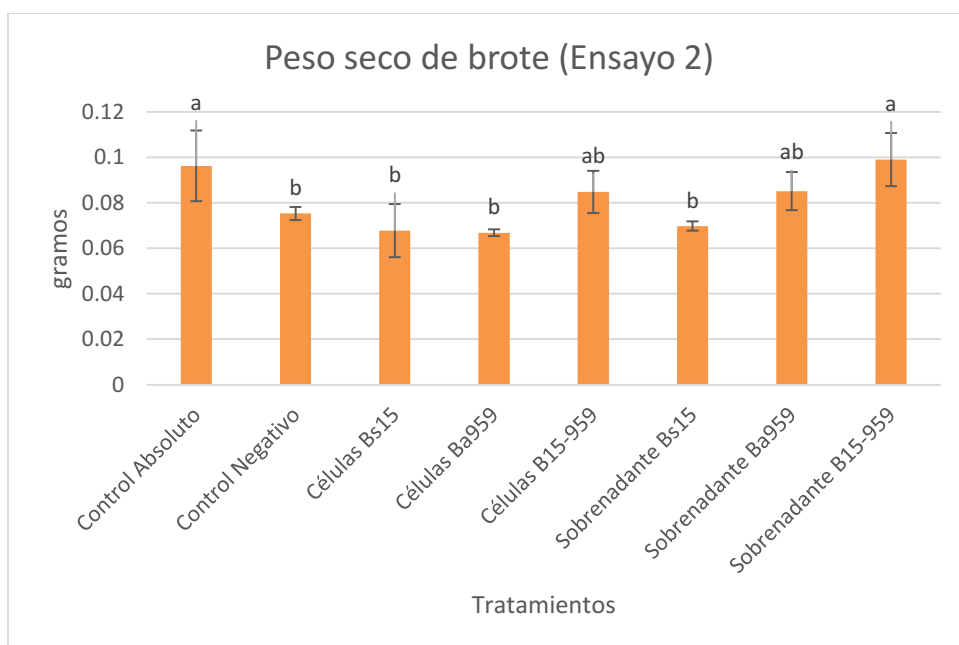


Figura 18. Peso seco del brote de plantas de arroz infectadas artificialmente con *G. graminis*. ANOVA $p = 0.02178343$. Medias de las barras sin diferencias estadísticas se denotan con las mismas letras de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa. MDS $p < 0.05$. Ensayo 2 en invernadero.

¿Hay diferencia en el porcentaje de área enferma de plantas de arroz infectadas con *G. graminis* al ser tratadas con *Bs15*, *Ba959* y *B15-959*?

Se midió la longitud de las lesiones en las plantas para ambos ensayos, pero solo en el segundo se encontró diferencia significativa, siendo el tratamiento de sobrenadante *B15-959* el que presentó el menor porcentaje de área enferma (Figura 19).

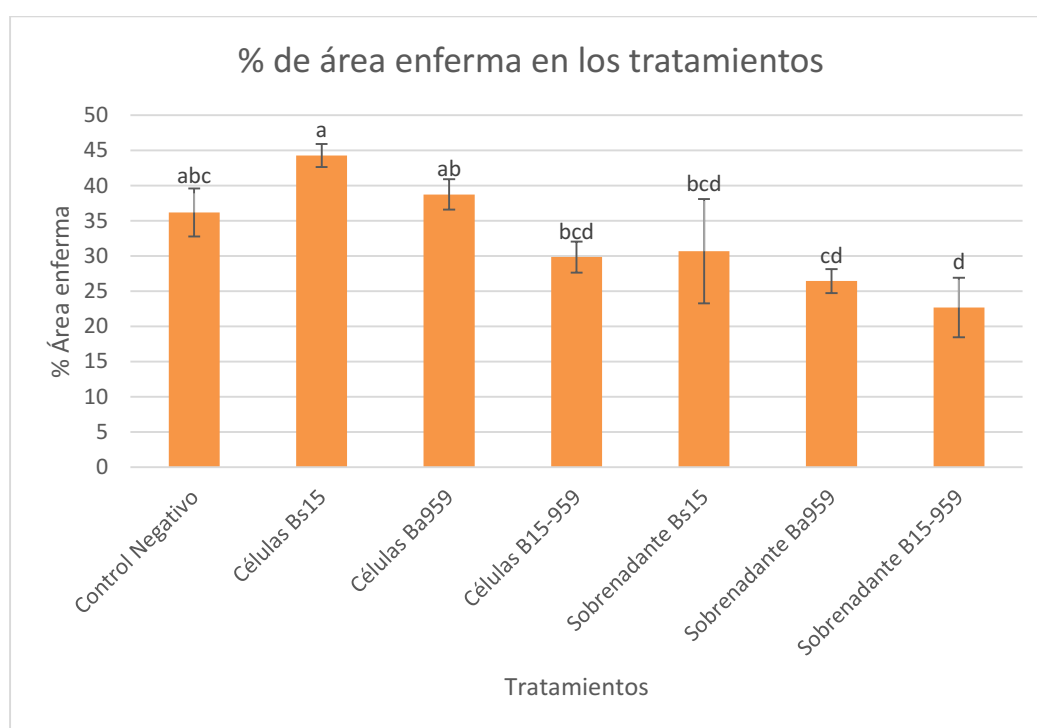


Figura 19. Área enferma de las plantas de arroz infectadas con *G. graminis*. ANOVA $p = 0.0164$. Medias de las barras sin diferencias estadísticas se denotan con las mismas letras de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa. MDS $p < 0.05$. Ensayo 2 en invernadero.

Discusión

Al analizar los resultados obtenidos con los tratamientos de células de *Bs15*, *Ba959* y *B15-959* a nivel *in vitro*, es posible observar que hay diferencias en los porcentajes de inhibición entre tratamientos para cada hongo evaluado. Este contraste entre los porcentajes de inhibición de cada tratamiento pudo deberse a varios factores como una diferencia en la cantidad de compuestos producidos por cada bacteria o el hecho de que cada uno de los hongos presentara una susceptibilidad diferente a los metabolitos producidos por cada cepa, ya que en estudios anteriores se ha encontrado que hongos patógenos como *Colletotrichum acutatum* y *Botrytis cinerea* son susceptibles a diferentes concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de fengicina C e iturina A producidas por *Bs15* (Arroyave-Toro et al., 2017).

Las especies del género *Bacillus* son conocidas por producir una amplia gama de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antibacterial, y se esperaría que los metabolitos responsables de la inhibición observada en los ensayos con células sean lipopéptidos, los cuales han sido evaluados previamente en *H. oryzae*, con iturinas producidas por *B. amyloliquefaciens* (Saechow et al., 2018); en *P. oryzae* con iturinas, surfactinas y fengicinas producidas por *B. amyloliquefaciens* (Liao et al., 2016), en *R. solani* con iturinas, surfactinas y fengicinas producidas por *B. subtilis* (Mnif et al., 2015) e iturinas producidas por *B. amyloliquefaciens* (Yu et al., 2002); y *G. graminis* var. *tritici* con iturinas de *B. subtilis* (D. Zhang et al., 2017). Es por esto que, para los ensayos con sobrenadante, se optó por cultivar las bacterias en medio D que permite la producción de lipopéptidos de las tres familias (Mosquera et al., 2014).

Los resultados con el sobrenadante libre de células a nivel *in vitro*, muestran diferencias significativas con respecto a los obtenidos con el tratamiento de células. La razón de la diferencia en el porcentaje de inhibición para cada uno de los hongos puede estar en la cantidad de metabolitos producidos por cada bacteria, pero en especial de lipopéptidos, que para *Ba959* fue de 79.7 mg, para *Bs15* de 29.1 mg y para *B15-959* fue de 92,7 mg. A pesar de que la cantidad de lipopéptidos en *Ba959* y *Bs15-Ba959* no fue similar, con una diferencia de 13 mg, los porcentajes de inhibición con ambos tratamientos a nivel *in vitro* no presentaron diferencias significativas (Figura 11), por lo que se podría inferir que en la combinación *B15-959* los lipopéptidos que se producen, probablemente iturinas y fengicinas por ser las familias de lipopéptidos que poseen mayor actividad antifúngica, están en concentraciones similares a las de *Ba959* sola, cosa que no ocurriría con *Bs15*, que además de producir una cantidad mucho menor de lipopéptidos, crece con una densidad celular menor a la de *Ba959* (Tabla 2), lo que indicaría que la cantidad de lipopéptidos obtenidos es directamente proporcional al número de células en los cultivos.

Los bajos porcentajes de inhibición para los ensayos con sobrenadante comparados con los ensayos de células a nivel *in vitro*, puede deberse a que en los ensayos de células las bacterias están creciendo en PDA y estarían produciendo continuamente metabolitos en concentraciones mucho mayores a las que se estarían adicionando con los sobrenadantes libres de células; además como las bacterias están creciendo en conjunto con los hongos puede estar presentándose una competencia por los nutrientes del medio que provoca un crecimiento menor de los patógenos.

En cuanto a los datos de los ensayos en invernadero, sólo en el segundo ensayo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y los controles; éste fue el ensayo con

el paso adicional en donde las macetas se regaron con los respectivos tratamientos una semana después de haber sembrado las semillas, esto indica que no bastaría con aplicar los tratamientos sólo a la semilla, sino que es necesario hacer aplicaciones continuas para controlar la enfermedad provocada por *G. graminis*. El “mal del pie” tiene consecuencias bastante negativas para las plantas de arroz puesto que provoca una reducción en el macollamiento, una maduración prematura de las plantas, vaneamiento, pérdidas de peso de grano y hasta la muerte de la plántula o su volcamiento cuando la enfermedad está muy avanzada (Smith et al., 1992); de estas consecuencias, la reducción del macollamiento y la aparición del vaneamiento tienen repercusiones directas en la productividad del cultivo y por consiguiente en su valor económico, puesto que la primera evita que se formen los macollos, que son estructuras originadas de la misma planta, y que en estadios avanzados de crecimiento pueden convertirse en plantas independientes al desarrollar sus propias raíces (Olmos, 2007), esto implicaría una reducción en el número de plantas que podrían crecer dentro del cultivo. En el caso del vaneamiento, este fenómeno impide que las espigas se llenen completamente de granos (Oñate Mendoza, 2015), lo que provoca una producción menor del cultivo.

De los resultados obtenidos a partir de los ensayos de invernadero sólo el tratamiento del sobrenadante *B15-959* traería beneficios a las plantas de arroz cuando estas se encuentran infectadas por *G. graminis*, puesto que fue el tratamiento donde se presentó un menor porcentaje de área infectada (20%) seguida del tratamiento con el sobrenadante de *Ba959* (25%), y que se diferencia del porcentaje de área infectada del control de hongo (35%), lo que muestra una reducción en el avance de la enfermedad; además el tratamiento de sobrenadante *B15-959* fue el único en donde el peso seco del brote fue similar al del control absoluto (0.1g), esto podría

indicar activación de esos mecanismo de defensa (Saechow et al., 2018), lo que se relaciona con la propiedad que tienen las bacterias del género *Bacillus* para potenciar el crecimiento en plantas, este fenómeno no ocurrió con los demás tratamientos, por lo que un método de control con ambas bacterias puede disminuir los síntomas de la enfermedad del “mal del pie” y evitar pérdidas económicas graves para los productores.

Conclusiones

- Las cepas de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 son capaces de inhibir el crecimiento in vitro de los cuatro hongos estudiados: *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium oryzae* y *Gaeumannomyces graminis*.
- Para los hongos *Helminthosporium oryzae* y *Pyricularia oryzae* se presentaron los porcentajes de inhibición más altos con los tratamientos de células de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 en los ensayos in vitro, con un 80% y 75%, respectivamente.
- Los tratamientos con los sobrenadantes de las bacterias mostraron un porcentaje de inhibición menor en comparación a los tratamientos con las células, siendo el hongo *Gaeumannomyces graminis* el único en el que se presentó el mismo porcentaje de inhibición para los dos tipos de tratamiento a nivel in vitro (60%).
- La cepa *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959 inhibió en mayor medida a los hongos patógenos en comparación con la cepa *Bacillus subtilis* EA-CB0015.
- Entre los tratamientos usados para los ensayos de invernadero sólo el sobrenadante de la combinación mostró un área enferma menor a la de los demás y un crecimiento del brote similar al del control absoluto, cuando se infectó con *Gaeumannomyces graminis*.

Perspectivas a futuro

- Para futuros ensayos sería útil hacer un reconocimiento más preciso de los hongos patógenos evaluados, especialmente de la susceptibilidad que cada uno pueda tener a los metabolitos producidos por las cepas de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0959, haciendo ensayos de concentración mínima inhibitoria.
- Para pruebas en invernadero sería adecuado hacer ensayos con más de una aplicación de los tratamientos en las macetas para ejercer un control periódico contra la enfermedad. También probar metodologías de infección con el hongo no directamente en la semilla sino en el suelo, en condiciones en las que la infección no sea tan propicia para el hongo.

Lista de referencias

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press.
- Ahimou, F., Jacques, P., & Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10), 749–754.
[https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00295-7](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00295-7)
- Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., & Jofré, E. (2011). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 159–174.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>
- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1713(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., & Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, 114(7), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014>
- Asaka, O., & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4081–4085.
- Bais, H. P. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiology*, 134(1), 307–319.
- Barnwal, M. K., Kotasthane, A., Magculia, N., Mukherjee, P. K., Savary, S., Sharma, A. K., ...

- Zaidi, N. (2013). A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. *European Journal of Plant Pathology*, 136(3), 443–457. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0195-6>
- Chen, Y., Zhang, A., Wang, W., Zhang, Y., & Gao, T. (2012). Baseline sensitivity and efficacy of thifluzamide in *Rhizoctonia solani*. *Annals of Applied Biology*, 161(3), 247–254. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00569.x>
- Corporación Arrocera Nacional. (2013). “Mancha naranja (*Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*)” Nuevo patógeno esta afectando los cultivos de arroz en Costa Rica.
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25(1), 165–186. <https://doi.org/10.5661/bger-25-165>
- Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., ... Birren, B. W. (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, 434(7036), 980–986. <https://doi.org/10.1038/nature03449>
- Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2005). Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface – implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283(2), 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.036>
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. In T. Scheper (Ed.), *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (pp. 1–39). Berlin: Springer.
- Development of e-courses for B. Sc Agriculture. (n.d.). Rice. Fungal diseases. Brown spot. Retrieved from <http://eagri.org/eagri50/PATH272/lecture01/002.html>

FAO. (2017). Plant health and food security.

FAO. (2018a). *Crop Prospects and Food Situation*. Retrieved from

<http://www.fao.org/3/CA2726EN/ca2726en.pdf>

FAO. (2018b). *FAO Rice Market Monitor* (Vol. 21). Retrieved from

<http://www.fao.org/3/I9243EN/i9243en.pdf>

Federación Nacional de Arroceros (FEDEARROZ). (2017). *IV Censo nacional arrocero 2016*.

Retrieved from http://www.fedearroz.com.co/doc_economia/Libro zona Bajo Cauca.pdf

Federación Nacional de Arroceros (FEDEARROZ). (2018a). Contenido nutricional del arroz.

Arroz, 66(537), 19–22. Retrieved from

<http://www.fedearroz.com.co/revistanew/arroz537.pdf>

Federación Nacional de Arroceros (FEDEARROZ). (2018b). El arroz, un gran alimento que

debemos consumir más. *Arroz*, 66(535), 4–11. Retrieved from

<http://www.fedearroz.com.co/revistanew/arroz535.pdf>

Ficke, A., Savary, S., Ficke, A., & Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4(4), 519–537. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>

Frederick, B. A., Caesar-Tonthat, T.-C., Wheeler, M. H., Sheehan, K. B., Edens, W. A., & Henson, J. M. (1999). Isolation and characterisation of *Gaeumannomyces graminis* var . *graminis* melanin mutants. *Mycological Research*, 103(1), 99–110.

Freeman, J., & Ward, E. (2004). *Gaeumannomyces graminis* , the take-all fungus and its relatives. *Molecular Plant Pathology*, 5(4), 235–252. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00226.X>

- Gangopadhyay, S., & Chakrabarti, N. (1982). Sheath blight of Rice. Review. *Plant Pathology*, 61, 451–460.
- Gnanamanickam, S. S. (2009a). Biological Control of Rice Blast. In *Biological Control of Rice Diseases* (1st ed., pp. 53–65). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2465-7>
- Gnanamanickam, S. S. (2009b). Major Diseases of Rice. In *Biological Control of Rice Diseases* (1st ed., pp. 13–42). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2465-7>
- Gnanamanickam, S. S. (2009c). Rice and Its Importance to Human Life. In *Biological Control of Rice Diseases* (1st ed., pp. 1–11). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2465-7>
- Guleria, S., Aggarwal, R., Thind, T. S., & Sharma, T. R. (2007). Morphological and Pathological Variability in Rice Isolates of *Rhizoctonia solani* and Molecular Analysis of their Genetic Variability. *Journal of Phytopathology*, 155(11–12), 654–661.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01291.x>
- Gupta, A., & Chattoo, B. B. (2007). A novel gene MGA1 is required for appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(11), 1157–1169.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.02.014>
- Jatoi, G. H., Abro, M. A., Tariq, J. A., Memon, S., Mangi, N., Maitlo, A., ... Mengal, A. S. (2016). Efficacy of selected fungicides on the linear colony growth of the *Helminthosporium oryzae* caused by brown spot disease of rice. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 13(1), 13–17.
- Kennedy, G., Burlingame, B., & Nguyen, V. N. (n.d.). Nutritional contribution of rice and

- impact of biotechnology and biodiversity in rice-consuming countries. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/006/Y4751E/y4751e05.htm>
- Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S., & Khosravi, V. (2012). Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(1), 297–305. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100035>
- Koumoutsis, A., Chen, X., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., ... Borriss, R. (2004). Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, *186*(4), 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/jb.186.4.1084-1096.2004>
- Kozaka, T. (1961). Ecological studies on sheath blight of rice plant caused by *Pelliculariasasakii* (Shirai) S. Ito, and its chemical control. *Chugoku Agricultural Research*, *20*, 1–133.
- Kubo, Y., & Furusawa, I. (1991). Melanin biosynthesis. In G. T. Cole & H. C. Hoch (Eds.), *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals* (pp. 205–218). New York: Plenum Press.
- Lee, F. N., & Rush, M. C. (1983). Rice Sheath Blight : A Major Rice Disease. *Plant Disease*, *67*, 829–832. <https://doi.org/10.1094/PD-67-829>
- Liao, J., Chen, P., Yang, Y., Kan, S., Hsieh, F., & Liu, Y. (2016). Clarification of the Antagonistic Effect of the Lipopeptides Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 against *Pyricularia oryzae* via In Situ. *Molecules*, *21*(12), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules21121670>
- Mathre, D. E. (1992). *Gaeumannomyces*. In L. L. Singleton, J. D. Mihail, & C. M. Rush (Eds.),

Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi (pp. 60–63). APS Press.

Mew, T. W., & Gonzales, P. (2002). *A handbook of rice seed borne fungi*. Science Publishers, Inc.

Mnif, I., Grau-campistany, A., Coronel-león, J., Hammami, I., Triki, M. A., Manresa, A., & Ghribi, D. (2015). Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6690–6699.

<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5826-3>

Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., & Orduz, S. (2014). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.004>

Moyne, A., Shelby, R., Cleveland, T., & Tuzun, S. (2011). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 622–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x>

Mukherjee, A. K., & Das, K. (2005). Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiology Ecology*, 54, 479–489.

Mycobank. (2016a). *Bipolaris oryzae*. Retrieved from http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycobankNr_=482518

Mycobank. (2016b). *Gaeumannomyces graminis*. Retrieved from <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basi>

c

Mycobank. (2016c). *Rhizoctonia solani*. Retrieved from

<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic>

c

Olmos, S. (2007). Apunte de morfología, fenología, ecofisiología, y mejoramiento genético del arroz.

Oñate Mendoza, A. M. (2015). Transformación del campo y crecimiento verde. Incidencias del vaneamiento en la producción de arroz seco, variedades fedearroz 60, 68 y 174 en la finca la escondida región de carimagua departamento del meta.

Ongena, M., & Jacques, P. (2007). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... Thonart, P. (2007).

Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–1090.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>

Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in Genetics*, 26(10), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.07.001>

Ou, S. H. (1985). *Rice diseases* (2nd ed.). Commonwealth mycological institute.

Padmanabhan, S. Y. (1973). The Great Bengal Famine. *Annual Review of Phytopathology*, 11(1), 11–24. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.11.090173.000303>

Peixoto, C. N., Ottoni, G., Filippi, M. C. C., Silva-lobo, V. L., & Prabhu, A. S. (2013). Biology

- of *Gaeumannomyces graminis* var . *graminis* isolates from rice and grasses and epidemiological aspects of crown sheath rot of rice. *Tropical Plant Pathology*, 38(6), 495–504.
- Persaud, R., Khan, A., Isaac, W., Ganpat, W., & Saravanakumar, D. (2019). Plant extracts , bioagents and new generation fungicides in the control of rice sheath blight in Guyana. *Crop Protection*, 119, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.01.008>
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(55), 553–563.
- Prabhu, A. S., & Filippi, M. C. (2002). Ocorrência do mal-do-pé causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, uma nova enfermidade em arroz no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 27(4), 417–419. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582002000400016>
- Prasad, B., & Eizenga, G. C. (2008). Rice Sheath Blight Disease Resistance Identified in *Oryza* spp . Accessions. *Plant Disease*, 92(11), 1503–1509. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-11-1503>
- R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Rabindran, R., & Vidhyasekaran, P. (1996). Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. *Crop Protection*, 15(8), 715–

721.

- Ribot, C., Hirsch, J., Balzergue, S., Tharreau, D., Nottéghem, J., Lebrun, M.-H., & Morel, J. (2008). Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Physiology*, *165*(1), 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.013>
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants : potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *57*(4), 609–618. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl024>
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J., Arrebola, E., ... Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*(4), 430–440. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-4-0430>
- Saechow, S., Thammasittirong, A., Kittakoop, P., Prachya, S., & Thammasittirong, S. N.-R. (2018). Antagonistic Activity against Dirty Panicle Rice Fungal Pathogens and Plant Growth-Promoting Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(9), 1527–1535.
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, *33*(8), 1523–1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
- Savary, S., Willocquet, L., & Teng, P. S. (1997). Modelling Sheath Blight Epidemics on Rice Tillers. *Agricultural Systems*, *55*(3), 359–384. [https://doi.org/10.1016/s0308-521x\(97\)00014-0](https://doi.org/10.1016/s0308-521x(97)00014-0)
- Singh, R. K., Singh, C. V., & Shukla, V. D. (2005). Phosphorus nutrition reduces brown spot incidence in rainfed upland rice. *International Rice Research Notes*, *30*, 31–32.

- Smith, I. M., Dunez, J., Phillips, D. H., Lelliott, R. A., & Archer, S. A. (1992). Ascomycetes III. Ophiostomatales, Diaporthales, Polystigmatales, Sphaeriales, Diatrypales, Coryneliales. In *Manual de enfermedades de las plantas* (pp. 371–373). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Sunder, S., Singh, R., & Agarwal, R. (2014). Brown spot of rice : an overview. *Indian Phytopathology*, 67(3), 201–215.
- Taheri, P., & Tarighi, S. (2010). Cytomolecular aspects of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology*, 129(4), 511–528.
<https://doi.org/10.1007/s10658-010-9725-7>
- Talbot, N. J. (2003). ON THE TRAIL OF A CEREAL KILLER : Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 177–202.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090957>
- Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Cortes-Velazquez, A., Lappe, P., Larque-Saavedra, A., & Perez-Brito, D. (2008). PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan peninsula. *Molecular Biotechnology*, 40(3), 293–298.
<https://doi.org/10.1007/s12033-008-9093-0>
- The American Phytopathological Society. (2006). *Rhizoctonia diseases of turfgrass*. Retrieved from
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/basidiomycetes/pages/rhizoctonia.asp>
x
- The Commission of the European Communities. (2002). Commission Regulation (EC) No 2076/2002. *Office of the Journal of European Communities*, L319, 3–11.

- Tirado Ospina, Y. C., & Higuera Acosta, O. L. (2018). Estrategia integral para el manejo del “mal del pie.” *Arroz*, 66(533), 39–45.
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1151–1160.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Vidhyasekaran, P., Borromeo, E. S., & Mew, T. W. (1986). Host specific toxin production by *Helminthosporium oryzae*. *Phytopathology*, 76(3), 261–266.
- Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J. J., Argel, L. E., & Peralta, S. O. (2013). Fengycin C Produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of Natural Products*, 76(4), 503–509.
- Vivas, L., & Intriago Mendoza, D. (2012). Guía para el reconocimientos y manejo de las principales enfermedades en el cultivo de arroz en Ecuador. *Departamento Nacional de Proteccion Vegetal. Sección Fitopatología, Boletín Di*, 12.
- Vukson - Van Beek, D. (2010). Disease cycle for take-all patch on graminaceous hosts (caused by *Gaeumannomyces graminis*). Retrieved from
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/LabExercises/ArticleImages/Forms/DispForm.aspx?ID=100>
- Wang, J., Liu, J., Chen, H., & Yao, J. (2007). Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 889–894. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1054-1>
- Wang, S., & Lu, Z. (2017). Secondary Metabolites in Archaea and Extreme Environments. In G. Witzany (Ed.), *Biocommunication of Archaea* (pp. 235–239). Springer, Cham.

- Yang, L., Quan, X., Xue, B., Goodwin, P. H., Lu, S., Wang, J., ... Wu, C. (2015). Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var . *tritici*. *BIOLOGICAL CONTROL*, 85, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.12.010>
- Yang, M., Mavrodi, D. V, Mavrodi, O. V, Bonsall, R. F., Parejko, J. A., Paulitz, T. C., ... Guo, J. (2011). Biological Control of Take-All by Fluorescent *Pseudomonas* spp . from Chinese Wheat Fields. *Phytopathology*, 101(12), 1481–1491.
- Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., & Bertagnolli, B. L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955–963. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(02)00027-5)
- Yugander, A., Ladhalakshmi, D., Prakasham, V., Mangrauthia, S. K., Prasad, M. S., Krishnaveni, D., ... Laha, G. S. (2014). Pathogenic and Genetic Variation among the Isolates of *Rhizoctonia solani* (AG 1-IA), the Rice Sheath Blight Pathogen. *Journal of Phytopathology*, 163(6), 465–474. <https://doi.org/10.1111/jph.12343>
- Zhang, C., Liu, Y., Ma, X., Feng, Z., & Ma, Z. (2009). Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. *Crop Protection*, 28(5), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.12.004>
- Zhang, D., Gao, T., Li, H., Lei, B., & Zhu, B. (2017). Identification of antifungal substances secreted by *Bacillus subtilis* Z-14 that suppress *Gaeumannomyces graminis* var . *tritici*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(2), 237–251. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1275522>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., ... Jin, M. (2017). Biological activity of

lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 5951–5960.

<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>