

## BACTERIAS ENDOFITAS ASOCIADAS A CULTIVO DE ARROZ CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE *Burkholderia glumae*

### ENDOPHYTIC BACTERIAL FROM RICE WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY ON *Burkholderia glumae*

Alexander Francisco Pérez Cordero<sup>1\*</sup>, Cristo Rafael Pérez Cordero<sup>2</sup>, Leonardo Miguel Chamorro Anaya<sup>3</sup>

<sup>1</sup>. Grupo de Investigación en Bioprospección Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre, Sincelejo, Sucre, Colombia. alexander.perez@unisucre.edu.co

<sup>2</sup>. Investigador Fondo Nacional del Arroz, seccional Montería. cristopcor@gmail.com

<sup>3</sup>. Investigador Grupo de Investigación en Bioprospección Agropecuaria, candidato a magister en Biología, Universidad de Sucre. lema1906@hotmail.com

Recibido: Agosto 30 de 2013

Aceptado: Octubre 3 de 2013

\*Correspondencia del autor. Calle 12 N° 24B-40 Barrio La Palma, Sincelejo-Sucre, Colombia, celular 3007649060.

Email: alexander.perez@unisucre.edu.co

#### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la diversidad poblacional de bacterias endófitas asociadas a diferentes tejidos de variedades de arroz y su actividad antimicrobiana sobre *Burkholderia glumae*. La diversidad poblacional de bacterias endófitas cultivables se realizó por aislamiento de morfotipos a partir de tejidos desinfectados superficialmente de cuatro variedades comerciales de arroz, se llevó a cabo en R2A, la densidad poblacional (UFC/ g de tejido), fue estimada mediante conteo directo de colonias en medio R2A. La presencia de bacterias endófitas totales no cultivables de bacterias se realizó mediante extracción del ADN y posterior amplificación de genes 16S rDNA utilizando cebadores universales para eubacterias. La actividad antibacteriana de bacterias endófitas sobre *B. glumae* se hizo mediante la técnica de difusión sobre la superficie de medios de cultivo con discos. Las diferencias estadísticas entre bacterias endófitas cultivables en función a variedad, tejido se realizaron ANOVAS, test paramétricos y no paramétricos utilizando el programa R. Un total de 89 morfotipos de bacterias endófitas fueron aislados con mayor presencia en las variedades Fmocari y F733, asociadas a raíz, tallo y hoja en mayor proporción. El perfil electroforético muestra presencia de bacterias endófitas en raíces, tallo y hojas de las variedades Fmocari y F733. La prueba antibacteriana in vitro muestra que las bacterias endófitas tienen actividad inhibitoria sobre *B. glumae*. Este es el primer reporte a la fecha que se tiene en Colombia sobre el efecto inhibitorio de bacterias endófitas sobre el agente causal del añublo bacterial de la panícula en arroz.

**Palabras claves:** Bacteria, endófitas, arroz, inhibición, añublo.

**ABSTRACT**

The present study objective was to determine the population diversity of endophytic bacteria associated to different tissues of rice varieties and their antimicrobial activity against *Burkholderia glumae*. The population diversity of culturable endophytic bacteria was performed by isolation morphotypes from tissues superficially disinfected four commercial rice varieties, was conducted in R2A, population density (CFU / gof tissue) was estimated by direct counting R2A medium colonies. The presence of total non-endophytic bacteria culturable bacteria was performed by extraction of DNA and subsequent amplification of 16S rDNA gene using universal primers for eubacteria. The antibacterial activity of endophytic bacteria on *B. glumae* was made by the technique of diffusion on the surface of culture media with discs. The statistical differences between culturable endophytic bacteria according to variety, tissue ANOVA were performed, parametric and non-parametric test using the program R. A total of 89 morphotypes of endophytic bacteria were isolated with greater presence F733 and Fmocari varieties associated to root, stem and leaf in greater proportion. The electrophoretic profiles shows the presence of endophytic bacteria in roots, stem and leaves of the varieties Fmocari and F733. Antibacterial in vitro test shows that endophytic bacteria have inhibitory activity on *B. glumae*. This is the first report to date has been in Colombia on the inhibitory effect of endophytic bacteria on the causal agent of bacterial panicle blight in rice.

**Keywords:** Bacteria, endophytes, rice, inhibition, blight.

**INTRODUCCIÓN**

En Colombia, el cultivo de arroz ocupa el primer lugar en términos de valor económico entre los cultivos de ciclo corto. Es el tercer país productor de América Latina y del Caribe después de Brasil y Perú (1) y ocupa el puesto 22 a nivel mundial con una participación de 0.4% (2). El arroz es el tercer producto agrícola en extensión, después del café y el maíz. Representa el 13% del área cosechada en Colombia y el 30% de los cultivos transitorios. Su producción representa el 6% del valor de la producción agropecuaria y el 10% de la actividad agrícola Colombiana. El valor generado por este producto es equivalente al 58% del valor constituido por el cultivo del café (3).

Las plantas de arroz son atacadas por muchas enfermedades causadas por múltiples fitopatógenos que dan como resultados la baja producción y la pérdida de los cultivos a nivel mundial. La aplicación de pesticidas para el control de estas enfermedades ha sido una técnica empleada, pero no ha traído eficacia en sus resultados y además acarrear un inminente peligro para el ambiente (4).

El añublo bacterial de la panícula del arroz causada por *B. glumae*, reportada en diferentes países del mundo, provoca reducciones en producción hasta en un 75% en las regiones gravemente afectadas, debido a que el fitopatógeno afecta directamente el llenado de grano (5). El vaneamiento del arroz es el principal problema que afecta la producción y la productividad del cultivo en

Colombia y otros países centroamericanos. *B. glumae* fue reportada por primera vez en los años 50's en Japón. Por primera vez la bacteria se reportó en América Latina en el año 1989 (6). Sin embargo, solo hasta el año 2007, los síntomas típicos de la enfermedad se manifestaron con mayor severidad en la región de Montería, produciendo pérdidas en rendimiento hasta de un 80% (7). En Colombia, se desconoce la variabilidad del patógeno, los mecanismos de virulencia y potenciales fuentes de resistencia en el hospedero, que faciliten el desarrollo de una herramienta efectiva para el manejo y control de la enfermedad. Teniendo en cuenta que en Colombia la presión de la enfermedad ha aumentado en los tres últimos años y aún se desconoce la variabilidad del patógeno, los mecanismos de virulencia y potenciales fuentes de resistencia en el hospedero.

Las bacterias endófitas viven asintóticamente dentro de los tejidos de la planta y se han encontrado en casi todos los estudios de plantas hasta la fecha (8). Ellas juegan un papel importante en las actividades fisiológicas de las plantas hospederas e influyendo en el mejoramiento al estrés y resistencia a enfermedades, insectos y nematodos (9- 12). Los endófitos también incrementan el crecimiento de la planta y la capacidad de fijar nitrógeno en la planta hospedera (13, 14). Las bacterias endófitas constituyen una búsqueda invaluable de metabolitos secundarios (15, 16) y sería una fuente de nuevos fármacos de importancia biotecnológica y un programa de gestión contra enfermedades de las plantas (17, 18). Trabajos previos en arroz han encontrado bacterias diazotróficas (19), rizobiales (20), bacterias fototróficas

anoxigénicas (21) y bacterias endófitas (22), poblaciones de hongos y actinomicetes y su función en la planta en la promoción del crecimiento, fijación del nitrógeno y resistencia a enfermedades (23, 24).

En busca de estrategias efectivas para el manejo de enfermedades, el control biológico con bacterias endófitas se convierte en una alternativa amigable en la sustitución de productos químicos. Por lo anterior se plantea aislar bacterias endófitas asociadas a cuatro variedades comerciales de arroz en el departamento de Córdoba y evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana sobre *B.glumae*. Así mismo se determinara mediante técnica de PCR, la presencia de bacterias endófitas no cultivables asociadas a cuatro variedades de arroz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio.** Variedades comerciales de arroz fueron colectadas de la granja experimental la Victoria del Fondo Nacional del arroz, localizado en el municipio de Mocarí-Córdoba-Colombia a 8°47'25" de la Longitud Norte 75°51'38" de longitud Oeste con respecto al Meridiano de Greenwich, con una temperatura promedio de 29°C, humedad relativa de 80%, precipitación anual promedio de 1200 mm y altura de 20 m.s.n.m.

**Muestra de estudio.** 10 plantas completa (incluyendo raíces) de cada variedades encontrada fueron colectadas en etapa de inflorescencia y transportadas al laboratorio de investigaciones microbiológicas de la Universidad de Sucre y procesada dentro de las 24 horas después de colectadas. De cada planta se separaron raíz, tallo, hojas, hojas banderas y panículas.

**Aislamiento de bacterias endófitas cultivables.** Las raíz, tallo, hojas, hojas banderas y panículas de cada planta de arroz se lavaron con agua estéril y se cortaron en segmento de 1 cm aproximadamente. La desinfección superficial de cada tejido fue realizada de la siguiente manera lavados de cada tejido por separado en agua destilada esterilizada, seguida de agitación por 15 min en solución tampón de fosfato de potasio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; inmersión por 1 min en alcohol 70%; agitación por 5 min en solución de hipoclorito de sodio 5% y Tween 80%; nuevamente inmersión por 1 min en alcohol 70% seguida de agitación por 15 min en solución tampón fosfato de potasio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 y, finalmente, el lavado por cuatro veces en agua destilada esterilizada. Para confirmar la esterilización de la superficie de las raíces, alícuota del último lavado fue espar-

cida en placa conteniendo medio agar R2A e incubada a 28 °C por 72 horas. La ausencia de crecimiento de bacteria en el medio R2A confirmó que el procedimiento de desinfección superficial fue eficaz en la eliminación de bacterias de la superficie (25).

Después del proceso de desinfección, cada tejido fue colocado en plato de porcelana y macerado con nitrógeno líquido hasta obtener una mezcla homogénea. De cada homogenizado fue preparado diluciones seriadas las cuales fueron sembradas por difusión sobre la superficie de agar R2A e incubada a 28 °C por 72 horas. La densidad poblacional de bacterias por tejido (UFC/g de tejido), fue estimada por conteo directo de colonias en placas. Durante el conteo fueron observadas y seleccionadas las colonias que se distinguían en cuanto a forma, aspecto de la superficie, color y tamaño. Los morfotipos seleccionados fueron purificados y mantenidos en agar R2A para su evaluación *in vitro* sobre *Burkholderia glumae*.

### Aislamiento de bacterias endófitas no cultivable.

Para la extracción del DNA total de bacterias se utilizaron 10 raíces por muestra de cada variedad de arroz, previamente lavados en agua milli-Q estéril y sometida a proceso de desinfección superficial (26).

El protocolo para la extracción de DNA de bacterias utilizado fue el propuesto por (tesis alex doctorado). Las raíces de colosoana fueron macerados en presencia de nitrógeno líquido, en plato porcelana, hasta la obtención de un homogenizado puro. El homogenizado fue transferido para tubo *eppendorf* esterilizado, al cual se adiciono 700 µL de tampón de extracción (4 % CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1 % PVP), 4 µL de β-mercaptoetanol y lisozima para una concentración final de 150 µg.mL<sup>-1</sup>, la mezcla fue incubada por 1 horas a 37 °C en baño a maría. El tubo fue transferido nuevamente a baño a maría a 65 °C por 20 minutos. A continuación la mezcla se llevó a temperatura ambiente por 10 min antes de la adición de 700 µL (1 volumen) de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v), la suspensión del *eppendorf* fue homogeneizada por repetidas invertidas del tubo antes de la centrifugación, 5 min a 10.000 g en microcentrifuga.

El sobrenadante fue transferido para otro tubo y precipitado con 0.7 volumen de isopropanol (almacenado en temperatura ambiente) e incubado a temperatura ambiente por 2 horas. Después de este tiempo, el tubo fue centrifugado por 5 min a 10.000 g y el precipitado re-

suspendido en 50  $\mu\text{L}$  de agua milli-Q esterilizada se le adicionó a RNase (Sigma-Aldrich Co. USA) para una concentración final de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  antes de la incubación a 37 °C por 1 hora. El DNA extraído fue precipitado con solución de NaCl 5 mM (1/10 del volumen) y con dos veces el volumen, con etanol absoluto.

El precipitado de DNA fue lavado con etanol 70 % y secado a temperatura ambiente para ser analizado en gel de agarosa 0.8 % en tampón TAE (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA) y bromuro de etidio (2  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Alícuotas de 3  $\mu\text{L}$  de DNA fue adicionada colorante (0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % de xilenocianol y 15 % de ficol) para su aplicación en el gel y sometidas a electroforesis por 2 horas a 60 volts utilizando fuente de Power Pac Basic™ BIO-Rad. El DNA del fago  $\lambda$  (Promega) fue utilizado como patrón, para la cuantificación del DNA. El perfil de bandas de DNA en el gel fue visualizado en el sistema de digitalización de imagen Eagle Eye™ (Stratagene), en archivo jpg. La cuantificación fue realizada utilizando marcadores de DNA de fago  $\lambda$  en concentración de 50  $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$ .

La amplificación del rDNA 16S de poblaciones de bacterias endófitas de las raíces de variedades de arroz, fue realizada por la técnica molecular de PCR. El molde utilizado para las reacciones fue el DNA total extraído de las muestras de raíces del pasto colosoana, (26). La amplificación de los fragmentos de rDNA 16S fue realizada con el cebador universal F984GC/R1378 (26) para estudio de la estructura de las poblaciones de eubacterias. Las reacciones fueron realizadas en tubos eppendorf de 100  $\mu\text{L}$  en volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , conteniendo tampón TAE (10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, pH 8.3), 3.75 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de desoxirribonucleotidos (dNTP's), 0.2 mM de cada cebador, 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de albumina sérica bovina (Invitrogen), 2 % (v/v) de formamida desionizada, 1.5 U de Taq DNA polimerasa, 20 ng de DNA total y agua milli-Q para completar el volumen final. En todas las reacciones fue utilizado un control negativo, sin el DNA molde. La PCR fue realizada en termociclador My cycler™ Thermal cycler (bio-rad) sobre las siguientes condiciones: temperatura inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos consistentes de 94 °C por 1 min para a desnaturalización, 1 min para alineamiento de cebador en la temperatura adecuada y 2 min a 72 °C para a extensión del cebador. El ciclo fue seguido por una extensión final a 72 °C por 10 min y finalmente enfriamiento a 4 °C. La verificación de los productos de la amplificación fue realizada por electroforesis en gel de agarosa

(Sigma-Aldrich Co. USA) 1.2 %, en tampón TAE (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA) y bromuro de etidio (2  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Fue aplicado 5  $\mu\text{L}$  de cada reacción junto con el marcador de tamaño de DNA del fago  $\lambda$ .

**Actividad antibacteriana.** Para evaluar la actividad antibacteriana de bacterias endófitas sobre *B. glumae*, se utilizó el método de difusión en disco sobre agar, el cual consistió en realizar siembra en superficie de *B. glumae* sobre agar Mueller-Hinton. Las bacterias endófitas empleadas en el presente estudio se utilizaron a una concentración de  $10^8$  UFC/ml. Discos estériles de papel filtro fueron sumergidos por 24 horas. Transcurrido este tiempo, los discos impregnados se depositaron sobre la superficie del medio de cultivo inoculado previamente con *B. glumae*. Las placas se incubaron a 28°C por 24 horas (27). Para los experimentos se utilizó un control positivo con gentamicina 120 mg/mL y negativo con agua estéril. Los ensayos se realizaron por triplicado y la evaluación se hizo por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de los discos (mm). La eficiencia de la actividad antibacteriana de las bacterias endófitas sobre *B. glumae* se realizó por comparación con los resultados obtenidos con el control positivo (28).

**Análisis estadísticos.** Diferencias entre la densidad poblacional (UFC/g de tejido) de bacterias endófitas en función a variedades y tipo de tejido fue analizada por ANOVA multifactorial. Asimismo se utilizó la prueba múltiple de rango (Tukey) para establecer diferencias por separado entre comunidades de bacterias endófitas (UFC/ g de tejidos) con relación a variedad y tipo de tejido colonizado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Muestra de estudio.** Cuatro variedades comerciales de arroz, registradas en el banco de germoplasma de la Estación Experimental La Victoria del Fondo Nacional del Arroz, localizada en el municipio de Mocarí, perteneciente al departamento de Córdoba, fueron utilizadas en este estudio, las cuales fueron designadas como Fedearroz 2000 (F2000), Fedearroz 473 (F473), Fedearroz Mocarí (Fmocarí) y Fedearroz 733 (F733).

**Aislamiento de bacterias endófitas cultivables.** Un total de 89 aislados de bacterias endófitas pertenecientes a las cuatro variedades fueron obtenidas de los diferentes tejidos de la planta de arroz. El número de aislados y la colonización de bacterias endófitas variaron significa-

**Tabla 1.** Anova multifactorial de UFC/ g de tejido de bacterias endófitas en tejidos y variedades de arroz de Mocarí-Córdoba-Colombia.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: tejido	9.10001E21	4	2.275E21	8.60	0.0000***
B: variedad	4.58909E21	3	1.5297E21	5.78	0.0017***
RESIDUOS	1.37524E22	52	2.64469E20		
TOTAL (CORREGIDO)	2.74415E22	59			

\*\*\*: Altamente significativa intervalos de confianza del 95.0%.

tivamente para variedad y tipo de tejido analizado. El análisis de varianza multifactorial (UFC/ g de tejido) de bacterias endófitas mostró diferencias significativas tanto para tejido, como variedad (tabla 1).

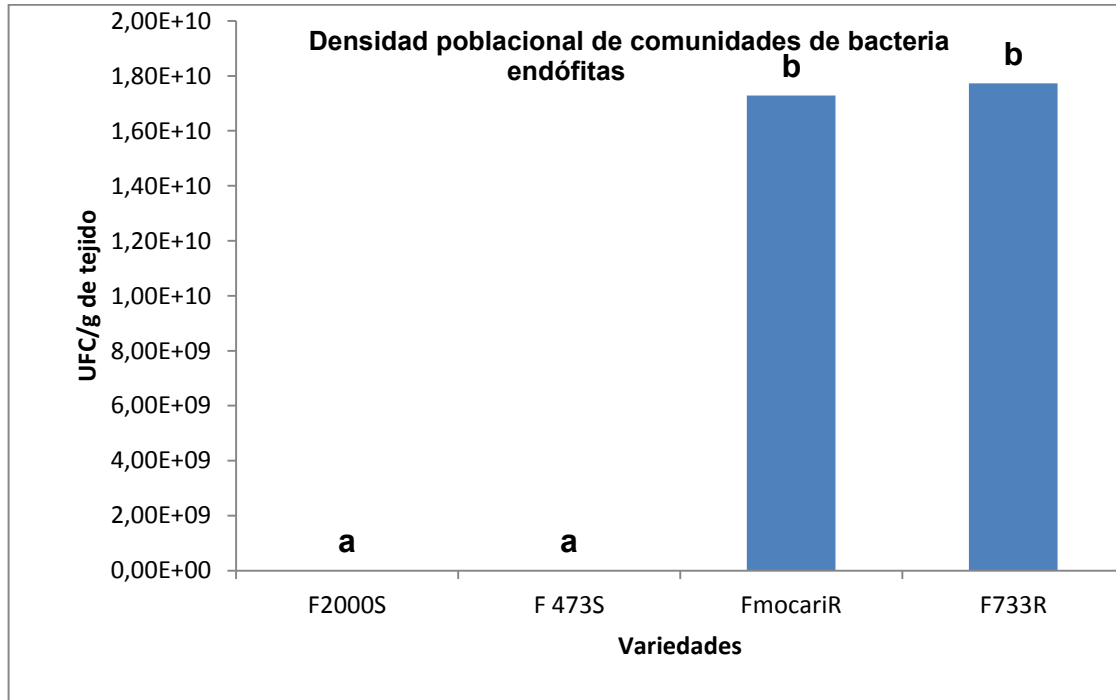
La prueba múltiple de rango para comunidades de bacterias endófitas (UFC/ g de tejidos) mostró significancia en cuanto a colonización entre las variedades de arroz estudiadas. Las variedades de arroz con mayor densidad de bacterias endófitas asociadas a ella fue F733 ( $1.77 \times 10^{10}$  UFC/ g de tejido) y FMocari ( $1.7 \times 10^{10}$  UFC/ g de tejido) con respecto a las que mostraron menor densidad de bacterias endófitas correspondiendo a F273 y F2000, las cuales tuvieron densidades de  $2.0 \times 10^7$  y  $1.56 \times 10^7$ , respectivamente (Figura 1).

La colonización de bacterias endófitas difiere significativamente entre las variedades de arroz y grado de susceptibilidad y tolerancia a *B. glumae*. Las variedades con mayor densidad de bacterias endófitas asociadas corresponden a las variedades tolerantes Fmocari y F733 en comparación con las variedades susceptibles F2000 y F473. Las bacterias endófitas son reconocidas como aquellas aisladas de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o, de su interior, y que no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (29). Estudios indican que las bacterias endófitas interactúan con patógenos (30), promueven el crecimiento en las plantas hospederas (31), aumentan la resistencia a enfermedades (32), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (33) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (34).

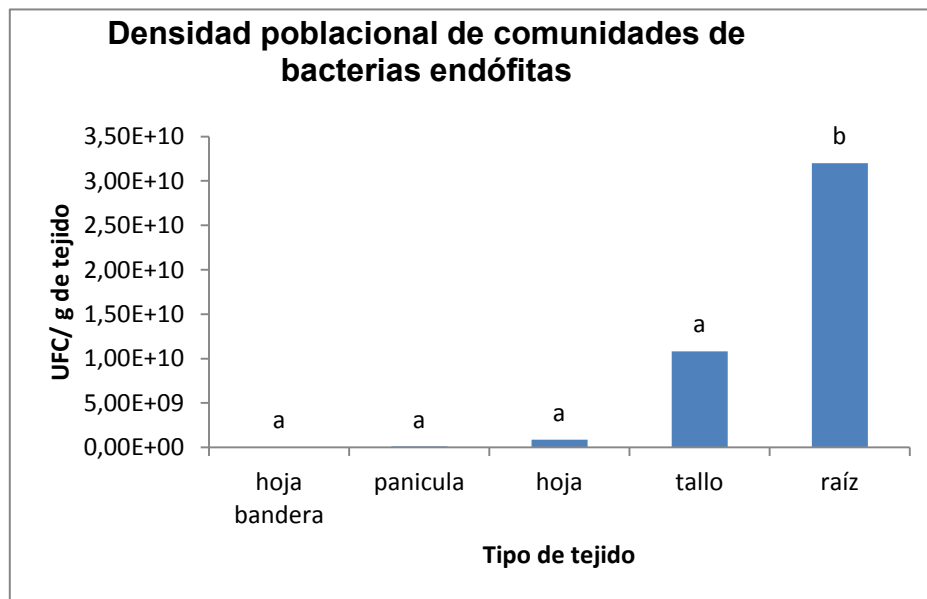
La prueba múltiple de rango para densidad de bacterias

endófitas (UFC/ g de tejidos) en función a tipo de tejido muestra mayor colonización de bacterias endófitas en raíces  $3.2 \times 10^{10}$  UFC/ g de tejido con respecto a tallo, hojas, hoja bandera y panícula (Figura 2). La densidad poblacional de bacterias en tejido de arroz varió desde  $1.06 \times 10^7$  en hoja bandera a  $3.2 \times 10^{10}$  en raíz.(35, 36), encontraron densidad poblacional de bacterias endófitas cultivables en semillas de arroz en un rango de  $10^2$  a  $10^6$ / g de peso fresco. La diversidad de bacterias endófitas varía de acuerdo al tejido de la planta de arroz. Bacterias endófitas han sido aisladas desde semilla, raíz, tallo, hoja y vaina de la hoja de diferentes variedades de arroz. (37) Poblaciones de bacterias endófitas fueron aisladas de 2400 segmentos de arroz colectadas del Sureste de la India en dos épocas del año. La tasa de colonización de tejidos por bacterias endófitas a partir de superficies desinfectadas varió en cuanto a la época del año, con 40.3 % en raíces y 25.83% en hojas durante el invierno y 20.15% en raíces y 8.66% en hojas durante el verano (4).

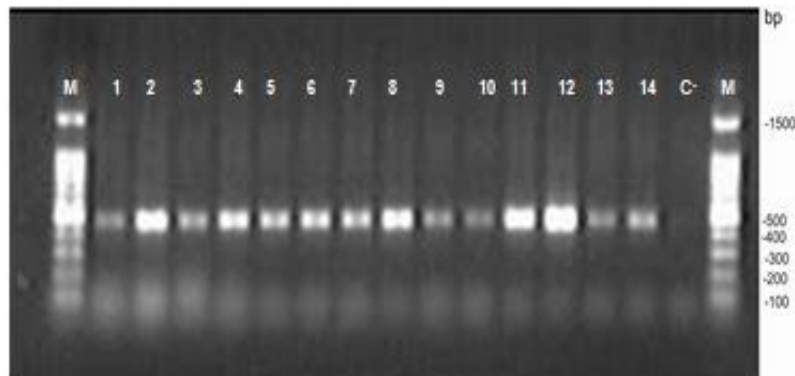
**Aislamiento de bacterias endófitas cultivables.** El perfil electroforético de fragmentos de rDNA 16S amplificados, con el uso de cebadores universal, para el total de bacterias endófitas revela la presencia de diversidad distinta con relación a variedad. Los resultados muestra que existe presencia de bacterias endófitas no cultivables asociadas a la variedad Fmocari (figura 3) y F733 (figura 4) con relación a las variedades F2000 y F473 donde se observó la presencia de estas bacterias. La figura señala por la presencia de bandas que fue encontrada bacterias endófitas asociada a raíces, tallo y hoja en ambas variedades.



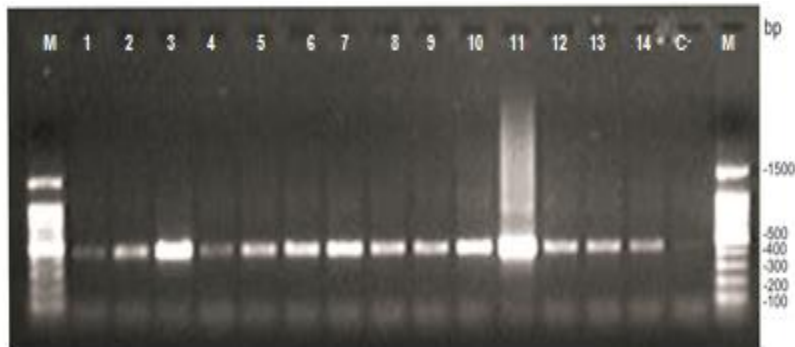
**Figura 1.** Densidad poblacional promedio de bacterias endófitas asociadas a variedades de arroz. F: Fedearroz, S: variedad susceptible, R: variedad tolerante a *Burkholderiaglumae*.



**Figura 2.** Densidad poblacional promedio de bacterias endófitas asociadas a tejidos de arroz.



**Figura 3.** Perfil electroforético en gel de agarosa a 1.2 % del producto de amplificación por PCR de fragmento de rDNA 16S, con cebadores F984GC/R1378, del total de bacterias endófitas asociadas a la variedad Fmocari. 1-7: raíces, 8-11: tallo, 12-14: hoja, M-100 pb de DNA Ladder, C : control negativo.



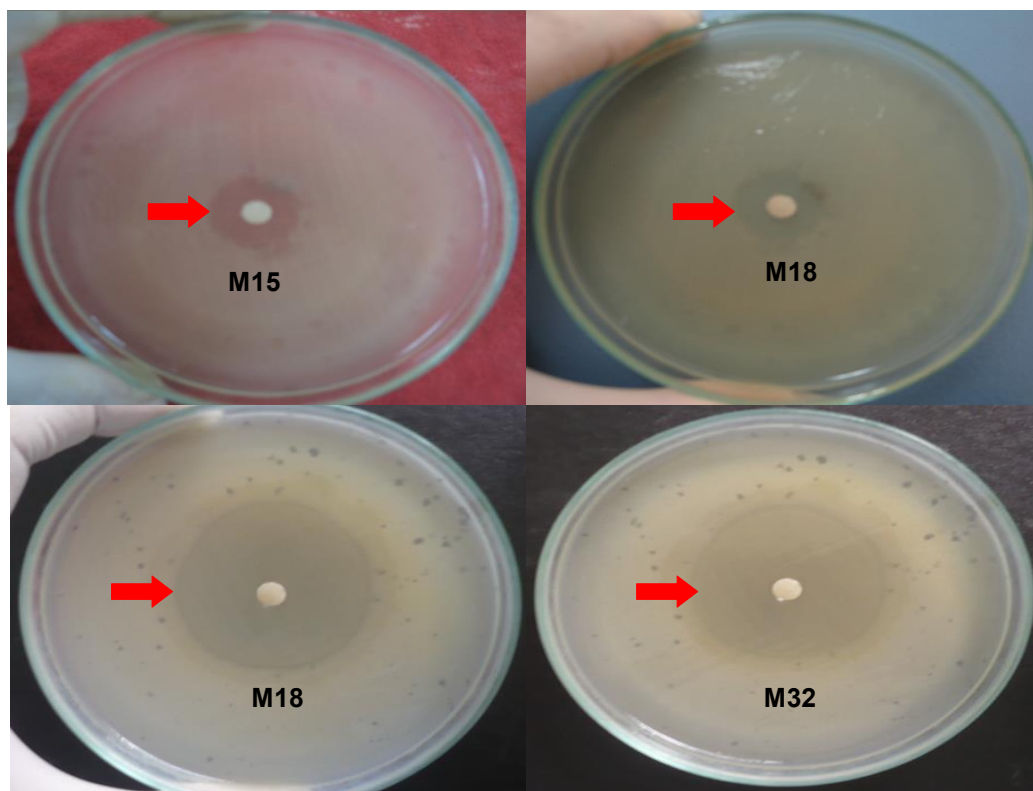
**Figura 4.** Perfil electroforético en gel de agarosa a 1.2 % del producto de amplificación por PCR de fragmento de rDNA 16S, con cebadores F984GC/R1378, del total de bacterias endófitas asociadas a la variedad F733. 1-7: raíces, 8-11: tallo, 12-14: hoja, M-100 pb de DNA Ladder, C: control negativo.

**Actividad antibacteriana de Bacterias Endófitas.** De los 89 morfotipos aislados de diferentes tejidos de planta de arroz, 28 de ellos mostraron actividad antibacteriana *in vitro* sobre *B. glumae*, causante del añublo bacteriano de la panícula del arroz. En la figura 5, se observa la actividad inhibitoria de las bacterias endófitas sobre la bacteria fitopatógena, en la figura se muestra que los morfotipos aislados de tallos presentaron mayor actividad inhibitoria con respecto a los morfotipos obtenidos de las raíces. Los morfotipos que presentaron actividad inhibitoria sobre *B. glumae* fueron aislados de las variedades Fmocari y F733, ambas variedades han mostrado tolerancia a la enfermedad del añublo bacteriano de la panícula. Un total de 570 aislados, correspondiente a hongos y bacterias endófitas colectadas de diferentes tejidos de plantas de arroz cultivado en el Sureste de la India durante la época de verano e invierno, mostraron

actividad antimicrobiana *in vitro* sobre los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Nigrospora oryzae*, *Macrophomina phaseolina*, *Phoma orghina* y *Alternaria alternata* (4).

## CONCLUSIONES

En los actuales momentos, la bacteria *B. glumae* causante del añublo de la panícula del arroz, se ha extendido rápidamente a lo largo de las principales zonas arroceras de Colombia, teniéndose registros, de la presencia de esta bacteria en 10 departamentos del País, donde ocasiona pérdida en la producción de dicho cultivo. A pesar de los esfuerzos del fondo nacional del arroz por encontrar solución a esta problemática. Estudios realizados demuestran que las bacterias endófitas se encuentran asociadas a todas las especies de plantas en el mun-



**Figura 5.** Prueba *in vitro* de la actividad antibacteriana de bacterias endófitas aislados de cultivo de arroz sobre *B. glumae*. M: morfotipo, R: raíz, T: tallo. Fuente: foto Chamorro, 2012.

do contribuyendo a su hospedero con la producción de sustancias que provean protección y supervivencia a las plantas.

Diversos estudios han demostrado que las bacterias endófitas son fuentes potenciales de nuevos productos naturales para su utilización en la medicina moderna, agricultura y biotecnología. La producción de alimento necesita ser incrementada para la subsistencia de la población a nivel mundial, desafortunadamente, algunos cereales como el arroz presentan pérdidas en la producción debido a la presencia de fitopatógenos (38). Resultados obtenidos demuestran que existe una diversidad incalculable de bacterias endófitas que presentan actividad antimicrobiana al menos sobre algún fitopatógeno. Existen algunos compuestos antimicrobianos aislados de microorganismos endófitos que solo ocupa una pequeña parte del total de las especies de endófitos, mostrando una gran oportunidad para encontrar nuevos productos naturales antimicrobianos en los endófitos, que se puede utilizar como antibióticos eficaces en el futuro para el control y erradicación de fitopatógenos en cultivos de interés comerciales en el Colombia (39).

Este estudio preliminar muestra el potencial que tiene las bacterias endófitas aisladas de variedades de arroz

en el Caribe Colombiano para el manejo integrado de la enfermedad del añublo bacterial. Estudios posteriores serán dirigidos hacia la obtención de antibiótico o metabolitos secundarios producidos por estas endófitas y su efecto sobre *B. glumae*. A futuro se prevé realizar ensayo en invernadero para evaluar la eficiencia de estas bacterias endófitas sobre la disminución del efecto que produce *B. glumae* sobre el cultivo del arroz.

#### AGRADECIMIENTOS

Los Investigadores agradecen al Fondo Nacional del Arroz por su colaboración en la realización del presente proyecto.



## BIBLIOGRAFÍA

1. FAO. Estadísticas mundiales sobre cultivos. Consultado octubre 10 de 2012 en: <http://www.Faostat.Org>. 2010.
2. Espinal, C. F., Martínez, H. J. & Acevedo, X. La cadena de arroz en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Consultado noviembre 2 de 2012 en: <http://www.agrocadenas.gov.co>. 2005.
3. Aramendiz., Tatis Hermes., Espitia Camacho Miguel., Cardona Ayala Carlos. Adaptación del arroz de riego (*Oryza sativa* L) en el Caribe Colombiano. Revista Acta Agronómica, 2011; 60 (1). 1-12.
4. Shankar, N. B., Shashikala, J., Krishna murthy, Y.L. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. Microbiological Research, 2009; 164: 290-296.
5. Laii, X.H., Mcclung, A.M., Marchettii, M.A. The effects of panicle blight of rice on grain weight and viability. Agricultural. Research Service, Tektran, Texas. USDA: Abstract. 1999.
6. Zeigler, R.S., Alvarez, E. Grain discoloration of rice caused by *Pseudomonas glumae* in Latin America. Plant Dis, 1989; 73 (4): 368.
7. Correa, F., Pérez, C.R., Saavedra, E. Añublo bacterial de la panícula del arroz. Revista Arroz, 2007; 57: 468.
8. Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S. Endophytes from herbaceous and shrubs: effective ness of surface sterilization methods. Mycol Res, 1993; 897: 1447–1450.
9. Carroll, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbionts. Ecology, 1988; 69:2–9.
10. Hallmann, J., Sikora, R.A. Toxicity of fungal endophytic secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil borne plant pathogenic fungi. Eur J Plant Pathol, 1996; 102: 155–62.
11. Azevedo, J.L., Macchroni, W., Pereira, J.O., Araujo, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Biotechnology, 2000; 3: 40–65.
12. Sturz, A.V., Nowak, J. An endophytic community of rhizobacteria and the strategies requires to created yield enhancing associations with crops. Appl Soil Ecol, 2000; 15: 183–190.
13. Verma, S.C., Ladha, J.K., Tripathi, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J Biotechnol, 2001; 91: 127–41.
14. Rahman, M.H., Saiga, S. Endophytic fungi (*Neotyphodium coenophialum*) affect the grow than mineral uptake, transport and efficiency ratiosint all fescue (*Festuca arundinacea*). Plant Soil, 2005; 272:163–71
15. Li, J.Y., Strobel, G.A., Harper, J.K., Lobkovsky, E., Clardy, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* of quercina. Org Lett, 2000; 2: 767–770.
16. Strobel GA. Rainforest endophytes and bioactive products. Crit Rev Biotechnol, 2002; 22: 325–33.
17. Murray, F.R., Latch, G.C.M., Scott, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. Mol Gen Genet , 1992; 233:1–9.
18. Berg, G., Krechel, A., Faltin, F., Ulrich, A., Hallmann, J., Grosch, R. Endophytes: a new source for environmental biotechnology. In: Abstracts of 10th international symposium on microbial ecology ISME-10, “Microbial Planet: sub surface to space”, Cancun, Mexico. August 22–27. 2004.
19. Barraquio, W.L., Revilla, L., Lodha, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. Plant Soil, 1997; 194: 15–24.
20. Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Ba, A., Gillis, M. Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the Africa wild rice *Oryza breviligulata*. Appl Environ Microbiol, 2000; 12:5437–5447.
21. Paolino, G., Scavino A.F. (2004). Molecular and physiological diversity of anoxygenic phototrophic bacteria in rice fields from temperate climate. In: Abstracts of tenth International symposium on Microbial Ecology ISME-10, “Microbial Planet: subsurface to space”, Cancun, Mexico, August: 22–27.
22. Fernandez, M.J., Ferrando, L., Fernandez A.S. Molecular and functional diversity of endophytic bacteria from leaves of three rice varieties. In: Eleventh international symposium on microbial ecology (ISME-11), Vienna, Austria, August 20–25. 2006.

23. Fisher, P.J., Petrini, O. Fungal saprobes and pathogens as endophyte of Rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol*, 1992; 120: 137–143.
24. Tian, X., Cao, L., Tan, H., Zeng, Q., Jia, Y., Han, W. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. *World J. Microbiol Biotechnol*, 2004; 20:303–9.
25. Perez, C.A., Rojas S.J y Fuentes, J. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta biol. Colomb*, 2010; 15(2): 219-228.
26. Perez, C.A. Diversidad de bacterias endófitas en frutos de café. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Federal De Viscosa, Brasil. 2008.
27. Cuellar, A., Hussein, R. Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* in barara district (Uganda). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 2009; 1(2): 240-249.
28. Rojas, S.J., Pérez, C.A., Martínez, A.J y Mieles, G.J. Actividad antibacteriana de extracto de hojas de *Melia azedarach* L. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 2012; 14(1): 224-232.
29. Hallmann, J., Quadt-hallmann, A., Mahaffee, W & Kloepper J. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology*, 1997; 43:895-914
30. Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., Wilhelm, E. Cultivation independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002; 39:23-32.
31. Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S & Netrusov A. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 2007; 162: 69-76.
32. Chanway, C. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia*, 1998; 50:149–170
33. Estrada, P., Mavingui, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., Caballero, J. A N<sub>2</sub>-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002; 48: 285–294.
34. Berg G., Krechel A., Ditz M, Sikora A., Ulrich A & Hallmann J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi, *FEMS Microbiology Ecology*, 2005; 5:1215–229.
35. Mano Hironobu, Tanaka Fumiko, Watanabe Asuka, Kaga Hiroko, Okunishi Suguru & Morisaki Hisao. Culturable Surface and Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Seeds of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. *Microbes and Environments - Microbes Environments*, 2006; 21(2): 86-100.
36. Okunishi, S., Sako, K., Hironobu, M., Mamura, A & Morisaki, H. Bacterial Flora of Endophytes in the Maturing Seed of Cultivated Rice (*Oryza sativa*). *Jou Microbes and Environments - Microbes Environments*, 2005; 20(3):168-177.
37. Hironobu Mano., Hisau Morisaki. Endophytic bacteria in the plant rice. *Microbes Environ*, 2008; 23(2): 19-117.
38. Aliye, N., Fininsa, C., Hiskias, Y. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*, 2008; 47:282–288.
39. Hongsheng, Y., Lei, Z., Lin, L., Chengjian, Z., Lei, G., Wenchao, L., Peixin, S., Luping, Q. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 2010; 165: 437-449.