



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**EFFECTO INDIVIDUAL Y POR INTERACCIÓN DE *Burkholderia glumae*  
Y *Burkholderia gladioli* EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE ARROZ (*Oryza  
sativa*), Y SU POTENCIAL CONTROL MEDIANTE APLICACIONES DE  
ZINC, BORO O MICROORGANISMOS BENÉFICOS.**

**Trabajo de Titulación Previo a la Obtención del Título de Magister en  
Investigación en Biotecnología Agrícola**

Presentado por:

Jonathan Leonidas Castro Lara

Guayaquil - Ecuador

2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por el financiamiento de este proyecto y por la dirección del mismo.

Al Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA) por las facilidades brindadas durante el periodo académico y por haberme permitido desarrollar mis investigaciones en sus instalaciones.

Al Ing. Eduardo Cervantes B., Decano de la Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales (FIMCBOR), y al M. Sc. Jerry Landívar Z., Director del CSA, por el apoyo brindado durante el periodo académico.

## DEDICATORIA

A Dios, que siempre mantiene una luz encendida con la cual me guía por los caminos torcidos de la vida, haciendo la estancia más dulce en este mundo.

A mis padres Gladys Lara Bayas y Arturo Avellán Naranjo, las personas que siempre han estado ahí para apoyarme en mis propósitos en el transcurso de mi vida.

A mi familia, Marilin Verdezoto, Jesua Navarrete, y mi hijo Frederic Castro que son la inspiración y la fortaleza que necesito para dar inicio a un desafío y para la culminación del mismo.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ramón Leonardo Espinel Martínez, Ph. D.  
DECANO DE FCV

Juan Manuel Cevallos Cevallos, Ph. D.  
DIRECTOR DE TESIS

María Isabel Jimenez Feijoo, Ph. D.  
CO-DIRECTOR DE TESIS

Efrén Germán Santos Ordóñez, Ph. D.  
VOCAL

José Jerry Landívar Zambrano, M. Sc.  
VOCAL

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Jonathan Leonidas Castro Lara

## GLOSARIO

**Antibiograma.** Prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones.

**Biocontrolador.** Son organismos que se utilizan para el control de plagas, pueden ser estos insectos, plantas, hongos y bacterias.

**Infeción.** Invasión y multiplicación de agentes patógenos en los tejidos de un organismo.

**Inóculo.** Es una suspensión de microorganismos vivos que se han adaptado para reproducirse en un medio específico.

**Patogenicidad.** Es la capacidad para producir enfermedad en huéspedes susceptibles.

**Patógeno.** Se denomina patógeno a todo agente biológico externo que se aloja en un ente biológico determinado, dañando de alguna manera su anatomía, a partir de enfermedades o daños visibles o no.

**Virulencia.** La virulencia es el grado de patogenicidad de un serotipo, de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible.

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	viii
Resumen.....	1
Capítulo I: Introducción y objetivos.....	2
Antecedentes y justificación.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	4
Marco teórico.....	4
Capítulo II: Metodología.....	7
Efecto de las cepas bacterianas en semillas de arroz y plántulas.....	7
Obtención del material biológico.....	7
Preparación del inóculo.....	7
Desinfección de semillas de arroz.....	8
Inoculación de semillas.....	8
Efecto de los micronutrientes sobre el desarrollo del BPB en plantas.....	10
Material biológico y micronutrientes.....	10
Preparación previa de las semillas y siembra.....	11
Preparación del inóculo.....	12
Inoculación de plantas.....	12
Toma y análisis de datos.....	13
Identificación de microorganismos benéficos para el control de BPB.....	14
Toma de muestra.....	14
Aislamiento de bacterias en muestras de suelo.....	15
Prueba de interacción entre cepas obtenidas del suelo y <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .....	15
Amplificación, secuenciación e identificación de posibles controladores.....	15
Capítulo III: Resultados y discusión.....	16
Efecto individual y por interacción de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> en el desarrollo germinativo de semillas de arroz.....	16
Efecto individual y por interacción de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> en plantas de arroz.....	26
Efecto de los micronutrientes zinc y boro, sobre el desarrollo de BPB.....	28
Microorganismos con potencial para el control de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .....	35
Conclusiones y recomendaciones.....	38
Bibliografía.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Diagrama de experimentación con semillas de arroz .....	9
Figura 2. Diagrama del diseño experimental en plantas.....	10
Figura 3. Semillas tratadas con micronutrientes. ....	11
Figura 4. Siembra de arroz.....	12
Figura 5. Inoculación de plantas de arroz.....	13
Figura 6. Niveles de severidad de BPB. ....	14
Figura 7. Curva de relación entre densidad óptica y concentración de UFC/ml. ....	16
Figura 8. Histograma de germinación de INIAP-11 .....	16
Figura 9. Histograma de germinación de SFL-11 .....	17
Figura 10. Histograma de germinación de INIAP-15 .....	18
Figura 11. Histograma de germinación de INIAP-14 .....	19
Figura 12. Histograma de germinación de SFL-09 .....	20
Figura 13. Longitud de las hojas de plantas inoculadas con <i>B. glumae</i> .....	22
Figura 14. Longitud de las raíces de plantas inoculadas con <i>B. glumae</i> .....	23
Figura 15. Longitud de las hojas de plantas inoculadas con <i>B. gladioli</i> .....	23
Figura 16. Longitud de las raíces de plantas inoculadas con <i>B. gladioli</i> .....	24
Figura 17. Longitud de las hojas de plantas inoculadas con <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .....	24
Figura 18. Longitud de las raíces de plantas inoculadas con <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .....	25
Figura 19. Afectación por patógenos en plantas .....	27
Figura 20. Efecto del zinc en semillas inoculadas con <i>B. glumae</i> .....	29
Figura 21. Efecto del zinc en semillas inoculadas con <i>B. gladioli</i> .....	29
Figura 22. Efecto del zinc en semillas inoculadas con <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> ...	30
Figura 23. Efecto del boro en semillas inoculadas con <i>B. glumae</i> .....	31
Figura 24. Efecto del boro en semillas inoculadas con <i>B. gladioli</i> .....	32

Figura 25. Efecto del boro en semillas inoculadas con <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> ..	32
Figura 26. Efecto del zinc y boro en semillas inoculadas con <i>B. glumae</i> .....	33
Figura 27. Efecto del zinc y boro en semillas inoculadas con <i>B. gladioli</i> .....	34
Figura 28. Efecto del zinc y boro en semillas inoculadas con <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .....	34
Figura 29. Antibiograma con bacterias aisladas de muestras de suelos.....	35

## ABREVIATURAS

**AUDPC:** Área bajo la curva de progresión de la enfermedad.

**B:** Boro.

**BPB:** Añublo bacteriano de la panícula.

**ml:** Mililitro.

**NaCl:** Cloruro de Sodio.

**O. D.:** Densidad óptica.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**UFC:** Unidades formadoras de colonias.

**Zn:** Zinc.

## Resumen

Un componente importante de la dieta diaria de los ecuatorianos es el arroz, y su cultivo cubre una superficie aproximada de 400 mil hectáreas, con un rendimiento de 3,9 Tm/ha. Sin embargo, la producción puede verse afectada por enfermedades como el tizón de la panícula. Esta enfermedad se la asocia indistintamente con *Burkholderia glumae* o *Burkholderia gladioli*, debido a que estas especies causan los mismos síntomas en plantas con la enfermedad. La especie aislada en mayor proporción en plantas enfermas ha sido *B. glumae*; no obstante, se conocen escasos reportes sobre el efecto de la interacción de ambos patógenos en semillas o plántulas de arroz, ni el posible control de la enfermedad utilizando microorganismos benéficos o micronutrientes. Además, existe poca información acerca de la virulencia de estos patógenos en las distintas variedades comerciales de arroz en el Ecuador. En este trabajo se evaluó, de forma individual y por interacción de las dos especies de patógenos; el efecto de la infección sobre la germinación y el desarrollo postgerminativo de las semillas de arroz; así como el efecto de los micronutrientes en el control de la enfermedad del tizón de la panícula causada por las dos especies de *Burkholderias*. Por último, se evaluó el control de la enfermedad mediante biocontroladores obtenidos de muestras de suelos. Como resultado se obtuvo que la cepa de *B. glumae* afectó de forma significativa en el porcentaje de germinación de las semillas; así como el desarrollo de las raíces y cotiledones en las plántulas de todas las variedades utilizadas. Sin embargo, *B. gladioli* no mostró mayores influencias en la germinación de las semillas de las 5 variedades de arroz; pero sí se observó un efecto de retardo en el desarrollo de las raíces y los cotiledones de arroz. Ambas especies patógenas causaron un efecto significativo en plantas en todas las variedades de arroz, pero la interacción de los patógenos no fue significativa. El efecto de los micronutrientes zinc y boro, sobre el desarrollo de la enfermedad tizón de la panícula en condiciones semicontroladas, no mostraron efectos favorables para el control. Sin embargo, se identificaron tres microorganismos con potencial para el control de *B. glumae*, incluyendo *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus altitudinis*; así mismo *Bacillus subtilis* fue capaz de controlar el crecimiento de *B. gladioli* mediante evaluaciones *in vitro*.

## Capítulo 1

### 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El arroz ha sido y es uno de los cereales mayormente cultivado a nivel mundial, y es considerado como una base en el alimento diario de gran parte de la población en todo el mundo. En Ecuador, también es un componente importante de la dieta diaria, y su cultivo ha cubierto en los últimos doce años una superficie anual aproximada entre 320 mil a 420 mil hectáreas, con un rendimiento de 3,9 Tm/ha, y una producción de arroz pilado entre 700 mil a 900 mil toneladas [1]. Sin embargo, la producción puede verse afectada por enfermedades como el tizón de la panícula, la cual está asociada indistintamente con *Burkholderia glumae* o *Burkholderia gladioli*, debido a que las dos cepas causan los mismos síntomas en plantas infectadas. La especie aislada en mayor proporción en plantas enfermas ha sido *B. glumae*; sin embargo, se conocen escasos reportes sobre el efecto de la interacción de ambos patógenos en semillas o plántulas de arroz, ni el posible control de la enfermedad utilizando microorganismos benéficos o micronutrientes. Además, existe poca información acerca de la virulencia de estos patógenos en las distintas variedades comerciales de arroz en el Ecuador. En este estudio, el efecto individual y por interacción de ambos patógenos se lo evaluará inoculando semillas y plántulas de las cinco variedades de arroz más utilizadas en el país. En las semillas se medirá el porcentaje de germinación, y en las plántulas obtenidas de estas semillas se medirá la longitud de hojas y raíces para cada tratamiento. En las plantas se evaluará la progresión diaria de los síntomas utilizando una escala de severidad. Para los estudios de control, se realizará una prospección *in vitro* contra ambos patógenos utilizando microorganismos pre-seleccionados aislados de muestras de suelos de diferentes locaciones. Finalmente, se evaluará el efecto de aplicación de micronutrientes como el boro y zinc en el desarrollo de la enfermedad en condiciones semicontroladas.

## 1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Durante sus años de producción hasta la fecha, el cultivo de arroz se ha visto afectado por varias enfermedades, una de ellas es el tizón de la panícula o pudrición del grano, conocida también como BPB por sus siglas en inglés (*bacterial panicle blight*), causada por *Burkholderia glumae*, reportada por primera vez en Japón en el año de 1956 [2]. Esta enfermedad presenta síntomas como decoloración de las espigas, manchas en las semillas y caída de los granos infectados, y generalmente se la asocia en dependencia de las condiciones climáticas de temperatura y humedad nocturna [3]. Esta enfermedad también fue reportada en otros países de Asia y África [4][5]; en Colombia también se ha reportado el proceso de la enfermedad y se ha aislado el agente causal de la misma [9], así como en otros países de Latinoamérica [10]. En el Sur de los Estados Unidos se reportó la presencia de la enfermedad, donde provocó pérdidas aproximadas de un 40% en los años 1996 y 1997 [6]; además se evidenció que no solamente *B. glumae* formaba parte de los aislados procedentes de plantas enfermas, sino que otra especie *B. gladioli* también se encontraba presente y causaba los mismos síntomas que *B. glumae* [7][8]. Otros estudios indicaron que, si bien las dos especies de *Burkholderia* se encontraban en las plantas enfermas, *B. gladioli* se encuentra en menor proporción que *B. glumae*, mostrando una baja agresividad que su par [11]; sin embargo, esto puede ser atribuido a las diferencias relacionadas con su ubicación geográfica [12]. En Ecuador, recientemente se reportó la presencia de *B. glumae* y *B. gladioli*, como agentes causales del tizón de la panícula en arrozales de Palestina (provincia del Guayas), enfermedad que dejó grandes pérdidas económicas [13][14].

Por otro lado, investigadores japoneses determinaron que *B. glumae* produce una toxina de suma importancia para su virulencia, denominando como cepas no virulentas a aquellas que no las producían [14]. Trabajos posteriores mostraron que algunas cepas no virulentas de *Burkholderia spp.* podían disminuir el desarrollo de la enfermedad de BPB, por lo que se podría estudiar la factibilidad de usarse como agentes de biocontrol [15][16][17]. Sin embargo, trabajos como estos, se han realizado muy poco a nivel mundial e inclusive existe poca evidencia del comportamiento de las dos especies de *Burkholderias* en una misma planta. Así, el estudio de la interacción entre estas dos especies, podría evidenciar una ruta con la cual podamos combatir la propagación de la enfermedad en los cultivos de arroz, y obtener una producción más saludable y amigable con el medio ambiente.

## 1.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos individuales y por interacción de *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*, agentes causales del tizón de la panícula, en semillas y plántulas

de arroz, así como su potencial control utilizando micronutrientes o microorganismos.

### 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de esta investigación fueron:

- Determinar el efecto individual y por interacción de *B. glumae* y *B. gladioli* en el desarrollo de semillas y plántulas de cinco variedades comerciales de arroz.
- Evaluar el efecto de los micronutrientes zinc y boro, sobre el desarrollo de la enfermedad del tizón de la panícula en condiciones semicontroladas.
- Identificar al menos un microorganismo con potencial para el control de *B. glumae* y *B. gladioli* mediante evaluaciones *in vitro*.

### 1.4 MARCO TEÓRICO

El arroz (*Oryza sativa*) es una de las gramíneas que ha sido cultivada de forma intensiva alrededor del mundo debido a su importancia en el porcentaje de la dieta del hombre [18]. Asia es uno de los continentes en donde el arroz forma gran parte de la alimentación básica de sus habitantes. América no se queda atrás, y sus países también han hecho del arroz parte importante dentro de la cocina diaria, y en muchos de estos países este grano es la base de sus platos insignia o sus platos típicos. Por su gran demanda, el arroz se ha convertido en el segundo cereal en ser cultivado a nivel mundial, escoltando al maíz que se lleva el primer lugar debido a sus variados usos dentro de los procesos de alimentos para el ser humano [19].

En Ecuador, el cultivo de arroz ocupa el tercer lugar en los productos con mayor superficie sembrada, satisfaciendo la demanda nacional en su totalidad. Existen 5 provincias donde su cultivo ocupa las mayores áreas de producción, Guayas con el 63,85 % es el principal productor arrocerero del país, seguido por la provincia de Los Ríos con un 28,19 % de superficie cultivada, y Manabí ocupa el tercer lugar con un área cultivada del 4,63 %; el 3 % restante lo comparten las provincias de El Oro y Loja [1]. En un periodo de 10 años el auge productivo de esta gramínea ha aumentado la superficie de cosecha de 320000 a 420000 hectáreas, resultando en una producción de 700000 a 900000 toneladas de arroz pilado. En el primer cuatrimestre del año 2014, las tres principales provincias arroceras obtuvieron un rendimiento general de 4,67 ton/ha; siendo la provincia del Guayas la que mejor rendimiento obtuvo (4,86 ton/ha), seguido por la provincia de Los Ríos con un 4,49 ton/ha, y Manabí con

un 4,32 ton/ha [20]. Para el año 2015, el primer cuatrimestre arrojó un rendimiento ligeramente superior al año 2014, con un valor de 4,78 ton/ha; en donde seguía siendo la provincia del Guayas la que mayor rendimiento obtuvo entre las tres principales provincias productoras de este cereal, con un valor de 5,23 ton/ha, seguido por 5,12 ton/ha de rendimiento que obtuvo la provincia de Manabí, este repunte en el rendimiento de su producción desplazó a la provincia de Los Ríos a la tercera ubicación en el rendimiento con un 4,02 ton/ha [21].

Según fuente del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), la variedad de arroz más solicitada por el productor en el año 2014 fue la INIAP-14; mientras que para el año 2015, las variedades más requeridas por los productores fueron la INIAP-14 con un 38,9 % y la SFL-09 con un 26,5 %; el resto del porcentaje fueron ocupadas por las variedades restantes que se utilizan en la producción en el país. Las encuestas realizadas por el INEC señalan que el 70 % de los productores han indicado que una de las problemáticas con las que se han encontrado en el año 2015 y que han disminuido sus producciones han sido indiscutiblemente las plagas y las enfermedades; de éstas, el manchado de grano ha sido observado por un 35 % de los productores y el vaneamiento de granos un 14 % [21].

Este tipo de enfermedades han sido reportada por productores alrededor del mundo y ha sido la causa de pérdidas de más del 75 % de la producción; el manchado de grano o pudrición de la panícula, conocido como BPB por sus siglas en inglés (*bacterial panicle blight*), es una de las enfermedades bacterianas, generalmente causada por *Burkholderia glumae*, antes denominada como *Pseudomonas glumae*, y fue reportada por primera vez en Kyushu-Japón, en 1956 por Goto y Ohata [2]. Desde entonces, el BPB ha sido reportado en varios países del continente asiático como Taiwán [22], Vietnan [23], Sri Lanka, Malasia, Filipinas [24], Nepal [25], Korea [26], China, Tanzania, Tailandia, Indonesia [27], Cambodia [28]; así como en Colombia [10], Estados Unidos [11], Panamá [29], Venezuela [30] y hace poco en Ecuador [14]. Tanto ha sido la afectación que esta enfermedad causó en sus inicios, que Ham *et al.* en el 2011, la denominó como la próxima enfermedad con mayor importancia para este cultivo.

Algunos estudios han demostrado que la enfermedad podría afectar en gran parte del desarrollo del cultivo desde la germinación, produciendo una inhibición de la misma, así como una decoloración, seguido de una necrosis de la panícula, hasta causar esterilidad en flores y producir el aborto del grano [7][26][6].

Las lesiones que causa el BPB a nivel de la hoja se evidencian con una coloración amarillenta que se torna a un color marrón rojizo con forme avanza la infección, hasta producir la necrosis o pudrición de la parte afectada. Cuando la infección ha llegado a la panícula, esta puede mostrar granos manchados en posición aleatoria por toda la panícula; sin embargo, si la infección es fuerte, esta puede mostrar el manchado de grano en toda la panícula. Otro aspecto que se evidencia debido al avance de la enfermedad, es que la panícula permanece vertical cuando sus granos

están formados, esto se debe a que el grano se encuentra lechoso y no se endurece, resultando en que la falta de peso del grano no incline la panícula [32].

En la mayoría de plantas enfermas y con sintomatología de BPB, se han aislado cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*; es poco frecuente no encontrarlas en la misma planta. Sin embargo, se han aislado cepas de *B. glumae* en plantas que no presentaban síntomas; debido a la carencia de una toxina, factor de virulencia asociada con la cepa bacteriana [15][33]. Tanto *B. glumae* como *B. gladioli* pertenecen al género de las *Burkholderias* [34][35], antes denominadas como *Pseudomonas*; son bacterias gram negativas, con forma de bastón, miden 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  de largo por 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro [36][37]. Estudios demuestran que la virulencia de *B. glumae* está relacionada con la producción de una fitotoxina, la toxo flavina, y la producción de la lipasa Lip A, y los sistemas de secreción del tipo II y del tipo III [15][38][39][40]; esta es la razón por la cual se han aislado cepas de *B. glumae* en plantas que no presentaban síntomas de BPB. Se ha demostrado que la toxo flavina tiene propiedades antibacteriales, antifúngicas y herbicidas, así como la de inducir toxicidad en ratones [26].

Por otro lado, los micronutrientes juegan un papel muy importante en el desarrollo de las plantas; para nuestro estudio nos hemos enfocado en la fertilización con Zinc y Boro. El Zinc contribuye a la síntesis de triptófano (auxinas), también está asociado en funciones de la membrana celular en cuanto a estructura y permeabilidad; razón por la cual, el déficit de zinc se ve ligado a la fácil infección de patógenos [41]. El Boro es un nutriente el cual interviene en la división celular, síntesis de ácidos nucleicos, crecimiento meristemático, formación de flores, y producción de semillas, así como regulador del sistema hormonal en plantas [42].

## Capítulo 2

### 2. METODOLOGÍA

#### 2.1 Efecto de las cepas bacterianas en semillas de arroz y plántulas.

##### 2.1.1 Obtención del material biológico

Las semillas de arroz fueron donadas por la empresa Semimor, recolectadas de sus campos de multiplicación, momentos antes de que se realice el tratamiento con plaguicidas para el mantenimiento de las semillas. Las variedades utilizadas fueron INIAP-11, INIAP-14, INIAP-15, SFL-09 Y SFL-11.

Las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* utilizadas durante toda esta investigación, fueron donadas por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), mismas que se conservaban a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y que fueron aisladas de cultivos infectados localizados en las regiones de Daule y Palestina, cantones pertenecientes a la provincia del Guayas. Las especies de *Burkholderias* fueron confirmadas mediante técnicas moleculares utilizando iniciadores específicos para cada una de ellas [43].

##### 2.1.2 Preparación del inóculo

Los aislados de *Burkholderia spp.* se extendieron sobre Agar de soja tríptico (Difco, Sparks, EE.UU.) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Las colonias obtenidas se transfirieron luego a caldo de soja tríptico (Difco, Sparks, EE.UU.) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas a 150 rpm (Serie Clásica C24, New Brunswick Scientific, New Jersey-USA). El cultivo bacteriano se concentró por centrifugación a 7500 rpm durante 5 minutos (Sorvall ST16, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Alemania). El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó con 35 ml de solución de NaCl al 0,75 % (J. T. Baker, Pennsylvania, EUA) y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos; este procedimiento se realizó 3 veces. A continuación, el sedimento se resuspendió en 35 ml de una solución estéril de NaCl al 0,75 % hasta llegar a una absorbancia de  $0,860 \pm 0,05$  OD a 600 nm para *B. glumae*, y  $0,740 \pm 0,05$  OD a 600 nm para *B. gladioli*, utilizando un Biophotometer 22331 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania); estas densidades ópticas corresponden a una concentración de  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml para cada patógeno. La correlación entre los valores de absorbancia y UFC/mL se determinó mediante curvas de calibración en ensayos preliminares.

### 2.1.3 Desinfección de semillas de arroz

Las semillas de arroz fueron previamente lavadas y desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 6% durante 1 min, con agitación constante a razón de 200 ml por cada 100 semillas. Posteriormente, se descartó la solución desinfectante y las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril, este lavado fue realizado 2 veces más. Adicionalmente, se hizo un segundo tratamiento de desinfección con etanol al 70 % por 6 min, con agitación constante, seguido por tres lavados con agua destilada estéril.

### 2.1.4 Inoculación de las semillas

El experimento se dividió en tres bioensayos, en el primer bioensayo se inoculó la cepa *B. glumae* (Figura 1), para el segundo bioensayo inoculamos las semillas con *B. gladioli*; y el tercer bioensayo fue inoculado con una solución que contenía un volumen igual de las dos bacterias patógenas a concentraciones similares. Cinco variedades de arroz *Oryza sativa* fueron utilizadas para este ensayo: INIAP-11, INIAP-14, INIAP-15, SFL-09 y SFL-11. Así mismo, se probaron cuatro concentraciones de inóculo  $1.0 \times 10^9$ ,  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^5$ , y  $1.0 \times 10^3$  UFC/ml. Las soluciones con cada concentración de bacterias fueron colocadas en un frasco de 250 ml con tapa rosca a razón de 100 ml por cada 50 semillas. Los frascos fueron llevados a una incubadora con agitación, a una temperatura de 37°C y una agitación constante de 150 rpm. Como control experimental, las semillas fueron sometidas al mismo tratamiento de desinfección y de incubación, con la diferencia de que estas se inocularon con una solución al 0,75 % de NaCl estéril, en lugar de la suspensión bacteriana.

Cada ensayo consistió en 1 unidad experimental con dos repeticiones de 50 semillas depositadas en el mismo contenedor. Las semillas fueron sembradas en recipientes de plástico con tapas (19x13x8cm), esterilizadas con etanol al 70% y expuestas a luz ultravioleta durante 15 minutos. Para mantener la humedad relativa (RH > 70%) en el interior del envase se utilizó papel toalla humedecida con 30 ml de agua destilada estéril; el papel toalla se esterilizó previamente a 121°C durante 15 minutos y se secó en un horno a 50°C. Los recipientes plásticos se incubaron en una habitación con luz las 24 horas del día a una temperatura ambiental aproximada de 27°C. Se evaluó la gravedad de la enfermedad al octavo día después de la inoculación. Se analizó la germinación para cada tratamiento y la longitud del cotiledón de las semillas germinadas y su respectiva raíz. Los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA con un 95 % de confianza; así mismo las medias se compararon con el grupo control con una prueba de Bonferroni con el 95 % de confianza.

### DIAGRAMA DE EXPERIMENTACIÓN CON SEMILLAS DE ARROZ

	Conc. 1 ( $1,0 \times 10^9$ )		Conc. 2 ( $1,0 \times 10^7$ )		Conc. 3 ( $1,0 \times 10^5$ )		Conc. 4 ( $1,0 \times 10^3$ )		CTRL	
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 1	Repetición 2						
Variedad 1	50 semillas	50 semillas	50 semillas	50 semillas						
Variedad 2	50 semillas	50 semillas	50 semillas	50 semillas						
Variedad 3	50 semillas	50 semillas	50 semillas	50 semillas						
Variedad 4	50 semillas	50 semillas	50 semillas	50 semillas						
Variedad 5	50 semillas	50 semillas	50 semillas	50 semillas						

**Figura 1.** Diagrama de experimentación con semillas de arroz. Se muestra la disposición del ensayo para las 5 variedades de arroz y para cada concentración probada. Este diagrama es uno de los tres bioensayos, el cual se inoculó con *B. glumae*, la misma distribución se utilizó para la inoculación con *B. gladioli* y la mezcla de las dos especies *B. glumae* y *B. gladioli* (v/v).

## 2.2 Efecto de los micronutrientes sobre el desarrollo del BPB en plantas.

### 2.2.1 Material biológico y micronutrientes.

Para este ensayo se utilizaron 4 variedades de arroz: INIAP-14, INIAP-15, SFL-09 y SFL-11; las dos cepas de *Burkholderias*, y los micronutrientes Zinc y Boro. En la figura 2 se muestra el diseño experimental utilizado.

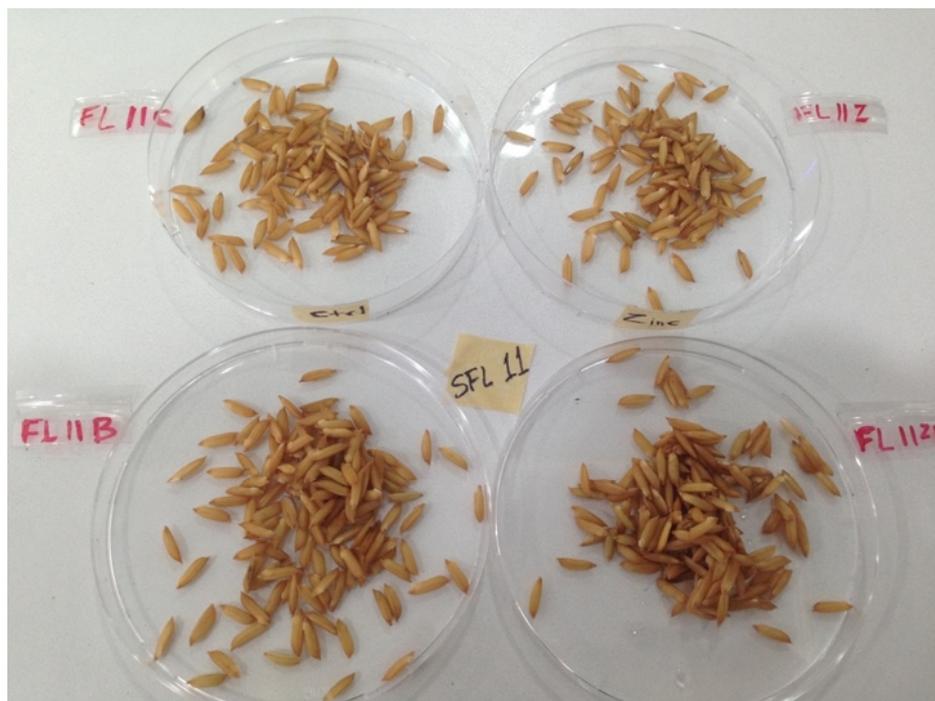
		B1	B2	B 1 y B2	Control 1		
Plantas + bacterias	V1	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	Plantas sin bacterias	
		6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10		
		1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		Plantas zinc
		6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10		
		1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		Plantas boro
6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10				
Plantas (semillas con zinc) + bacterias	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	Plantas zinc y boro		
Plantas (adición de boro) + bacterias	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5			
Plantas (zinc y boro) + bacterias	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10			
Plantas + bacterias	V2	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	Plantas sin bacterias	
		6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10		
		1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		Plantas zinc
		6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10		
		1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		Plantas boro
6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10				
Plantas (semillas con zinc) + bacterias	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	Plantas zinc y boro		
Plantas (adición de boro) + bacterias	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5			
Plantas (zinc y boro) + bacterias	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10			
Plantas + bacterias	V3	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	Plantas sin bacterias	
		6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10		
		1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		Plantas zinc
		6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10		
		1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		Plantas boro
6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10				
Plantas (semillas con zinc) + bacterias	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	Plantas zinc y boro		
Plantas (adición de boro) + bacterias	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5			
Plantas (zinc y boro) + bacterias	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10			
Plantas + bacterias	V4	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	Plantas sin bacterias	
		6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10		
		1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		Plantas zinc
		6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10		
		1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		Plantas boro
6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10				
Plantas (semillas con zinc) + bacterias	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	Plantas zinc y boro		
Plantas (adición de boro) + bacterias	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5			
Plantas (zinc y boro) + bacterias	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10	6 7 8 9 10			

**Figura 2.** Diagrama del diseño experimental en plantas. Los bloques de la columna B1 fueron inoculados con *B. glumae*, mientras que los bloques de la columna B2 se infectaron con *B. gladioli*, y por último el tercer bloque de la columna B1-B2 fueron inoculados con la mezcla v/v de cada patógeno. Para efectos de comparación y control, el bloque de la columna control no fue inoculado con ningún patógeno, pero sí fue suplementado con zinc y boro de acuerdo a cada tratamiento. Las variedades de arroz utilizadas en el ensayo fueron denominadas con V1, V2, V3 y V4. Las réplicas de cada tratamiento se identificaron con números del 1 al 10.

Se utilizaron vasos plásticos de 900 ml de capacidad, mismos que fueron llenados con tierra preparada sin esterilizar hasta 2 cm antes de colmarse. La tierra se preparó con 2 partes de tierra de sembrado y 1 parte de tierra arenosa recolectada a orillas del Río Daule. Los vasos conteniendo la tierra preparada fueron regados durante 1 hora en las mañanas, por tres días.

### 2.2.2 Preparación previa de las semillas y siembra

Las semillas de cada variedad fueron tratadas con micronutrientes, siendo colocadas en mallas de tela y luego sumergidas por tres días en 1 litro de: solución 1 (0,5 cc de ácido bórico por kilogramo de semillas), solución 2 (2 cc de zinc por kilogramo de semillas), solución 3 (igual volumen de cada micronutriente en las concentraciones ya mencionadas), y solución 4 (agua destilada), cada solución fue utilizada para un tratamiento distinto. Al tercer día las semillas fueron retiradas de las soluciones y se sembró 3 semillas por cada vaso. La siembra fue regada todos los días en las mañanas. El tiempo de cultivo previo la infección con las bacterias fue de 45 días (Figura 3 y 4).



**Figura 3.** Semillas tratadas con micronutrientes. La variedad SFL-11 fue sometida al tratamiento con agua destilada para el control de semillas, y el resto de semillas fueron colocadas en solución con zinc, boro y la mezcla de zinc y boro.



**Figura 4.** Siembra de arroz. Las semillas germinaron a los 5 y 8 días luego de haberse sembrado en los vasos plásticos.

### 2.2.3 Preparación del inóculo

Las cepas de *Burkholderia* utilizadas en este ensayo fueron las mismas cepas donadas por el CIBE, las cuales se encontraban en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para su reactivación se procedió a sembrar en cajas Petri con medio de cultivo Agar de soja tríptico (Difco, Sparks, EE.UU.) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Las colonias obtenidas se transfirieron entonces a caldo de soja tríptico (Difco, Sparks, EE.UU.) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas a 150 rpm (Serie Clásica C24, New Brunswick Scientific, New Jersey-USA). El cultivo bacteriano se concentró entonces por centrifugación a 7500 rpm durante 5 minutos (Sorvall ST16, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Alemania). El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó con 35 ml de solución de NaCl al 0,75 % (J. T. Baker, Pennsylvania, EUA) y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos; este procedimiento se realizó 3 veces. A continuación, el sedimento se resuspendió en 250 ml de una solución estéril de NaCl al 0,75 % y se utilizó un McFarland 0,5 para preparar la solución a una concentración de  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml.

### 2.2.4 Inoculación de plantas

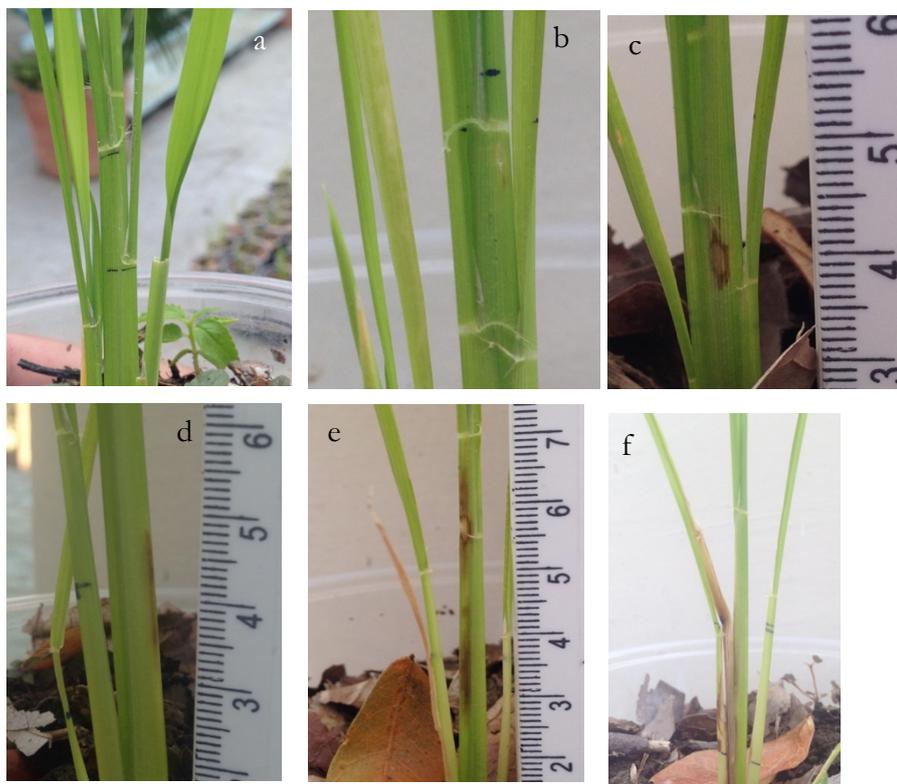
Las plantas cultivadas por 45 días fueron inoculadas utilizando una jeringuilla de 1cc, con la cual se tomó el inóculo preparado y se procedió a inyectar las plantas hasta que el inóculo sature el lugar de inyección. Las plantas control fueron inoculadas con una solución estéril al 0,75% de NaCl, de forma similar que las plantas infectadas con bacterias (Figura 5).



**Figura 5.** Inoculación de plantas de arroz. Infección de plantas mediante inyección con solución de bacterias a las concentraciones determinadas.

### 2.2.5 Toma y análisis de datos

Al siguiente día luego de la inoculación de las plantas, se empezó la evaluación de las mismas durante 30 días, tomando como referencia la escala utilizada por Riera et *al.* en el 2016 [50], donde se modificó los niveles de daños producidos por las especies utilizadas mismos que se detallan en la Figura 6. El Nivel 0, se nota la presencia de la herida causada por la inyección suministrada. La herida se puede tornar algo blanquecina o con ligera clorosis; para el Nivel 1, se observa una mancha alrededor del punto de inoculación con un tamaño de 1 a 2mm, y una coloración café oscuro, encerrando el punto blanquecino de la inoculación; en ocasiones la mancha café cubre toda la superficie de inoculación; en el caso del Nivel 2, se observa una mancha de coloración café oscuro sobre el punto de inoculación, con un tamaño de 3 a 10mm; para el Nivel 3, el tamaño de la mancha aumenta entre 1 y 2 cm en el área inoculada de la planta; para el Nivel 4, la necrosis producida por la infección ha aumentado al 75 % ó 100 % del tallo infectado; en el Nivel 5, la infección se ha trasladado desde el tallo donde fue inoculado hasta la hoja, notándose una necrosis en toda la hoja enferma y produciendo la muerte de la misma. Así la infección con *B. glumae* y *B. gladioli* en plantas de arroz fue medida mediante el área bajo la curva de progresión de la enfermedad (AUDPC).



**Figura 6.** Niveles de severidad de BPB. a) Nivel 0, b) Nivel 1, c) Nivel 2, Nivel 3, e) Nivel 4, f) Nivel 5.

## 2.3 Identificación de microorganismos benéficos para el control de BPB.

### 2.3.1 Toma de muestra.

Se tomaron 5 muestras de suelos por cada una de las dos localidades en el interior del Campus Gustavo Galindo, ESPOL. La localización 1 se encuentra en la Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales (FIMCBOR) en las coordenadas 2°08'41.9"Sur y 79°57'41.7"Oeste. El segundo lugar de muestreo fue en el Centro de Enseñanza Agropecuario de ESPOL (CENAE) con coordenadas 2°08'25.3"Sur y 79°57'45.8"Oeste. Las muestras fueron tomadas con una espátula metálica previamente esterilizada en una autoclave a 121°C durante 15 minutos. El suelo fue colectado a razón de 400 gramos en fundas plásticas, debidamente marcadas; y luego transportadas hasta el laboratorio.

### 2.3.2 Aislamiento de bacterias en muestras de suelo.

Para la recuperación de bacterias se utilizó 10 g de suelo previamente homogenizado. El suelo fue colocado en frascos de tapa rosca con una capacidad de 200 ml, que contenía 90 ml de agua de peptona esterilizada a 121°C durante 15 minutos. Los frascos fueron agitados a 150 rpm durante 10 minutos, para luego realizar diluciones seriadas, utilizando solución salina al 0,75 % de NaCl previamente esterilizada. Las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  fueron sembradas en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) e incubadas a 28°C durante 48 horas. Las colonias obtenidas fueron luego aisladas en nuevas cajas con PDA e incubadas a 28°C durante 24 horas.

### 2.3.3 Prueba de interacción entre cepas obtenidas del suelo y *B. glumae* y *B. gladioli*.

Las bacterias fueron enfrentadas entre sí utilizando placas de Agar Mueller Hinton, donde se sembraron las bacterias patógenas a una concentración de  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml, utilizando un McFarland 0.5 como referencia. Luego de 10 minutos de que la solución con el patógeno haya sido absorbida por el agar, se procedió a realizar unos orificios en el agar, utilizando el extremo ancho de una pipeta Pasteur, previamente esterilizada. En los pocillos realizados se procedió a colocar una 40 ul de una solución de bacterias obtenidas de las muestras de suelo, a una concentración de  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas.

### 2.3.4 Amplificación, secuenciación e identificación de posibles controladores

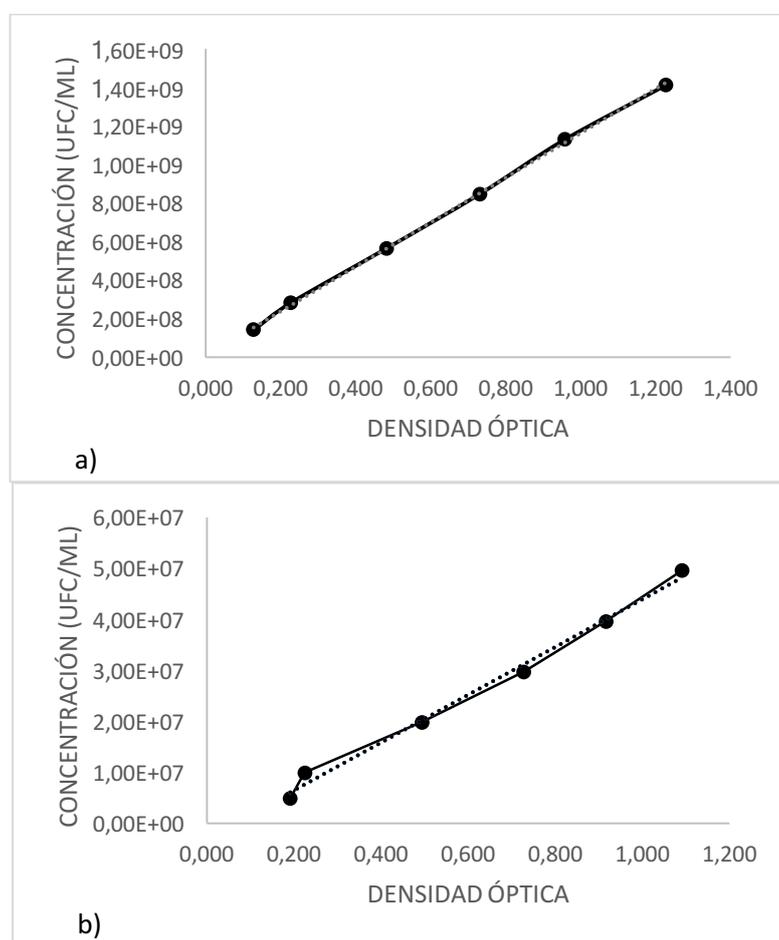
Las colonias seleccionadas como posibles controladores fueron sometidas a una PCR directo en la colonia, utilizando un juego de iniciadores específicos para la región 16S bacteriano: 27f -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- y 1492r -CGGTTACCTTGTTACGACTT-. Para el efecto se utilizó un termociclador (Applied Biosystems) con una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 5 minutos; y 35 ciclos de: desnaturalización 95°C por 1 minuto, hibridación de iniciadores 55°C por 1 minuto, y elongación a 72°C por 1 minuto. Los productos obtenidos fueron migrados en un gel de Agarosa al 1,4 % para confirmar la existencia del amplicón, y luego enviados a secuenciar comercialmente. Una vez obtenidas sus secuencias, fueron analizadas en las bases de datos del Centro Nacional para la Información de la Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés).

## Capítulo 3

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

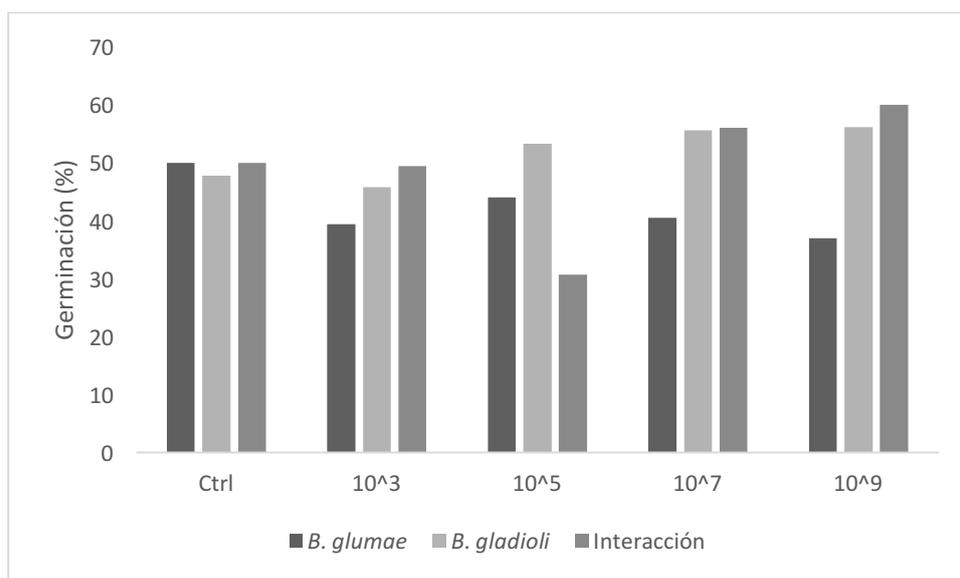
#### 3.1 Efecto individual y por interacción de *B. glumae* y *B. gladioli* en la germinación de semillas de arroz.

La germinación fue evaluada para 5 concentraciones distintas de cada una de las dos especies de *Burkholderia*, así como para la mezcla de las dos cepas (50 % de cada cepa en v/v). Para llegar a estas concentraciones, se utilizó la curva de calibración para cada una de las especies utilizadas en este ensayo (Figura 7).



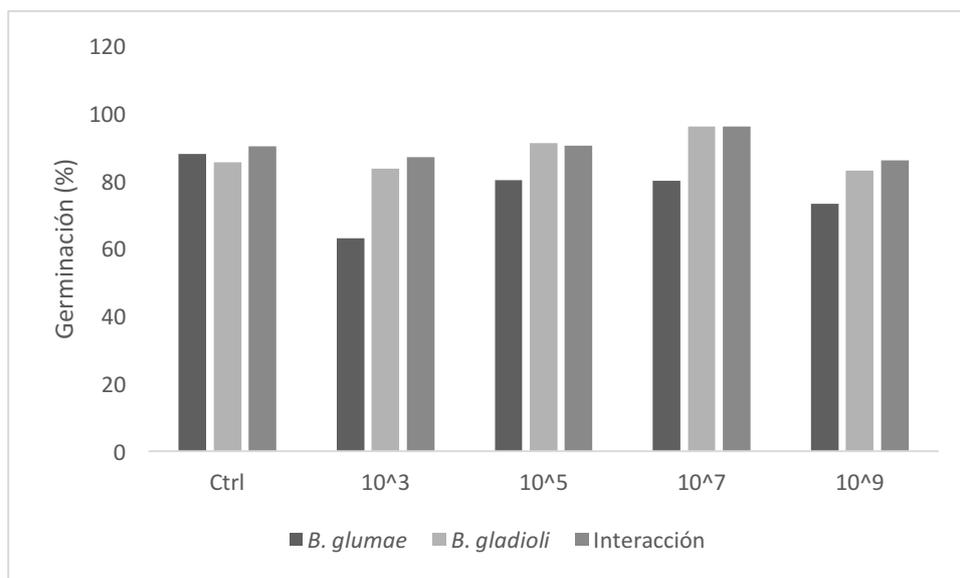
**Figura 7.** Curva de relación entre densidad óptica y concentración de UFC/ml. a) Relación entre la densidad óptica y el conteo de UFC de *B. glumae* sembradas en placas con Agar de soja tríptica (TSA). b) Relación entre la densidad óptica y el conteo de UFC de *B. gladioli* obtenidas al sembrar en TSA las diluciones medidas previamente en el espectrofotómetro.

Esta prueba reveló que en la variedad INIAP-11 la germinación pasó del 50 % en el tratamiento control al 37 % ( $p < 0,05$ ) en el tratamiento con *B. glumae* a una concentración de  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml; mientras que las semillas que fueron inoculadas con *B. gladioli* ( $1,0 \times 10^9$  UFC/ml) la germinación pasó del 48 % al 56 % ( $p > 0,05$ ). Así mismo, la inoculación de la mezcla de las dos especies a las concentraciones estipuladas en los otros dos ensayos, indicó que la germinación pasó del 50 % al 60 % en esta variedad ( $p > 0,05$ ). Dando a notar que, entre las dos especies, únicamente *B. glumae* causó una disminución en el porcentaje de germinación (Figura 8).



**Figura 8.** Histograma de germinación de INIAP-11. Porcentajes de semillas que germinaron luego de ser inoculadas con *B. glumae*, *B. gladioli* y la mezcla de las dos especies (v/v). Las semillas pertenecientes al Ctrl no fueron inoculadas con ningún patógeno.

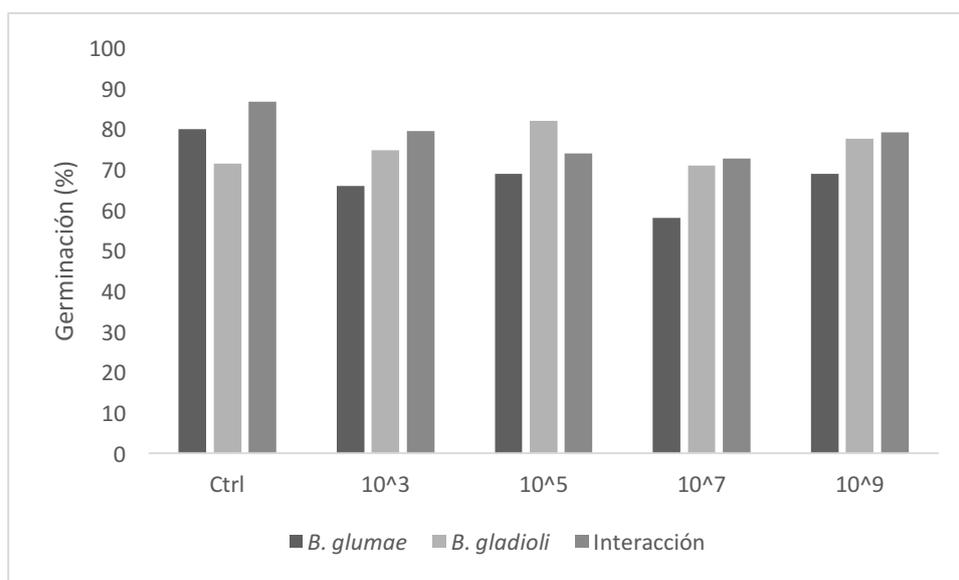
Los resultados de la variedad SFL-11 mostraron patrones distintos a la variedad INIAP-11. La germinación con *B. glumae* ( $1,0 \times 10^9$  UFC/ml) se vio afectada en un 15 % ( $p < 0,05$ ) en relación a las semillas del tratamiento control; mientras que, las semillas inoculadas con *B. gladioli* ( $1,0 \times 10^9$  UFC/ml) apenas germinaron en un 3 % menos que el control ( $p > 0,05$ ); y las semillas que se inocularon con la mezcla de las dos cepas ( $1,0 \times 10^9$  UFC/ml) la germinación varió en un 4% menos, no siendo significativamente diferente al control ( $p > 0,05$ ) como se muestra en la figura 9.



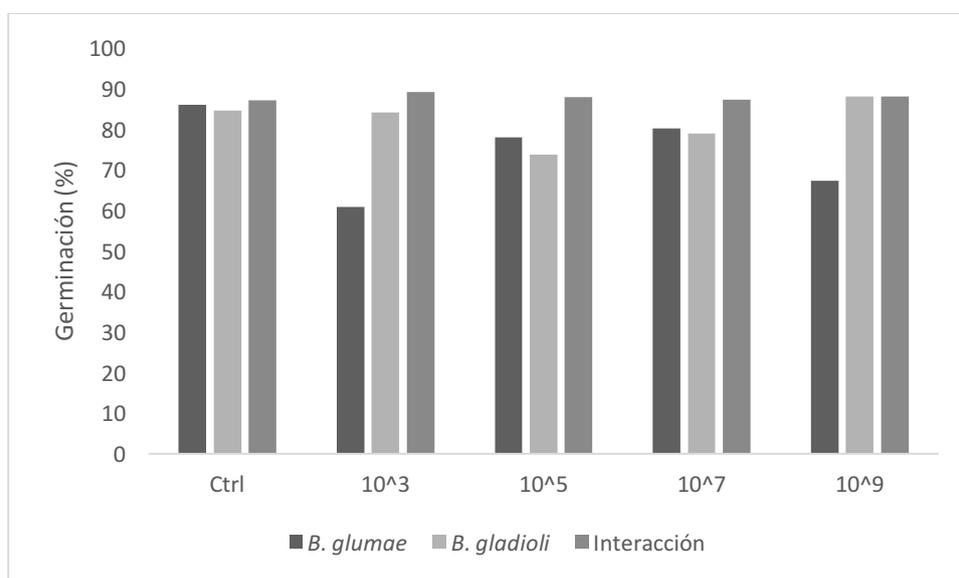
**Figura 9.** Histograma de germinación de SFL-11. Porcentajes de semillas que germinaron luego de ser inoculadas con *B. glumae*, *B. gladioli* y la mezcla de las dos especies (v/v). Las semillas pertenecientes al Ctrl no fueron inoculadas con ningún patógeno.

Por otro lado, la variedad INIAP-15 mostró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) del 11 %, pasando del 80 % de semillas germinadas en el tratamiento control, al 69 % de germinación de las semillas expuestas a *B. glumae* ( $1,9 \times 10^9$  UFC/ml). Mientras que, para las semillas que se infectaron con *B. gladioli* ( $1,0 \times 10^9$  UFC/ml), la germinación se incrementó en un 7 % ( $p > 0,05$ ) con relación a las semillas del tratamiento control. Sin embargo, al ser expuestas a la mezcla de las dos *Burkholderias*, la germinación disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) del 87 % al 79 % en las semillas infectadas con una concentración de  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml de los patógenos (Figura 10).

El análisis de la variedad INIAP-14 reveló que el porcentaje de germinación de las semillas al ser inoculadas con  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml de *B. glumae* disminuye en un 19 %; decrecimiento que no fue observado cuando las semillas se inocularon con  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml de *B. gladioli*, pues diferencia de *B. glumae*, la germinación se incrementó en un 3 % respecto a las semillas del tratamiento control; aunque en concentraciones de  $1,0 \times 10^5$  y  $1,0 \times 10^7$  UFC/ml de *B. gladioli*, se observó una disminución de la germinación del 11 % y 6 % respectivamente. Por otro lado, no existió diferencia estadística ( $p > 0,05$ ) cuando las semillas fueron inoculadas con una concentración de  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml de *B. glumae* y *B. gladioli* (v/v), pues su germinación pasó del 87 % en las plantas control, al 88 % en las plantas inoculadas con la solución de patógenos (Figura 11).

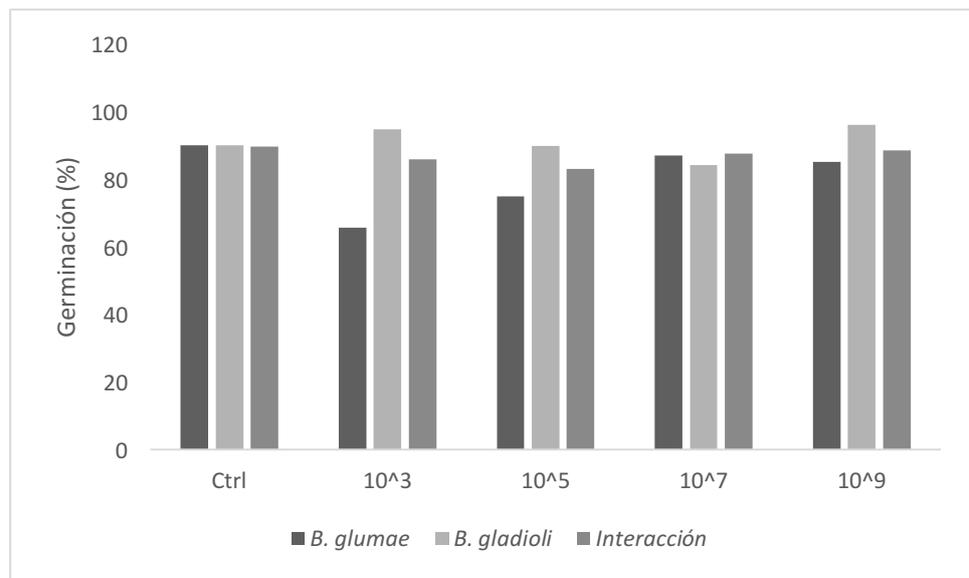


**Figura 10.** Histograma de germinación de INIAP-15. Porcentajes de semillas que germinaron luego de ser inoculadas con *B. glumae*, *B. gladioli* y la mezcla de las dos especies (v/v). Las semillas pertenecientes al Ctrl no fueron inoculadas con ningún patógeno.



**Figura 11.** Histograma de germinación de INIAP-14. Porcentajes de semillas que germinaron luego de ser inoculadas con *B. glumae*, *B. gladioli* y la mezcla de las dos especies (v/v). Las semillas pertenecientes al Ctrl no fueron inoculadas con ningún patógeno.

Por último, la variedad SFL-09 mostró un comportamiento similar a las otras variedades, manteniendo el decrecimiento en su germinación causado por *B. glumae* ( $1,0 \times 10^9$  UFC/ml) en un 5 %; mientras que para las semillas inoculadas con *B. gladioli* ( $1,0 \times 10^9$  UFC/ml) la germinación se incrementó en un 6 %. Así también tenemos que la germinación de semillas se afectó solo en un punto porcentual al ser expuestas a una solución de  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml de los dos patógenos (v/v), tal como lo muestra la figura 12.



**Figura 12.** Histograma de germinación de SFL-09. Porcentajes de semillas que germinaron luego de ser inoculadas con *B. glumae*, *B. gladioli* y la mezcla de las dos especies (v/v). Las semillas pertenecientes al Ctrl no fueron inoculadas con ningún patógeno.

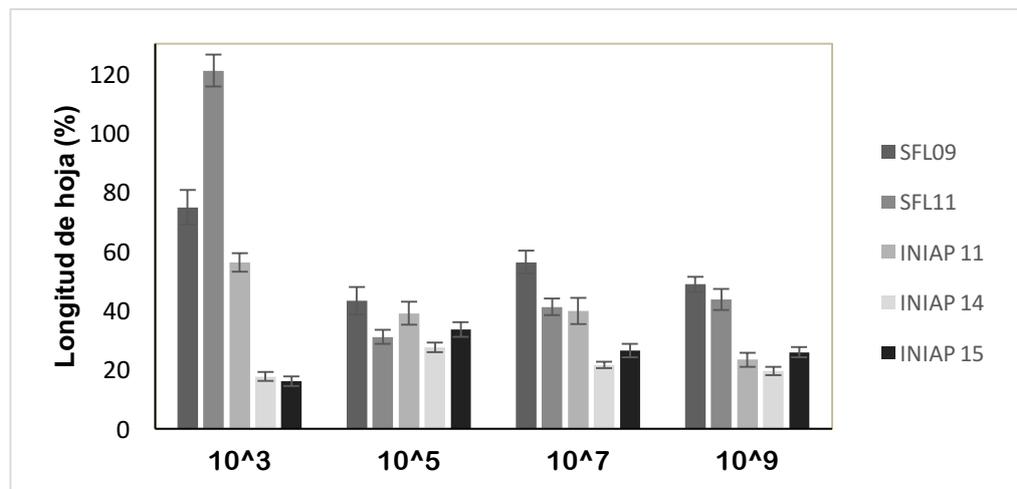
Por lo expuesto anteriormente con el análisis de las 5 variedades testeadas para cada uno de los patógenos en estudio, podemos indicar que la mayor afectación a nivel germinativo lo ha causado *B. glumae*, debido a que su patrón de disminuir la germinación de las semillas infectadas se mantiene en las 5 variedades. Un resultado similar, obtuvo Fory et al. (2014) cuando su equipo evaluó el manchado de grano y la patogenicidad de cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* en variedades de arroz de Colombia. Sus resultados indicaron que *B. glumae* producía mayor manchado de grano que *B. gladioli*. Si bien el análisis de Fory no se basó en el porcentaje de germinación, nos da la pauta del porqué de los comportamientos de las semillas expuestas a estos patógenos. No obstante, cuando hablamos de *B. gladioli* el panorama cambia, pues esta cepa bacteriana al parecer no causa efecto alguno en la germinación de las semillas que han sido expuestas; los leves incrementos que se han obtenido pueden también ser parte de la tasa normal de germinación que se da en cada una de las variedades que se usaron en esta prueba; o también puede ser atribuido a la cepa de *B. gladioli* que según estudios realizados por Nandakumar et al. (2009), la patogenicidad de una cepa varía de acuerdo a la ubicación geográfica de

donde fue aislada. Debido a esto puede haber cepas, tanto de *B. glumae* como de *B. gladioli* que no son patógenas para el arroz. Por otro lado, la incidencia de la mezcla de los dos patógenos (v/v) no mantiene un patrón mediante el cual podamos indicar si causa o no una afectación en la germinación de forma global; pues dependiendo de la variedad de la semilla de arroz, mostró un incremento o un decrecimiento de la germinación de las mismas, sin mantener un efecto notorio en el proceso. Se tendrían que realizar más estudios en relación a la germinación de semillas infectadas para lograr tener una visión más general de los efectos que estas bacterias puedan causar en la germinación de las semillas.

En este ensayo, no solamente se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas sometidas a un tratamiento con varias concentraciones de *B. glumae*, *B. gladioli*, y la mezcla de los dos patógenos (v/v); sino que también se analizó el desarrollo de la plántula 10 días después de empezado el proceso de inoculación con bacterias. Los resultados se basaron en el análisis del crecimiento de la hoja y de la raíz para demostrar los efectos causados por las especies usadas en el ensayo, basadas en la concentración de cada una de ellas.

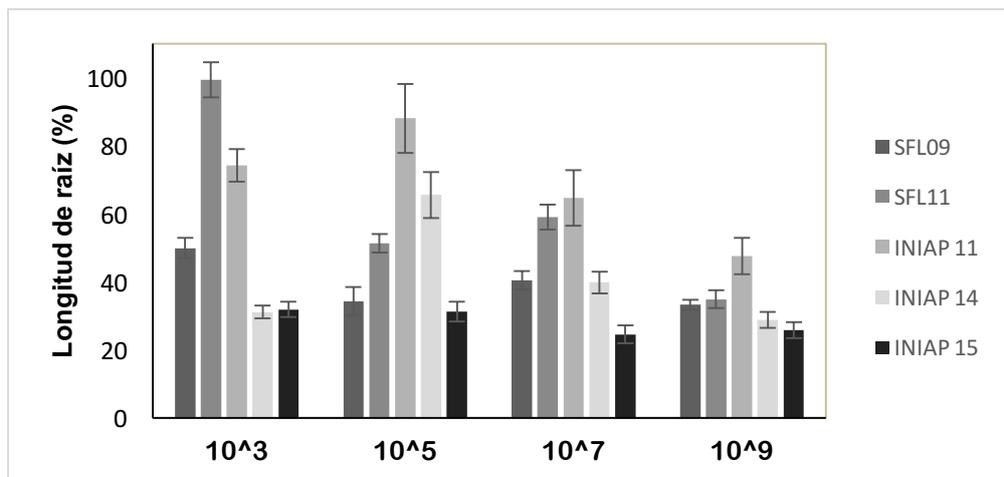
La longitud de las hojas de las plántulas que germinaron de semillas inoculadas con *B. glumae* disminuyó apenas fueron expuestas las semillas de las variedades INIAP-14 e INIAP-15 a concentraciones de  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml del patógeno; mientras que las variedades SFL-09, SFL-11 e INIAP-11 disminuyeron en un porcentaje menor; sin embargo, todas las 5 variedades de arroz disminuyeron drásticamente a partir de concentraciones de  $1,0 \times 10^5$  hasta  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml, sin tener evidencia estadística para indicar que los tratamientos a concentraciones a partir de  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml son diferentes. Por lo que podemos inferir en que los daños causados en la postgerminación de las semillas de arroz de las 5 variedades expuestas a *B. glumae* son bien definidos y retardan el crecimiento normal a partir de concentraciones de  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml, y en algunos casos producen la muerte de la plántula conforme pasan los días desde que se produjo la germinación de la semilla.

Los resultados que arrojó la medición de las raíces cuando fueron expuestas a varias concentraciones de *B. glumae*, cambiaron en dependencia de la variedad de semilla. La variedad INIAP-11 mostró mayor resistencia al daño causado por la bacteria; fue la única variedad que se mantuvo por encima del 45 % en relación con las plántulas del tratamiento control, entre todas las variedades. Mientras que, las variedades SFL-09, INIAP-14 e INIAP-15, mostraron mayor susceptibilidad a la infección, aun cuando las concentraciones utilizadas eran bajas ( $1,0 \times 10^3$  UFC/ml). La variedad SFL-11 no mostró ningún efecto frente a la concentración más baja del patógeno ( $1,0 \times 10^3$  UFC/ml), pues la longitud de sus raíces no evidenció disminución alguna; sin embargo, a partir de la concentración  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml, demostró el decrecimiento habitual causado por *B. glumae* en las otras variedades de arroz.

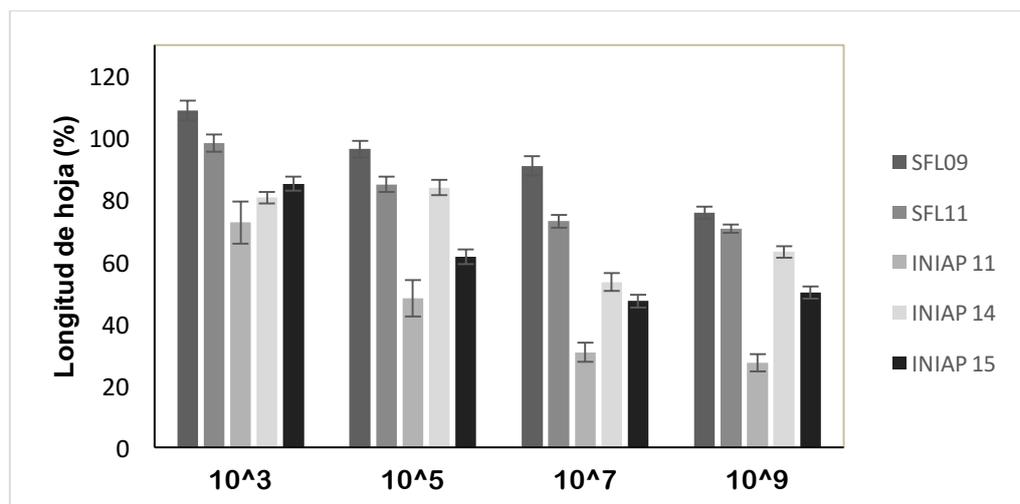


**Figura 13.** Longitud de las hojas. Longitud de las hojas de plántulas del tratamiento con *B. glumae* en relación con el tratamiento control, de las 5 variedades de semillas de arroz. El ensayo contó con dos repeticiones de 50 semillas cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.

La respuesta postgerminación de las semillas que fueron expuestas a *B. gladioli*, mostraron patrones similares a los producidos por *B. glumae*; sin embargo, esta disminución en la longitud de las hojas de las plántulas no fue tan marcada como lo fue con *B. glumae*. Para la variedad INIAP-11, las 4 concentraciones de bacterias causaron retardo en el crecimiento de las hojas, en las cuales se obtuvo una evidencia estadística entre las concentraciones y el tratamiento control ( $p < 0,05$ ); además, esta variedad fue la más afectada debido a que mostró una reducción del 27 % la longitud de sus hojas en plantas inoculadas con  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml de *B. gladioli*, en comparación con las plantas del tratamiento control. La variedad SFL-09 fue la variedad que mostró menor alteración en la longitud de sus hojas cuando fueron inoculadas a *B. gladioli*, desde las concentraciones de  $1,0 \times 10^3$ ,  $1,0 \times 10^5$  hasta  $1,0 \times 10^7$  UFC/ml del patógeno; a estas concentraciones no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para estos tratamientos en comparación con el tratamiento control; sin embargo, cuando la concentración pasó a  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml, se encontró evidencia estadística ( $p < 0,05$ ) para indicar que este tratamiento versus el tratamiento control eran diferentes. La variedad SFL-11 no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando se midió sus hojas en relación a la concentración de  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml en comparación con el tratamiento control; solamente evidenció diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) cuando fueron expuestas a concentraciones por encima de  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml. También las variedades INIAP-14 y INIAP-15 mostraron ser diferentes estadísticamente, desde la primera concentración de patógenos a la que fue expuesta.



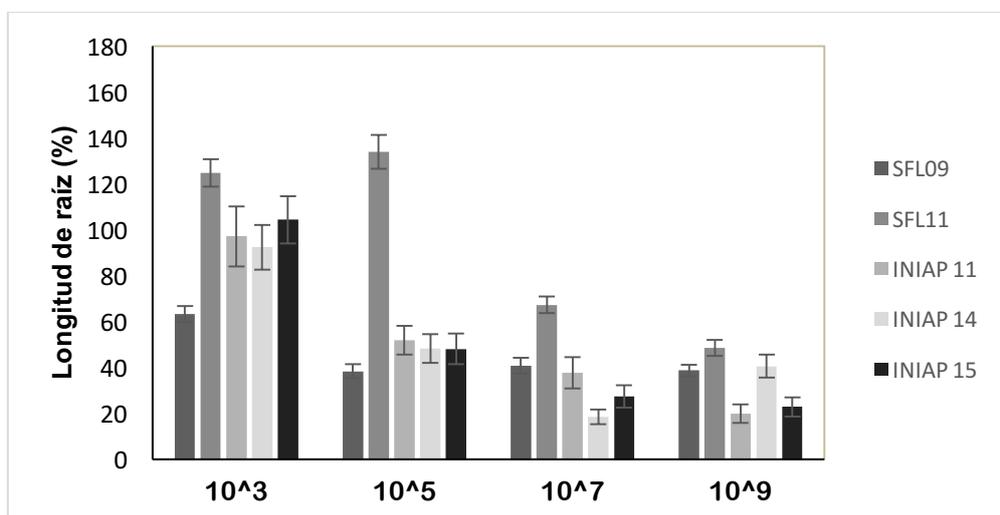
**Figura 14.** Longitud de las raíces. Longitud de las raíces de plántulas del tratamiento con *B. glumae* en relación con el tratamiento control, de las 5 variedades de semillas de arroz. El ensayo contó con dos repeticiones de 50 semillas cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.



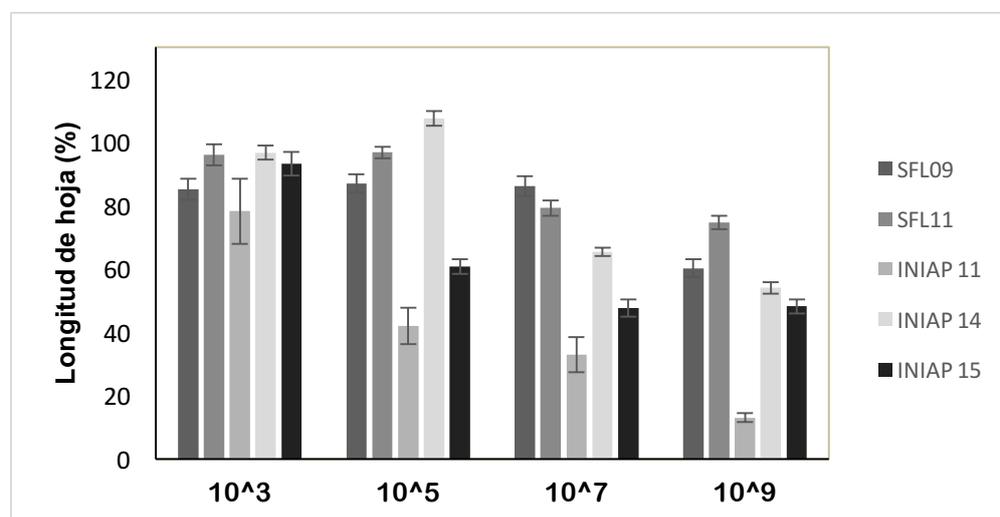
**Figura 15.** Longitud de las hojas. Longitud de las hojas de plántulas del tratamiento con *B. gladioli* en relación con el tratamiento control, de las 5 variedades de semillas de arroz. El ensayo contó con dos repeticiones de 50 semillas cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.

La interacción de *B. glumae* y *B. gladioli* (v/v) a varias concentraciones también fue evaluada en este ensayo. Las variedades SFL-11, INIAP-11, INIAP-14 e INIAP-15, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la longitud de sus hojas de plantas infectadas a una concentración de  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml de la mezcla de los patógenos, frente al control. Las variedades SFL-11 e INIAP-14 continuaron sin evidencia estadística entre la concentración  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml de la mezcla del patógeno frente al tratamiento control ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, todas las 5 variedades testeadas en este ensayo sufrieron los efectos del retardo en el crecimiento de las

hojas con relación al tratamiento control a partir de la concentración de  $1,0 \times 10^7$  UFC/ml ( $p < 0,05$ ), incluida la variedad SFL-11 que, si bien mostró diferencias significativas a partir de la segunda concentración, fue la variedad que menos daños presentó durante el proceso postgerminativo de sus semillas.



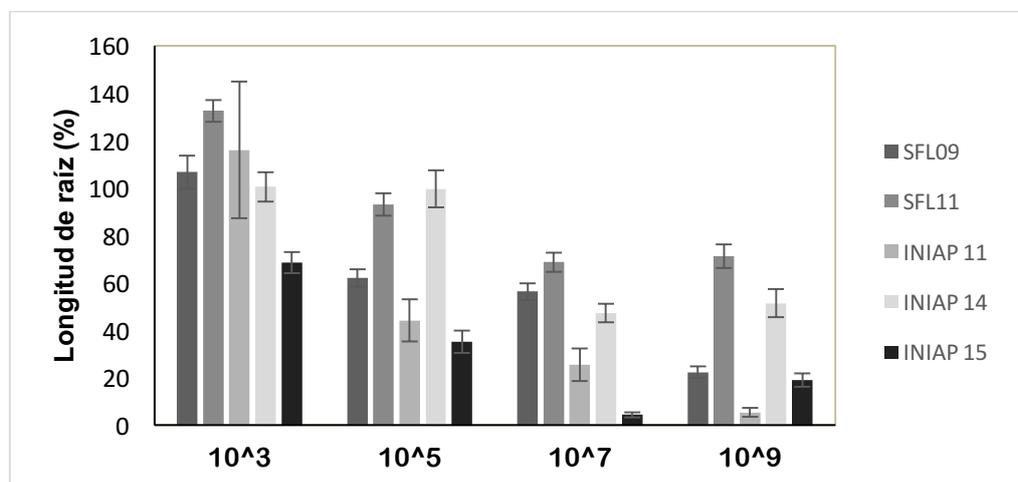
**Figura 16.** Longitud de las raíces. Longitud de las raíces de plántulas del tratamiento con *B. gladioli* en relación con el tratamiento control, de las 5 variedades de semillas de arroz. El ensayo contó con dos repeticiones de 50 semillas cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.



**Figura 17.** Longitud de las hojas. Longitud de las hojas de plántulas del tratamiento con *B. glumae* y *B. gladioli* (v/v) en relación con el tratamiento control, de las 5 variedades de semillas de arroz. El ensayo contó con dos repeticiones de 50 semillas cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.

Así podemos indicar que, SFL-11 es la variedad que menos niveles de afectación presentó con la inoculación de los dos especies patógenas simultáneamente, pues mostró un decrecimiento en la longitud de sus hojas del 25 % cuando fue expuesta a la concentración más alta ( $1,0 \times 10^9$  UFC/ml); mientras que, para las otras variedades los porcentajes de retardo en el crecimiento de la hoja fue del 87 % para la variedad INIAP-11, 52 % para la variedad INIAP-15, 46 % para la variedad INIAP-14, y 40 % para la variedad SFL-09.

La longitud de las raíces de las plántulas, fueron evaluadas para los tratamientos con la mezcla v/v de *B. glumae* y *B. gladioli*, donde se observó que la concentración de  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml de esta mezcla, favoreció el desarrollo radicular de 4 de 5 variedades, la única variedad que no tuvo este comportamiento fue la INIAP-15, que mostró un retardo en el crecimiento de sus raíces, disminución que fue significativa ( $p < 0,05$ ). A partir del tratamiento a una concentración de  $1,0 \times 10^5$  hasta la concentración de  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml, las raíces de 3 variedades: SFL-09, INIAP-11 e INIAP-15, mostraron la reducción significativa ( $p < 0,05$ ) en la longitud de sus raíces. Sin embargo, las variedades SFL-11 e INIAP-14 no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para la concentración  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml; únicamente mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación al tratamiento control cuando las concentraciones se incrementaron a  $1,0 \times 10^7$  y  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml. Cabe indicar, que estas dos variedades mostraron mayor resistencia en la afectación de sus raíces, puesto que se produjo una reducción del 29 % y 18 % respectivamente, en relación a las raíces de las plantas control.



**Figura 18.** Longitud de las raíces. Longitud de las raíces de plántulas del tratamiento con *B. glumae* y *B. gladioli* (v/v) en relación con el tratamiento control, de las 5 variedades de semillas de arroz. El ensayo contó con dos repeticiones de 50 semillas cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.

Uno de los objetivos de este trabajo fue conocer los efectos causados por las *Burkholderias* en los procesos postgerminación de las variedades mayormente

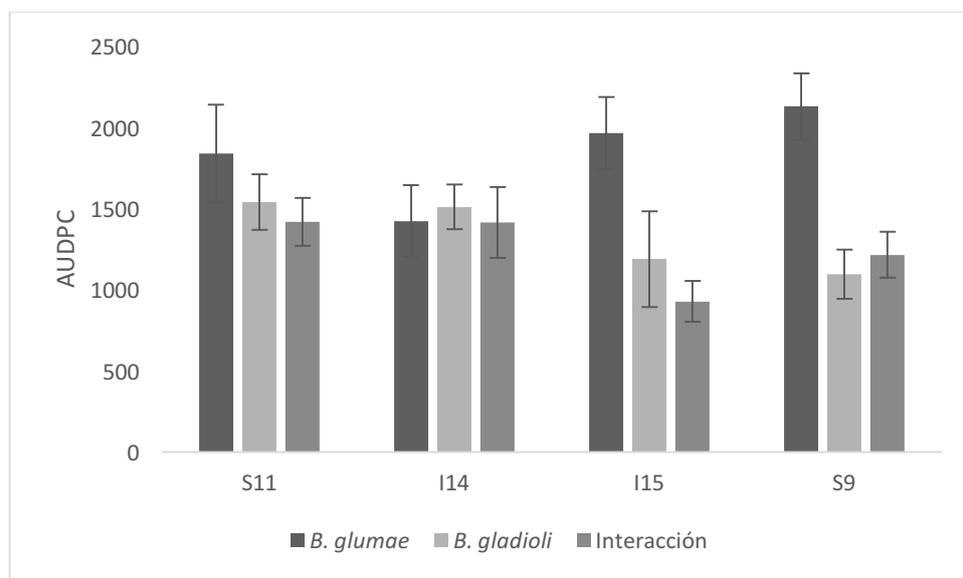
cultivadas en el Ecuador; y lo observado en las pruebas acerca del desarrollo de los cotiledones y raíces en semillas infectadas con *B. glumae* en relación con *B. gladioli* fue lo esperado, debido a que *B. glumae* por lo general es más patogénica que *B. gladioli* [12]. La disminución en el porcentaje de sus hojas, así como en el crecimiento radicular verifican su efecto dañino a nivel postgerminativo, algo también visto por Nandakumar et al. en el 2009, donde indicó que una de las etapas más vulnerables para el desarrollo de BPB causado por las dos especies de *Burkholderias* era al momento en que emerge la panícula, algo similar a lo observado por investigadores en Japón y Taiwán [4][48]. Por otro lado, el comportamiento de los efectos de la interacción de las dos bacterias fue menos dañino en relación a *B. glumae* por sí sola, esto puede indicar que, la presencia de la cepa utilizada de *B. gladioli* produjo una disminución de la patogenicidad de la cepa utilizada de *B. glumae*. Cabe recalcar, que en la mayoría de estudios se han evaluado los efectos que causan estas cepas por separado; sin embargo, casi siempre se las han encontrado a las dos *Burkholderias* en la misma planta que ha presentado los síntomas de la enfermedad del añublo bacteriano; por ende, este es el primer trabajo que se enfoca en el análisis de la interacción de *B. glumae* y *B. gladioli* en la misma plántula. Casos similares han sido estudiados por Partida-Martínez & Hertweck en el 2005, donde demuestran la actividad sinérgica entre *Burkholderia* sp. y el hongo *Rhizopus microsporus*, micotoxina que causa una variedad del añublo de la panícula en el arroz. En este caso la bacteria es una endosimbionte del hongo, y se cree que *R. microsporus* manipula a la bacteria para que esta genere la toxina y se produzca la muerte de la hoja o incluso de la planta; debido a que esta micotoxina ataca al proceso de la mitosis celular en las plantas de arroz; y así la muerte de la hoja, deriva en la disponibilidad de nutrientes que fácilmente son aprovechados por el hongo.

### 3.2 Efecto individual y por interacción de *B. glumae* y *B. gladioli* en plantas de arroz.

La infección con *B. glumae* en plantas de arroz, medida mediante el área bajo la curva de progresión de la enfermedad (AUDPC), indicó que de las 4 variedades (SLF-09, SFL-11, INIAP-14 e INIAP-15) que fueron testeadas, la variedad SLF-09 evidencia una afectación mayor en el lugar de infección, mientras que la variedad INIAP-14 mostró una menor susceptibilidad a la infección por *B. glumae*. La estadística efectuada a los promedios estas dos variedades (2129 y 1422,5 respectivamente) indica que existe evidencia estadística entre estas dos variedades con un  $p=0,032$  en un grado de aceptación del 95% de confianza. Mientras que las variedades restantes mostraron valores de AUDPC de 1840 para la variedad SFL-11y 1965,56 para la variedad INIAP-15, resultados que no mostraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) comparadas con las variedades SFL-09 e INIAP-14, de mayor y menor susceptibilidad respectivamente frente al patógeno *B. glumae*.

El área bajo la curva tomada de las plantas infectadas con *B. gladioli* mostró un promedio de 1095 para SFL-09, 1541,25 para SFL-11, 1510 para INIAP-14 y

1188,57 para INIAP-15; los cuales estadísticamente no mostraron diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ), por lo que se puede indicar que la *B. gladioli* causa el mismo efecto en todas las variedades utilizadas en este ensayo.



**Figura 19.** Efectos de los patógenos en plantas. Valores de AUDPC que se evidenció en las plantas de las cuatro variedades de arroz que fueron inoculadas con *B. glumae*, *B. gladioli* y la mezcla de estas dos especies (v/v).

La interacción de los dos patógenos, generalmente encontrados en las plantas que muestran la sintomatología de BPB, *B. glumae* y *B. gladioli*, también fue analizada en este ensayo. Los resultados mostraron que la variedad INIAP-15 fue la de menor susceptibilidad entre las 4 variedades, con un valor de AUDPC = 927,5; mientras que, la variedad que mayor daño mostró fue la SFL-11, con un AUDPC = 1420. El valor p obtenido al momento del análisis estadístico para estas dos variedades fue de 0,02; mientras que para las dos variedades restantes (SFL-09 e INIAP-14) en valor p fue mayor a 0,05 con una aceptación del 95% de confianza.

Los resultados obtenidos con *B. glumae* son semejantes a lo observado en estudios realizados por Fory et al. (2014) y Nandakumar et al. (2009), donde indican que *B. glumae* es conocida por su mayor patogenicidad frente a *B. gladioli*; aunque el grado de virulencia de las cepas varía de acuerdo a la localidad de donde fueron aisladas [7]. Similitud obtenida en los resultados expuestos, ya que el daño causado por la interacción de estos dos patógenos, disminuyó en la misma proporción que lo causado por efecto de la inoculación solo con *B. gladioli*.

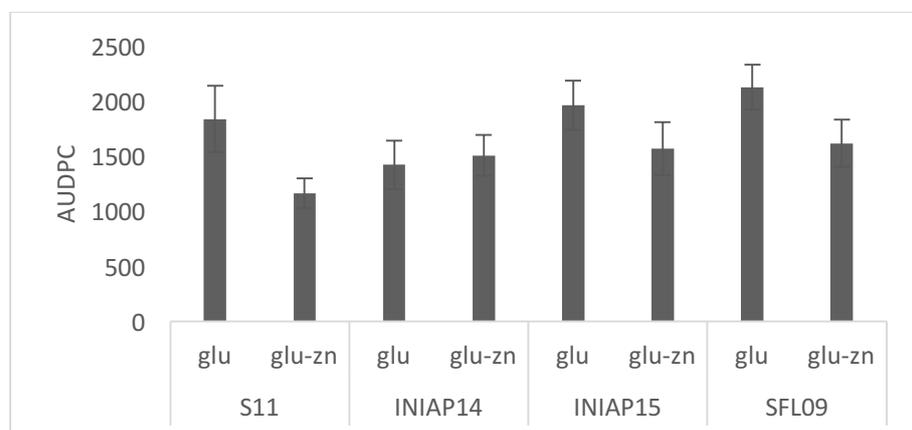
### 3.3 Efecto de los micronutrientes zinc y boro, sobre el desarrollo de BPB.

La adición de Zinc al momento de pregerminar las semillas de arroz de las distintas variedades, no mostró una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) al momento del análisis de las AUDPC causadas por *B. glumae* entre las 4 variedades. La variedad SFL-11 fue la que menor daños mostró frente al resto de variedades (AUDPC = 1166,25), seguida por la INIAP-14 con un valor de AUDPC = 1508,75; y la variedad INIAP-15 con un AUDPC = 1572,22; mientras que, la variedad SFL-09 fue la que mayores efectos negativos causó *B. glumae* con un AUDPC de 1617,78.

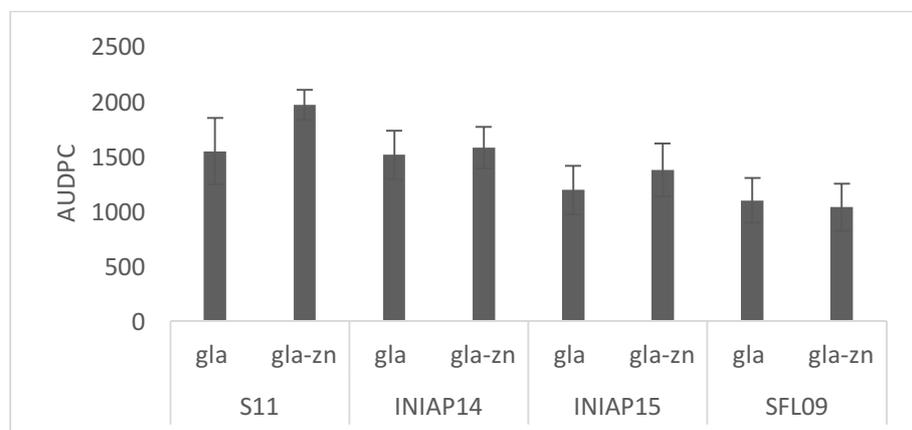
Por otro lado, el análisis de las AUDPC de las plantas que emergieron de semillas con tratamiento de Zinc y que luego fueron inoculadas con *B. gladioli* indicó que las 4 variedades siguen el mismo patrón que las plantas sin tratamiento con Zinc; así, la variedad SFL-11 mostró más daños en relación con las otras variedades, con una AUDPC = 1961,25; por otro lado, la variedad SFL-09 mostró menos daños con una AUDPC = 1032,22. Sin embargo, con la adición de Zinc se obtuvo diferencias significativas en relación al grado de afectación entre las cuatro variedades de arroz hacia *B. gladioli*; así las variedades SFL-09 e INIAP-14 son significativamente distintas con un  $p < 0,05$ ; así como las variedades SFL-09 y SFL-11 que obtuvieron un  $p < 0,05$ .

La interacción de los dos patógenos de *Burkholderia* en plantas que emergieron de semillas pregerminadas con Zinc denotan una diferencia significativa ( $p = 0,006$ ) entre las variedades SFL-11 (AUDPC=1867,5) y SFL-09 (AUDPC=1005). Sin embargo, la variedad que muestra mayores afectaciones a la mezcla de las *Burkholderias* sigue siendo la SFL-11, en comparación con las plantas de esta variedad que no fueron fertilizadas con Zinc. Así mismo, la variedad de arroz que menos daños mostró fue la SFL-09 (semillas tratadas con Zinc).

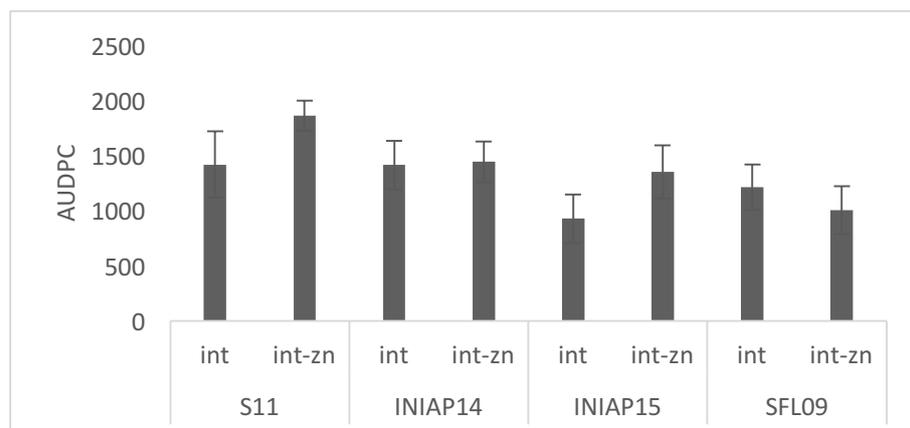
Si bien hemos visto que los resultados varían de acuerdo al tratamiento y a la especie de patógeno a la cual han sido expuestas las variedades de arroz, la incidencia de la fertilización con zinc en la pregerminación de semillas, no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de AUDPC obtenidos de plantas que provinieron de semillas con el tratamiento con zinc y las plantas que sus semillas no fueron expuestas al micronutriente, y que luego fueron infectadas con *B. glumae*, *B. gladioli*; y con la mezcla de estas dos (v/v), tal como lo muestran la figuras 16, 17 y 18. Estos resultados no concuerdan cuando revisamos los resultados obtenidos por Alagarsamy (1986) frente a otros patógenos, donde indica que las plantas de arroz son menos susceptibles a la incidencia de patógenos cuando se encuentra la presencia de zinc u otros elementos como el manganeso o el yodo. Además, Alagarsamy indica en su trabajo que la forma de incorporar el zinc, fue realizado mediante fertilización directa en el suelo o de forma foliar, nosotros tratamos de incorporar el micronutriente directamente en las semillas, esta podría ser la razón por la cual los resultados no ratifican lo expuesto por Alagarsamy.



**Figura 20.** Efecto del zinc (glu-zn) en semillas inoculadas con *B. glumae* (glu). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.



**Figura 21.** Efecto del zinc (gla-zn) en semillas inoculadas con *B. gladioli* (gla). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.



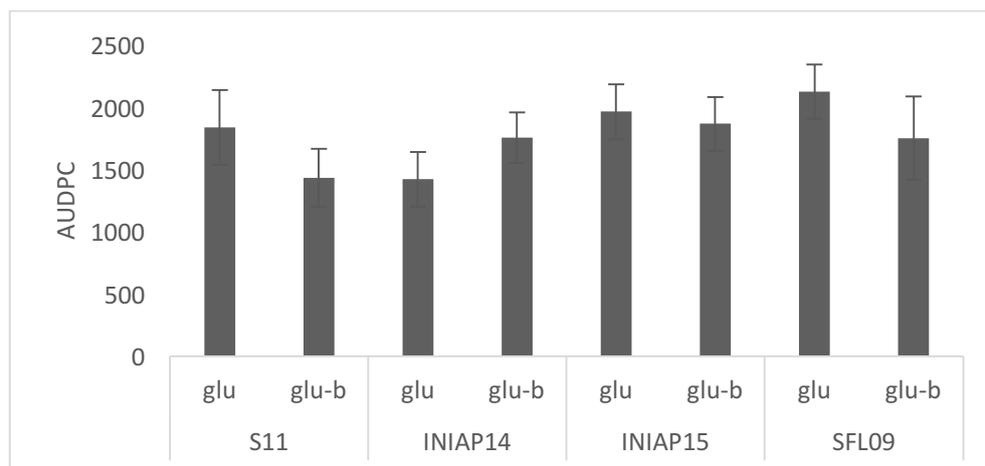
**Figura 22.** Efecto del zinc (int-zn) en semillas inoculadas con *B. glumae* y *B. gladioli* (int). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.

La adición de Boro en la preparación de las semillas para la obtención de plantas en las que se infectó con *B. glumae*, no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el control del progreso de la enfermedad de BPB entre las 4 variedades. Sin embargo, las semillas de este mismo tratamiento mostraron efectos distintos cuando sus plantas fueron infectadas con *B. gladioli*. Así, la variedad que más daño muestra sigue siendo la SFL-11 con un AUDPC de 1862,5; al igual que observado en los resultados de plantas que no tenían un enriquecimiento con Boro, y que también fueron inoculados con esta especie de *Burkholderia*. Lo que no ocurrió con la variedad de menos daños mostró en relación a lo observado en las plantas que no fueron fertilizadas con Boro, que en esa ocasión fue la SFL-09, y que para este ensayo la adición de Boro provocó el desplazamiento de esta denominación hacia la variedad INIAP-14 que mostró una disminución en la afectación (AUDPC=952) en relación a las plantas sin Boro (AUDPC=1510) y de la misma variedad. Estas dos variedades que mostraron las reacciones adversas de afectación fueron estadísticamente diferentes con un  $p=0,007$ ; dejando a un lado las variedades INIAP-15 y SFL-09 en las cuales la afectación fue similar entre ellas.

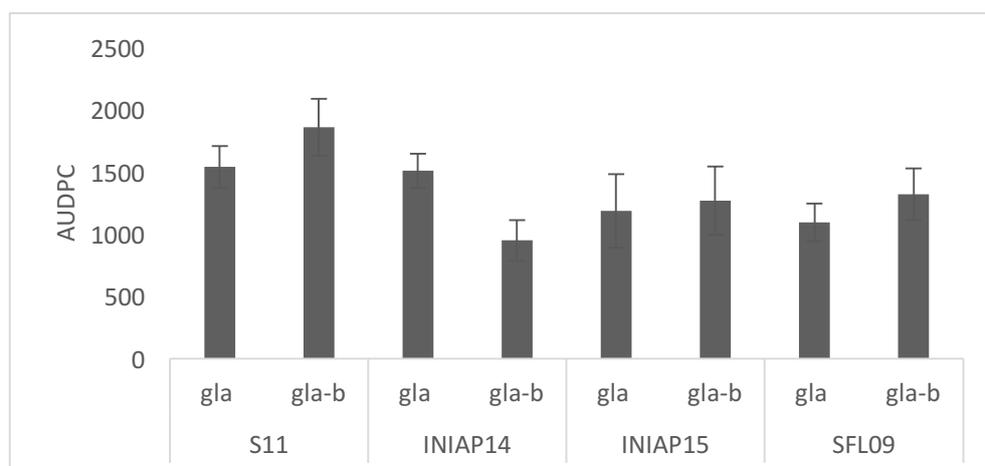
Por otro lado, la mezcla v/v de las dos especies, mostró un comportamiento completamente contrario al obtenido con *B. gladioli*. En esta prueba, la variedad que menor daño mostró frente a la mezcla de los patógenos fue la SFL-11 (AUDPC=1156), siguiendo el mismo patrón que lo ocurrido con las plantas que fueron inoculadas con *B. glumae* y Boro, dando a entender que, en la mezcla de patógenos, el comportamiento que mayor predomina, aunque las concentraciones de las dos cepas fueron iguales, es el comportamiento de *B. glumae* que disminuye el efecto de la enfermedad cuando sus plantas han sido germinadas con boro previamente. Lo mismo podemos inferir en cuanto a la variedad INIAP-14 que mostró mayor daño en sus hojas, frente a la mezcla de estos dos patógenos

(AUDPC=11678,75), corroborando la teoría de la predominancia del comportamiento de *B. glumae* frente a *B. gladioli*, pues el patrón es similar a lo mostrado en plantas que fueron inoculadas con *B. glumae* y enriquecidas con Boro. Entre las variedades que mayor y menor daño mostraron, existió una diferencia estadística con un  $p=0,05$  y un grado de aceptación del 95%.

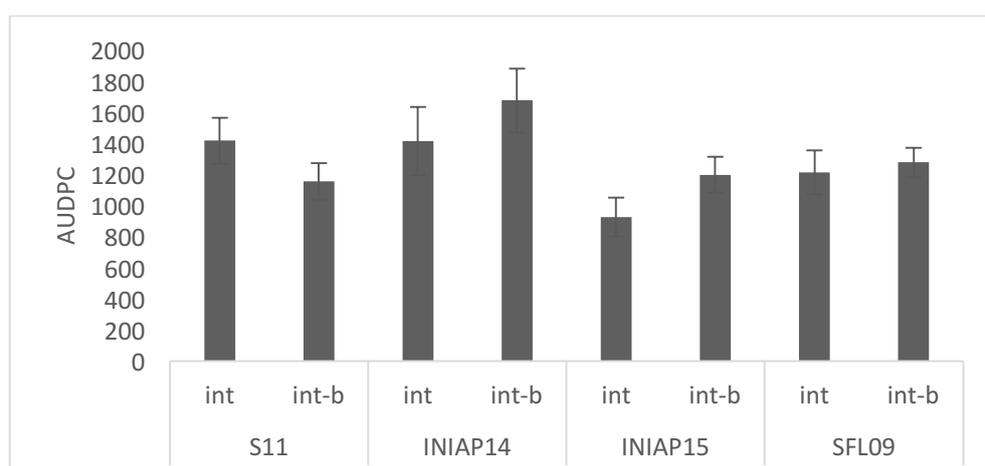
En lo relacionado a hallar una respuesta diferente entre plantas de semillas germinadas con un tratamiento previo con boro, y plantas de semillas germinadas sin tratamiento previo, no encontramos respuesta diferente entre la mayoría de estos dos tratamientos, para las distintas cepas patógenas. Únicamente hallamos una respuesta estadísticamente significativa con un  $p<0,05$  entre la variedad INIAP-14, con tratamiento y sin tratamiento previo en sus semillas, y que a su vez fueron infectadas con *B. gladioli*. El resto de variedades en sus dos tratamientos, no mostraron diferencia estadística significativa ( $p>0,05$ ) dentro del 95 % de aceptación (ver figuras 23, 24 y 25).



**Figura 23.** Efecto del boro (glu-b) en semillas inoculadas con *B. glumae* (glu). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.



**Figura 24.** Efecto del boro (gla-b) en semillas inoculadas con *B. gladioli* (gla). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.



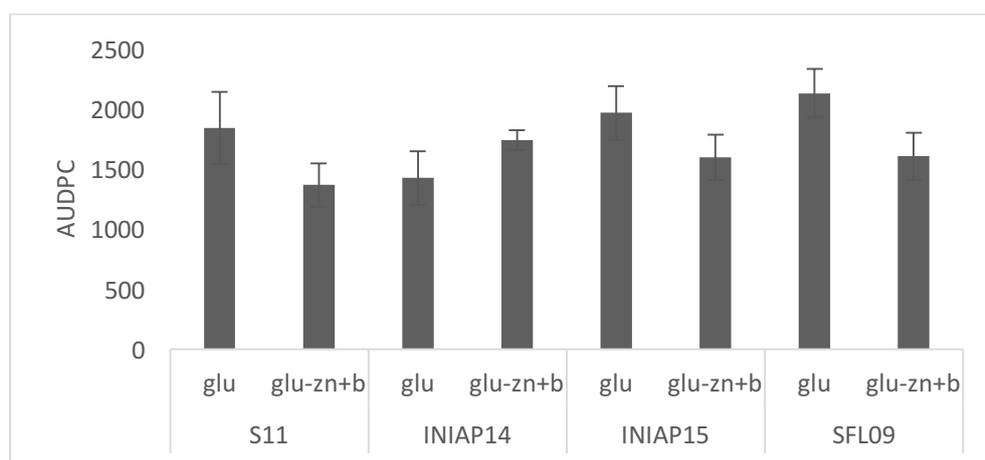
**Figura 25.** Efecto del boro (int-b) en semillas inoculadas con *B. glumae* y *B. gladioli* (int). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.

Estos resultados pueden ser comparados con el trabajo de Andrade 2011, donde relacionó la adición de varios nutrientes en el suelo, dentro de ellos el boro, para el control de patógenos como los ácaros y la *B. glumae* [45]. Sin embargo, al igual que en este estudio, no obtuvieron diferencias significativas al momento de controlar las enfermedades que producían estos dos patógenos; únicamente obtuvo mejora en el rendimiento; inclusive los otros tratamientos con manganeso y la interacción con manganeso y boro, no produjeron efectos sobre el rendimiento. Además, según la literatura, la incorporación del boro dentro de la planta depende mucho de la transpiración de la misma, por lo que hacerlo en semillas únicamente y no continuar con la fertilización en el suelo, puede limitar a absorción del nutriente en la planta.

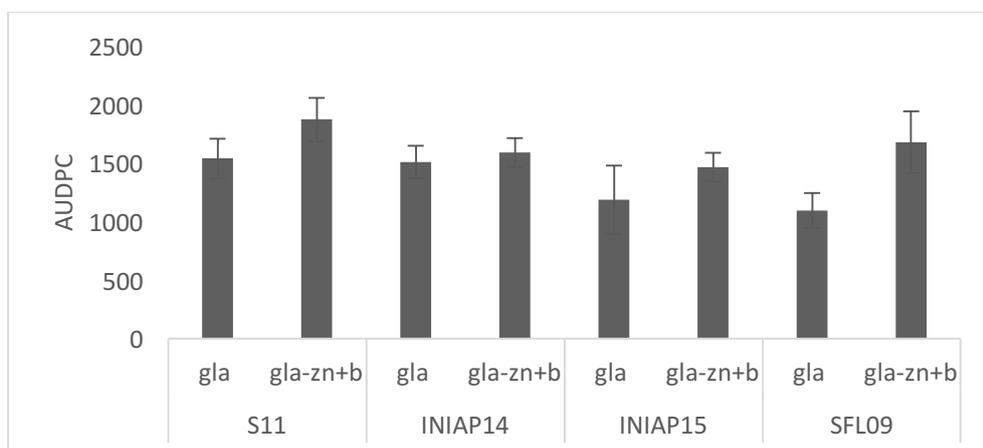
Adicional a las pruebas realizadas con zinc y boro independientemente, también se realizó un ensayo en donde las semillas de las 4 variedades de arroz fueron enriquecidas con los dos micronutrientes a la vez; así podemos observar que para las plantas que fueron infectadas con *B. glumae*, no se hallaron diferencias significativas entre las 4 variedades de arroz. La variedad menos afectada fue SFL-11 (AUDPC=1364,29), seguida por la variedad INIAP-15 (ADUPC=1594), y la variedad SFL-09 (ADUPC=1603,33), y por último la variedad INIAP-14 (AUDPC=1737,5).

El mismo patrón fue observado cuando las plantas obtenidas de semillas con tratamiento previo de zinc y boro, fueron infectadas con *B. gladioli*. No se encontró evidencia estadística para indicar que las variedades eran diferentes entre ellas al momento de suministrar estos micronutrientes. Al igual que cuando fueron infectadas con una mezcla conteniendo los dos patógenos de *Burkholderia*. La variedad que mayor daño mostró entre las 4 variedades fue SFL-11 (AUDPC=1630), escoltado por INIAP-15 (AUDPC=1446,25), INIAP-14 (AUDPC=1432,86), y finalmente la variedad menos afectada fue SFL-09 con un AUDPC de 1320.

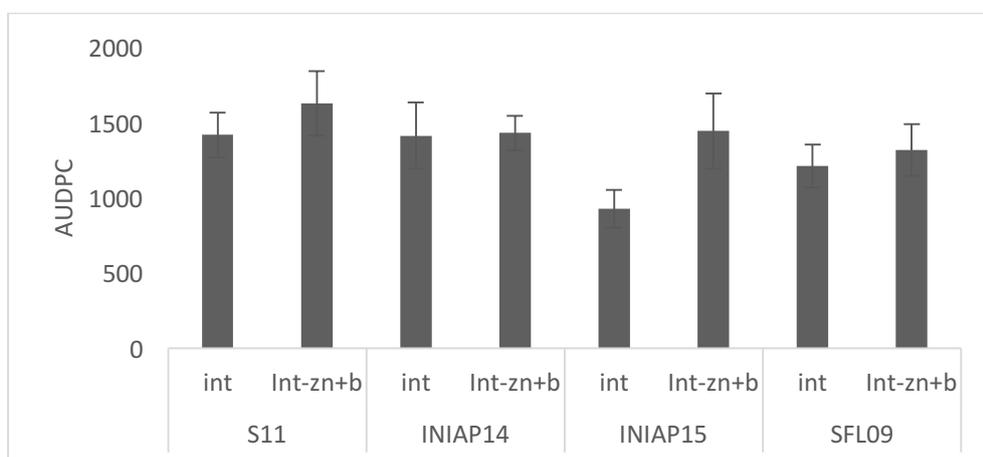
Al igual que el comportamiento observado en las plantas de las 4 variedades testeadas en la adición de zinc y boro, las plantas obtenidas de semillas con el tratamiento de los dos micronutrientes, no mostraron diferencias significativas en relación a las plantas provenientes de semillas que no se sometieron a tratamiento alguno (figuras 26, 27 y 28). Así podemos indicar que la adición de estos dos micronutrientes a las concentraciones probadas, no producen una variación significativa al momento de controlar los estragos causados por *B. glumae* y *B. gladioli*, agentes que desencadenan la enfermedad de BPB.



**Figura 26.** Efecto del zinc y boro (glu-zn+b) en semillas inoculadas con *B. glumae* (glu). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.



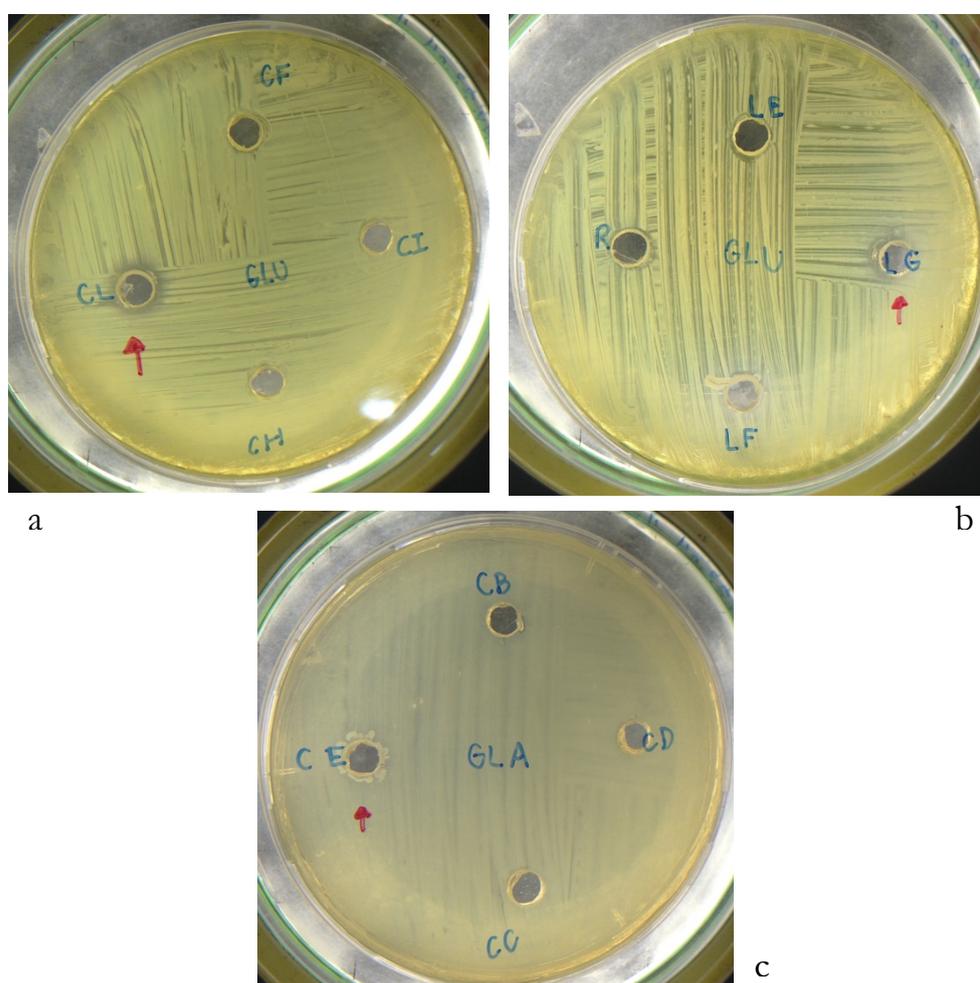
**Figura 27.** Efecto del zinc y boro (gla-zn+b) en semillas inoculadas con *B. gladioli* (gla). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.



**Figura 28.** Efecto del zinc y boro (int-zn+b) en semillas inoculadas con *B. glumae* y *B. gladioli* (int). El ensayo contó con 10 repeticiones cada una. Las barras de error corresponden al error estándar calculado para cada uno de los tratamientos.

### 3.4 Microorganismos con potencial para el control de *B. glumae* y *B. gladioli*.

De las muestras de suelo que se tomaron en las dos distintas localidades de la ESPOL, se lograron recuperar más de 75 colonias, de las cuales se seleccionó 50 colonias basados en la morfología de las mismas. Luego de haberse realizado las pruebas de sensibilidad entre las colonias aisladas del suelo y las cepas de *Burkholderias*, únicamente 2 colonias mostraron un halo de inhibición frente a *B. glumae*, mismas que mantenían una rotulación de CL y LG; mientras que para *B. gladioli* solo una colonia mostró una reacción positiva frente al patógeno, misma que fue denominada previamente como CE (Figura 29).



**Figura 29.** Antibiogramas con bacterias aisladas de muestras de suelo. a) La cepa CL aislada del CENAE produjo un halo frente a la *B. glumae*; b) LG aislada del lago de la FIMCBOR también produjo su reacción notoria frente a *B. glumae*. c) La cepa CE aislada del CENAE produjo una reacción de crecimiento el cual desplazó el crecimiento de *B. gladioli*.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de genomas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando la herramienta bioinformática de alineamiento Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Para la cepa denominada CL, el alineamiento indicó que se trataba del *Bacillus amyloliquefaciens*, strain W1-7; secuencia que se encuentra identificada en la base de datos de NCBI con la siguiente denominación: KY496289.1; así mismo, la contraparte de la misma cepa CL, fue comparada con la base de datos, y el Blast delimitó a *Bacillus amyloliquefaciens*, strain KN8C, secuencia registrada en la base de datos de NCBI con la denominación: KY497442.1; las dos secuencias comparadas perteneciente a la colonia denominada como CL demostraron tener el 99% y 100% de identidad respectivamente.

Para la colonia denominada como LG, el alineamiento indicó que las dos secuencias obtenidas de esta colonia, pertenecen al *Bacillus altitudinis*, strain G01-F12; con una identificación en el Gen Bank denominada: KY416926.1; estos alineamientos mostraron un 99% de identidad entre las secuencias comparadas.

La colonia que registró una reacción positiva frente a *B. gladioli*, misma que se denominó como CE, fue denotada como *Bacillus subtilis*, strain p19; con identificación en la base de datos de la NCBI denominada como KX783604.1; mientras que la contraparte secuenciada denunció la identidad con el *Bacillus subtilis*, strain CLB-17; identificado con KX664475.1 dentro de la base de datos del Gen Bank. Los dos alineamientos mostraron una identidad del 99% con las secuencias registradas en las bases de datos.

**Tabla I.** Biocontroladores aislados. Nombre de las cepas controladoras de la enfermedad de BPB, generadas por el Blast de las secuencias en el gen bank de la NCBI.

Nombre	Cepa a controlar	Halo (mm)	Nombre de especie	ID gen bank	Identidad
CL	<i>B. glumae</i>	13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , strain W1-7	KY496289.1	99%
			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , strain KN8C	KY497442.1	100%
LG	<i>B. glumae</i>	12	<i>Bacillus altitudinis</i> , strain G01-F12	KY416926.1	99%
CE	<i>B. gladioli</i>	10	<i>Bacillus subtilis</i> , strain p19	KX783604.1	99%
			<i>Bacillus subtilis</i> , strain CLB-17	KX664475.1	99%

Estas cepas identificadas dentro del género *Bacillus*, concuerdan con varios estudios de bacterias que funcionan de una u otra forma como controladores de otros microorganismos. Por ejemplo, el *Bacillus subtilis*, es uno de los microorganismos reconocido por más de 50 años para la producción de antibióticos [46]; mientras que el *Bacillus amyloliquefaciens*, es referido por Chen et al. (2009) como un potencial biocontrolador de plagas de plantas de acuerdo al análisis genómico que realizó en su investigación, la cual se basó en la comparación genómica entre el *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*.

## Conclusiones y Recomendaciones

Se determinó el efecto individual y por interacción de *B. glumae* y de *B. gladioli* en el desarrollo de semillas y plántulas de las cinco variedades comerciales de arroz en Ecuador, donde las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* con las que se desarrolló el proyecto no mostraron mayor influencia en la germinación de las semillas de las 5 variedades de arroz. Sin embargo, estos resultados podrían variar de acuerdo a la ubicación geográfica de donde se obtuvieron las cepas, según estudios de otros autores; por lo que se recomienda realizar estudios con cepas obtenidas de diferentes localidades del país; así como analizar el rendimiento de las plantas, siguiendo un proceso normal de fertilización durante el cultivo.

Las aplicaciones de los micronutrientes zinc y boro, sobre el desarrollo de la enfermedad del tizón de la panícula en condiciones semicontroladas, no evidenciaron un efecto directo en los daños producidos por la infección de las especies de patógenos estudiadas. Por lo que se recomienda, analizar formas de incorporación de estos micronutrientes para futuros ensayos.

Así mismo, se logró identificar tres microorganismos con potencial para el control de *B. glumae* (2 microorganismos) y *B. gladioli* (1 microorganismo) mediante evaluaciones *in vitro*, las cuales mostraron efectos prometedores en laboratorio. Sin embargo, se tendría que realizar un ensayo para observar el comportamiento de los posibles biocontroladores en condiciones normales de cultivo; así como evaluar la adaptabilidad en las plantas de arroz.

## BIBLIOGRAFÍA

1. MAGAP-CGSIN-INEC. (01 de junio de 2015). Ecuador en cifras, datos estadísticos. Recuperado el 02 de noviembre de 2016, de [www.ecuadorencifras.gob.ec](http://www.ecuadorencifras.gob.ec)
2. Goto, K., and Ohata, K. (1956). New bacterial disease of rice (brown stripe and grain rot). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 21:46-47.
3. Tsushima, S., Naito, H., and Koitabashi, M. (1996). Population dynamics of *Pseudomonas glumae*, the causal agent of bacterial grain rot of rice, on leaf sheaths of rice plants in relation to disease development in the field. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62:108-113.
4. Chien, C. C., and Chang, Y. C. (1987). The susceptibility of rice plants at different growth stages and of 21 commercial rice varieties to *Pseudomonas glumae*. *J. Agric. Res. China* 36:302-310.
5. Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T. W., and Swings, J. (2001). Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology* 91:282-292.
6. Shahjahan, A. K. M., Rush, M. C., Groth, D., and Clark, C. (2000). Panicle blight. *Rice J.* 15:26-29.
7. Nandakumar, R., Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E., Clark, C. A., Cartwright, R. D., and Rush, M. C. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Dis.* 93:896-905.
8. Ura, H., Furuya, N., Iiyama, K., Hidaka, M., Tsuchiya, K., and Matsuyama, N. (2006). *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:98-103.
9. Flórez, N. y Uribe, D. (2011). Determinación de la Infección de *Burkholderia glumae* en Semillas de Variedades Comerciales Colombianas de Arroz. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 64(2): 6093-6104.
10. Zeigler, R. S., and Alvarez, E. (1989). Grain discoloration of rice caused by *Pseudomonas glumae* in Latin America. *Plant Dis.* 73:368.
11. Nandakumar, R., Rush, M., Shahjahan, A., O'Reilly, K. and Groth, D. (2005). Bacterial panicle blight of rice in the southern United States caused by *Burkholderia glumae* and *B. gladioli*. *Phytopathology* 95 (suppl.): S73.
12. Fory, P. A., Triplett, L., Ballen, C., Abello, J. F., Duitama, J., Aricapa, M. G., Prado, G. A., Correa, F., Hamilton, J., Leach, J. E., Tohme, J., and Mosquera, G. M. (2014). Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. *Phytopathology* 104:436-444.
13. Riera, C., Vargas, J., Cedeño, C., Quirola, P., Escobar, M., Cevallos, J., Ratti, M. And Peralta, E. (2014). First Report of *Burkholderia glumae* Causing Bacterial Panicle Blight on Rice in Ecuador. *Plant Disease.* 98:7, 988-988.

14. Riera, C., Vargas, J., Cevallos, J., Ratti, M. And Peralta, E. (2014). First Report of Bacterial Panicle Blight of Rice Caused by *Burkholderia gladioli* in Ecuador. Plant Disease. 98:11, 1577-1577.
15. Sato, Z., Koiso, Y., Iwasaki, S., Matsuda, I., and Shirata, A. (1989). Toxins produced by *Pseudomonas glumae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55:353-356.
16. Hyun, J., Melanson, R. And Rush, M. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? Molecular Plant Pathology. 12(4), 329–339.
17. Miyagawa, H. and Takaya, S. (2000) Biological control of bacterial grain rot of rice by avirulent strain of *Burkholderia gladioli*. Bull. Chugoku Nat. Agr. Expt. Sta. 21, 1–21.
18. Cottyn, B., Debode, J., Regalado, E., Mew, T. W. and Swings, J. (2009). Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. J. Appl. Microbiol. 107:885-897.
19. FAOSTAT. 2016. Recuperado el 06 de enero de 2017, de [www.fao.org/faostat/es/#data](http://www.fao.org/faostat/es/#data)
20. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos –I.N.E.C, (2014). Bases de Datos: Encuesta de Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2003-2014. Recuperado el 6 de Agosto del 2014 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continuabbd/>
21. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos –I.N.E.C, (2015). Bases de Datos: Encuesta de Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2003-2015. Recuperado el 10 de Agosto del 2015 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continuabbd/>
22. Chien, C. C., Chang, Y. C., Liao, Y. M. & Ou, S. H. (1984). Bacterial grain rot of rice—a new disease in Taiwan. Review of Plant Pathology 63(8): 317.
23. Trung, H. M., Van, N. V., Vien, N. V., Lam, D. T. & Lien, M. (1993). Occurrence of rice grain rots disease in Vietnam. Int. Rice Res. Notes 18:30.
24. Cottyn, B., Cerez, M. T., Van Outryve, M. F., Barroga, J., Swings, J., Mew, T. W. (1996). Bacterial diseases of rice. I. Pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in The Philippines. Plant Dis. 80:429-437.
25. Nieves, C. (1999). Bacterial grain rot. In: Seed-Borne Bacterial Diseases. 8th Revised Edition. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. pp.108-113.
26. Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T. & Hwang, I. (2003). Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. Plant Dis. 87: 890-895.
27. Zhu B., Lou M., Huai Y., Xie G., Luo J. & Xu L. (2008). Isolation and identification of *Burkholderia glumae* from symptomless rice seeds. Rice Science 15(2):145–149.
28. Cother, E. J., Noble D. H., van de Ven R. J., Lanoiselet V., Ash G., Vuthy N., Visarto P. & Stodart B. (2010). Bacterial pathogens of rice in the Kingdom of Cambodia and description of a new pathogen causing a serious sheath rot disease. Plant Pathology 59: 944–953.
29. Nandakumar, R., Rush, M. C. & Correa, F. (2007). Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with panicle blight symptoms on rice in Panama. Plant Dis. 91:767.

30. González, A., Graterol, E., Arnao, E., Torres, E., Acevedo, M. & Mosquera, G. (2011). Primer reporte de *Burkholderia glumae* causante de la pudrición bacteriana de la panícula del arroz en Venezuela. *Fitopatología Colombiana* 35(1): 81.
31. Ham, J.H., Melanson, R.A. & Rush, M.C. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Mol. Plant Pathol.* 12:329–339.
32. Saylor, R. J., Cartwright, R. D. & Yang, Y. (2006). Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *Plant Dis.* 90: 603-610.
33. Iiyama, K., Furuya, N., Hara, K., Nakashima, N., Takanami, Y., and Matsuyama, N. (1994). Phytotoxin produced by *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei, a causal bacterium of the grain and seedling rot of rice. *J. Fac. Agric.* 38:175-181.
34. Yabuuchi, E., Yoshimasa, K., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M. (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36, 1251–1275.
35. Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K. and Komagata, K. (1994) Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 235–245.
36. Ou, S.H. (1985). Rice diseases. CAB Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, England. p. 380
37. Saddler, G.S. (1994). IMI Descriptions of fungi and bacteria. No. 1219. *Mycopathologia* 128: 59-60
38. Suzuki, F., Sawada, H. Azegami, K. and Tsuchiya, K. (2004). Molecular characterization of the tox operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *J. Gen. Plant Pathology* 70:97–107.
39. Iiyama, K., Furuya, N., Takanami, Y., and Matsuyama, N. (1995) A role of phytotoxin in virulence of *Pseudomonas glumae*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 61: 470–476.
40. Kang, Y., Kim, J., Kim, S., Kim, H., Lim, J. Y., Kim, M., Kwak, J., Moon, J. S., and Hwang, I. (2008). Proteomic analysis of the proteins regulated by HrpB from the plant pathogenic bacterium *Burkholderia glumae*. *Proteomics* 8:106-121.
41. Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed. Academic Press, New York. USA. 889 p.
42. HEWITT, E.J.; SMITH, T.A. (1975). Plant mineral nutrition, Unbooks. English Universities Press. London.
43. Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezaki, T., Vandamme, P., Tsushima, S., and Hikichi, Y. (2006). Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using gyrB and rpoD sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1031-1038.
44. Alagarsamy, G. (1986). Effect of nutrients on sheath rot incidence and grain yield of rice. *Madras Agric. J.* 73 (2): 117-118.

45. Andrade, M. (2011). Efecto de la aplicación de manganeso y boro sobre la severidad del ataque del ácaro (*Steneotarsonemus pinki* Smiley) y la bacteria (*Burkholderia glumae*) en el cultivo de arroz. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Tesis de grado.
46. Katz, E., and Demain, A.L. (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* 41: 449–474.
47. Chen, X. H., Koumoutsia, A., Scholza, R., Schneiderb, K., Vaterb, J., Süßmuthb, R., Piel, J. and Borrissa, A. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*. 140: 27–37.
48. Tsushima, S., Naito, H., and Koitabashi, M. (1995). Change in panicle susceptibility associated with flowering rate of spikelets in bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61:109- 113.
49. Partida-Martinez, LP., & Hertweck, C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* 437: 884–888.
50. Riera, C., Castro, J., Jimenez, M. and Cevallos, J. (2016) *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* interaction in Symptoms Development of Bacterial Panicle Blight in Rice Seeds and Seedlings. Artículo recibido.