



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Evaluación de tres aislamientos bacterianos como potenciales promotores de crecimiento vegetal en plantas de arroz (*Oryza sativa*)**

**Diana Marcela Vinchira Villarraga**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología  
Bogotá, Colombia

2014

# **Evaluación de tres aislamientos bacterianos como potenciales promotores de crecimiento vegetal en plantas de arroz (*Oryza sativa*)**

**Diana Marcela Vinchira Villarraga**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en ciencias-Microbiología**

Director (a):

Ingeniera química, MsC. Nubia Moreno Sarmiento

Codirector (a):

Química farmacéutica, Ph.D. Zulma Rocío Suárez Moreno

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología

Bogotá, Colombia

2014

*Una lección sin dolor no tiene sentido.*

*Eso es porque no se puede ganar algo sin sacrificar algo a cambio.*

*Sin embargo, una vez que hayas soportado el dolor y lo hayas superado, ganarás un corazón que es más fuerte que todo lo demás. Así es, un corazón de acero.*

*Fullmetal Alchemist Brotherhood*

## Agradecimientos

Agradezco inmensamente a Dios, por permitirme disfrutar, aprender y experimentar cada día. Por enseñarme a ser honesta, perseverante, comprometida y congruente en todos los aspectos de mi vida.

A mis papás, Dora y Antonio, por ser mi más grande apoyo. Por enseñarme a pensar y a tomar las decisiones con madurez y responsabilidad. Por permitirme tener su confianza y su respaldo, y por alentarme a creer en mí. A mi hermana, Liliana, por demostrarme que alegría, confianza y disciplina pueden estar presentes en una persona, y enseñarme que cada día hay que hacer aquello que te llena de felicidad y satisfacción.

A mis amigas: Katherine Vargas porque hemos crecido y aprendido juntas, Karen Narváez que fue el soporte espiritual que muchas veces necesite y a mis amigos que de lejos o de cerca, han sido una grata compañía y un gran respaldo en mi vida.

A la Universidad Nacional y todas las personas, docentes, estudiantes y administrativos, que me brindaron su ayuda para llevar a feliz término esta investigación. Al Posgrado en Microbiología, muy especialmente a la profesora Martha Fontanilla y el profesor Daniel Uribe, por ser los primeros en guiarme y enseñarme el inmenso potencial del área de la microbiología, y a Socorro Prieto por su continuo acompañamiento y gran apoyo emocional.

A mis directoras de tesis la Profesora Nubia Moreno y la Dra. Zulma Suárez, por su decidida e incondicional colaboración durante todo el desarrollo del proyecto, por sus enseñanzas, por todo su tiempo y su inmenso apoyo para que este proyecto pudiera llevarse a cabo, y por su exigencia, que me impulsa a demostrarme que siempre se puede ser mejor. Gracias, porque en dos años hicieron de mi una mejor profesional y una mejor persona. . Un agradecimiento especial a la profesora Ivonne Gutiérrez, por los consejos académicos y personales que recibí de su parte durante el desarrollo de mi investigación.

A mis amigos del laboratorio de Fermentaciones (los que aún están y los que ya se fueron): Diana, María Angélica, Martha, Jorge, Alejandra y Don Carlos, y mis grandes amigas de maestría Diana Catalina, Vanessa y Catalina, su apoyo incondicional, sus alientos y su alegría hicieron de mi maestría una experiencia gratificante en todos los sentidos. Gracias por brindarme su valiosa amistad.

## Resumen

El uso de biofertilizantes y biocontroladores en cultivos de alto impacto económico como el arroz, buscan fortalecer las técnicas de fertilización y control de enfermedades en los procesos de producción de los cultivos y han sido aceptados como alternativas al manejo químico tradicional. La presente investigación evaluó el potencial de las cepas bacterianas A20, 5.1 y 7.1, como promotores de crecimiento vegetal en dos variedades colombianas de arroz (F60 y F733) con el objetivo de contribuir en el desarrollo de un bioinoculante dirigido al sector arrocero. Los tres aislamientos fueron clasificados dentro del género *Streptomyces* por medio del secuenciamiento del gen 16S rARN. Para evaluar el potencial de los tres microorganismos como promotores de crecimiento vegetal se llevaron a cabo diferentes ensayos que pusieron de manifiesto la capacidad de estas cepas de producir sideróforos, AIA, enzimas extracelulares, solubilizar fosfatos (7.1) y controlar el crecimiento de un amplio rango de microorganismos patógenos *in vitro*. Adicionalmente, se verificó la capacidad de colonización de los tres aislamientos destacando la eficiente colonización de A20 y 7.1 en suelo rizosférico y en el rizoplano de las dos variedades de arroz evaluadas. Ambos aislamientos demostraron tener la capacidad de colonizar la endósfera de la raíz de las plantas de arroz bajo condiciones gnotobióticas. Los ensayos de promoción de crecimiento *in vivo* permitieron establecer que A20 y 7.1 poseen el potencial de promover el crecimiento de las plantas inoculadas en Hoagland y suelo en condiciones de invernadero. Teniendo en cuenta estos resultados, se propone a los aislamientos A20 y 7.1 como cepas promisorias para el desarrollo de un inoculante con características de biofertilizante (A20 y 7.1) y biocontrolador (A20). El aislamiento 5.1 que no presentó ninguna influencia sobre el crecimiento de las plantas de arroz tratadas, demostró en los ensayos *in vitro* un potencial interesante como biocontrolador, por ello se sugiere continuar su estudio en este campo.

**Palabras clave:** Bacterias promotoras de crecimiento vegetal, inoculantes bacterianos, *Streptomyces*, arroz.

## Abstract

The use of biofertilizers and biocontrol agents in high economic impact crops like rice, seeking to strengthen fertilization techniques and disease control in production processes of crops and have been accepted as alternatives to traditional chemical management. The present study evaluated the potential of bacterial strains A20, 5.1 and 7.1, as promoters of plant growth in two Colombian rice cultivars ( F60 and F733 ) with the aim of contributing to the development of a bacterial inoculant for the rice sector. The three isolates were classified within the genus *Streptomyces* by sequencing of the 16S rRNA gene. *In vitro* assays were conducted to evaluate the potential of the three microorganisms as plant growth promoters. These assays demonstrated the ability of these strains to produce siderophores, AIA, extracellular enzymes, solubilizing phosphate (7.1) and controlling the growth of a wide range of pathogenic microorganisms. Additionally, colonization ability of the three isolates was evaluated. The efficient colonization of A20 and 7.1 in rhizosphere soil and the rhizoplane of the two rice cultivars were verified. Both isolates were shown to have the ability to colonize the root endosphere under gnotobiotic conditions. *In vivo* assays confirm that A20 and 7.1 have the potential to promote the growth of inoculated plants in Hoagland and soil under greenhouse conditions. With these results, it is proposed that A20 and 7.1 isolates are promising strains for the development of a biofertilizer inoculant (A20 and 7.1) and biocontrol agents (A20). Isolation 5.1 that had no influence on the growth of rice plants treated demonstrated in *in vitro* tests an interesting potential of biocontrol therefore is suggested to continue their study in this field.

**Keywords:** Plant Growth Promoting Bacteria, Bacterial inoculates, *Streptomyces*, Rice

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>V</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Marco Teórico</b> .....	<b>3</b>
1.1 El cultivo de arroz en Colombia. ....	3
1.1.1 Consideraciones generales del arroz. ....	3
1.1.2 Fertilización en el cultivo de arroz. ....	5
1.1.3 Problemas fitosanitarios de interés actual: Añublo bacteriano de la panícula y pudrición bacteriana de la vaina. ....	5
1.1.4 Alternativas en el manejo integrado del cultivo de arroz. ....	7
1.2 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal. ....	7
1.2.1 Procesos de colonización bacteriana. ....	8
1.2.2 Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal. ....	11
1.2.3 Desarrollo de biofertilizantes y biocontroladores .....	20
1.3 <i>Streptomyces</i> spp. como agentes potenciales de inoculantes biológicos.....	21
1.3.1 Antecedentes de investigación sobre <i>Streptomyces</i> spp. en el instituto de biotecnología de la Universidad Nacional. ....	24
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
2.1 Objetivo general.....	25
2.2 Objetivos específicos. ....	25
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>26</b>
3.1 Material biológico.....	26
3.1.1 Cepas bacterianas. ....	26
3.1.2 Preparación de inóculos bacterianos.....	26
3.1.3 Semillas de arroz. ....	27
3.1.4 Suelo.....	28
3.2 Esquema metodológico general.....	28
3.3 Caracterización de los aislamientos.....	29
3.3.1 Caracterización molecular. ....	29
3.3.2 Caracterización bioquímica y fisiológica. ....	30

3.4	Identificación de características asociadas a efectos de promoción de crecimiento vegetal (Objetivo 1). .....	30
3.4.1	Fijación biológica de nitrógeno. ....	30
3.4.2	Solubilización de fosfatos. ....	31
3.4.3	Producción de Ácido-3 Indol Acético. ....	32
3.4.4	Producción de sideróforos. ....	32
3.4.5	Producción de ACC deaminasa .....	33
3.4.6	Producción de enzimas extracelulares. ....	33
3.4.7	Actividad antimicrobiana. ....	34
3.5	Ensayos de colonización en planta (Objetivo 2). ....	37
3.5.1	Ensayos en medio gnotobiótico. ....	38
3.5.2	Ensayos en suelo. ....	39
3.6	Ensayos de promoción de crecimiento en planta. ....	40
3.7	Análisis estadístico. ....	41
<b>4.</b>	<b>Resultados y discusión. ....</b>	<b>42</b>
4.1	Caracterización taxonómica de los aislamientos A20, 5.1 y 7.1. ....	42
4.2	Identificación de características asociadas a la promoción de crecimiento (objetivo 1). ....	46
4.2.1	Fijación biológica de nitrógeno .....	46
4.2.2	Solubilización de fosfatos. ....	48
4.2.3	Producción de Ácido 3 Indol acético (AIA). ....	51
4.2.4	Producción de sideróforos. ....	52
4.2.5	Producción de ACC deaminasa. ....	54
4.2.6	Producción de enzimas extracelulares. ....	55
4.2.7	Promoción indirecta de crecimiento vegetal. Screening del potencial biocontrolador de los <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1. ....	57
4.3	Capacidad de colonización de la rizósfera y la endosfera de plantas de arroz (Objetivo 2). ....	64
4.3.1	Ensayo de colonización en condiciones gnotobióticas. ....	64
4.3.2	Ensayo de colonización en suelo. ....	66
4.4	Promoción de crecimiento en plantas de arroz (Objetivo 3). ....	68
4.4.1	Promoción de crecimiento en medio gnotobiótico. ....	69
4.4.2	Promoción de crecimiento en suelo. ....	75
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones. ....</b>	<b>79</b>
5.1	Conclusiones .....	79
5.2	Recomendaciones .....	80
<b>A.</b>	<b>Anexo: Medios de cultivo y reactivos. ....</b>	<b>81</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Curvas de calibración de las técnicas de solubilización de fosfatos y producción de AIA. ....</b>	<b>87</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo: Perfil de sensibilidad de <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1 .....</b>	<b>88</b>
<b>D.</b>	<b>Anexo: Secuencias del 16s rRNA de los <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1 .....</b>	<b>89</b>
<b>E.</b>	<b>Anexo: Análisis de secuencias del gen 16S rRNA de los <i>Streptomcyes</i> A20, 5.1 y 7.1 en la plataforma SeqMatch del RDP. ....</b>	<b>91</b>
<b>F.</b>	<b>Anexo: Elaboración de un mutante marcado con EGFP de la cepa de <i>Streptomyces</i> A20. ....</b>	<b>93</b>
<b>G.</b>	<b>Anexo: Datos de parámetros biométricos evaluados en los ensayos de promoción de crecimiento vegetal. ....</b>	<b>95</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>98</b>

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: La rizósfera (Philippot, <i>et al.</i> , 2013) .....	9
Figura 1-2: Interacciones positivas Planta-microorganismo (Rajkumar, <i>et al.</i> , 2010).....	10
Figura 1-3: Ciclo del nitrógeno (Thamdrup, 2012). .....	11
Figura 1-4: Estructura general del complejo nitrogenasa (Rubio & Ludden, 2005.....	12
Figura 1-5: Solubilización de fosfatos en la rizósfera (Richardson, <i>et al.</i> , 2009) .....	13
Figura 1-6: Modelo de interacción planta - <i>Azospirillum</i> mediado por AIA (Lambrecht, <i>et al.</i> , 2000).....	15
Figura 1-7: Modelo de disminución de los niveles de etileno en las plantas mediado por ACC deaminasa (Glick, <i>et al.</i> , 1998).....	17
Figura 1-8: Mecanismos de competencia por nutrientes mediada por sideróforos (Hibbing, <i>et al.</i> , 2010) .....	18
Figura 1-9: Ciclo de vida general de <i>Streptomyces</i> spp (Flardh & Buttner, 2009) .....	23
Figura 3-1: Características de las semillas de arroz pre germinadas, seleccionadas para su uso en los ensayos <i>in vivo</i> .....	27
Figura 3-2: Esquema metodológico general del proyecto de investigación.....	28
Figura 3-3: Ensayo de reducción del acetileno .....	31
Figura 3-4: Esquema general de los ensayos de colonización en planta.....	37
Figura 3-5: Ensayos de colonización en plantas de arroz.....	39
Figura 4-1: Amplificación por PCR del gen 16S rRNA de los aislamientos A20, 5.1 y 7.1 .....	42
Figura 4-2: Árbol filogenético generado para los <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1.....	43
Figura 4-3: Determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno de los <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1 mediante el ensayo de reducción del acetileno.....	47
Figura 4-4: Determinación cualitativa de solubilización de fosfatos. ....	49
Figura 4-5: Determinación cuantitativa de solubilización de fosfato tricálcico.. ....	50
Figura 4-6: Cuantificación de la producción de AIA en TBS tras 5 días de incubación. .	52
Figura 4-7: Determinación cualitativa de producción de sideróforos en medio CAS. ....	53
Figura 4-8: Determinación cualitativa de producción de ACC deaminasa.....	55
Figura 4-9: Determinación cualitativa de producción de enzimas lignocelulosicas.....	56
Figura 4-10: Determinación cualitativa de producción de proteasas .....	56
Figura 4-11: Registro fotográfico de ensayos de actividad antibacteriana. ....	58

Figura 4-12: Ensayo de actividad antibacteriana mediante enfrentamiento directo en placa. ....	59
Figura 4-13: Ensayos de actividad antifúngica.....	61
Figura 4-16: Promoción de crecimiento vegetal en plantas de arroz variedad 60. ....	69
Figura 4-17: Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad F60 (Primera réplica) .....	69
Figura 4-18: Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad F60 (Segunda réplica) .....	71
Figura 4-19: Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad F733 (Primera réplica). ....	73
Figura 4-20: Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad F733 (Segunda réplica).....	74
Figura 4-22: Ensayo de promoción de crecimiento en suelo con plantas de arroz variedad F60. ....	76
Figura 4-23: Ensayo de promoción de crecimiento en suelo con plantas de arroz variedad F733. ....	77

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Zonas arroceras de Colombia.....	4
Tabla 1-2: Distribución de especies de <i>Streptomyces</i> asociados a plantas. ....	22
Tabla 3-1: Cepas bacterianas evaluadas en los estudios de actividad antibacteriana. ...	35
Tabla 3-2: Cepas fúngicas utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana.....	36
Tabla 4-1. Pruebas bioquímicas realizadas a <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1.....	44
Tabla 4-2: Características fenotípicas de crecimiento en medios diferenciales de los <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1.....	44
Tabla 4-3: Actividad antibacteriana de <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1. ....	57
Tabla 4-4: Actividad antibacteriana de <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1 frente a la colección de cepas FEDEARROZ 2011.....	60
Tabla 4-5: Actividad antagónica generada por los <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1 frente a 9 cepas fúngicas fitopatógenas mediante enfrentamiento directo en placa.. ....	61
Tabla 4-6: Colonización de las variedades colombianas de arroz Fedearroz 60 y Fedearroz 733 por las cepas de <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1 en Hoagland semisólido.. ....	65
Tabla 4-7: Colonización en suelo de las variedades colombianas de arroz Fedearroz 60 y Fedearroz 733 por las cepas de <i>Streptomyces</i> A20, 5.1 y 7.1 en suelo.. ....	67

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos

Símbolo	Término
ml	Mililitro
mg	Miligramos
°C	Grados centígrados
μl	Microlitro
μg	Microgramo
cm	Centímetro
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico
g	Gramo
Kb	Kilobase
Kda	Kilo Daltons
L	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanogramo
nm	nanómetros
p/v	Proporción peso a volumen
pb	Pares de base
v/v	Proporción volumen a volumen
UFC/ml	Unidades Formadoras de colonia por mililitro
UFC/g	Unidades Formadoras de colonia por gramo

## Abreviaturas

### Abreviatura Término

---

ACC	1-aminociclopropana-1-carboxylato
AIA	3-Ácido indolacético
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
CMC	Carboxi Metil Celulosa
dNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfato
D.O	Densidad óptica
D.S	Desviación Estándar
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
IBUN	Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
ppm	Partes por millón
rARN	ARN ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidad Formadora de Colonia



# Introducción

En el contexto mundial, Colombia está clasificado en el puesto número 23 en términos de producción de arroz, ocupando en América el cuarto lugar precedido por Brasil, Estados Unidos y Perú (Mendez del Villar, 2011). De acuerdo con las estadísticas del convenio DANE-FEDEARROZ al finalizar el primer semestre del 2013, la producción total de arroz (paddy verde) fue de 852.190 toneladas, siendo el tercer producto agrícola del país con mayor movimiento, con un total de 293.179 hectáreas cultivadas (DANE & FEDEARROZ, 2013).

Para mantener e incrementar la productividad de este y otros cultivos, es necesaria la implementación de procesos de fertilización y control de plagas y enfermedades. La aplicación de fertilizantes químicos u orgánicos, que suplen al suelo con los macro y micro nutrientes requeridos para el buen desarrollo de la planta y el uso de pesticidas para el control de patógenos son prácticas habituales en los sistemas agrícolas. Sin embargo, la tendencia al alza en los precios de los fertilizantes más comunes usados en agricultura (urea, cloruro de potasio y fosfato de amonio) y los problemas ambientales asociados a su uso excesivo, además de la aparición de patógenos que generan pérdidas importantes en la productividad para los cuales no se cuenta con un control químico efectivo, han promovido la aplicación en campo de productos alternativos dentro de los que se incluyen los bioinoculantes (Salazar & López, 2011).

Los bioinoculantes, son insumos compuestos por microorganismos que se caracterizan por tener la capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante procesos directos (biofertilizantes) o indirectos (biocontroladores). Su uso en la agricultura tiene como objetivo disminuir el uso de fertilizantes químicos, o incrementar la eficiencia de los mismos para mejorar el crecimiento de las plantas, bien sea por aplicación única del inóculo o en conjunto con la fertilización tradicional (Adesemoye & Kloepper, 2009).

Dentro del proceso de formulación de este tipo de insumos se deben verificar tres aspectos básicos que permitan tener un pleno conocimiento del comportamiento del inóculo tras ser aplicado en campo. En primer lugar deben realizarse pruebas que

establezcan que características intrínsecas del microorganismo permiten catalogarlo como un promotor de crecimiento vegetal o biocontrolador. Se debe verificar si el microorganismo de interés es capaz de colonizar eficientemente la planta o el ambiente en donde será aplicado y deben evaluarse los efectos de la inoculación del microorganismo *in vivo*.

En este contexto, la empresa BIOCULTIVOS S.A. en asociación con el grupo de Bioprocesos y Bioprospección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, se propusieron desarrollar un producto dirigido al mercado arrocerero, teniendo como punto de partida tres cepas bacterianas aisladas de suelos colombianos, las cuales están siendo evaluadas dentro de cuatro líneas de investigación. La primera línea se centra en la caracterización de las cepas como promotores de crecimiento vegetal para evaluar su uso como biocontrolador de enfermedades específicas de cultivos de arroz o como biofertilizante. La segunda busca determinar el comportamiento *in vivo* de estos microorganismos en el mismo cultivo. La tercera tiene como objetivo la identificación taxonómica de los aislamientos y la cuarta se enfoca en procesos de escalamiento y optimización de fermentación líquida y sólida para su posterior formulación.

El presente estudio se desarrolló dentro del marco de la primera y segunda líneas de investigación, para determinar los efectos de la inoculación de las tres cepas sobre plantas de arroz e identificar las características asociadas a procesos de promoción de crecimiento vegetal. Es así como en esta investigación, se llevaron a cabo diferentes aproximaciones para contribuir con el desarrollo del primer inoculante basado en bacterias del género *Streptomyces* en el país.

# 1. Marco Teórico.

## 1.1 El cultivo de arroz en Colombia.

### 1.1.1 Consideraciones generales del arroz.

El arroz es un gramínea autógena monocotiledónea perteneciente a la familia *Gramineaceae* (*Poaceae*). Dentro de las especies de plantas de arroz existentes, resaltan dos de importancia mundial: *Oryza glaberrima* (original de África occidental) y *Oryza sativa* (original de Asia) (Dalrymple, 1986), esta última posee cuatro subespecies: *sativa* (conocida también como subespecie Indica), *japónica*, *brevendica* y *brevis* (Bernis & Pamies, 2004, Amela, 2008).

Morfológicamente, los órganos del arroz se dividen en órganos vegetativos (raíz, tallo y hojas) y reproductivos (flores y semillas). La unidad base de la planta conocida como “*Shoot unit*” describe el característico crecimiento del tallo (redondo y hueco) que está compuesto por nudos y entrenudos consecutivos a partir de los cuales nacen las hojas (Moldenhauer & Gibbons, 2003). La altura de la planta se da en función del número y longitud de los nudos y entrenudos midiendo desde 40 cm (variedades enanas) hasta más de 7 metros (variedades flotantes). El sistema radical de la planta se caracteriza por presentar dos tipos de raíces: las raíces seminales (temporales) y las raíces adventicias (permanentes). Las hojas de esta planta tienen forma de lámina aplanada y se encuentran unidas al nudo por medio de la vaina foliar. La inflorescencia de la planta de arroz se da en panícula (CIAT, 2005).

Esta planta crece rápidamente en ambientes calientes y húmedos, característicos de las zonas tropicales. La temperatura mínima para la germinación es de 10 a 13 °C, con un óptimo entre 30 a 35 °C, mientras que su desarrollo (en términos de crecimiento de tallos, hojas y raíces) requiere una temperatura cercana a los 23 °C (Amela, 2008). La duración de cada ciclo del cultivo de arroz cambia dependiendo de la variedad que se esté cultivando, encontrando periodos de cultivo de 80 a 280 o más días. Las etapas de crecimiento de esta planta se dividen en tres fases: fase vegetativa (germinación hasta el inicio de la formación de la panícula), fase reproductiva (crecimiento de la panícula hasta el florecimiento) y fase de maduración o fase de llenado de grano. La duración de cada

una varía entre 25 a 90 días para la primera fase, 30 días para la segunda y 25 a 45 días para la tercera (Moldenhauer & Gibbons, 2003).

Colombia posee cinco zonas dedicadas al cultivo de arroz (Tabla 1-1), con un total de 20 departamentos arrocero. Existen dos sistemas de cultivo en el país: arroz mecanizado y arroz manual (FEDEARROZ, 2008). En el año se realizan dos siembras, el semestre A comprende las siembras realizadas entre Enero y Junio y el semestre B entre Julio y Diciembre.

**Tabla 1-1:** Zonas arroceras de Colombia.

<b>Zona Arrocera</b>	<b>Departamentos de la zona</b>
<b>Bajo Cauca</b>	Antioquia, Bolívar, Choco, Córdoba, Sucre.
<b>Zona Centro</b>	Caquetá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Tolima, Valle del Cauca.
<b>Costa Norte</b>	Atlántico, Cesar, Guajira, Magdalena. Municipio de Yondó (Antioquía).
<b>Zona Llanos</b>	Meta, Casanare, Arauca, Guaviare. Municipio de Paratebueno (Cundinamarca).
<b>Santanderes</b>	Norte de Santander y Santander.

El arroz constituye el tercer producto agrícola en extensión, después del café y el maíz, y representa el 12% del área cosechada y el 30% de los cultivos transitorios del país. Su producción constituye el 6% del valor de la producción agropecuaria y el 10% de la actividad agrícola colombiana, constituyéndose como un importante generador de empleo (Amela, 2008). El número de productores de arroz mecanizado en 2007, año de referencia para al III Censo Nacional Arrocero (último censo realizado a nivel nacional a la fecha), fue de 12.414 y el número de unidades productoras de arroz (UPA), fue de 17.352 (FEDEARROZ, 2008).

Al finalizar el primer semestre de 2013, el área sembrada de arroz mecanizado en el país fue de 293.179 hectáreas, con un área cosechada de 157.502 hectáreas y una producción total de 852.190 toneladas, destacándose el departamento del Tolima con un 39.0% del total de producción del arroz nacional (DANE & FEDEARROZ, 2013). De acuerdo con los datos obtenidos de la encuesta de calidad de vida desarrollada por el DANE en 2012, el consumo de arroz en el país es de 72.266.397 libras con un total de 12.285.210 hogares que lo usan como alimento básico, sirviendo de fuente nutricional para aproximadamente 46.168.649 de personas (DANE, 2012).

### **1.1.2 Fertilización en el cultivo de arroz.**

En el cultivo de arroz, el nitrógeno, el fósforo y el potasio son los nutrientes más importantes durante el desarrollo de la planta (IRRI, 2013). Por ello es muy común encontrar que los sistemas de fertilización de este cultivo están basados en la aplicación de urea y fosfato de amonio (DAP). Sin embargo, se ha demostrado que la eficiencia real de la aplicación de urea en cultivos de arroz (Paddy verde) se encuentra entre el 30 y el 40% (porcentaje de nitrógeno captado por la planta) (Choudhurya & Khanifb, 2001). Estos porcentajes de eficiencia son preocupantes en relación al costo-beneficio del uso de los fertilizantes químicos, por lo cual se debe establecer un mejor manejo en términos de fertilización en este cultivo con el fin de obtener los rendimientos esperados y disminuir los problemas inherentes a la fertilización química tradicional.

En Colombia, los fertilizantes representan entre un 12% y 14% de los costos de producción del cultivo y en los últimos años, dada la necesidad de incrementar la producción, las dosis de fertilización se han incrementado, generando un impacto considerable sobre los costos de producción debido a que la mayoría de estos productos son importados (Alvarez, *et al.*, 2008). Este efecto se ha pronunciado debido a la tendencia de incremento en los precios que ha tenido lugar desde finales del 2009 (urea y DAP) y mitad del 2010 (Cloruro de potasio, KCl), de manera tal que al término del año 2011 los precios nacionales de la urea, DAP y KCl se incrementaron en un 33%, 26% y 5% con respecto a años anteriores (Salazar & López, 2011).

### **1.1.3 Problemas fitosanitarios de interés actual: Añublo bacteriano de la panícula y pudrición bacteriana de la vaina.**

El cultivo del arroz, es afectado por un extenso número de microorganismos patógenos que causan distintas enfermedades, las cuales en determinadas condiciones ambientales constituyen uno de los factores limitantes de mayor importancia en la explotación de este cereal. La sintomatología ocasionada por la infección desarrollada en la planta por estos microorganismos (hongos, bacterias o virus) en los órganos invadidos (hojas, tallos, inflorescencias, semillas) genera reducciones, tanto en la calidad como en la cantidad de la cosecha. En este punto, la magnitud de las pérdidas económicas se encuentra determinada por los niveles de susceptibilidad de las variedades sembradas y por el tipo de manejo agronómico que ellas reciben.

En Colombia, los patógenos del arroz que revisten mayor importancia son entre otros, los hongos del género *Bipolaris*, *Sarocladium*, *Rhizoctonia* y *Gaeumannomyces*, el ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley y las bacterias *Burkholderia glumae*, *B. gladiolii*, *Acidovorax avenae* y *Pseudomonas fuscovaginae* (Caro, 2012).

El añublo bacteriano de la panícula, es una enfermedad transmitida por semillas, causada por la bacteria *B. glumae*, que ha sido descrita en diferentes zonas a nivel mundial como Asia (Japón, China, Taiwán, Korea, Filipinas, Indonesia, Tailandia, Vietnam, Malasia, Sri Lanka), Estados Unidos y América Latina (Panamá, Venezuela y Colombia) (Coenye & Vandamme, 2003, Nandakumar, *et al.*, 2007, Nandakumar, *et al.*, 2009, Pérez, 2010, Betancur, 2011). Los síntomas generados por este patógeno van desde la inhibición de la germinación de la semilla, añublo de la panícula, pudrición de vainas, esterilidad de flores y aborto del grano (Nandakumar, *et al.*, 2009, Betancur, 2011, Flórez & Uribe, 2011, Ham, *et al.*, 2011). Las pérdidas causadas en la productividad de los cultivos no han sido bien establecidas. Sin embargo, algunos autores reportan pérdidas entre el 15% y el 80% de la producción (Flórez & Uribe, 2011, Ham, *et al.*, 2011). Las zonas particularmente afectadas por este patógeno son los departamentos del caribe colombiano como Córdoba (La Doctrina, Montería), Bolívar (María la Baja), Tolima (Ambalema, Saldaña) y Huila (Campoalegre) (Diago, *et al.*, 2009).

En los últimos años *P. fuscovaginae* ha cobrado protagonismo por su incidencia como patógeno del arroz en Colombia. Esta bacteria, produce síntomas típicos en las plantas de arroz maduras tales como manchas de color marrón-negro, manchado del grano, mala emergencia de la espiga y esterilidad de las semillas en los casos más graves (Zeigler & Alvarez, 1987, Jaunet, *et al.*, 1996, Mattiuzzo, *et al.*, 2011). Es un microorganismo de distribución mundial siendo reportado por primera vez en Japón en el año de 1976 (Tanii, *et al.*, 1976). Ha sido aislado como agente causal de la enfermedad denominada pudrición bacteriana de la vaina en arroz y otros cereales como maíz, sorgo y trigo (Duveiller, *et al.*, 1989, Duveiller, 1990), en Latino América, Asia y África principalmente, siendo reportada por primera vez en Colombia por Zeigler y Álvarez en 1987. Al igual que en el caso de *B. glumae*, se ha propuesto que el medio de transmisión de este patógeno es asociado a semilla (Zeigler & Alvarez, 1990). Sin embargo. los síntomas generados por este patógeno suelen asemejarse a los ocasionados por *Sarocladium oryzae*, lo cual dificulta su diagnóstico y tratamiento en campo.

El manejo de *B. glumae* y *P. fuscovaginae* ha sido estudiado ampliamente. Sin embargo para el caso colombiano, no se cuenta actualmente con una solución definitiva para tratar con estos patógenos, aun cuando se han implementado diferentes estrategias de manejo que incluyen control químico, manejo de semillas certificadas (que incluye estudios de diagnóstico para detectar la presencia de los patógenos en la semilla), uso de variedades resistentes entre otros (Pérez, 2010, Betancur, 2011).

### **1.1.4 Alternativas en el manejo integrado del cultivo de arroz.**

Durante los últimos años, en todo el mundo se ha incrementado la búsqueda de soluciones a un amplio rango de problemas en el sector agrícola, que incluyen: seguridad alimentaria, sostenibilidad de los sistemas de producción, cambio climático, degradación de los suelos y contaminación ambiental, sin que se generen pérdidas en la productividad de los cultivos (Stoop, *et al.*, 2009). Los sistemas de manejo integrado propuestos para cultivos como el arroz en el país, han enfocado sus esfuerzos en dos puntos críticos particulares: la fertilización y el manejo de plagas y enfermedades.

La aplicación en campo de productos alternativos a los fertilizantes químicos como los inoculantes biológicos, son actualmente foco de interés del mercado agrícola y objeto de estudio en el ámbito académico del país. Los inoculantes biológicos, buscan generar un efecto igual o mejor al observado con la fertilización química mediante el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal. De manera tal, que empresas del sector privado como BIOCULTIVOS S.A., han lanzado al mercado nacional productos de esta naturaleza que presentan resultados exitosos en cultivos como el arroz (Torres, 2013).

Por otra parte, el control biológico, entendido como el proceso de control de un agente patógeno o la reducción de los síntomas que este genera en su planta huésped, mediante el uso de organismos vivos (particularmente bacterias y hongos) se ha propuesto como una alternativa viable para el control de patógenos como *B. glumae* y *P. fuscovaginae* (Roberts & Lohrke, 2003). Este tipo de estrategia pretende establecer un mecanismo eficiente para el manejo de patógenos en campo, aprovechando las ventajas que se derivan del uso de microorganismos como biocontroladores (Numeral 1.2.2) y de la amplia diversidad microbiana presente en los suelos de estos cultivos que no ha sido estudiada y que es potencialmente una fuente invaluable de microorganismos nativos con diversas aplicaciones agrícolas e industriales.

## **1.2 Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.**

El término “Rizobacteria” fue introducido por Kloepper y Schroth en el año 1978 para hacer referencia a aquellas comunidades bacterianas que se encontraban presentes en el suelo y que eran capaces de colonizar las raíces de las plantas (Kloepper & Schroth, 1978). Los mismos autores en 1981, ampliaron este concepto y dieron el nombre de

Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPRs por sus siglas en inglés) a todos aquellos microorganismos capaces de estimular el crecimiento de las plantas posterior a la colonización de sus raíces (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Actualmente, los microorganismos promotores de crecimiento vegetal no se restringen únicamente a las rizobacterias, además se incluyen hongos (especialmente micorrizas) y bacterias de vida libre.

Los mecanismos de acción de estos microorganismos se basan en la interacción con la planta “huésped”, que puede ocurrir en tres niveles: la filósfera, la endósfera y la rizósfera (Bhattacharyya & Jha, 2012). Estos mecanismos se clasifican como mecanismos de **promoción directa** del crecimiento, en donde se incluyen los procesos de incremento de la disponibilidad de nutrientes y la producción de compuestos reguladores de crecimiento vegetal (fitohormonas y compuestos para minimizar el estrés), y procesos de **promoción indirecta**, que engloban los mecanismos de protección de la planta contra patógenos (biocontrol y resistencia Sistémica inducida), la estimulación de formación de micorrizas y la remoción de sustancias fito-tóxicas del suelo (Lugtenberg & Kamilova, 2009, Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). Es pertinente aclarar que en la mayoría de los casos las PGPR no se restringen a un único mecanismo de acción, por lo que el efecto sobre una planta huésped puede no estar asociado a una única característica sino a una combinación de ellas (El-tarabily, *et al.*, 2010).

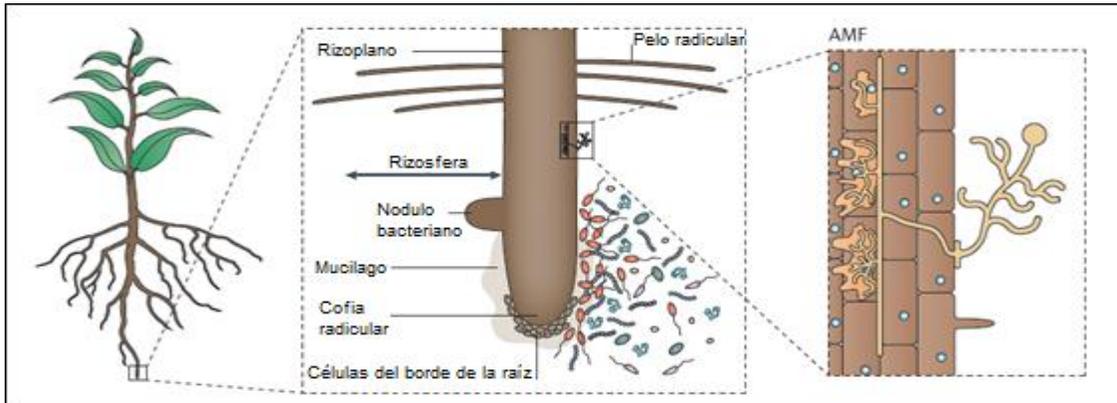
### 1.2.1 Procesos de colonización bacteriana.

Las interacciones planta-microorganismo son altamente complejas y dinámicas. Estas interacciones están mediadas por el proceso de colonización microbiana que como se mencionó anteriormente puede ocurrir en la filósfera, la endósfera o la rizósfera. La filósfera comprende las partes aéreas de las plantas, siendo las hojas los puntos principales de interacción. Se ha estimado que las poblaciones bacterianas por centímetro cuadrado (cm<sup>2</sup>) de superficie de la hoja están en el orden de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> UFC (Lindow & Brandl, 2003). La rizósfera es la zona de suelo que rodea y está influenciada por las raíces de plantas vivas y es considerada una de las interfaces más dinámicas en el planeta en donde interactúan bacterias (saprófitas y simbióticas), hongos (incluyendo micorrizas), oomicetos, virus y arqueas (Figura 1-1) (Philippot, *et al.*, 2013) . Por otra parte, la endosfera hace referencia al sistema interno de la planta que incluye los espacios intercelulares y los sistemas de transporte de la misma.

El proceso de colonización endofítica y rizosférica, inicia con la “migración” de las poblaciones bacterianas hacia las raíces de la planta por quimio taxis. El tropismo de los microorganismos por la raíz, es resultado de la liberación de diferentes compuestos orgánicos de las plantas hacia el suelo, denominados comúnmente como fotosintatos o

exudados, los cuales contienen concentraciones importantes de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, orgánicos, fenólicos, azúcares y vitaminas que sirven a los microorganismos como fuente de nutrientes (Uren, 2007, Prasha, *et al.*, 2013). El “Efecto rizosférico” describe la capacidad de los exudados, para actuar como quimio-atrayentes para poblaciones microbianas específicas (Hardoim, *et al.*, 2008). La carga microbiana en la rizósfera alcanza concentraciones del orden de  $10^{10}$  o  $10^{12}$  UFC/g de suelo, mientras que las concentraciones del suelo que no está siendo afectado por el sistema radicular de las plantas presenta concentraciones menores a  $10^8$  sirviendo como ejemplo del efecto rizosférico (Foster, 1988).

**Figura 1-1: La rizósfera (Philippot, *et al.*, 2013).** En la figura se muestra como los diferentes microorganismos son “atraídos” hacia la rizósfera y la superficie de las raíces (rizoplano) en donde se da el proceso de colonización, generalmente estos procesos se originan en los extremos de las raíces donde se lleva a cabo la elongación radicular y en los puntos de emergencia de los pelos radiculares.



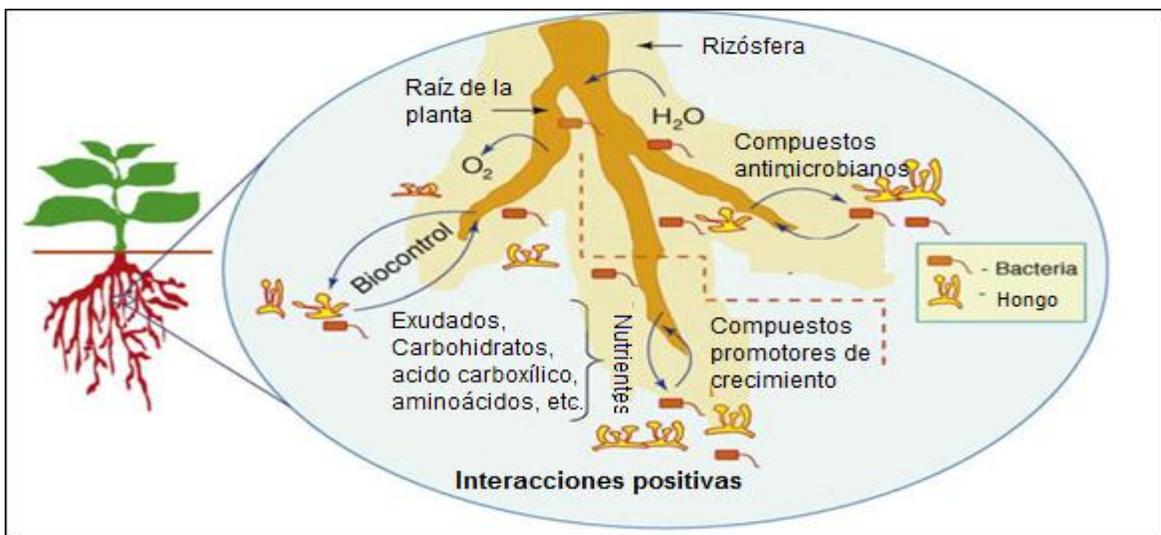
Una vez entran en contacto con la superficie de la raíz los microorganismos rizosféricos forman micro-colonias, y dependiendo del tipo de microorganismo van a permanecer en la superficie o iniciarán el proceso de colonización endofítica (Hardoim, *et al.*, 2008). Los microorganismos endófitos entran en los tejidos de la corteza de las raíces en los puntos de emergencia de las raíces laterales las puntas de las raíces. Estos microorganismos pueden establecerse en este punto o migrar a través de los sistemas internos de transporte hacia diferentes partes de la planta (Hardoim, *et al.*, 2008).

Este tipo de colonización, es un proceso complejo que involucra la respuesta inmune de la planta frente a los microorganismos y la habilidad de estos últimos para “invadir” y colonizar el interior del huésped sin causar ningún efecto deletéreo en él (Hardoim, *et al.*, 2008, Compant, *et al.*, 2010). En este punto es pertinente aclarar, que un microorganismo endófito es aquel que es capaz de vivir al menos una parte de su ciclo de vida dentro de

los tejidos de las plantas y que puede ser aislado o visualizado en estos tejidos una vez su superficie ha sido esterilizada por métodos dependientes de cultivo y por técnicas especiales de microscopía. (Hallmann, *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que la colonización en la filósfera presenta un esquema general similar al de la colonización rizosférica. Sin embargo, a diferencia de la rizósfera y la endosfera, en la filósfera, los microorganismos deben lidiar con condiciones menos favorables, no solo debido a la limitación de nutrientes, sino además a condiciones ambientales más agresivas como radiación ultravioleta, temperatura, precipitación y viento, entre otros, los cuales hacen que los microorganismos se organicen y multipliquen irregularmente en este ambiente (Vorholt, 2012). Los microorganismos presentes en cualquiera de las zonas descritas anteriormente pueden establecer interacciones benéficas (positivas), neutrales o negativas con sus plantas huésped. Las interacciones positivas son de gran interés en el ámbito de la bioprospección, ya que constituyen en sí mismas los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal (Figura 1-1) (Turner, *et al.*, 2013).

**Figura 1-2: Interacciones positivas Planta-microorganismo** (Rajkumar, *et al.*, 2010). El intercambio por los nutrientes liberados por las plantas en la rizósfera (zona café claro), los microorganismos pueden suplirla con compuestos promotores de crecimiento vegetal. Adicionalmente, en este espacio se dan también procesos de biocontrol de patógenos, mediados entre otros mecanismos por liberación de compuestos antimicrobianos.



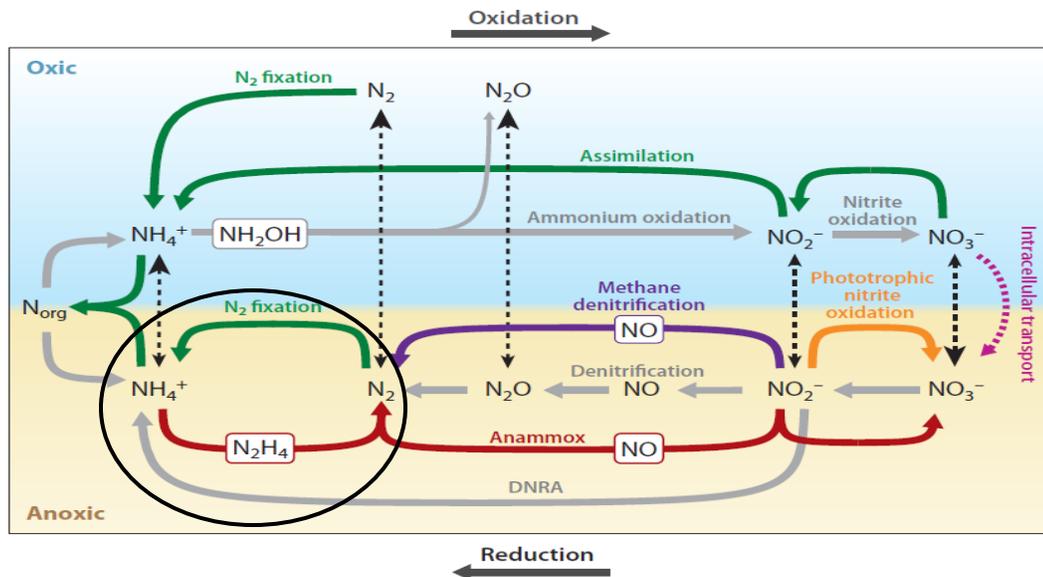
### 1.2.2 Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.

Como se mencionó anteriormente, las PGPR pueden promover el crecimiento vegetal por mecanismos directos o indirectos. Los promoción directa usualmente hace referencia a procesos en los cuales la bacteria facilita a las plantas el acceso a nutrientes poco disponibles o modula los niveles de hormonas que intervienen en el proceso de crecimiento (Glick, 2012). Dentro de estos mecanismos se encuentran entre otros la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas, ACC deaminasa y sideróforos.

- **Fijación biológica de nitrógeno.**

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso biológico mediante el cual se da la conversión del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amonio. Hasta la fecha, este proceso ha sido descrito en bacterias y arqueas, ningún organismo eucariota presenta esta capacidad (Rubio & Ludden, 2005). Este proceso permite suplir a la biosfera con nitrógeno y a la vez compensa las pérdidas del mismo generadas por efectos de denitrificación (Figura 1-3) (James, 2000, Rubio & Ludden, 2005).

**Figura 1-3: Ciclo del nitrógeno (Thamdrup, 2012).** Representación esquemática del ciclo del nitrógeno, las flechas punteadas muestran los procesos mediados por transformaciones metabólicas, note como la fijación de nitrógeno (circulo negro) es un proceso reductivo que se da en ambientes anóxicos.

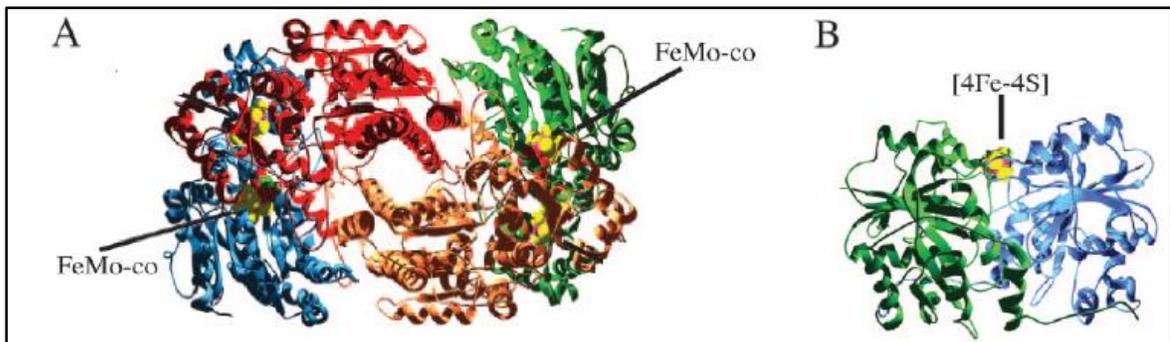


Los microorganismos fijadores de nitrógeno pueden encontrarse en la naturaleza como microorganismos simbióticos (*Rhizobium* spp.), asociativos (*Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp.) o de vida libre (*Klebsiella* spp. y *Rhodospirillum* spp.) (James, 2000). Estos microorganismos poseen un complejo enzimático conocido como “Nitrogenasa” que cataliza la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio. Este complejo se caracteriza por ser susceptible al oxígeno y tener alta dependencia de ATP.

El complejo de la nitrogenasa posee una estructura conservada de dos componentes proteicos, la dinitrogenasa o proteína hierro molibdeno (MoFe) y la dinitrogenasa reductasa o proteína hierro (*Fe Protein*) (Figura 1-4), codificados por los genes *nif* (Dixon & Kahn, 2004; Rubio & Ludden, 2005). Otros dos complejos de nitrogenasa que difieren genéticamente del primero pero que comparten similitudes en términos de función y composición de subunidades han sido descritos: la V-nitrogenasa y la Fe-nitrogenasa. En la naturaleza, los tres tipos de nitrogenasa están ampliamente distribuidos. Un microorganismo puede contener uno o los tres tipos de este complejo como en el caso de *Azotobacter vinelandii* (Rubio & Ludden, 2005). Adicionalmente, un cuarto complejo enzimático ha sido descrito en *Streptomyces thermoautotrophicus*, el cual cumple con la misma función de la nitrogenasa pero difiere estructuralmente de los complejos descritos anteriormente (Ribbe, *et al.*, 1997).

**Figura 1-4: Estructura general del complejo nitrogenasa (Rubio & Ludden, 2005).**

A. Tetrámero de la proteína Mo-Fe de *A. vinelandii*. Las subunidades  $\alpha$  se presentan en azul y verde y  $\beta$  en rojo y naranja. B. Proteína Hierro (*Fe protein*) de *A. vinelandii*.



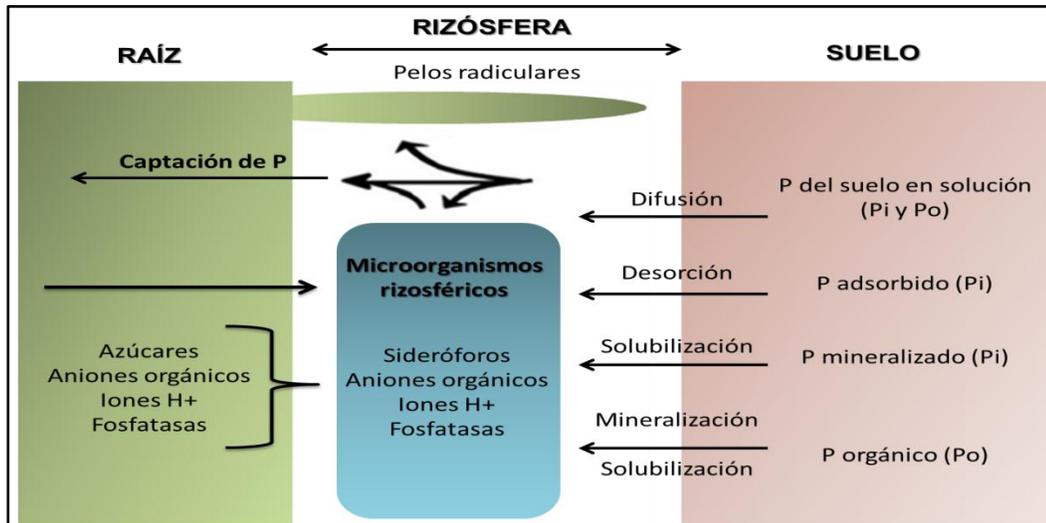
La fijación biológica de nitrógeno es la principal característica de muchos inóculos usados como biofertilizantes dentro de los cuales destacan *Azospirillum* spp. (James, 2000), *Azotobacter* spp, *Burkholderia* spp. (Caballero-Mellado, *et al.*, 2007), *Rhizobium* spp (Dixon & Kahn, 2004) entre otros. Estos inóculos son de particular utilidad en cultivos altamente demandantes de nitrógeno como el arroz.

▪ **Solubilización de fosfatos.**

El fósforo, considerado como el segundo nutriente limitante para el crecimiento de las plantas, tiene su mayor reservorio en el suelo. Sin embargo, la mayor parte de sales de fósforo son insolubles en agua (75-90% del total del fósforo presente en suelos) debido a que forman complejos con metales como el hierro, el aluminio y el calcio generando su precipitación y adsorción en los suelos (Iguar, *et al.*, 2001). Las plantas únicamente son capaces de captar el fósforo en sus formas de iones monobásico ( $H_2PO_4^-$ ) y di básico ( $HPO_4^{2-}$ ), por lo cual requieren que este elemento sea suministrado bien sea por medio de fertilización tradicional (química u orgánica) o por la contribución de microorganismos solubilizadores (Rodríguez & Fraga, 1999, Iguar, *et al.*, 2001).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato son capaces de realizar este proceso por dos vías. La primera de ellas se basa en la capacidad de estos microorganismos para secretar enzimas como fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas que solubilizan el fósforo a partir de fuentes orgánicas (mineralización de fosfato orgánico). La segunda, está dada por la liberación al medio de ácidos orgánicos (ácido glucurónico, por ejemplo) y cationes (generalmente hidrogeniones) que son capaces de solubilizar el fosfato de fuentes inorgánicas (Figura 1-5) (Rodríguez & Fraga, 1999, Hamdali, *et al.*, 2008, Richardson, *et al.*, 2009). La producción de sideróforos se ha asociado también a la solubilización de fosfatos particularmente cuando el fósforo está en asociación con algunos metales como el aluminio o el hierro.

**Figura 1-5: Solubilización de fosfatos en la rizósfera (Richardson, *et al.*, 2009).** Esquema general de los procesos asociados a la captación de fósforo por parte de la planta en interacción con microorganismos.



Se debe recordar que estos mecanismos de solubilización son llevados a cabo tanto por microorganismos como por plantas. La actividad fosfatasa ha sido detectada en cantidades significativamente altas en la rizósfera, por lo cual es considerado como un mecanismo de respuesta rápido de plantas y microorganismos para mineralizar fósforo orgánico en condiciones limitantes de este elemento (Richardson, *et al.*, 2009).

Los microorganismos solubilizadores, incluyen un amplio rango de géneros simbióticos y no simbióticos como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* spp., varios géneros de actinomicetos (*Streptomyces* y *Micromonospora* por ejemplo) y hongos como *Aspergillus* y *Penicillium* spp (Rodríguez & Fraga, 1999). La capacidad de estos microorganismos de solubilizar una fuente específica de fosfato, está dada por condiciones genéticas (particulares de cada microorganismo) y ambientales. La contribución de estos microorganismo en la disponibilidad de fósforo y su posterior captación por la planta conlleva a un mejor estado nutricional de la misma y ha sido ampliamente demostrado en ensayos *in vivo* (Rodríguez & Fraga, 1999, Richardson, *et al.*, 2009).

#### ▪ **Producción de fitohormonas.**

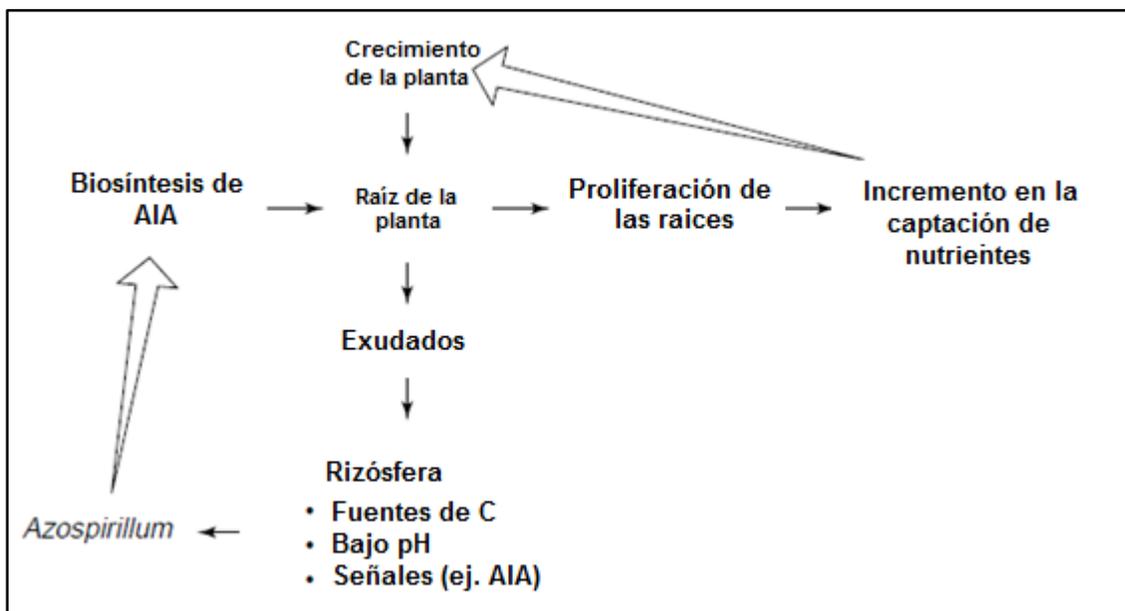
Los microorganismos fitoestimulantes poseen la habilidad de alterar la estructura y morfología de las raíces y promover el desarrollo y crecimiento de las plantas gracias a la producción de fitohormonas (Kloepper, *et al.*, 2007). Las fitohormonas son compuestos de diferente naturaleza química, producidas por plantas y microorganismos (particularmente bacterias) que al actuar como moléculas señal son capaces de regular los eventos fisiológicos de las plantas en concentraciones extremadamente bajas (Javid, *et al.*, 2011). Dentro de este tipo de compuestos, las auxinas, giberelinas, citoquininas, jasmonatos y el etileno han sido ampliamente estudiados en relación al desarrollo de las plantas (Glick, 2012). Las citoquininas, están involucradas en procesos de diferenciación celular (Glick, 2012). Las auxinas y el ácido giberélico (representante de las giberelinas) han sido descritos como inductores de la elongación de las células de la raíz y de procesos de diferenciación en células vegetales. Ambos tipos de compuestos están involucrados en el incremento de la longitud y número de raíces y pelos radiculares (Glick, 2012).

Las auxinas son compuestos derivados del triptófano, que regulan un amplio repertorio de procesos asociados al desarrollo de las plantas (Spaepen & Vanderleyden, 2010), sin embargo el rol que cumplen en los microorganismos ha sido menos investigado. Se ha propuesto que esta clase de moléculas, particularmente el Ácido 3-Indol Acético (AIA), funciona como una molécula señal en algunos microorganismos teniendo en cuenta que estas moléculas generan cambios en la expresión genética bacteriana (Spaepen, *et al.*, 2007).

Actualmente se reconoce que muchos microorganismos (incluyendo algunos patógenos) son capaces de producir AIA. La biosíntesis de este compuesto puede ser dependiente o independiente de triptófano y se ha propuesto como una vía inducible a través de una retroalimentación positiva entre la planta y el microorganismo (Lambrecht, *et al.*, 2000).

*Azospirillum brasilense* es considerado un microorganismo modelo para la producción de AIA. Se ha descrito que la expresión del gen *ipdC*, el cual codifica para la enzima Indol 3-piruvato decarboxilasa, es activada en respuesta a la presencia de AIA en el medio (Lambrecht, *et al.*, 1999). Lambrecht y colaboradores, propusieron en base a sus observaciones que la concentración de AIA en los exudados de algunas plantas podría ser suficiente para activar la transcripción de este gen e incrementar la producción de AIA en los microorganismos, de forma tal que se genere un efecto positivo sobre el crecimiento de las raíces, siempre que se encuentren en el medio suficientes precursores para su producción (triptófano) (Figura 1-6) (Lambrecht, *et al.*, 2000). Sin embargo, los mismos autores describen que el efecto del AIA es dependiente de la concentración por lo cual proponen que tras cierto umbral, la concentración de AIA puede inhibir el crecimiento de las raíces, siendo este un proceso altamente regulado. Por este motivo, el uso de microorganismos con este tipo de características para la inoculación en plantas debe ser rigurosamente estudiado para evitar obtener efectos indeseados sobre el desarrollo radicular de las plantas (Lambrecht, *et al.*, 2000).

**Figura 1-6: Modelo de interacción planta - *Azospirillum* mediado por AIA (Lambrecht, *et al.*, 2000).**



- **Moduladores de estrés: ACC deaminasa.**

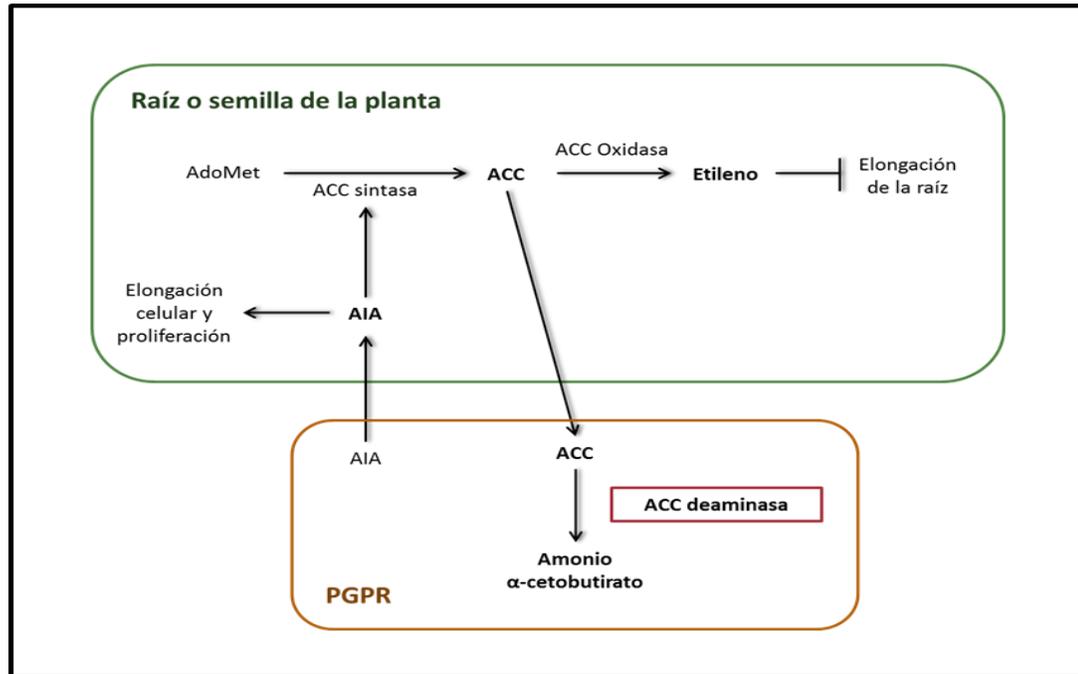
El etileno es un compuesto necesario para el desarrollo normal de las plantas particularmente durante las etapas de germinación y maduración de frutos. Este compuesto genera efectos deletéreos al estar presente en elevadas concentraciones, principalmente cuando la planta se encuentra bajo diferentes tipos de estrés generados por condiciones medioambientales como salinidad, sequía, contaminantes y presencia de patógenos (Choudhary, 2012).

La enzima 1-Amino Ciclopropano–Carboxilato deaminasa (ACC deaminasa) es una enzima de origen microbiano, que actúa disminuyendo los niveles de etileno al catalizar la conversión del ácido 1-amino ciclopropano–carboxílico (ACC), precursor del etileno, en amonio y  $\alpha$ -cetobutirato, con lo cual se disminuyen las concentraciones de etileno en la planta brindándole resistencia frente a diferentes tipos de estrés. La producción de esta enzima está ampliamente distribuida entre las bacterias, siendo los géneros *Achromobacter spp*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas spp*, *Streptomyces spp*, *Burkholderia spp* y *Rhizobium spp* los más estudiados (Honma & Shimomura, 1978, Glick, *et al.*, 1998, Glick, *et al.*, 2007, Lugtenberg & Kamilova, 2009, Bhattacharyya & Jha, 2012).

En el modelo propuesto por Glick y colaboradores en 1998, se describe claramente el papel de las bacterias productoras de la enzima ACC deaminasa sobre la modulación de los niveles de etileno en las plantas, en donde se incluye además el papel del AIA dentro del proceso (Figura 1-7) (Glick, *et al.*, 1998). En este modelo se explica que las bacterias productoras de ACC deaminasa presentarían una ventaja adaptativa frente a los demás microorganismos rizosféricos debido a que tendrían a disposición el ACC como una fuente de nitrógeno adicional.

El ACC ha sido encontrado en los exudados de las raíces de algunas plantas, lo cual explicaría el mecanismo por el cual los microorganismos rizosféricos pueden obtener este compuesto para ser metabolizado. Los microorganismos endófitos por otra parte, al vivir dentro de la planta tendrían una ruta más asequible de obtención de este compuesto y por ende su función en disminuir los niveles de etileno en la planta teóricamente sería más eficiente en comparación a los microorganismos rizosféricos (Glick, *et al.*, 2007).

**Figura 1-7: Modelo de disminución de los niveles de etileno en las plantas mediado por ACC deaminasa (Glick, *et al.*, 1998).** En la figura se muestra como la enzima ACC deaminasa producida por bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) convierte al precursor del etileno, el ACC en amonio y  $\alpha$ -cetobutirato. Observe que el AIA interviene en el proceso al inducir la producción de ACC sintasa, por lo cual se propone que esta fitohormona podría incrementar la producción de etileno en la planta.



- **Producción de sideróforos.**

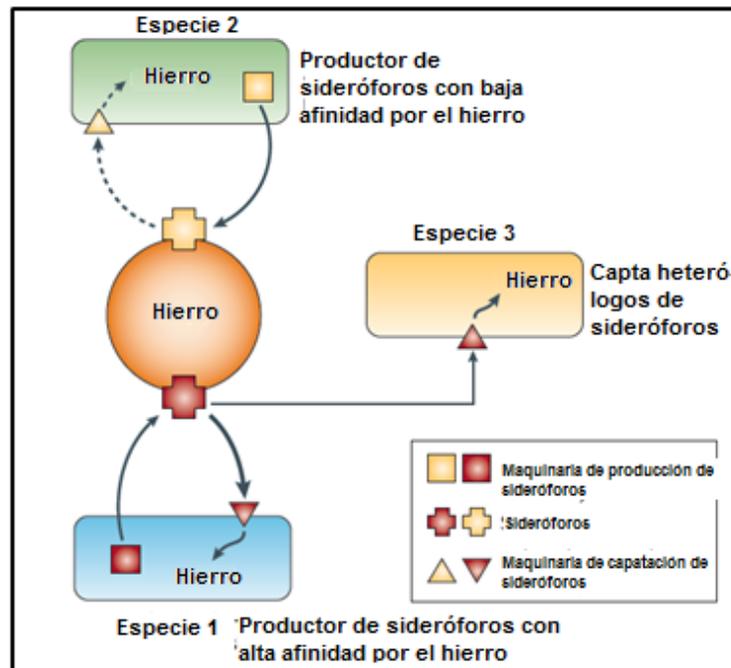
El hierro (Fe) es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre sin embargo, su disponibilidad real para los organismos vivos es relativamente baja (Loper & Buyer, 1991). Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (400-1000Kda) producidos por bacterias, hongos y algunas plantas monocotiledóneas, bajo condiciones limitantes de hierro. Estos compuestos se caracterizan por tener una alta afinidad por los iones férricos, por lo que constituyen el mecanismo más común de adquisición de este elemento (Andrews, *et al.*, 2003, Katiyar & Goel, 2004, Saha, *et al.*, 2013).

Se han descrito aproximadamente 500 tipos de sideróforos diferentes, los cuales son clasificados en tres categorías de acuerdo a los grupos funcionales que usan como ligandos para los iones de hierro, encontrando los catecolatos como las enterobactinas y vibriobactinas (producidas por *Streptomyces* spp y *Vibrio cholera* respectivamente), los hidroxamatos como la estafiloferrina (*Sthaphylococcus* spp.) y los sideróforos de tipo mixto como la micobactina (*Mycobacterium tuberculosis*) (Saha, *et al.*, 2013).

Los sideróforos quelan el hierro presente en el ambiente (suelo) de manera tal que forman un complejo caracterizado por ser termodinámicamente estable (Neilands, 1995). Una vez el complejo Hierro-sideróforo se ha formado, existen dos mecanismos por los cuales el hierro puede ingresar a las células. En primer lugar, el complejo puede disolverse y el hierro entraría a la célula como un ion ( $\text{Fe}^{+3}$ ) (característico en hongos y algas), o puede darse un proceso de internalización del complejo completo mediado por transportadores tipo ABC o permeasas (Saha, *et al.*, 2013).

En términos de promoción del crecimiento en plantas, los sideróforos producidos por bacterias en ambientes con limitaciones de hierro, pueden actuar de dos formas: (i) secuestrando el hierro para dejarlo no disponible para comunidades microbianas patógenas (considerado como un mecanismo de biocontrol) (Figura 1-8) o (ii) aportando los complejos Fe-sideróforo a las plantas que son capaces de adquirirlo (Kloepper, *et al.*, 1980, Loper & Buyer, 1991, Katiyar & Goel, 2004). Sin embargo, este último mecanismo se encuentra aún en estudio. Sin importar de qué mecanismo se trate, la producción de sideróforos es una característica de algunos microorganismos promotores de crecimiento vegetal y por ello su estudio es relevante en investigaciones de esta naturaleza.

**Figura 1-8: Mecanismos de competencia por nutrientes mediada por sideróforos (Hibbing, *et al.*, 2010).** En la figura se muestra como las especies 1 y 2 producen sideróforos con diferentes afinidades por el hierro, aquí la especie uno tendría más oportunidad de capturar el elemento que la especie 2. La especie 3 no produce sideróforos, sin embargo posee transportadores de membrana que reconocen el sideróforo producido por la especie 1, capturando así el complejo para sí misma.



En contraste a los mecanismos directos de promoción mencionados hasta este punto, los **mecanismos indirectos** de promoción de crecimiento hacen referencia a la disminución en el efecto negativo generado en el crecimiento de las plantas por agentes patógenos, actuando como **biocontroladores** o como inductores de resistencia sistémica (Kloepper, *et al.*, 2004, Lugtenberg & Kamilova, 2009, Bhattacharyya & Jha, 2012, Glick, 2012, Turner, *et al.*, 2013)

El **control biológico** ha sido descrito como “la reducción del inóculo o la actividad causante de enfermedad de agentes patógenos sobre las plantas a través del uso de organismos diferentes al hombre” (Baker, 1987). A la fecha el biocontrol mediado por microorganismos, particularmente bacterias, ha sido ampliamente estudiado y su aplicación en plantas demuestra tener efectos positivos importantes. A pesar de la gran diversidad de estudios de bioprospección adelantados para aislar e identificar microorganismos biocontroladores, muchos de los agentes evaluados presentan resultados variables en ensayos de inoculación en campo. Por lo cual su estudio debe ser riguroso (Roberts & Lohrke, 2003).

Dentro de los proceso de control biológico intervienen el patógeno, el organismo controlador, la planta, la microbiota nativa, el medio de crecimiento de la planta (suelo, arena, vermiculita) y las condiciones ambientales del lugar de inoculación. Los mecanismos responsables por la actividad biocontroladora incluyen la competencia por nutrientes, exclusión de nichos (competencia por espacio), interferencia de señales tipo Quorum sensing (*Quorum quenching*), parasitismo, predación y producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Bloemberg & Lugtenberg, 2001, Hibbing, *et al.*, 2010).

Los metabolitos biológicamente activos producidos por los agentes biocontroladores pueden suprimir la actividad del patógeno o destruir los propágulos de este, evitando su dispersión (Roberts & Lohrke, 2003). La mayoría de estos metabolitos son antibióticos, que pueden actuar inhibiendo la síntesis de pared celular, alterar las estructuras de la membrana celular, inhibir la síntesis de proteínas o alterar el material genético del microorganismo susceptible (Maksimov, *et al.*, 2011). En este grupo de microorganismos es destacable la actividad que presentan la bacterias del género *Streptomyces*. Adicionalmente, El efecto protector de los agentes biocontroladores se atribuye también a la producción de enzimas extracelulares (quitinasas por ejemplo) que son capaces de degradar las paredes celulares de los patógenos o sus toxinas (Maksimov, *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta que el hierro, se encuentra presente en el suelo en forma de iones férricos, y que estos no son directamente asimilables por los microorganismos, la producción de sideróforos se ha propuesto como un método de biocontrol eficiente, común en géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Frankia*, y *Streptomyces* (Hayat, *et al.*, 2010).

La habilidad de estos microorganismos para controlar agentes patógenos ha sido fuente de gran interés debido a la posibilidad de emplear estas bacterias comercialmente para sustituir pesticidas químicos (Glick, 2012) . Por ello, el conocimiento acerca de cuál es el mecanismo de acción que un biocontrolador está usando frente a un patógeno debería facilitar el proceso de formulación, escalamiento y diseño de aplicación de un bioinoculante para obtener una mayor eficiencia del mismo en campo.

### **1.2.3 Desarrollo de biofertilizantes y biocontroladores**

Los biofertilizantes se definen como “sustancias que contienen microorganismos vivos, los cuales cuando son aplicados a semillas, superficies de las plantas o el suelo, son capaces de colonizar la rizósfera o el interior de la planta y promover el crecimiento de la misma por medio del suministro de nutrientes o el incremento de su disponibilidad en el suelo para que puedan ser consumidos por la planta” (Vessey, 2003). A pesar de que esta definición no incluye los demás mecanismos de promoción (directa) que se han descrito anteriormente, si pone de manifiesto las tres características clásicas que debe cumplir todo biofertilizante: (i) El principio activo del producto son microorganismos vivos, (ii) estos microorganismos deben poseer la capacidad de colonizar la rizósfera o la endosfera de las plantas en donde son aplicadas, o al menos deben ser capaces de sobrevivir de manera libre en el suelo y (iii) deben generar un efecto positivo significativo sobre el crecimiento de las plantas hospederas (Bloemberg & Lugtenberg, 2001, Herrmann & Lesueur, 2013).

Estas características son también aplicables a los biocontroladores, también conocidos como biopesticidas, que en esencia son iguales a los biofertilizantes en cuanto a sus características de formulación (principio activo) y colonización pero que difieren en términos de sus mecanismos de acción, ya que su objetivo es proteger a la planta (s) de un patógeno específico contra el cual tiene actividad controladora (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

Existen varios puntos clave en el desarrollo y evaluación de un microorganismo para que pueda ser usado en procesos de generación de nuevos bioinoculantes. La selección

adecuada del microorganismo a inocular, las ventajas adaptativas que le permitan persistir en el ambiente en donde van a ser aplicados (bien sean relacionadas a su forma de crecimiento, o con la diversidad metabólica inherente del microorganismo), su tolerancia a estrés, eficiencia en campo y estabilidad como producto biológico son los criterios básicos que se deben tener en cuenta durante el proceso de desarrollo de un bioinoculante (Herrmann & Lesueur, 2013, Miransari, 2013).

A pesar de su potencial en el campo de la agricultura, algunos microorganismos no han podido introducirse al mercado debido a la discrepancia existente entre los resultados de ensayos a nivel laboratorio y los que son observados en campo (Herrmann & Lesueur, 2013). Estos problemas se han asociado particularmente a dificultades en la formulación del producto, que conllevan a una disminución en la actividad del microorganismo previamente evaluada a nivel de laboratorio (*in vitro*). Por ello, se hace énfasis en la importancia de seleccionar un microorganismo eficiente que demuestre la característica deseada al ser evaluado a nivel laboratorio, invernadero y campo, y que además presente alguna ventaja adaptativa que le permita sobrevivir en el ambiente tras su inoculación. De aquí que es común encontrar productos cuyas formulaciones poseen estructuras de resistencia como esporas (como el caso de *Bacillus subtilis*), o son capaces de presentar una mejor colonización dada su forma de crecimiento (ventaja particular en el caso de los hongos como *Trichoderma spp* o bacterias filamentosas como *Streptomyces spp*) (Maksimov, *et al.*, 2011), de manera tal que el estudio de aquellos microorganismos que presentan este tipo de ventajas han captado la atención del mundo científico e industrial en las últimas décadas.

### **1.3 *Streptomyces* spp. como agentes potenciales de inoculantes biológicos.**

El phylum Actinobacteria (uno de los más grandes dentro del dominio bacteria) está conformado por 5 subclases, 14 subórdenes, 39 familias y 130 géneros. Estas bacterias se caracterizan por ser Gram positivas y poseer un alto contenido de G+C en su ADN como es el caso de *Corynebacterium* spp. (51%) y *Streptomyces* spp. (70%) (Kieser, *et al.*, 2000). Exhiben una amplia variedad morfológica, incluyendo bacterias filamentosas capaces de generar micelios ramificados altamente diferenciados pertenecientes al género *Streptomyces* spp. (Ventura, *et al.*, 2007).

Las actinobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos, llegando a componer del 10 al 50% de la microflora del suelo en diversos ambientes (Hamdali, *et al.*, 2008, El-tarabily, *et al.*, 2010). Géneros como

*Micromonospora spp*, *Streptomyces spp*, *Streptosporangium spp* y *Thermobifidans spp*, son reconocidos como buenos colonizadores de la rizósfera en numerosas plantas huésped y algunos han sido aislados como endófitos en diferentes plantas (Franco - Correa, *et al.*, 2010).

Las especies del género *Streptomyces* son probablemente las más estudiadas de este phylum. Son predominantemente saprofitos del suelo, aunque los reportes de endofitismo en estos microorganismos se han incrementado en años recientes (Tabla 1-2) (Coombs & Franco, 2003, Franco, *et al.*, 2007). Algunas especies de *Streptomyces* han sido descritas como patógenos de plantas y como microorganismos simbióticos en una amplia variedad de organismos que incluyen insectos, plantas y esponjas (Kinkel, *et al.*, 2012).

**Tabla 1-2: Distribución de especies de *Streptomyces* asociados a plantas.**

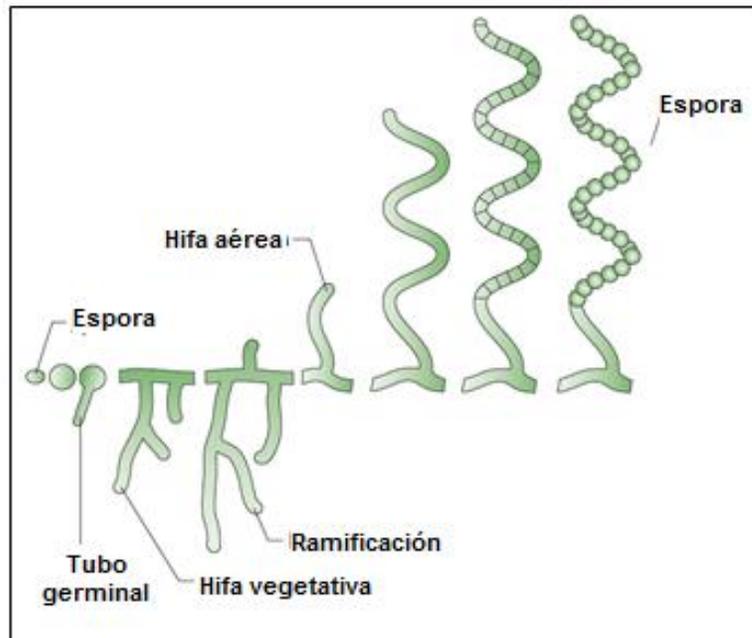
Aislamiento	Planta	Lugar de aislamiento	Referencia
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	Guisantes	Rizósfera/Rizoplano	(Tokala, <i>et al.</i> , 2002)
	Semillas de lino	Suelo rizosférico	(Crawford, <i>et al.</i> , 1993)
<i>Streptomyces spp.</i>	<i>Aquilaria crassna</i>	Endófito raíces	(Nimnoi, <i>et al.</i> , 2010)
<i>Streptomyces sp g10</i>	<i>Rhizophora apiculata</i>	Sin descripción	(Getha, <i>et al.</i> , 2005)
<i>Streptomyces globisporus</i>	Centeno	Endófito	(Merzaeva & Shirokikh, 2006)
<i>Streptomyces sp.</i>	Trigo	Endófito/Raíz	(Coombs & Franco, 2003)
<i>Streptomyces sp.</i>	Papa	Endófito	(Sessitsch, <i>et al.</i> , 2002)
<i>Streptomyces sp.</i>	Tomate	Endófito	(Cao, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Streptomyces sp.</i>	Arroz	Endófito	(Tian, <i>et al.</i> , 2007)

Dado que las bacterias del género *Streptomyces* poseen un complejo metabolismo secundario que les permite producir diversos metabolitos como enzimas extracelulares (celulasas, hidrolasas y quitinasas), antibióticos y otros compuestos bioactivos (Chater, *et*

*al.*, 2010, Qin, *et al.*, 2011), el interés sobre este grupo de microorganismos ha aumentado significativamente, al punto de convertir a las especies de este género en los organismos productores de antibióticos principales dentro de la industria farmacéutica (Ventura, *et al.*, 2007, Hamdali, *et al.*, 2008). Gracias a esta característica y a su habilidad de solubilizar fosfatos, producir compuestos como fitohormonas, sideróforos y enzimas extracelulares de diferentes aplicaciones, se asume que este grupo bacteriano posee un gran potencial como promotores de crecimiento vegetal.

Una de las ventajas del uso de estas especies como agentes activos de biofertilizantes y biocontroladores es la formación de hifas ramificadas y la producción de esporas como formas de diseminación características de su crecimiento (Figura 1-9) (Flardh & Buttner, 2009). Las esporas, proporcionan ventajas en términos de colonización de la rizósfera de las plantas, e incrementan la persistencia de *Streptomyces* en el suelo, permitiendo que la expresión de características asociadas a la promoción de crecimiento vegetal sea eficiente, disminuyendo las pérdidas de inóculo por baja competitividad en la colonización de la planta o escasa dispersión.

**Figura 1-9: Ciclo de vida general de *Streptomyces* spp (Flardh & Buttner, 2009).** Esquema general del ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*. El crecimiento de este género bacteriano es en forma de hifas ramificadas provenientes de una espora, que se diferencian en hifas vegetativas encargadas de obtener nutrientes del ambiente y posteriormente hifas aéreas que se dividen para formar las cadenas de esporas que iniciaran un nuevo ciclo.



### **1.3.1 Antecedentes de investigación sobre *Streptomyces* spp. en el instituto de biotecnología de la Universidad Nacional.**

Como parte del proceso de búsqueda de organismos biocontroladores en los años 2010 y 2011, la línea de BIOINSUMOS del grupo de Bioprocesos y Bioprospección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia con apoyo de la división de Investigación y Desarrollo de la empresa Biocultivos S.A. realizó un muestreo sobre suelos colombianos del sur del Tolima cultivados con arroz, mango y estevia, con el objetivo de aislar bacterias del orden Actinomycetales, con posible actividad antagónica contra las cepas patógenas del arroz *B. glumae* y *P. fuscovaginae*.

Como resultado de este trabajo se obtuvieron en total 60 aislamientos, identificados como actinomicetos en base a criterios morfológicos y bioquímicos. Tres de ellos exhibieron actividad antagónica contra estos patógenos. Estas cepas se codificaron como A20, 5.1 y 7.1, y fueron propuestas como candidatos para el desarrollo de bioinoculantes, teniendo como principal objetivo su uso sobre cultivos de arroz.

Actualmente, estos aislamientos están siendo evaluados dentro de cuatro líneas de investigación. La primera se centra en la caracterización de las cepas como promotores de crecimiento vegetal para evaluar su uso como biocontrolador de enfermedades específicas de cultivos de arroz o como biofertilizante, la segunda busca determinar el comportamiento *In vivo* de estos microorganismos en el mismo cultivo, la tercera tiene como objetivo la identificación taxonómica de los aislamientos y la cuarta se enfoca en procesos de formulación, escalamiento y optimización de fermentación líquida y sólida.

EL presente proyecto se desarrolla en las primeras líneas de investigación y tiene como objetivo contribuir al desarrollo del primer inoculante biológico basado en *Streptomyces* destinado al cultivo de arroz, que contribuya con el manejo de los patógenos *B. glumae* y *P. fuscovaginae*, y con la productividad general de arroz en campo en el país.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad de las cepas de actinomicetos A20, 5.1 y 7.1 para promover el crecimiento de variedades colombianas de plantas de arroz (*Oryza sativa*).

### **2.2 Objetivos específicos.**

- Identificar características de los tres aislamientos que estén involucradas con la promoción de crecimiento vegetal.
- Evaluar la capacidad de colonización de la rizósfera y la endósfera de plantas de arroz por las cepas de actinomicetos A20, 5.1 Y 7.1
- Determinar los efectos de la inoculación de las cepas de actinomicetos A20, 5.1 y 7.1 sobre el crecimiento de plantas de arroz.

## **3. Materiales y métodos.**

### **3.1 Material biológico.**

#### **3.1.1 Cepas bacterianas.**

Las cepas en estudio A20, 5.1 y 7.1, fueron aisladas por el grupo de investigación de Bioprocesos y bioprospección del IBUN, en colaboración con la empresa BIOCULTIVOS S.A durante el año 2011 en un muestreo sobre suelos cultivados con arroz, mango y estevia del sur del Tolima. La preservación de las cepas fue realizada de acuerdo a lo establecido por Kieser y colaboradores (2000). Para ello colonias aisladas de cada aislamiento fueron sembradas de forma masiva en agar ISP3 (Anexo A), las placas de agar se incubaron a 30°C por 6 días. Tras la incubación, las cajas esporuladas fueron raspadas con un asa bacteriológica añadiendo previamente 5ml de glicerol 20% (v/v) estéril, la suspensión resultante fue filtrada en jeringas con algodón hidrofóbico con el fin de retener los restos de hifas que permanecían en la suspensión. 1ml del filtrado de esporas fue dispensado en viales estériles y conservado a -20°C hasta su uso (Kieser, *et al.*, 2000). Una muestra aleatoria de cada uno de los viales de los tres aislamientos se tomó en el momento de preparación del banco de trabajo y una vez cada 3 meses, para verificar viabilidad, pureza y recuento de las cepas. El recuento de los viales de esporas se encontraba en todos los ensayos realizados en el orden de 10<sup>8</sup> UFC/ml.

#### **3.1.2 Preparación de inóculos bacterianos**

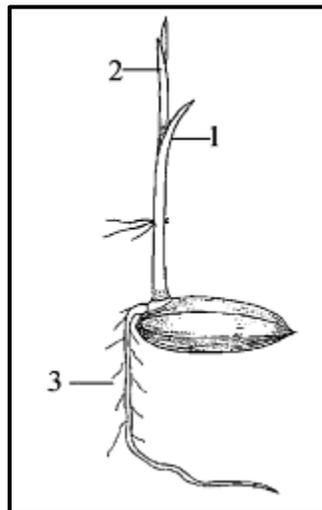
Para la preparación de los inóculos de los tres aislamientos, se utilizó el medio de producción M3.7 (Anexo A), desarrollado por el grupo de investigación de Bioprocesos y Bioprospección, conservando una proporción de 1/3 de medio con respecto al volumen total del recipiente, dada la alta necesidad de oxígeno necesaria para el crecimiento característico de estos microorganismos. Una vez inoculados, cada cultivo tuvo un tiempo de incubación de 5 días a 30°C en agitación constante (150rpm) a excepción de los inóculos usados en los ensayos de actividad antimicrobiana que tuvieron un tiempo de incubación de 10 días.

### 3.1.3 Semillas de arroz.

En los ensayos de inoculación en planta fueron utilizadas semillas de arroz (paddy verde) variedad FEDEARROZ733 (tratada con antimicótico) y variedad FEDEARROZ 60, facilitadas por el área de asistencia técnica de Biocultivos S.A. La selección de estas variedades de arroz se dio teniendo en cuenta que las dos variedades se encuentran entre las semillas más utilizadas en campo dado sus buenos rendimientos (buen macollamiento), versatilidad de crecimiento en términos de clima y necesidades nutricionales y susceptibilidad frente a *B. glumae* (la variedad FEDEARROZ 60 es reportada como sensible hacia *B. glumae* y la variedad 733 como tolerante frente a este patógeno) (Medina, 2009).

Antes de su uso en los ensayos, las semillas de arroz fueron desinfectadas superficialmente utilizando una modificación de la metodología descrita por Flórez y Uribe (2011), mediante inmersión de las semillas en soluciones de Hipoclorito de sodio 5%, agua destilada estéril y alcohol 70% por 4 minutos cada uno, finalizando con cuatro lavados con agua destilada estéril (Flórez & Uribe, 2011). Una vez desinfectadas, las semillas fueron pre-germinadas en agar agua 1% por 4 días a 30 °C en oscuridad. Al finalizar este tiempo las plántulas más uniformes en términos de crecimiento de la raíz seminal y coleóptilo, fueron seleccionadas para el desarrollo de los ensayos *in vivo*, esto se realizó con el fin de reducir la variabilidad de crecimiento intrínseca de las plantas (Figura 3-1).

**Figura 3-1: Características de las semillas de arroz pre germinadas, seleccionadas para su uso en los ensayos *in vivo*.** 1. Coleóptilo, 2. Prófilo (primera hoja), 3. Raíz seminal, la longitud del coleóptilo y la raíz seminal era de aproximadamente 1cm en las plántulas seleccionadas para los ensayos *in vivo*.



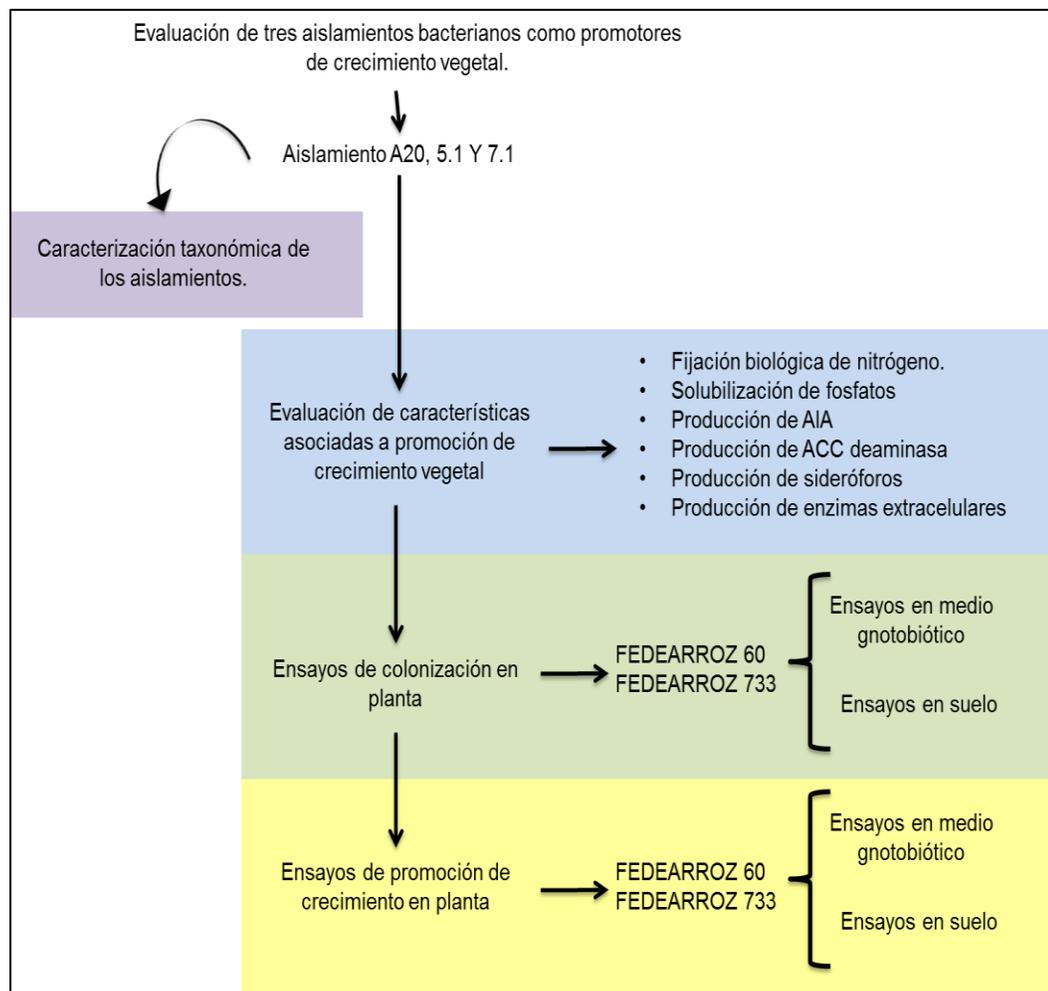
### 3.1.4 Suelo.

Para los ensayos del objetivo 2 y 3 que incluían pruebas de invernadero, se utilizó suelo procedente de la Finca La Pilar, Vereda Palmarosa, Venadillo, Tolima. Suelos cultivados permanentemente con Arroz desde hace aproximadamente 10 años.

## 3.2 Esquema metodológico general.

El presente trabajo de investigación se desarrolló de acuerdo al esquema metodológico general presentado en la Figura 3-2, con el cual se pretendía dar respuesta a los objetivos planteados. Cada uno de los ensayos allí indicados son descritos en detalle en las siguientes secciones.

**Figura 3-2: Esquema metodológico general del proyecto de investigación.** La metodología definida para cada objetivo se presenta en colores azul (objetivo 1), verde (objetivo 2) y amarillo (objetivo 3). Los ensayos adicionales se presentan en color morado.



### 3.3 Caracterización de los aislamientos.

#### 3.3.1 Caracterización molecular.

La clasificación taxonómica de los aislamientos estudiados en esta tesis se realizó mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rARN (gen ribosomal 16S). Para tal efecto, se realizó la extracción y purificación del ADN genómico de los tres aislamientos usando la metodología Pospiech y Newman (1995) como método de referencia. El inóculo usado para este fin se realizó en 30ml de medio TBS líquido inoculado con colonias individuales de cada cepa (Pospiech & Neumann, 1995). Estos inóculos se dejaron crecer durante 48 horas a 30°C en agitación constante (150rpm). El gen ribosomal 16S *rRNA* fue amplificado por PCR siguiendo los protocolos descritos por Cui y colaboradores (2001), usando los cebadores: 16S\_A (5'CCGTCGACGAGCTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y 16S\_B (5'CCCGGGTACCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCCGCA3'), descritos para la caracterización molecular de actinomicetos (Cui, *et al.*, 2001).

Cada reacción se hizo en un volumen final de 100 µL usando 100 ng de ADN template en cada caso. Cada reacción utilizó 2.5 mM de cloruro de magnesio, 0.24 mM de dNTPs, 0.2 uM de cada cebador y 5 unidades de ADN polimerasa BIOLASE™ (Bioline ®) y el buffer de reacción proporcionado por el fabricante. Las condiciones del ciclo de PCR incluyeron una denaturación inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de denaturación a 95°C por 1 minuto, anillamiento a 56°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos, seguidos por una extensión final en un periodo de 5 minutos a 72°C. Este procedimiento fue llevado a cabo en las instalaciones del laboratorio de epidemiología molecular del IBUN usando el termociclador *iCycler* (Bio-Rad®).

El producto de la PCR fue evaluado por electroforesis en un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, a 80 V/cm. Las bandas de interés fueron eluidas del gel usando el Kit *Euro Gold Gel Extraction* en un volumen final de 50 µL. El ADN obtenido fue cuantificado con el kit Qubit (Invitrogen®) y sometido a secuenciación en Macrogen (Corea del Sur), utilizando los primers universales: 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'), 800 R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') y 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'). Las secuencias parciales obtenidas para cada alineamiento fueron ensambladas con el software CLCbio Mainworkbench 6.9.1 y la secuencia entera del gen 16S rARN se analizó mediante una búsqueda y comparación de las secuencias alineadas en la plataforma del *Ribosomal Data Project* (<https://rdp.cme.msu.edu/login/myrdp/logout.spr>). Una vez identificados las especies más cercanamente relacionadas se construyó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA® (Versión 5.2.2.)

### 3.3.2 Caracterización bioquímica y fisiológica.

Se realizó una caracterización macroscópica de los aislamientos de acuerdo a Shirling y Gottlieb (1968), observando las características de crecimiento en agar nutritivo, Mueller Hillton, ACA, ISP2, ISP3 e ISP4 tras 5 días de incubación a 30°C (Shirling & Gottlieb, 1968). Así mismo, se realizaron pruebas bioquímicas (consumo de fuentes de carbono, catalasa y oxidasa) y los resultados se compararon con el perfil descrito en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2012) para las especies sugeridas por los análisis del 16S rARN (Goodfellow, 2012).

## 3.4 Identificación de características asociadas a efectos de promoción de crecimiento vegetal (Objetivo 1).

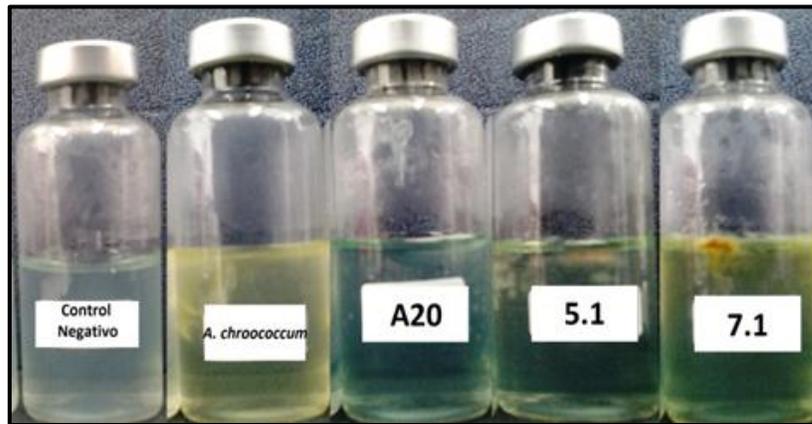
### 3.4.1 Fijación biológica de nitrógeno.

Para la identificación de la capacidad fijadora de nitrógeno se utilizó una metodología modificada del ensayo de reducción del acetileno planteado por Hardy et al (1968), el cual ha sido estandarizado en el laboratorio de fermentaciones del IBUN (Hardy, *et al.*, 1968). La lectura de reducción del acetileno se llevó a cabo por cromatografía de gases en el cromatógrafo Varian Modelo 3400, usando una columna Layesep P 80/100 (6 pulgadas X 1/8) del laboratorio de Instrumental del IBUN. Con esta metodología se estimó indirectamente la capacidad del complejo enzimático de la nitrogenasa para romper el triple enlace del acetileno y convertirlo en etileno.

En este ensayo se evaluaron por triplicado las cepas A20, 5.1 y 7.1 teniendo como control positivo la cepa *Azotobacter chroococcum* AZFN010 (perteneciente al cepario del laboratorio de fermentaciones) y como control negativo el medio sin inocular. Se prepararon tres inóculos independientes de A20, 5.1 y 7.1 en medio M3.7 como se describió previamente. El inóculo de *A. chroococcum* fue realizado en medio ASHBY, con un periodo de incubación de 4 días con agitación constante (120 rpm) a 30°C. Al término del periodo de incubación los inóculos fueron centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm, y 100 µl de la biomasa se transfirieron a 17 ml de medio NFB semisólido previamente esterilizado en viales de vidrio sellados con un tapón de algodón.

Cada muestra fue incubada sin agitación por 5 días a 30°C. Una vez transcurrido este tiempo se realizó la inyección de 2 cm<sup>3</sup> de acetileno, tras lo cual se reemplazó el tapón de algodón por uno de caucho y los viales fueron sellados herméticamente (Figura 3-3). Una muestra de 1 cm<sup>3</sup> fue tomada de cada vial 24 horas después de la inyección del acetileno, para su lectura en el cromatógrafo de gases.

**Figura 3-3: Ensayo de reducción del acetileno.** En la figura se muestran de izquierda a derecha los montajes del control negativo, control positivo (*A. chroococcum*), A20, 5.1 y 7.1. Nótese como se da un cambio de color de azul a amarillo por descenso del pH en el medio, sugestivo de crecimiento bacteriano.



Es pertinente aclarar que con esta metodología se midió indirectamente la capacidad de fijar nitrógeno de las cepas evaluadas al determinar la actividad enzimática del complejo de la nitrogenasa, haciendo uso de su capacidad de romper el triple enlace del acetileno y convertirlo en etileno (proceso análogo a la fijación biológica del nitrógeno) (Hardy et al., 1968).

### 3.4.2 Solubilización de fosfatos.

La determinación de solubilización de fosfatos se realizó de manera cualitativa por medio de la inoculación de colonias individuales de cada aislamiento en medios NBrip y SRS, los cuales fueron incubados a 30°C por 5 días. La aparición de halos claros alrededor de las colonias en medio NBrip y el viraje de color de púrpura a naranja en SRS fueron usados como indicadores presuntivos de solubilización de fosfatos. En cada caso, la fuente de fosfato insoluble fue fosfato de calcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)) (Franco - Correa, et al., 2010).

Se realizó adicionalmente la determinación cuantitativa de solubilización de fosfatos en medio NBrip líquido por medio del Test de fosfatos Spectroquant® fósforo (pmb) (Merck) que tiene como principio el método colorimétrico del ácido fosfato vanadato-molibdato, y permite medir la concentración de fosfato liberado en el medio por acción de los microorganismos tras 5 días de incubación a 30°C en agitación constante, usando como fuente insoluble de fósforo 5g/L de fosfato tricálcico (Franco - Correa, *et al.*, 2010). En ambos casos los ensayos contaron con dos repeticiones para cada cepa evaluada, teniendo en cada caso tres réplicas biológicas. Se utilizó como control positivo el hongo solubilizador *Penicillium janthinellum* FP010, perteneciente al cepario del laboratorio de fermentaciones del IBUN.

### **3.4.3 Producción de Ácido-3 Indol Acético.**

Para la determinación cuantitativa de producción de ácido Indol acético se implementó el protocolo establecido por Tang y Bonner en 1947 (Tang & Bonner, 1947, Gordon & Weber, 1951). Para ello, 20 ml de caldo TBS suplementado con 100 µl de triptófano 60mM fue inoculado con 100 µl de un pre inculo de A20, 5.1 y 7.1, un control positivo (*Azospirillum brasilense* AZPP010), un control biológico negativo (*Escherchia coli* ATCC 12167) y un control abiótico negativo (Medio sin inocular). Los medios fueron incubados a 30°C en agitación constante (150rpm) por 4 días. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron 4 ml de cada cultivo a 10.000 rpm por 10 minutos. Se adicionó 1 ml de reactivo de Salkowsky (Anexo A) a 1 ml del sobrenadante y se dejó reaccionar por 30 minutos para su lectura en espectrofotómetro a 535nm. La concentración de AIA se calculó mediante regresión lineal usando la curva de calibración elaborada con patrones de AIA (Anexo B). El ensayo consistió en tres réplicas biológicas para cada uno de los microorganismos y controles, y fue llevado a cabo por triplicado.

### **3.4.4 Producción de sideróforos.**

La producción de sideróforos se determinó cualitativamente utilizando el medio CAS (Anexo A). En este medio el hierro se encuentra formando un complejo estable con el Chrome Azurol S (CAS) y el HDTMA (Bromuro Hexadeciltrimetil Amonio), siendo este complejo el responsable del color azul del medio. Cuando un quelador fuerte, en este caso los sideróforos, capturan el hierro del complejo este pierde su color azul y se torna naranja. Este cambio de color es usado como variable de respuesta en los microorganismos productores de sideróforos (Schwyn & Neilands, 1987, Mahmoud & Abdallah, 2001).

Para este ensayo, 50 µl del inóculo de A20, 5.1 y 7.1 previamente crecidos en medio M3.7 y ACA fueron adicionados a pozos de 5mm en agar CAS e incubados a 30°C por 2 días. Se utilizó como control positivo la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y como control negativo 50 µl de los medios sin inocular. El ensayo se realizó por triplicado y los halos naranja formados alrededor de las colonias fueron medidos como parámetro de comparación con el control positivo.

### 3.4.5 Producción de ACC deaminasa

Con el objetivo de determinar si las cepas en estudio producían la enzima ACC-deaminasa se realizó una prueba indirecta cualitativa en medio mínimo de sales y medio Dworkin y Foster sin nitrógeno o suplementado con 2 g/L de sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) o ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC) 3mM como única fuente de nitrógeno (Anexo A) (Belimov, *et al.*, 2001, El- tarabily, 2008). Cada medio se inoculó con 10 µl de una suspensión de esporas de las cepas, incubándose 5 días a 30°C. El crecimiento y la esporulación de los aislamientos en el medio suplementado con ACC fueron considerados como indicadores de la capacidad de los microorganismos para utilizar el ACC como fuente de nitrógeno mediado por la producción de ACC-deaminasa. El experimento fue efectuado por triplicado, usando como control positivo la cepa *Burkholderia unamae* MT1 641<sup>T</sup> (Caballero-Mellado, *et al.*, 2004).

### 3.4.6 Producción de enzimas extracelulares.

Los actinomicetos son reconocidos por su capacidad de colonizar endófitamente una amplia variedad de plantas huésped (Franco, *et al.*, 2007, El- tarabily, *et al.*, 2010) este es un proceso complejo que esta mediado por muchos factores dentro de los que se destaca la capacidad de los microorganismos endófitos de penetrar las células vegetales por medio de la excreción de algunas enzimas hidrolíticas como las celulasas, proteasas, pectinasas entre otras (Compant, *et al.*, 2010). La evaluación de estas enzimas sirve como indicador del tipo de colonización en estos microorganismos, a pesar de no ser una característica excluyente o incluyente del mismo.

La producción de celulasas se evaluó cualitativamente en medio CMC, que tiene como única fuente de carbono la carboxi-metil celulosa (CMC) (Anexo A) (Kasana, *et al.*, 2008). Tras la inoculación de colonias individuales de A20, 5.1 y 7.1, las cajas de agar

CMC se incubaron por 5 días a 30°C incluyendo el control positivo que en este caso fue el hongo del género *Paecilomyces* H1, perteneciente al banco de cepas y genes del IBUN. Posteriormente se realizó la tinción y el revelado de las zonas de degradación del CMC con rojo Congo al 0.2% (p/v) y cloruro de sodio (NaCl) 1M respectivamente, ambos se dejaron actuar por 15 minutos (uno después del otro) y se observó la formación de halos naranjas en la superficie del agar, indicador de la degradación de la celulosa por acción de las enzimas celulasas secretadas por el microorganismo evaluado.

La detección de proteasas se realizó en agar leche (Anexo A). Cada cepa fue inoculada en las placas de agar e incubadas por 5 días a 30°C. Al finalizar la incubación, la aparición de zonas claras en forma de halos alrededor de las colonias indicó la presencia de proteasas.

Finalmente, la producción de enzimas lignolíticas fue evaluada en medio lignina (Anexo A). Para tal efecto, colonias individuales de cada aislamiento fueron inoculadas en el medio e incubadas en las mismas condiciones de las demás pruebas. Al finalizar el periodo de incubación se buscó la presencia de halos rojo-vinotinto alrededor de las colonias generados por la oxidación del guayacol a tetraguayacol por acción de peroxidasas producidas por los microorganismos, como indicador de la presencia de enzimas degradadoras de lignina. En este caso el hongo *Pleurotus* T1.1. fue usado como control positivo.

### **3.4.7 Actividad antimicrobiana.**

- **Ensayos de actividad antibacteriana.**

La actividad antibacteriana y anti fúngica de las cepas evaluadas fue determinada por el método de difusión en placa, de acuerdo a las normas descritas en el manual CLSI. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana, se utilizaron 21 cepas bacterianas de 15 especies, proporcionadas por el Banco de cepas y genes del IBUN (Tabla 5-1). Para tal efecto, cada actinomiceto se cultivó en medio M3.7 durante 10 días con agitación de 150 rpm, a una temperatura de 30°C. Para evaluar la actividad antibacteriana, cada uno de las 21 cepas bacterianas a evaluar se cultivó en 5 mL de caldo LB (Anexo A), con agitación durante 16 horas a 30 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de cada cultivo a 600 nm y se ajustó a 0.25 con la adición de caldo LB estéril, para partir de una misma absorbancia en todos los ensayos de acuerdo a recomendaciones del CLSI.

La dilución de cada cultivo se utilizó para embeber un hisopo de algodón estéril, y este se utilizó para diseminar cada cultivo mediante estría en la superficie de una caja de Petri servida con 25 mL de agar Mueller Hinton. La estría se repitió cinco veces en diferentes direcciones para asegurar una siembra uniforme en cada caja. Las cajas se dejaron secar durante 5 minutos, y se hicieron pozos con un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro. 50 µl del cultivo de A20, 5.1 y 7.1 con una concentración en el orden de 10<sup>6</sup> UFC/mL fueron dispensados en cada pozo. Se permitió la difusión del cultivo en los pozos y las cajas se incubaron a 30°C por 24 horas.

La presencia de halos de inhibición fue registrada para cada cepa evaluada y se midieron los diámetros de los halos por triplicado, con dos réplicas biológicas para cada caso. 10 µl de gentamicina (0.2 µg/ml) fueron empleados como control de inhibición de crecimiento en todos los ensayos.

**Tabla 3-1: Cepas bacterianas evaluadas en los estudios de actividad antibacteriana.**

Identificación de la cepa	Procedencia
<i>Acidovorax avenae</i> CIAT 4008-2	Laboratorio de Diagnóstico, FEDEARROZ
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>Bacillus</i> C636	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>B.subtilis</i> ATCC 21556	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>Burkholderia glumae</i> CIAT 320012	Laboratorio de Diagnóstico, FEDEARROZ
<i>B. glumae</i> CIAT 4026	Laboratorio de Diagnóstico, FEDEARROZ
<i>B. gladioli</i> 3704-1	Laboratorio de Diagnóstico, FEDEARROZ
<i>B. gladioli</i> CIAT 3962	Laboratorio de Diagnóstico, FEDEARROZ
<i>Chromobacterium violaceum</i> 31592	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>Enterobacter aerogenes</i> 7ARG	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 19344	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>Escherichia coli</i> ATCC 12167	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>E. coli</i> DH5a	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>E. coli</i> ATCC 23724	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>Pseudomonas putida</i> F11PQRC12	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones
<i>P. fuscovaginae</i> 3638-19	Laboratorio de Diagnóstico, FEDEARROZ
<i>P. fuscovaginae</i> 3668π3	Laboratorio de Diagnóstico, FEDEARROZ
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	Banco de cepas y genes IBUN – Lab. Fermentaciones

Adicionalmente, se llevó a cabo una prueba de actividad antimicrobiana usando el cepario de 48 aislamientos presuntivos de *Burkholderia glumae* aislados por el laboratorio de diagnóstico de FEDEARROZ a lo largo del año 2011 de plantas de arroz sintomáticas de añublo bacteriano.

▪ **Ensayos de actividad anti fúngica.**

Para evaluar la actividad antifúngica se emplearon 9 cepas de hongos fitopatógenos descritos en la Tabla 3-2. Para ello, cada hongo se inoculó en cajas de Petri de agar PDA y se incubó a 25 °C. Una vez formado el micelio, se cortaron discos de 5mm de cada hongo los cuales fueron retirados y puestos en cajas nuevas de agar PDA en dos de los extremos de la misma; en los otros dos extremos se dispensaron 50 µl de un cultivo de 10 días de crecimiento de cada uno de los aislamientos de interés, una caja control en donde no se inoculó ninguno de las cepas en estudio (A20, 5.1 o 7.1) fue colocada a incubar junto con los tratamientos a 25°C (Kanini, *et al.*, 2013).

**Tabla 3-2: Cepas fúngicas utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana.**

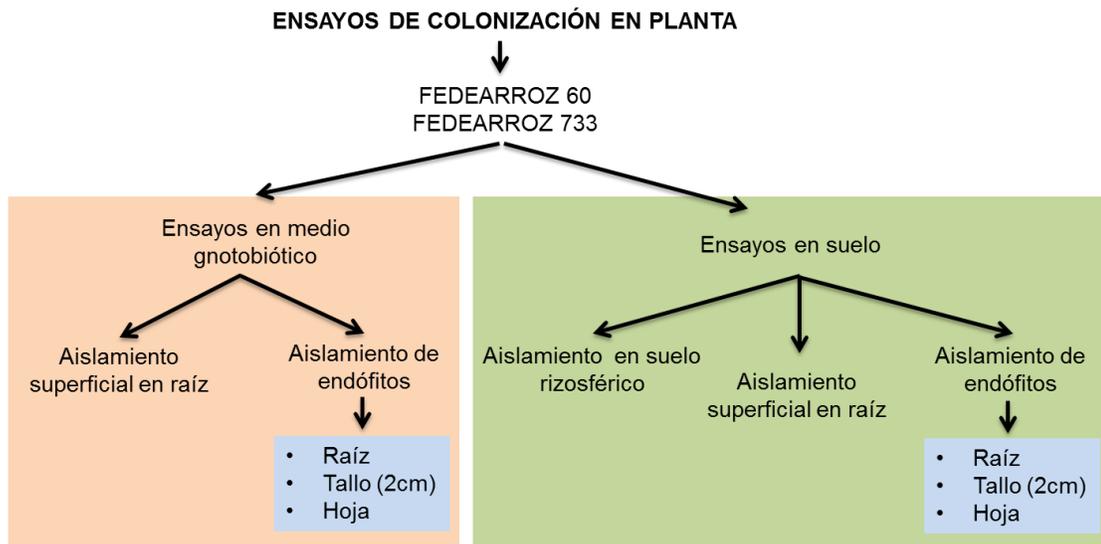
Identificación de la cepa	Procedencia
<i>Fusarium DC9</i> (FIF025)	Ñame (Grupo de investigación en ñame IBUN)
<i>Fusarium DC 13B</i>	Ñame (Grupo de investigación en ñame IBUN)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clavel (Grupo de estudio de actividades metabólicas vegetales. Departamento de química UNAL)
<i>Gaeumannomyces sp</i> (FPR010)	Arroz (Grupo de investigación en ñame IBUN)
<i>Phomopsis sp.</i> DC1B (FIF027)	Ñame(Grupo de investigación en ñame IBUN)
<i>Ulocladium sp.</i> 29E (FIF023)	Ñame (Grupo de investigación en ñame IBUN)
<i>Rhizoctonia solani</i> (FPR011)	Arroz (Grupo de investigación en ñame IBUN)
<i>Colletotrichum 24C</i> (FIF024)	Ñame (Grupo de investigación en ñame IBUN)
<i>Colletotrichum 26B</i>	Ñame (Grupo de investigación en ñame IBUN)

La lectura de inhibición se realizó una vez el crecimiento del hongo en la caja control cubría la totalidad del medio (Kanini, *et al.*, 2013). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado, teniendo cada ensayo dos réplicas biológicas de A2, 5.1 y 7.1.

### 3.5 Ensayos de colonización en planta (Objetivo 2)

Con el objetivo de determinar las características de colonización de los aislamientos A20, 5.1 y 7.1 en las variedades de arroz FEDEARROZ60 y FEDEARROZ 733, se llevaron a cabo ensayos de colonización en plantas realizados en dos condiciones diferentes: medio gnotobiótico (usando Hoagland semisólido como matriz) y suelo. El esquema general de estos ensayos se muestra en la Figura 3-4.

**Figura 3-4: Esquema general de los ensayos de colonización en planta.** En los recuadros naranja y verde se presentan las características evaluadas en condiciones gnotobióticas y de suelo respectivamente. El recuadro azul presenta las secciones de las plantas de cada ensayo que fueron procesadas para la verificación de la colonización endofítica.



Las plantas de cada uno de los ensayos fueron esterilizadas, pre germinadas y seleccionadas para su uso como se describió anteriormente; los individuos usados en cada ensayo se dejaron crecer en condiciones de invernadero (Humedad relativa  $43\% \pm 8.6$ , Temperatura promedio  $24^{\circ}\text{C} \pm 5.2$ ) durante quince días para las pruebas en medio gnotobiótico y treinta y un días para los ensayos en suelo.

### 3.5.1 Ensayos en medio gnotobiótico.

El ensayo gnotobiótico pretendía evaluar el comportamiento en términos de colonización de los aislamientos A20, 5.1 y 7.1 en un medio en el cual se aseguraba la interacción de la planta (Fedearroz 60 o Fedearroz 733) con cada una de las cepas, sin interferencia de ningún otro microorganismo. Estos ensayos se realizaron dos veces, con tres réplicas biológicas por aislamiento y 5 individuos por réplica, usando como matriz el medio Hoagland semisólido (Anexo A). Para su desarrollo, las semillas de ambas variedades de arroz fueron esterilizadas superficialmente, pre-germinadas y transferidas a frascos de vidrio estériles (4cm de diámetro por 15 cm de alto) que contenían 40ml de Hoagland semisólido previamente inoculado con cada una de las cepas de interés hasta alcanzar una concentración de  $10^3$  UFC/ml de medio (Figura 3-5 A). Tras 15 días de crecimiento en invernadero, las plantas de cada tratamiento fueron retiradas de los frascos para su evaluación.

En primer lugar fragmentos de 2 cm de las raíces de cada una de las plantas fueron cortados y colocados asépticamente sobre placas de agar ISP3, las cuales fueron incubadas a 30°C por 5 días. La aparición de colonias típicas de A20, 5.1 o 7.1 fueron usados como indicativos de una colonización exitosa del **rizoplano**. Para asegurar la existencia de una verdadera asociación entre la raíz y el microorganismo, las raíces fueron lavadas gentilmente con agua destilada estéril antes de ser colocadas en las placas de agar, con el objetivo de retirar microorganismos no adheridos a la raíz que pudieren estar presentes en la muestra por contacto en el momento de extracción de la planta del medio de cultivo.

Para el aislamiento de microorganismos **endófitos** se realizó una metodología basada en el protocolo propuesto por Compant y colaboradores en 2005. Todas las plantas de cada tratamiento fueron esterilizadas superficialmente utilizando el mismo protocolo usado para la desinfección de semillas. Posteriormente fueron fraccionadas en tres secciones: raíces, tallo (correspondiente a los 2cm inmediatamente posteriores a las raíces) y hojas (Compant, *et al.*, 2005). Se elaboró una muestra compuesta de cada sección con las 5 plantas de las réplicas biológicas, esta muestra fue pesada, macerada y diluida hasta  $10^5$ . Todas las diluciones se sembraron en agar ISP3 por triplicado y se incubaron a 30°C por tres días, el recuento de colonias fue anotado y reportado como UFC/g de peso fresco.

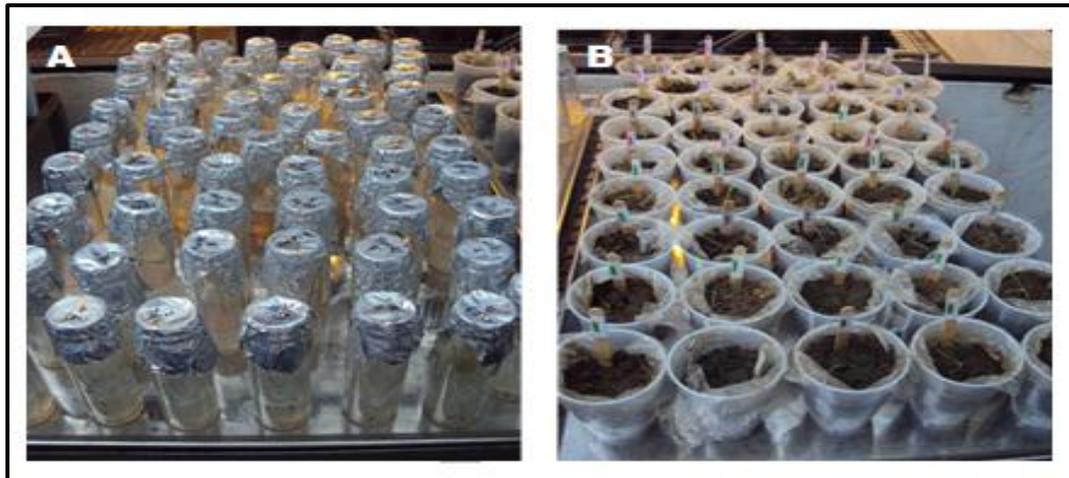
La **validación** de la técnica de esterilización se llevó a cabo de dos maneras: en primer lugar inmediatamente después de la esterilización superficial de las plantas, muestras al azar de cada individuo fueron tomadas y colocadas sobre placas de agar ISP3 e

incubadas en las mismas condiciones de las muestras maceradas; así mismo, 100  $\mu$ l de la última agua de lavado usada en el proceso de esterilización fue plaqueada directamente en agar ISP3 (Compant et al., 2005), la ausencia de crecimiento de colonias compatibles con A20, 5.1 o 7.1 validaba la técnica de esterilización y por ende los resultados obtenidos de colonización endofítica.

### 3.5.2 Ensayos en suelo.

Los ensayos en suelo se realizaron con el objetivo de obtener un acercamiento a la interacción planta - microorganismo que se daría tras la aplicación en campo de cualquiera de los tres aislamientos en evaluación. Estos experimentos se realizaron en vasos plásticos de 20 onzas que contenían 250 g de suelo (Figura 3-5 B).

**Figura 3-5: Ensayos de colonización en plantas de arroz.** A. Ensayo en medio gnotobiótico. B. Ensayo en suelo.



Se llevaron a cabo dos experimentos completos con tres réplicas biológicas por tratamiento y 5 individuos en cada réplica con una duración de 31 días de crecimiento. La inoculación de los microorganismos en suelo se realizó aplicando 10ml de un cultivo de 8 días de crecimiento de cada cepa, verificando que la concentración había alcanzado un orden de  $10^8$  UFC/ml, de manera tal que al ser aplicada al suelo quedara en una concentración aproximada de  $10^5$  UFC/g de suelo. Una única aplicación de 5ml de solución Hoagland líquida se realizó el día del montaje a todos los tratamientos, con el fin de disminuir el estrés infringido en las plántulas tras el trasplante.

Para comprobar la permanencia y viabilidad de A20, 5.1 y 7.1 en suelo, se realizó un muestreo de **suelo rizosférico** (fracción del suelo que, después de ser retirada la planta de la matriz permanecía adherido a las raíces) en todos los tratamientos evaluados, de forma tal que 1 g de suelo rizosférico fue tomado de cada una de las plantas para formar una muestra compuesta de 5 g por réplica biológica. Esta muestra fue diluida en Tween 80 (0.1% v/v) hasta  $10^6$ , plaqueando las tres últimas diluciones en agar ISP3 suplementado con Ácido nalidixico (20µg/ml) y Nitrofurantoina (10 µg/ml), los resultados fueron leídos tras 4 días de incubación a 30°C y reportados como UFC/g de suelo rizosférico. El aislamiento de A20, 5.1 y 7.1 del rizoplasma y del interior de las plantas fue realizado siguiendo el mismo protocolo descrito para el ensayo gnotobiótico. La única diferencia entre los dos procedimientos fue la suplementación del agar ISP3 con antibióticos (Ácido nalidixico 20µg/ml y Nitrofurantoina 10 µg/ml) en el caso del ensayo en suelo.

La adición de los antibióticos antes mencionados a las placas de agar ISP3 se realizó con el fin de disminuir la presencia de flora acompañante en las muestras que estaban siendo procesadas, considerando que a pesar de que el suelo había sido esterilizado, los tratamientos se dejaron expuestos al ambiente en el invernadero, por lo cual la presencia de otros microorganismos era de esperarse. Los antibióticos seleccionados se escogieron en base al perfil de sensibilidad realizado a los *Streptomyces* A20 5.1 y 7.1 (Anexo C).

### 3.6 Ensayos de promoción de crecimiento en planta.

Dentro del desarrollo del presente proyecto de investigación se realizaron dos diferentes metodologías con el objetivo de determinar el efecto sobre el crecimiento de las plantas de arroz generado por la inoculación de las cepas en estudio (A20, 5.1 y 7.1), bajo diferentes condiciones de esterilidad (cultivos gnotobióticos en Hoagland semisólido y cultivos en suelo). En todos los ensayos se manejaron las variedades de semillas de arroz 60 y 733. El montaje de estos ensayos, el método de inoculación y el tiempo de crecimiento de las plantas fue el mismo que el utilizado en los ensayos de colonización, aunque la variación radica en los tratamientos evaluados y los parámetros evaluados.

Siete tratamientos fueron usados para los ensayos de promoción de crecimiento: un control negativo sin inocular, un control del medio de producción (M3.7), dos controles biológicos positivos (*A. chroococcum* y *A. brasilense*, ambos en una concentración de  $10^5$  UFC/ml o g de suelo respectivamente) y las cepas A20, 5.1 y 7.1 ( $10^3$  UFC/ml en Hoagland semisólido y  $10^5$  UFC/g de suelo respectivamente). Cada uno de los ensayos

incluyó dos réplicas biológicas que estaban conformadas por diez individuos cada una. En el caso de Hoagland se realizó una réplica del ensayo completo, mientras que el de suelo solo se llevó a cabo una vez.

Al finalizar el tiempo de crecimiento se llevaron a cabo las siguientes mediciones biométricas: Peso fresco y peso seco de raíces y hojas de la planta, longitud de la planta y longitud de raíces. Para comprobar que el efecto observado fuera generado por el microorganismo evaluado, al finalizar el experimento se tomaron tres muestras al azar de suelo rizosférico de las plantas, las cuales fueron procesadas de la misma forma que en los ensayos de colonización para verificar la presencia de la cepa de interés.

### **3.7 Análisis estadístico.**

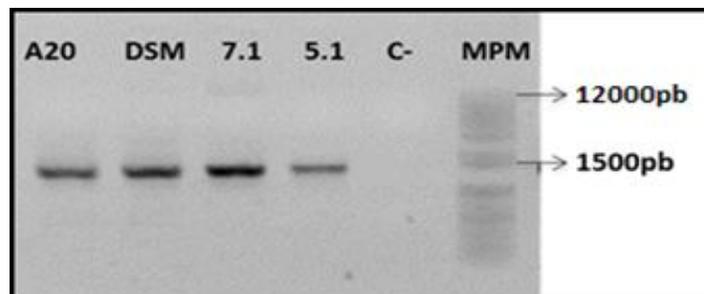
Todos los ensayos, cualitativos y cuantitativos del presente proyecto de investigación fueron realizados por triplicado. Se llevaron a cabo pruebas de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos cuantitativos. Adicionalmente, se evaluó si los datos obtenidos de las réplicas de cada ensayo presentaban tendencias similares. De ser así, los datos fueron combinados y analizados. Se elaboraron pruebas de Tukey combinadas con boxplot para cada conjunto de datos con el fin de hallar datos atípicos. Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento de las plantas de arroz, los datos biométricos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas entre medias se compararon mediante la aplicación de un test de Tukey ( $p=0.05$ ). El programa GraphPad Prism© (GraphPad Software, Inc. ©2012) fue usado para llevar a cabo todos los análisis.

## 4. Resultados y discusión.

### 4.1 Caracterización taxonómica de los aislamientos A20, 5.1 y 7.1.

Con el objetivo de identificar molecularmente los tres aislamientos de interés, se llevó a cabo una extracción de ADN genómico de A20, 5.1 y 7.1 sobre la cual se realizó una PCR con el fin de amplificar el gen 16S rARN de cada cepa, obteniéndose un amplímero de aproximadamente 1500pb (Figura 4-1). Este fragmento, fue eluido del gel de agarosa y enviado a secuenciar en Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron alineadas (Anexo D) y sometidas a comparación en la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project), de este proceso se obtuvo que los tres aislamientos pertenecen al género *Streptomyces*.

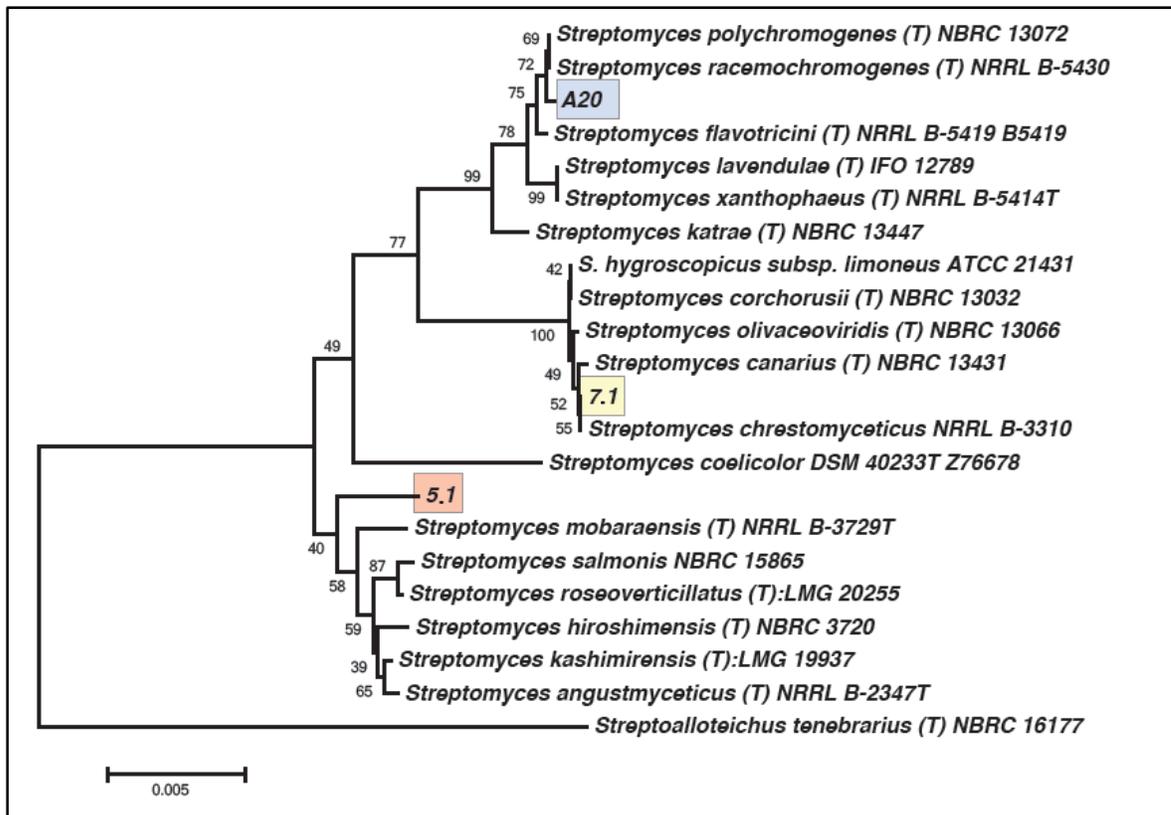
**Figura 4-1: Amplificación por PCR del gen 16S rRNA de los aislamientos A20, 5.1 y 7.1.** Los carriles DSM y C- corresponden respectivamente a los controles positivo (cepa tipo de *Streptomyces racemocrhomogenes* ATCC 23954) y negativo de la PCR, el patrón 1Kb plus de Invitrogen fue utilizado como marcador de peso molecular (MPM).



Tradicionalmente, es aceptado que una cepa puede ser incluida dentro de una especie determinada si su porcentaje de similitud para el gen 16S rARN es superior al 98.5% (Labeda, *et al.*, 2011). En este caso en particular, la comparación con la base de datos de las secuencias del 16S rARN de A20, 5.1 y 7.1 arrojó varias especies posibles que superaban este límite de identidad, con las cuales se elaboró un árbol filogenético para cada uno de los aislamientos de interés (Figura 4-2).

El análisis filogenético del gen *16SrARN* ubicó a las cepa A20 como cercanamente relacionadas con las especies *S. racemochromogenes*/*S. polychromogenes* (100 % de similaridad), mientras que la cepa 7.1 se ubicó en el clado de *S. chrestomyceticus* con valores de similaridad superiores al 99 % con las especies *S. canarius* y *S. corchorusii* respectivamente. La cepa 5.1 se ubicó en el grupo de *S. roseoverticillatus*, aunque su similaridad a nivel de secuencia fue de solo el 98 % y en el árbol forma una rama independiente que podría sugerir que se trata de una nueva especie (Anexo E).

**Figura 4-2: Árbol filogenético generado para los *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1.** Para la construcción del árbol filogenético, se utilizó *Neighbour Joining* como estrategia de agrupamiento. La cepa tipo *Streptoalloteichus tenebrarius* NBRC 16177 fue usada como grupo externo. Escala= 0.005



Con el objetivo de complementar la información obtenida de la caracterización molecular, se desarrollaron pruebas bioquímicas y se evaluaron características de crecimiento macroscópico en medios específicos según esta reportado en el manual *Bergey* (Tabla 4-1 y 4-2). Gracias a los resultados obtenidos en este punto, se realizó la selección del medio ISP3 como agar diferencial para el crecimiento de los tres *Streptomyces*, teniendo en cuenta el crecimiento característico que presentaron las cepas en este medio, lo cual facilitó su estudio en posteriores ensayos.

**Tabla 4-1. Pruebas bioquímicas realizadas a *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1. (+) Fermentación del azúcar o reacción positiva. (-) No hay fermentación del azúcar o reacción negativa. (Cat) Catalasa, (Oxi) Oxidasa.**

	Cat	Oxi	Glucosa	Sucrosa	Fructosa	Ramnosa	Arabinosa	Inositol	Xilosa	Manitol
<b>A20</b>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>7.1</b>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>5.1</b>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-

**Tabla 4-2: Características fenotípicas de crecimiento en medios diferenciales de los *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1.** Cada uno de los aislamientos fue sembrado por agotamiento en los medios solidos correspondientes; el crecimiento de las cepas fue monitoreado hasta el octavo día de incubación.

	Nutritivo	MH	ACA	ISP2	ISP3	ISP4
A20	Colonias definidas, opacas, color crema. No se desprenden con facilidad del medio			Colonias redondas granulosas, Color inicial: Blanca Color final: Rosa pálido Pigmento: No produce	Colonias redondas granulosas, Color inicial: Blanca Color Final: Rosado Pigmento: azul en la parte posterior que es reabsorbido cuando empieza a esporular	Colonias redondas granulosas Color inicial: Blanca Color final: Rosa pálido. No produce pigmento
7.1	Colonias definidas, opacas, color crema. No se desprenden con facilidad del medio			Colonias redondas, granulosas,. Color inicial: Blanco Color final: Blanco Producción de pigmento: ausente	Colonias redondas, granulosas,. Color inicial: Blanco Color final: Gris Producción de pigmento amarillo (No se reabsorbe)	Colonias redondas, granulosas. Color inicial: Blanco Color final: Blanco Producción de pigmento: ausente
5.1	Colonias definidas, opacas, color crema. No se desprenden con facilidad del medio			Colonias redondas algodonosas. Color inicial: Rosa pálido Color final: Rosa pálido Pigmento: rosado no se reabsorbe	Colonias redondas algodonosas. Color inicial: Rosa pálido Color final: Rosado/rojo Pigmento: rojo no se reabsorbe	Colonias redondas algodonosas. Color inicial: Rosa pálido Color final: Rojo Pigmento: roja no se reabsorbe

La caracterización taxonómica del género *Streptomyces* ha constituido todo un reto para los investigadores debido al gran número de especies descritas, que ha generado lo que algunos autores denominan la sobre especiación del género *Streptomyces* (Anderson & Wellington, 2001). Numerosos investigadores han descrito que esta situación se debe principalmente al incremento en el interés industrial y académico de estas cepas, ocasionado particularmente por su amplio rango de producción de metabolitos secundarios. Este interés llevo a que en 1970 se hubieran descrito alrededor de 3000 especies dentro del género *Streptomyces*, teniendo en cuenta únicamente diferencias pequeñas en cuanto a características morfológicas y bioquímicas (metabolismo y pared celular entre otras), por lo cual no era de extrañar que existieran especies “sinónimo” dentro de las especies reportadas (Hopwood, 1999, Anderson & Wellington, 2001, Labeda, *et al.*, 2011, Goodfellow, 2012).

Se han adelantado diferentes aproximaciones en cuanto al tema con el fin de aclarar la taxonomía de *Streptomyces*, siendo las más representativas el estudio adelantado por Williams y colaboradores (1983) y las investigaciones cooperativas realizadas dentro del “*International Streptomyces Project (ISP)*” (Labeda, *et al.*, 2011). A pesar de estos esfuerzos, aun es difícil determinar si un aislamiento dado pertenece o no a una especie de *Streptomyces* previamente descrita en la literatura basándose únicamente en la secuencia del gen 16S rRNA o en características morfológicas y bioquímicas, tal como se vio en el presente estudio, en donde se obtuvieron resultados de similaridad de porcentajes iguales con diferentes especies, por lo cual no era posible discriminar con certeza a que especie correspondía cada aislamiento.

La técnica “*Multi Locus Sequence Typing MLST*” se ha propuesto como una herramienta valiosa que usa la heterogeneidad de varios genes “*Housekeeping*” además del 16S, para caracterizar y definir especies bacterianas. En la actualidad esta técnica está siendo implementada en el grupo de investigación y se espera que pueda aportar información concluyente sobre filiación taxonómica de los tres aislamientos objeto de estudio, lo cual es de particular importancia si se tiene en cuenta que la legislación actual exige la plena identificación de cualquier microorganismo que vaya a ser usado como principio activo de un bioinoculante.

## 4.2 Identificación de características asociadas a la promoción de crecimiento (objetivo 1).

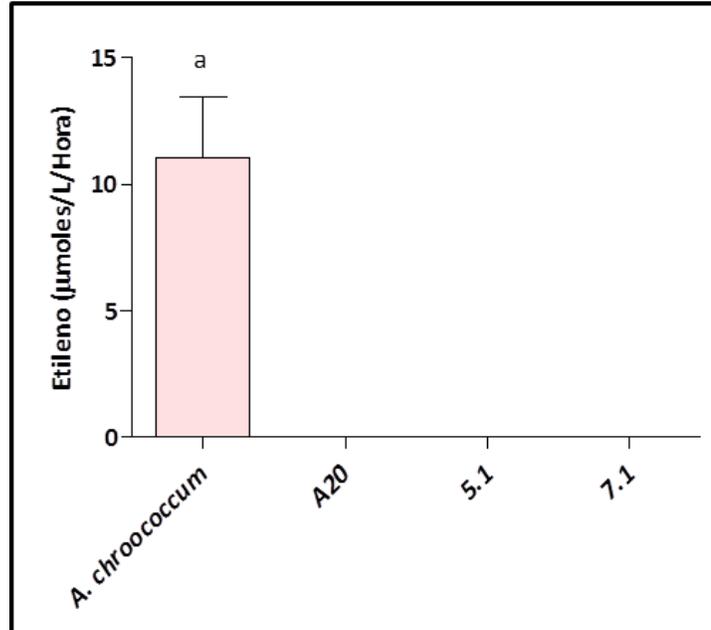
Para determinar el potencial de los tres aislamientos de interés como promotores de crecimiento vegetal, se evaluaron cinco características que han estado tradicionalmente relacionadas con efectos de **promoción directa de crecimiento**: fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de Ácido Indolacético, producción de ACC deaminasa y producción de siderófos. Adicionalmente, se evaluó cualitativamente la producción de algunas enzimas extracelulares que han sido descritas dentro del género *Streptomyces* y que están vinculadas a procesos de colonización endófito en algunos microorganismos (Hallmann, *et al.*, 1997, Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Por último, la actividad antimicrobiana de los tres aislamientos fue evaluada como representante de los mecanismos de **promoción indirecta de crecimiento vegetal**.

### 4.2.1 Fijación biológica de nitrógeno

Teniendo en cuenta que la fijación biológica de nitrógeno es uno de los mecanismos centrales de promoción directa de crecimiento, porque puede llegar a aportar concentraciones importantes de este elemento a los sistemas de cultivo, particularmente en plantas altamente demandantes de nitrógeno (Bohlool, *et al.*, 1992), su estudio en investigaciones sobre promotores de crecimiento vegetal es imprescindible.

En el presente estudio, la capacidad de fijar nitrógeno se evaluó mediante cromatografía de gases, por medio del ensayo de reducción del acetileno. *A. chroococcum* (AZFN010), el cual fue usado como control positivo, obtuvo una producción de etileno de 10.7  $\mu\text{moles/L/Hora}$ , demostrando la actividad enzimática del complejo nitrogenasa característico de este microorganismo. Sin embargo, ninguno de los aislamientos de interés fueron capaces de reducir el acetileno por lo cual se concluye que no presentan la capacidad de fijar nitrógeno. (Figura 4-3).

**Figura 4-3: Determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno de los *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 mediante el ensayo de reducción del acetileno.**



Hasta la fecha, la única especie reconocida dentro del género *Streptomyces* que presenta la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico es *S. thermoautotrophicus*, cuyo sistema nitrogenasa posee características particulares que la diferencian de las enzimas nitrogenasa tradicionales tales como su resistencia al oxígeno ( $O_2$ ), su necesidad de radicales aniones superóxido, su incapacidad para reducir acetileno y su baja dependencia de MgATP (Ribbe, *et al.*, 1997, Kieser, *et al.*, 2000).

Es interesante notar que en esta especie particular el ensayo usado para comprobar la capacidad de fijar nitrógeno (Ensayo de reducción de acetileno) no es útil dada la incapacidad del sistema enzimático de reducir el acetileno. Esta característica permite pensar en la existencia de otras especies de este y otros géneros que pueden compartir esta propiedad, particularmente en cepas como *Streptomyces* 7.1 el cual a pesar de tener un resultado negativo en el ensayo de reducción del acetileno, tuvo un crecimiento escaso pero perceptible (Figura 3-3). El secuenciamiento de los genes *nif* que han sido aceptados como marcadores moleculares útiles para la detección de potenciales fijadores de nitrógeno (Miyazaki, *et al.*, 2009), podrían aportar información complementaria sobre el potencial de esta cepa (7.1) para fijar nitrógeno.

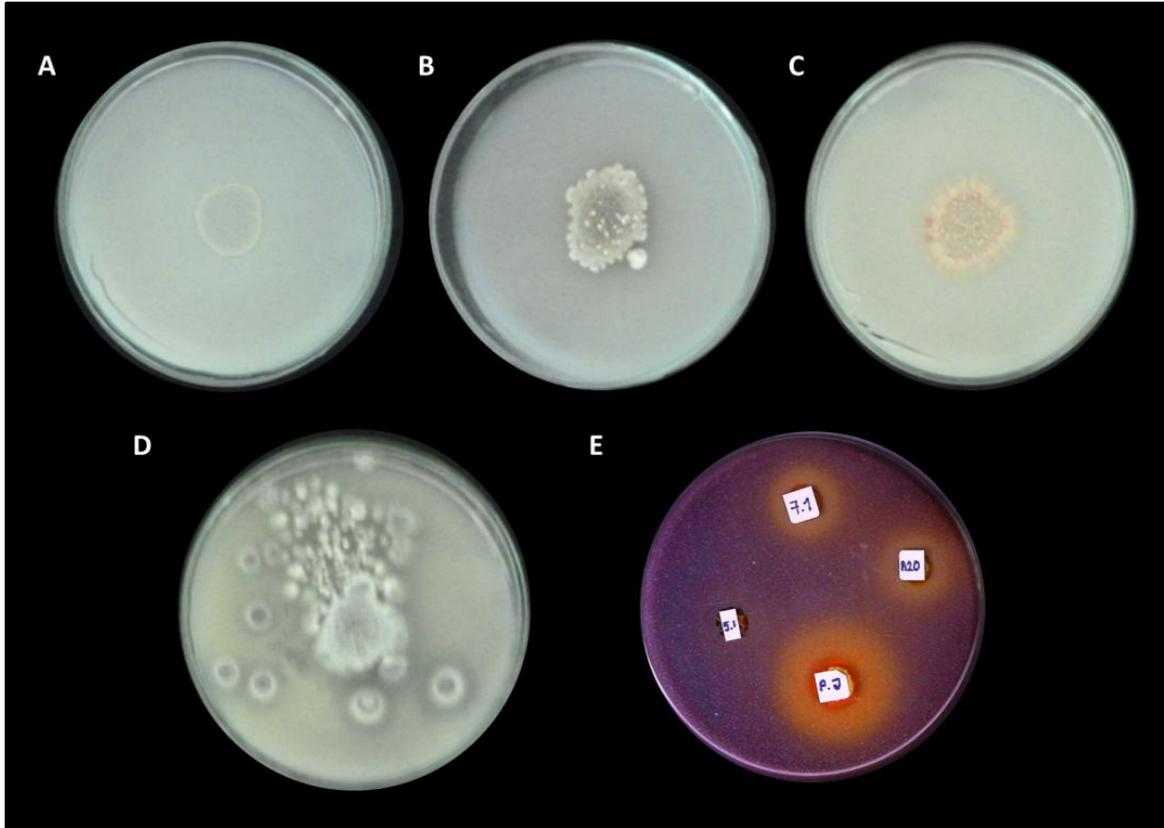
### 4.2.2 Solubilización de fosfatos.

La capacidad de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal de incrementar la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas como el fósforo, que naturalmente se encuentra en formas no asimilables, soportan el interés industrial y agronómico de estos microorganismos en procesos de optimización de los sistemas de fertilización actuales (Adesemoye, *et al.*, 2008, Hamdali, *et al.*, 2008, Adesemoye & Kloepper, 2009, Adesemoye, *et al.*, 2009). Los estudios de bioprospección de cepas potenciales con capacidad de solubilizar fosfato incluyen por lo general dos ensayos ligados entre sí: la detección cualitativa de cepas solubilizadoras y la evaluación cuantitativa de esta capacidad *in vitro* (Gulati, *et al.*, 2008, Franco - Correa, *et al.*, 2010). Los métodos cualitativos, llevados a cabo sobre medios sólidos que contienen una fuente insoluble de fósforo (en el caso de la presente investigación fosfato tricálcico), tienen como variable de respuesta la aparición de un halo de solubilización alrededor de la colonia (medio NBrip) asociado generalmente a la producción de enzimas como fosfatasas, C-P liasas, fitasas entre otras, o el cambio de color de violeta a amarillo (medio SRS) generado por la acidificación del medio como consecuencia de la liberación de ácidos orgánicos que modifican el pH con el fin de solubilizar el fósforo del medio (Rodríguez & Fraga, 1999).

La evaluación en ambos medios en el presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de realizar un ensayo presuntivo sobre la capacidad solubilizadora de fosfatos de las tres cepas y el mecanismo involucrado en ello, usando para ambos casos el hongo *Penicillium janthinellum* como control positivo. En estos ensayos se encontró, que mientras en el medio NBrip únicamente *P. janthinellum* y 7.1 generaban la aparición de un halo de solubilización (Figura 4-4 A-D), en el medio SRS además de estos dos microorganismos A20 también generaba la aparición de un halo naranja alrededor de la colonia (Figura 4-4 E).

Estos resultados sugirieron que 7.1 podría considerarse como un solubilizador de fosfatos al igual que el control positivo. La discrepancia encontrada entre los resultados de los dos medios para el caso de A20 podría corresponder a la producción de ácidos no asociados a la solubilización que generaran un descenso en el pH del medio y por ende la aparición del halo naranja más que a una solubilización real del fósforo presente, esta hipótesis se generó partiendo del hecho de que aun cuando en el medio NBrip no se tiene un indicador de pH, como en el caso del SRS, la solubilización del fósforo debería verse reflejada por la aparición del halo transparente alrededor de la colonia sin importar que mecanismo estuviese involucrado en el proceso.

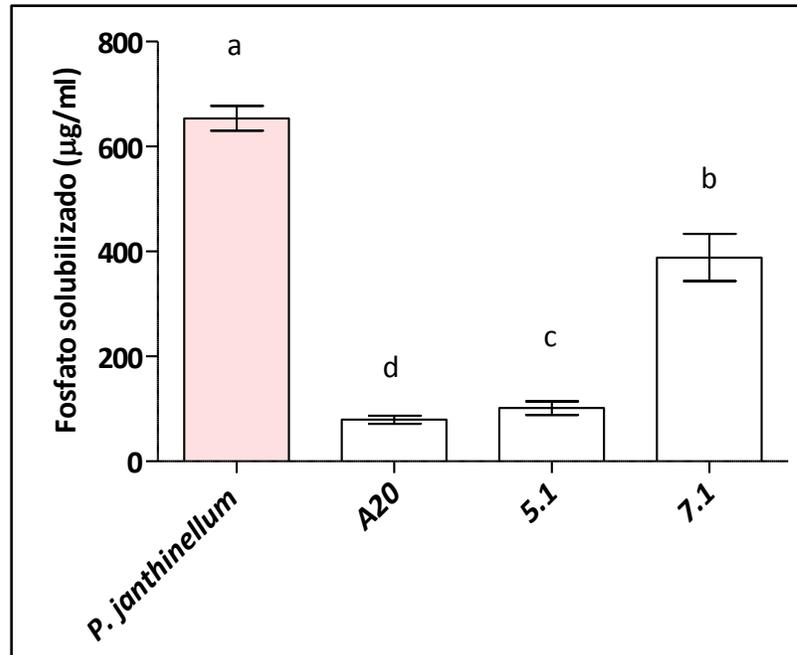
**Figura 4-4: Determinación cualitativa de solubilización de fosfatos. Los medios corresponden a Nbrip (A-D) y SRS (E) suplementados con fosfato tricálcico como fuente insoluble de fósforo. A. A20, B. 7.1, C. 5.1, D. *Penicillium janthinellum*. En cada caso una colonia individual de cada microorganismo fue sembrada en el centro de la caja o en los extremos correspondientes en SRS.**



Para resolver la duda generada sobre la capacidad de estas cepas de solubilizar fosfatos se realizó una prueba cuantitativa en medio Nbrip líquido, en donde tras 5 días de incubación se medía la cantidad de fosfato libre en el medio por medio del Test de fosfatos sepectroquant® fósforo (pmb) de Merck; el **porcentaje de solubilización** se calculó de acuerdo a la fórmula:  $(\text{Fosfato solubilizado} / \text{Fosfato inicial del medio}) * 100$ .

Como resultado de este ensayo, se obtuvo que las cepas A20, 5.1 y 7.1 presentaron porcentajes de solubilización del 2,71%, 3,65% y 13,90% respectivamente, con concentraciones de fosfato libre de  $79,54 \pm 7,64$ ,  $101,5 \pm 12,93$  y  $388,5 \pm 44,92$   $\mu\text{g/ml}$  de medio (Figura 4-5).

**Figura 4-5: Determinación cuantitativa de solubilización de fosfato tricálcico.** El ensayo fue realizado en medio Nbrp con 5 días de incubación. Letras diferentes en las barras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).



A pesar de que ninguno de los aislamientos presentó un porcentaje de solubilización similar al del control positivo (porcentaje de solubilización 22,39%, fosfato libre en el medio  $654 \pm 23,78$  µg/ml), se puede resaltar el papel de 7.1 en estos ensayos. La prueba cuantitativa confirmó su capacidad solubilizadora, la cual representaría una característica clave para efectos de promoción de crecimiento tras la inoculación de esta cepa en plantas. Es pertinente aclarar que en este tipo de pruebas se obvia la cantidad de fósforo que para el momento de la medición ya ha sido consumido por el microorganismo, de aquí que pueda existir una sub estimación de la capacidad solubilizadora real de los aislamientos (Rodríguez & Fraga, 1999).

Para el caso de A20 y 5.1 se concluyó que estas cepas no presentan capacidad significativa para solubilizar fosfatos y que la presencia del halo naranja en el medio SRS para A20 podría corresponder a una reacción cruzada generada por la producción de otro tipo de compuestos que ocasionaron el descenso en el pH del medio con el consecuente viraje de color a amarillo.

### 4.2.3 Producción de Ácido 3 Indol acético (AIA).

La producción de AIA, como representante del grupo de las auxinas, reconocidas fitohormonas que regulan una amplia variedad de eventos fisiológicos en las plantas, ha sido descrito en diferentes microorganismos, particularmente aquellos que forman parte de la rizósfera de las plantas (Lin & Xu, 2013). La biosíntesis de AIA ha sido reportada en bacterias del género *Streptomyces* (Solans, *et al.*, 2011, Sadeghi, *et al.*, 2012, Lin & Xu, 2013), siendo esta característica de particular interés en la especie *S. scabies*, por su participación en el proceso patogénico que el microorganismo genera en tubérculos (Legault, *et al.*, 2011); sin embargo esta característica ha sido asociada también a efectos positivos observados tras la inoculación de algunas cepas de *Streptomyces* sobre plantas de trigo (Sadeghi, *et al.*, 2012, Yandigeri, *et al.*, 2012) y tomate (Verma, *et al.*, 2011), particularmente cuando las plantas están sometidas a condiciones de estrés.

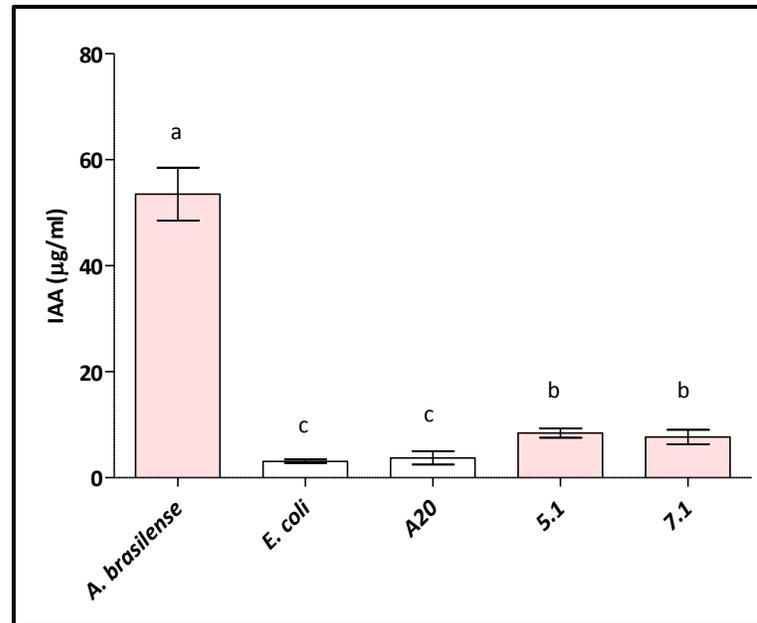
En el presente estudio, se evaluó cuantitativamente la producción de AIA en TBS suplementado con triptófano 60mM de acuerdo a la metodología descrita por Tang y Bonner (Tang & Bonner, 1947). Como resultado de este ensayo se obtuvo que los *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 produjeron  $3.73 \pm 1.28$ ,  $8.45 \pm 0.9$  y  $7.69 \pm 1.3$   $\mu\text{g}$  de AIA/ml respectivamente tras cinco días de incubación (Figura 4-6), sin embargo únicamente los aislamientos 5.1 y 7.1 presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo *E. coli*, el cual fue seleccionado en función de su baja productividad de este tipo de compuestos. En contraste, ninguno de los microorganismos evaluados presentó un comportamiento similar al del control positivo *A. brasilense* (AZPP010) el cual produjo  $53.53 \pm 5.0$   $\mu\text{g}$ /ml de AIA bajo las mismas condiciones de crecimiento.

Investigaciones previas desarrolladas con *Streptomyces* aislados de diferentes ambientes, que incluyen la rizósfera y endosfera de arroz, trigo y algunas plantas medicinales han demostrado que este género presenta una variabilidad importante con respecto a la cantidad de AIA que son capaces de producir, encontrando concentraciones desde 2.63  $\mu\text{g}$ /ml hasta 43.7  $\mu\text{g}$ /ml (Gopalakrishnan, *et al.*, 2011, Jog, *et al.*, 2012), con un efecto positivo constante sobre el crecimiento de las plantas inoculadas.

Es importante tener en cuenta que no necesariamente la producción *in vitro* de AIA va a reflejar lo que ocurre en interacción con la planta, esto se debe a que en los ensayos *In vitro* se incluye en el medio el precursor principal para la biosíntesis de esta fitohormona (Triptófano). *In vivo* la producción de AIA ha sido descrita como un proceso de retroalimentación en donde la planta aporta a los microorganismos el triptófano necesario

para la biosíntesis de AIA, de esta “comunicación” planta-microorganismo dependerá el efecto mediado por esta fitohormona sobre el crecimiento de la planta (Lambrecht, *et al.*, 2000).

**Figura 4-6: Cuantificación de la producción de AIA en TBS tras 5 días de incubación.** Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas  $p < 0.05$ . Las barras de color rosado presentaron diferencias significativas con respecto al control biológico negativo.

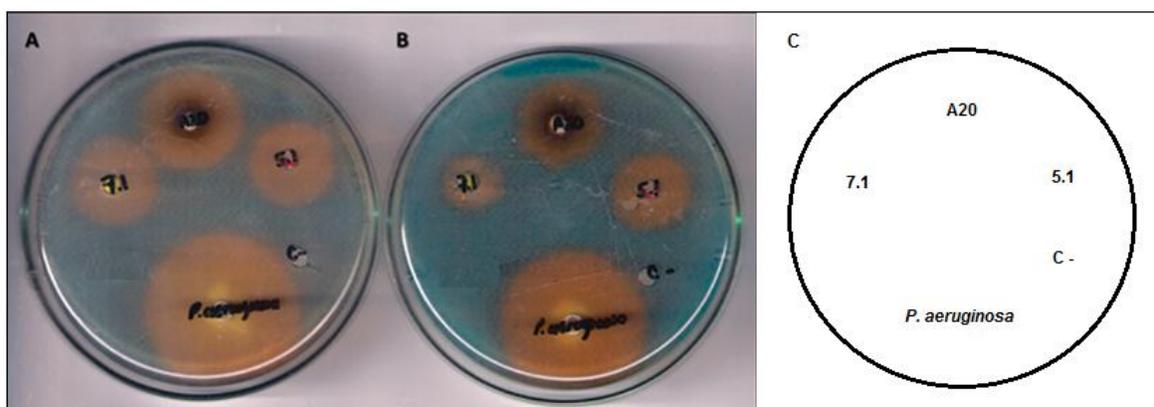


#### 4.2.4 Producción de sideróforos.

Las plantas requieren concentraciones de hierro en el rango de  $10^{-9}$  y  $10^{-4}$  M para tener un crecimiento normal (Loper & Buyer, 1991). Los mecanismos de captación de este elemento por parte de las plantas se basan en tres estrategias: (i) la acidificación de la rizósfera con lo cual se incrementa la solubilidad del hierro, (ii) la secreción de agentes quelantes de hierro conocidos como fitosideróforos o (iii) la captación de sideróforos microbianos presentes en el medio (Loper & Buyer, 1991). A pesar de que esta última estrategia es aun debatida en el mundo académico el rol de los sideróforos microbianos en procesos de control biológico de patógenos se ha estudiado ampliamente (Fones & Preston, 2013, Saha, *et al.*, 2013).

El método cualitativo de Chrome Azurol Blue (CAS) utilizado en este trabajo, permitió determinar que los tres aislamientos eran capaces de producir sideróforos en función de la aparición de halos naranja alrededor de las colonias sembradas en medio CAS (Figura 4-7). Es pertinente aclarar que esta prueba es preliminar e idealmente se debería corroborar la producción de estas moléculas por métodos cuantitativos que además permiten la identificación del tipo de sideróforos que se están generando (Radzki, *et al.*, 2013).

**Figura 4-7: Determinación cualitativa de producción de sideróforos en medio CAS.** Lectura realizada tras 48 horas de incubación. A. Cultivo realizado en medio M3.7, B. Cultivo realizado en ACA, C. Esquema de la prueba.



La producción de sideróforos en *Streptomyces* ha sido descrita en relación a procesos de biocontrol de patógenos por competencia de nutrientes (Doubou, *et al.*, 2001, Gopalakrishnan, *et al.*, 2011, Verma, *et al.*, 2011). Sin embargo, otras aplicaciones de estas moléculas en relación a su papel en promoción de crecimiento vegetal incluyen: el incremento de hierro disponible para plantas en ambientes carentes de este elemento (particularmente efectivo en plantas monocotiledóneas) (Radzki, *et al.*, 2013), la optimización en procesos de fitorremediación de metales (Dimkpa, *et al.*, 2009) y su participación en la reducción del efecto inhibitorio de algunos metales sobre la síntesis de auxinas (Dimkpa, *et al.*, 2008, Dimkpa, *et al.*, 2008). Por ello, el uso potencial de esta característica presente en los tres aislamientos de interés no debería restringirse a efectos de biocontrol o de captación de hierro para la planta huésped. Otras posibles aplicaciones en campos como la fitorremediación deberían ser exploradas con el objetivo de ampliar el rango de utilidad de las cepas de interés en el mercado agroindustrial.

#### 4.2.5 Producción de ACC deaminasa.

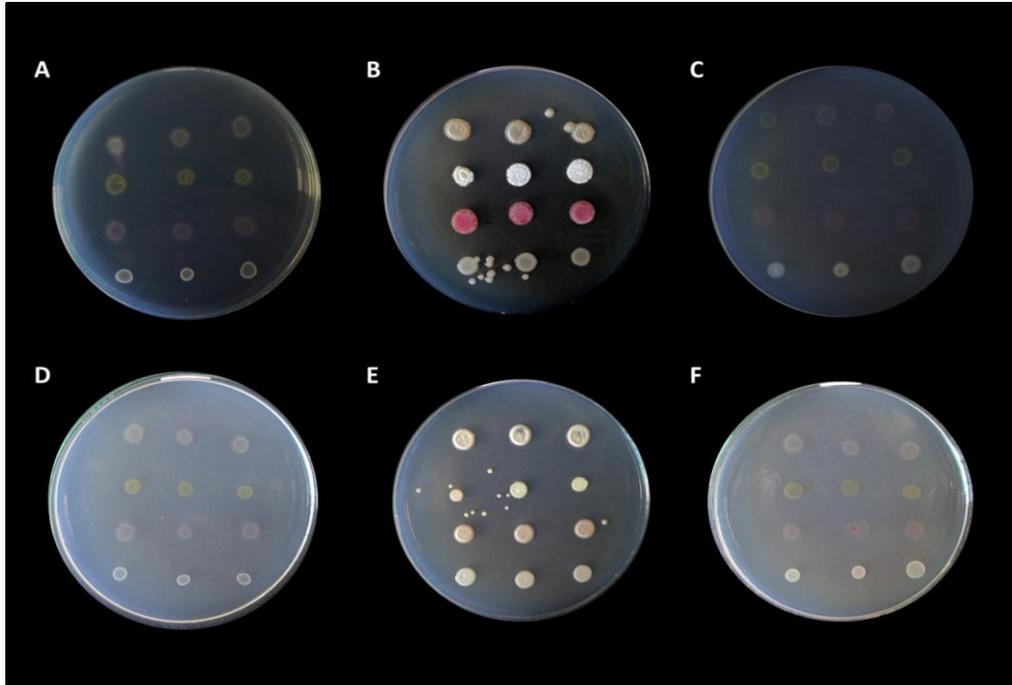
La producción de ACC deaminasa es un mecanismo de promoción que genera una reducción en las concentraciones de etileno en las plantas evitando buena parte de los efectos adversos que esta molécula genera en el desarrollo de las mismas (Penrose & Glick, 2001). El uso de microorganismos con esta capacidad, sería útil para el manejo del estrés en las plantas bajo condiciones de crecimiento poco favorables (Glick, *et al.*, 2007) y ha sido descrito previamente en bacterias del género *Streptomyces* (El-tarabily, 2008).

La evaluación de la producción de la enzima ACC deaminasa se llevó a cabo por un método cualitativo que mide de forma indirecta la producción enzimática por medio de la inoculación de los microorganismos de interés en el medio DF, desarrollado por Dworkin y Foster (1958) que contiene ACC como única fuente de nitrógeno, el crecimiento de los microorganismos en este medio es comparado con medios control que no contienen fuente de nitrógeno o que son suplementados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; el ensayo cuenta adicionalmente con un control biológico positivo (*B. unamae* MT1 641T), cuya capacidad de producción de ACC deaminasa ha sido previamente reportada (Caballero-Mellado, *et al.*, 2004).

El crecimiento observado de *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 en los medios DF sin nitrógeno y suplementados con ACC fue mínimo en comparación al medio suplementado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 4-8 A-C), de esto se concluye que ninguno de los aislamientos es capaz de producir la enzima ACC deaminasa y por ello no usan el ACC como fuente de nitrógeno. Para comprobar que esta observación fuera efectivamente resultado de la incapacidad de las cepas para producir la enzima, se decidió probar un segundo medio mínimo de sales (MM8) con las mismas características de los tres medios DF (sin nitrógeno o suplementado con ACC o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), obteniendo los mismo resultados que en el primer ensayo (Figura 4-8 D-F).

El crecimiento de los microorganismos apreciado en el control negativo (medio sin nitrógeno) y en el medio con ACC, pudo deberse al uso de agar bacteriológico estándar que contiene proteínas que serían usadas hasta cierto punto por los microorganismos para su crecimiento, sin embargo en ningún caso las colonias observadas en los medios suplementados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fueron comparables a las presentes en los otros dos medios, lo cual soporta la conclusión de que las tres cepas evaluadas no presentan actividad ACC deaminasa

**Figura 4-8: Determinación cualitativa de producción de ACC deaminasa.** A. Medio MM8, B. MM8 suplementado con  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , C. MM8 suplementado con ACC, D. Medio DF, E. DF suplementado con  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , F. DF suplementado con ACC. Orden de los microorganismos (de arriba hacia abajo en cada caja): A20, 7.1, 5.1 y *B. unamae* MT1 641T.



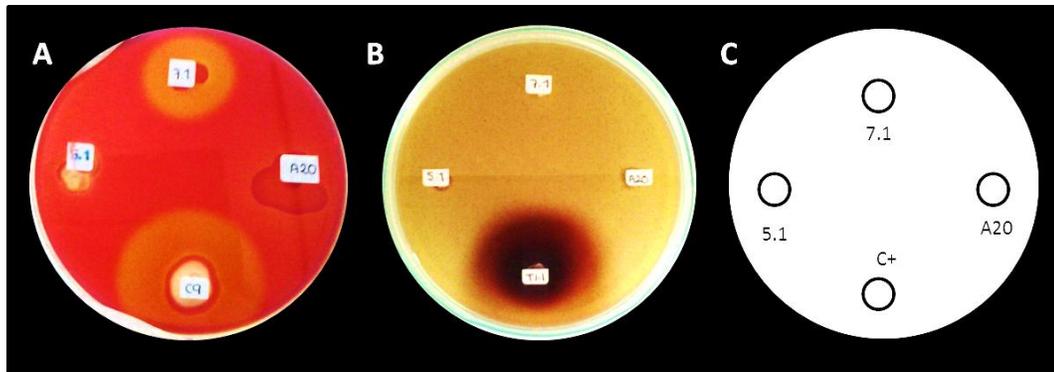
#### 4.2.6 Producción de enzimas extracelulares.

Las bacterias endófitas, poseen la capacidad de ingresar a los tejidos vegetales pasivamente (penetrando en sitios de emergencia de raíces laterales) o activamente mediante la producción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared de las células vegetales en concentraciones bajas que no generen efectos deletéreos en el huésped (Hasegawa, *et al.*, 2006, Maheshwari, *et al.*, 2012). La presencia o ausencia de estas enzimas no son factores incluyentes o excluyentes de un tipo de colonización, únicamente se consideran como puntos de apoyo que facilitan la adaptación de un microorganismo a diferentes ambientes y han sido observadas en alta abundancia y diversidad en el metagenoma de microorganismos endófitos de plantas como el arroz (Sessitsch, *et al.*, 2012).

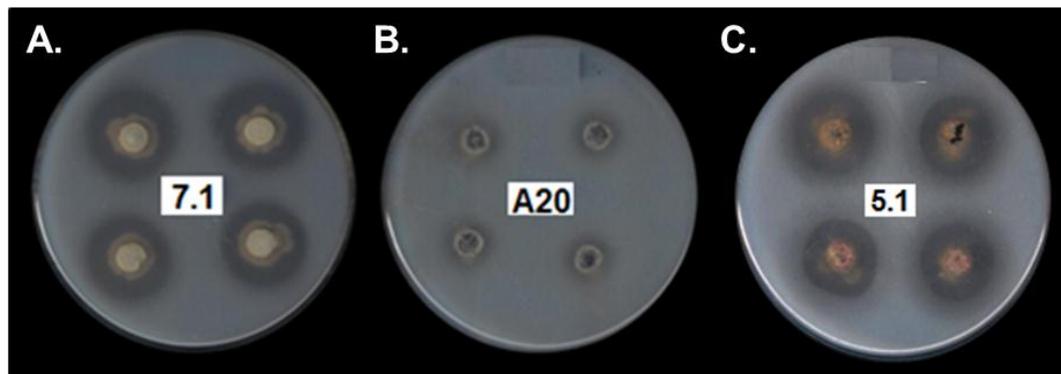
En el presente estudio se evaluó cualitativamente la producción de las enzimas celulasas (específicamente endoglucanasas), ligninasas y proteasas en los medios CMC, lignina y agar leche. En cada caso las variables de respuesta esperadas correspondían a la

formación de halos alrededor de las colonias producto de la degradación del sustrato correspondiente. Ninguno de los aislamientos evaluados presentó una reacción positiva en el medio lignina por lo cual se descarta que estos microorganismos sean productores de enzimas lignolíticas, por otra parte se evidenció que el aislamiento 7.1 posee actividad celulolítica y que las tres cepas en estudio muestran actividad proteolítica (Figura 4-9 y 4-10), estas características facilitarían a estos microorganismos (particularmente a 7.1) colonizar endofíticamente los tejidos vegetales de las plantas.

**Figura 4-9: Determinación cualitativa de producción de enzimas lignocelulosicas.** Las imágenes corresponden a: A. Celulasas totales (medio CMC), B. Enzimas lignolíticas (medio lignina), C. Esquema de la prueba.



**Figura 4-10: Determinación cualitativa de producción de proteasas.** La determinación de proteasas se realizó en agar leche tras 48 horas de incubación. Las imágenes corresponden a: A. 7.1, B. A20, C. 5.1.



El hallazgo de la capacidad de 7.1 para producir enzimas celulolíticas permitió que este aislamiento fuera postulado como una cepa de interés dentro del marco de otro proyecto de investigación centrado en la búsqueda de microorganismos con capacidad de degradar residuos lignocelulosicos para su aplicación en el tratamiento *in situ* de residuos de cosecha de cultivos de arroz.

#### 4.2.7 Promoción indirecta de crecimiento vegetal. Screening del potencial biocontrolador de los *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1.

Los microorganismos biocontroladores poseen la capacidad de proteger a las plantas de los efectos adversos generados por patógenos bacterianos, fúngicos e incluso nemátodos (Samac & Kinkel, 2001). El uso de estos microorganismos en campo permite generar un efecto protector al cultivo a largo plazo disminuyendo el impacto ambiental generado por los tratamientos químicos tradicionales (Emmert & Handelsman, 1999). Las pruebas de inhibición de crecimiento *in vitro* constituyen la primera línea de investigación establecida dentro del proceso de desarrollo de un bioinoculante con fines de biocontrol. Estas pruebas permiten establecer el rango de acción del microorganismo de interés y su efectividad frente al patógeno o patógenos objetivo.

En el presente estudio, se buscó establecer el rango de acción de los tres *Streptomyces* frente a diferentes cepas patógenas bacterianas y fúngicas, con el objetivo de evidenciar cuál de los aislamientos presentaba mejores características para ser propuesto como principio activo de un insumo biológico con capacidad biocontroladora. Las pruebas de antagonismo frente a cepas bacterianas demostraron que *Streptomyces* A20 y 5.1 presentan un amplio rango de acción (Tabla 4-3). A20 demostró ser la cepa con un espectro de actividad más amplio al generar inhibición de crecimiento en 20 de los 21 microorganismos evaluados. Por otra parte, 5.1 presentó actividad frente a 17 aislamientos encontrando en algunas cepas halos de inhibición mayores a los observados en el caso de A20 (Figura 4-11).

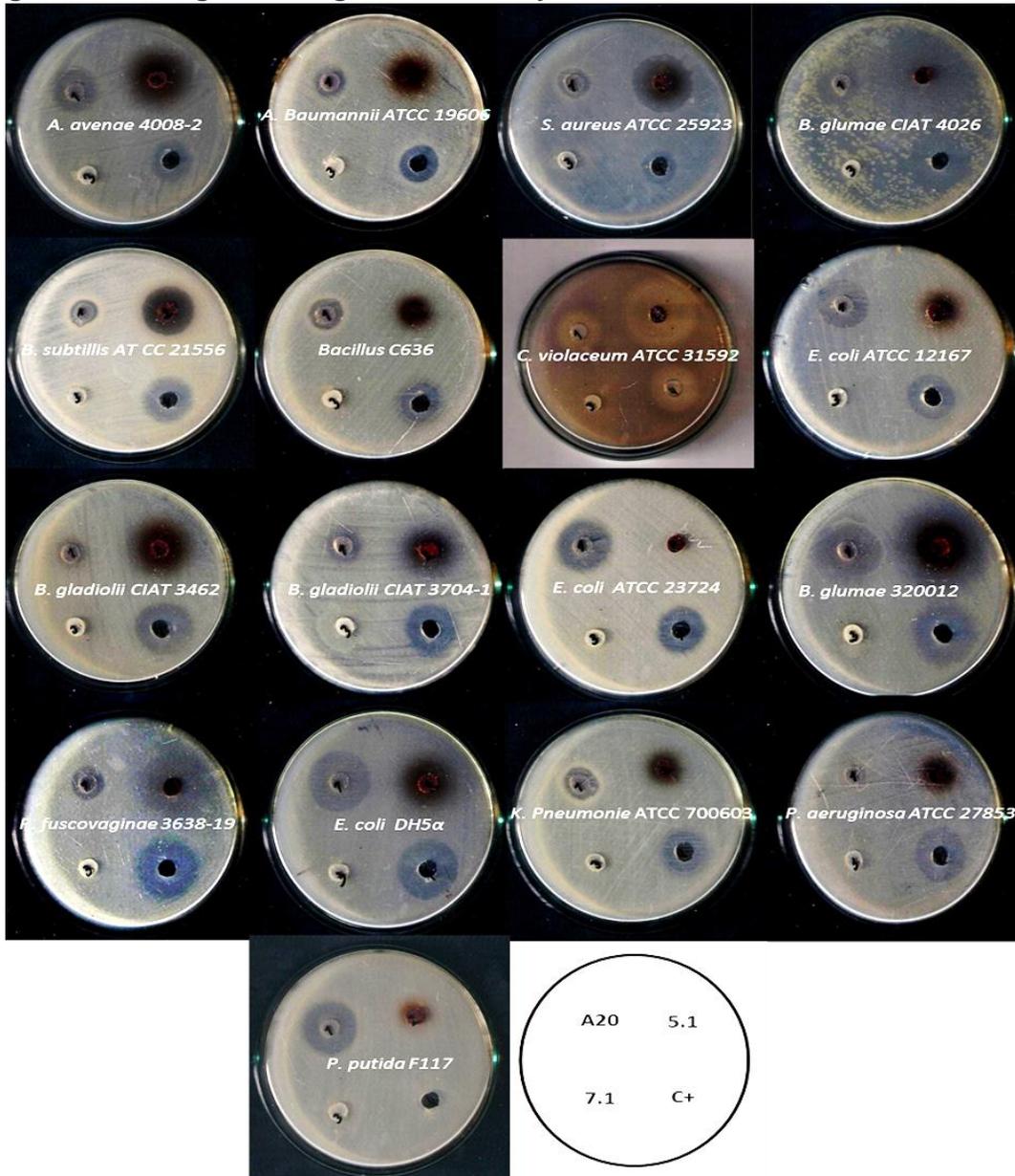
**Tabla 4-3: Actividad antibacteriana de *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1.** Diámetro promedio de inhibición (mm): (-) No se detecta inhibición, (+) 5-10mm, (++) 11-15mm, (+++) 16-20mm, (++++) > 20mm. Gm, Gentamicina.

MICROORGANISMO	Gm (0,2 µg/ml)	A20	5.1	7.1
<i>A. avenae</i> 4008-2	+	++	++	-
<i>A. baumannii</i> 19606	++	+	-	-
<i>Bacillus</i> C636	++	+	+	-
<i>B.subtillis</i> 21556	++	+	+++	-
<i>B. glumae</i> 320012	+++	+++	++++	-
<i>B. glumae</i> CIAT 4026	+++	++	+++	-
<i>B. gladiolii</i> 3704-1	+++	+	+++	-
<i>B. gladiolii</i> 3962	+++	+	++	-
<i>C. violaceum</i> 31592	++	++	++++	-
<i>E. aerogenes</i> 7ARG	-	+	-	-
<i>E. cloacae</i> 19344	+	+	+++	-

Tabla 4-3: Actividad antibacteriana de *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1. Continuación.

MICROORGANISMO	Gm (0,2 µg/ml)	A20	5.1	7.1
<i>E. coli</i> 12167	+++	+++	++	-
<i>E. coli</i> DH5α	+++	+++	++	-
<i>E. coli</i> 23724	++	+++	-	-
<i>E. coli</i> 25922	++	++	+	-
<i>K. pneumoniae</i> 700603	++	+	++	-
<i>P. putida</i> F11PQRC12	-	+++	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 27853	+++	-	++	-
<i>P. fuscovaginae</i> 3638-19	++	+	++++	-
<i>P. fuscovaginae</i> 3668π3	+++	+	++	-
<i>S. aureus</i> 25923	+	+	+++	-

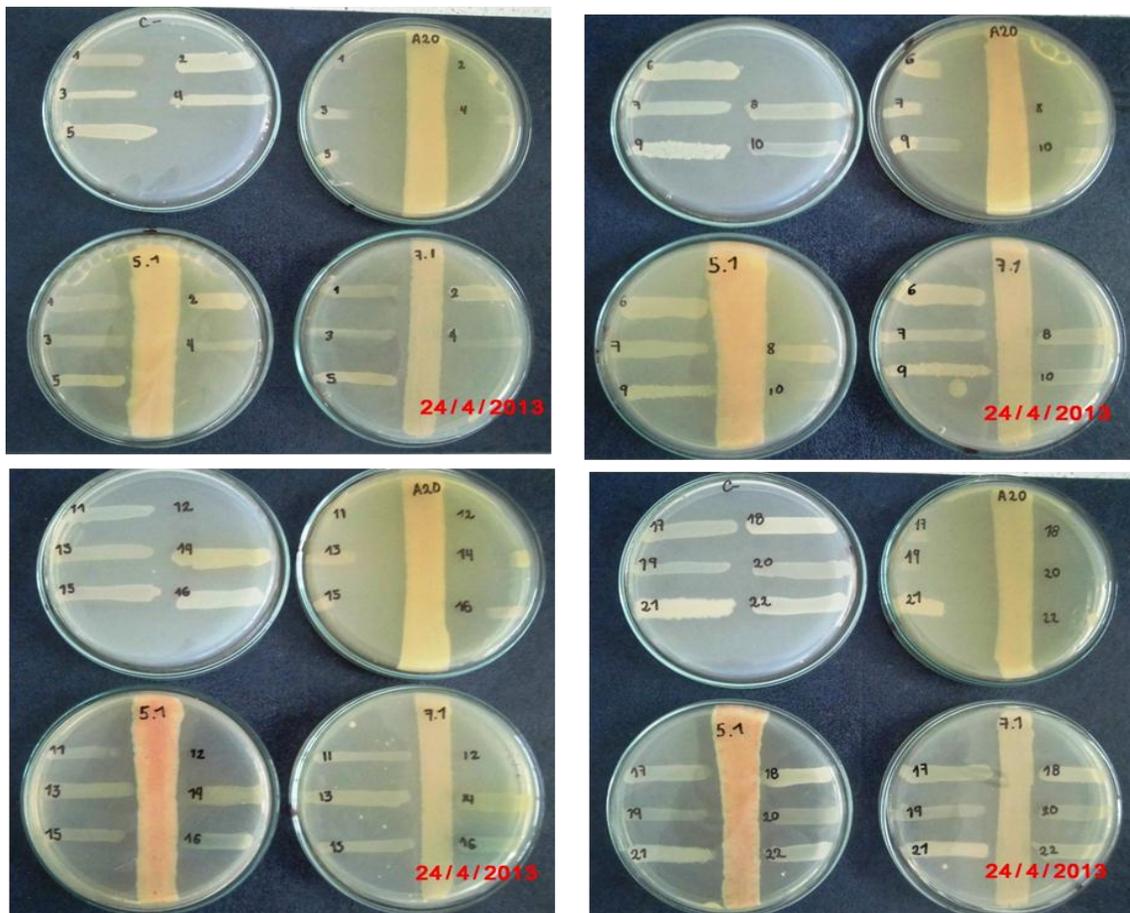
Figura 4-11: Registro fotográfico de ensayos de actividad antibacteriana.



El aislamiento 7.1 no mostró ninguna actividad antibacteriana en los ensayos realizados, sin embargo de acuerdo con los antecedentes del grupo esta cepa fue seleccionada por presentar actividad frente a *B. glumae*, debido a esta discrepancia entre los resultados se decidió montar un segundo ensayo de enfrentamiento en placa, en el cual cada uno de los *Streptomyces* fueron sembrados en línea recta en agar MH e incubados por 5 días a 30°C, transcurrido este tiempo se sembraron en forma horizontal los microorganismos usados en la anterior prueba y el medio fue incubado durante 24 horas adicionales. Al finalizar el periodo de incubación se verificó el crecimiento de cada microorganismo comparándolo con un control en el cual no se había sembrado A20, 5.1 o 7.1. Como resultado, se obtuvo que 7.1 redujo el crecimiento en dos cepas de *B. gladiolii* (31704-1 y 3462), sin embargo no se logró reproducir su efecto sobre *B. glumae* (Figura 4-12).

**Figura 4-12: Ensayo de actividad antibacteriana mediante enfrentamiento directo**

**en placa.** 1. *C. violaceum* 31592, 2. *K. pneumoniae* 700603, 3. *B. gladiolii* 3704-1, 4. *B. gladiolii* 3462, 5. *P. putida* F11PQRC12, 6. *A. baumannii* 19606, 7. *A. avenae* 4008-2, 8. *E. aerogenes* 7ARG, 9. *E. cloacae* 19344, 10. *S. aureus* 25923, 11. *B. glumae* 320012, 12. *B. glumae* CIAT 4026, 13. *P. fuscovaginae* 3638-19, 14. *P. fuscovaginae* 3668π3, 15. *P. fuscovaginae* UPB 0736, 16. *P. aeruginosa* 27853, 17. *E. coli* 25922, 18. *E. coli* 23724, 19. *E. coli* DH5α, 20. *E. coli* 12167, 21. *B. subtilis* 21556, 22. *Bacillus* C636.



Teniendo en cuenta que el eje central del proyecto de investigación del que forma parte este estudio es el aislamiento de cepas potenciales capaces de controlar el patógeno *B. glumae*, y que los ensayos de antagonismo mostraron resultados importantes para los aislamientos A20 y 5.1, se realizó un tercer ensayo de actividad antibacteriana frente a un cepario de aislamientos sugestivos de *B. glumae* provenientes de plantas de arroz sintomáticas en el año 2011, los cuales fueron facilitados por el equipo de investigación y diagnóstico de FEDEARROZ. En este ensayo se obtuvo un patrón de actividad similar al observado en la prueba de difusión en placa. A20 presentó actividad antagónica frente a 43 de 47 cepas evaluadas, 5.1 frente a 37 y 7.1 no presentó actividad (Tabla 4-4).

**Tabla 4-4: Actividad antibacteriana de *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 frente a la colección de cepas FEDEARROZ 2011.** Diámetro promedio de inhibición (mm): (-) No se detecta inhibición, (+) 5-10mm, (++) 11-15mm, (+++) 16-20mm, (++++) > 20mm. Gm, Gentamicina

CEPA	Gm (0,2 µg/ml)	A20	5.1	7.1	CEPA	Gm (0,2 µg/ml)	A20	5.1	7.1
1A1	+++	+++	++++	-	26C	++	+++	+	-
2 <sup>a</sup>	+++	+++	++++	-	27C	++	++	+++	-
3 <sup>a</sup>	++	++	++++	-	28C	++	+++	+++	-
4 <sup>a</sup>	+++	+++	-	-	29B	++++	+++	++++	-
5 <sup>a</sup>	+++	+++	++++	-	30C	+++	++	++++	-
6 <sup>a</sup>	++	++++	-	-	31C	+++	++	++++	-
7 <sup>a</sup>	++	+++	+++	-	32C	+++	+++	++++	-
8 <sup>a</sup>	-	-	-	-	33C	+++	++++	++++	-
9 <sup>a</sup>	+	++	-	-	34C	+++	++++	++++	-
10 <sup>a</sup>	++	+++	+++	-	35C	+++	++	++++	-
12B	+	++	-	-	36D	+++	++	-	-
13B	+++	++++	++++	-	37D	++	++	++	-
14B	+++	+++	++++	-	38D	++	++	+	-
15B	+++	+++	++++	-	39D	++	++	+++	-
16B	+++	+++	++++	-	40D	++	+++	+++	-
17B	+++	+++	++++	-	41D	-	+	-	-
18B	+++	+++	-	-	43D	++	+++	+++	-
19B	++++	++++	++++	-	44B	++	+++	++++	-
20B	+++	+++	++++	-	47E	++	++++	++++	-
21B	+++	+++	-	-	48E	+++	+++	++++	-
22B	++	+++	+	-	49E	+++	++	++++	-
23B	-	+++	+	-	51E	-	-	++++	-
24C	++	+++	++++	-	52E	-	-	++++	-
25C	+++	++++	-	-					

Es importante tener en cuenta que cada una de las cepas de *B. glumae* utilizadas en este ensayo presentaban en campo diferentes escalas de patogenicidad siendo aisladas de diferentes zonas arroceras afectadas por la enfermedad del añublo bacteriano. El resultado obtenido con A20 y 5.1 resulta particularmente prometedor ya que su eficiencia en el control de estas cepas es constante por lo cual se esperaría que su comportamiento en campo fuera similar y el efecto sobre el control de cepas patógenas de *B. glumae* fuera eficiente y reproducible en diferentes zonas del país

En los ensayos de actividad antimicrobiana se demostró además, que los tres *Streptomyces* presentaban actividad anti fúngica frente a diferentes aislamientos de hongos fitopatógenos, resaltando una vez más los resultados obtenidos con A20 y 5.1 los cuales lograron tener un efecto antagónico contra todas las cepas fúngicas probadas. En este caso, el aislamiento 7.1 consiguió controlar a 5 de los 9 aislamientos fúngicos siendo particularmente efectivo contra las cepas de *Colletotrichum spp.* (Tabla 4-5, Figura 4-13).

**Tabla 4-5: Actividad antagónica generada por los *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 frente a 9 cepas fúngicas fitopatógenas mediante enfrentamiento directo en placa.**

(+) Presencia de zona de inhibición. (-) Ausencia de zona de inhibición.

CEPA	A20	5.1	7.1
<i>Fusarium DC9</i>	+	+	-
<i>Fusarium DC 13B</i>	+	+	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+
<i>Gaeumannomyces sp</i>	+	+	+
<i>Phomopsis sp.</i>	+	+	-
<i>Ullocladium sp.</i>	+	+	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	+	-
<i>Colletotrichum 24C</i>	+	+	+
<i>Colletotrichum 26B</i>	+	+	+

**Figura 4-13: Ensayos de actividad antifúngica.**

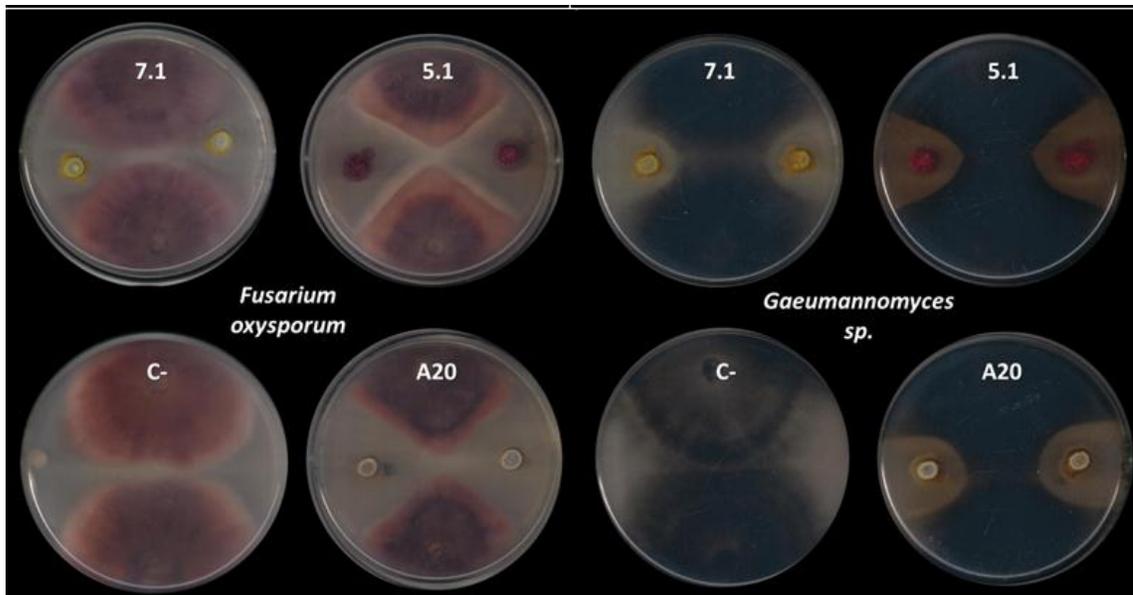
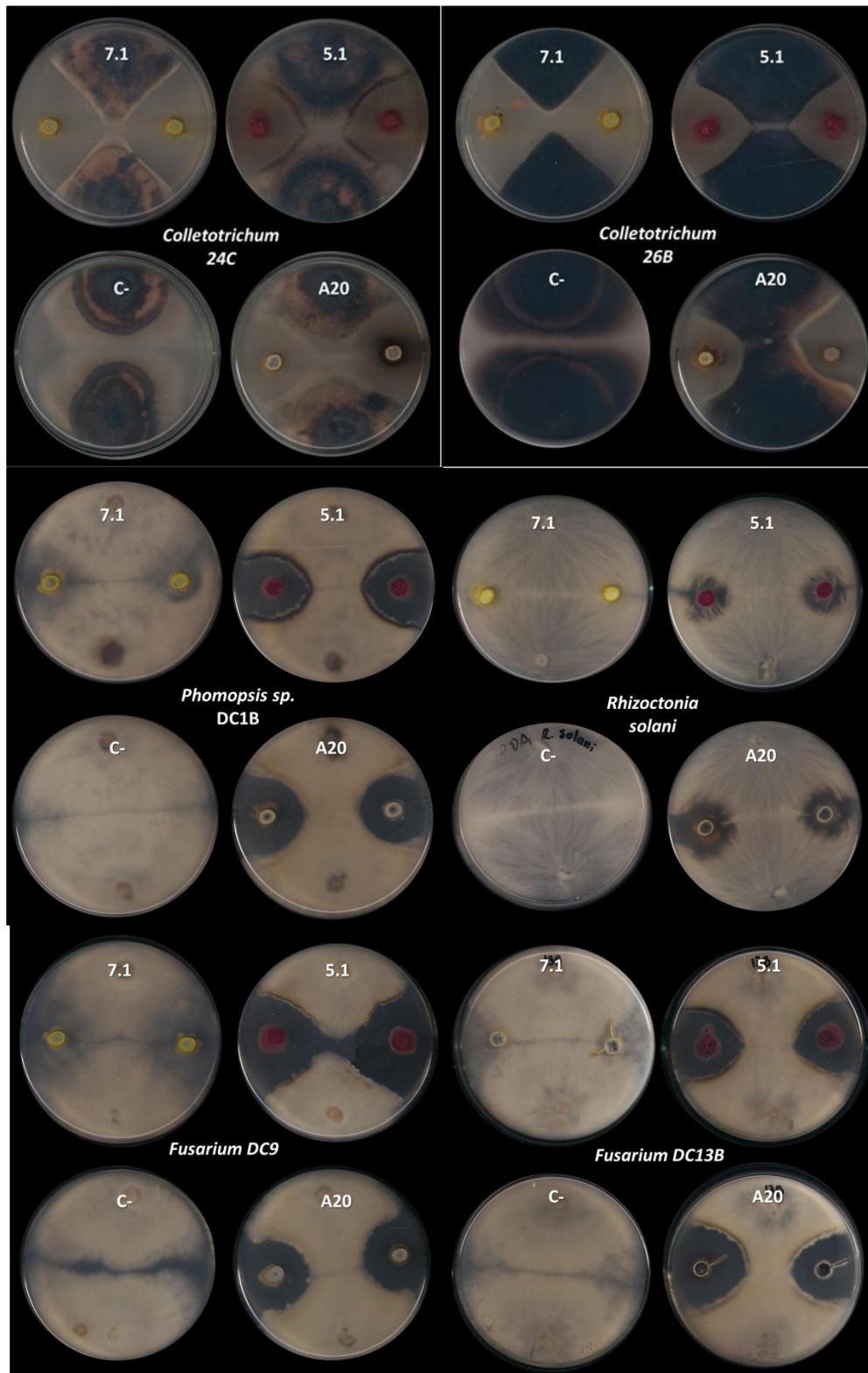


Figura 4-13: Ensayos de actividad antifúngica. Continuación.



Diferentes especies de *Streptomyces* como *S. sindeneusis*<sup>263</sup>, *S. griseofuscus*, *S. hygrosopicus*, *S. globisporus*, *S. aureus*, *S. albosporus* entre otras han sido evaluadas para el control biológico de una amplia variedad de patógenos con resultados prometedores para su aplicación en campo particularmente frente a hongos fitopatógenos como *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri*, *Rhizoctonia solani*, *R. bataticola* *Magnaporthe grisea*, *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* y *Magnaporthe oryzae* (Emmert & Handelsman, 1999, Samac & Kinkel, 2001, Taechowisan, *et al.*, 2003, Tian, *et al.*, 2004, Zarandi, *et al.*, 2009, Gopalakrishnan, *et al.*, 2011, Patil, *et al.*, 2011, Kanini, *et al.*, 2013). Los mecanismos de acción asociados a la capacidad biocontroladora característica de este género bacteriano incluyen antibiosis, competencia por nutrientes, producción de enzimas degradadoras de pared celular, producción de óxido nitroso y *Quorum quenching* (Kinkel, *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta que en los resultados obtenidos se observa un claro efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos generado posiblemente por un compuesto con capacidad de difundirse por el medio, se propone la producción de antibióticos como mecanismo de biocontrol en los aislamientos A20, 5.1 y 7.1. Las referencias al amplio espectro de producción de sustancias antimicrobianas descritas para este género bacteriano resaltan la diversidad metabólica de *Streptomyces* y soportan la hipótesis sobre el mecanismo de acción antagónico de estos aislamientos (Chater, 2006, Hasegawa, *et al.*, 2006, Chater, *et al.*, 2010, Kinkel, *et al.*, 2012).

Es interesante observar que los tres *Streptomyces* presentan rangos de acción diferentes, esto sugiere que cada uno de los aislamientos produce sustancias antimicrobianas particulares, por ello su aplicación en biocontrol sería más amplia y sus usos podrían abarcar un gran número de plantas huésped. Sin embargo, se ha encontrado que la eficiencia de algunos *Streptomyces* para controlar diferentes fitopatógenos es inconsistente entre los resultados obtenidos *in vitro* y lo observado en aplicaciones en campo (Leisso, *et al.*, 2009, Kinkel, *et al.*, 2012). Tales inconsistencias han sido asociadas a los procesos de colonización y crecimiento en suelo (o superficie) de los *Streptomyces* una vez han sido inoculados (Ryan & Kinkel, 1997). Por esta razón es recomendable verificar mediante experimentos *in vivo* el comportamiento de las cepas biocontroladoras en términos de persistencia en el ambiente y eficiencia de control del patógeno de interés.

Los productos *Mycostop*® de la empresa finlandesa Kemira Agro Oy y *Phytolavin-30*® de *NBC Pharmbiomed* (Rusia) cuyo principio activo son *S. griseoviridis* K61 y *S. lavengulata/S. griseus* respectivamente, son dos ejemplos de inoculantes biológicos basados en *Streptomyces* que se distribuyen como biocontroladores para el mercado agrícola y cuya eficiencia ha sido comprobada en campo. Los resultados obtenidos del

screening de actividad antimicrobiana de los tres aislamientos demuestran que tanto *Streptomyces* A20 como *Streptomyces* 5.1 son candidatos óptimos para la formulación de un biocontrolador e idealmente se esperaría desarrollar con estas cepas un producto similar a lo ejemplos anteriormente mencionados.

### **4.3 Capacidad de colonización de la rizósfera y la endosfera de plantas de arroz (Objetivo 2).**

Con el objetivo de evaluar la capacidad de colonización de las cepas A20, 5.1 y 7,1 *in vivo*, se llevaron a cabo dos experimentos independientes, usando en ambos casos las variedades de arroz Fedearroz 60 y Fedearroz 733. El primer ensayo, evaluó la interacción planta – *Streptomyces* en condiciones gnotobióticas usando el medio Hoagland semisólido como matriz. En el segundo experimento, usando suelo como matriz, se pretendía evaluar la capacidad de colonización de los tres aislamientos en un medio complejo que simula en pequeña escala la situación que se presentaría bajo condiciones de campo. En este ensayo se verificó la presencia de los aislamientos en: suelo rizosférico, superficie de la raíz (rizoplano) y endosfera de la planta.

#### **4.3.1 Ensayo de colonización en condiciones gnotobióticas.**

Como se observa en la tabla 4-6, en condiciones gnotobióticas todos los *Streptomyces* fueron aislados del rizoplano de las plantas evaluadas, lo cual indica que las tres cepas pudieron adherirse a la superficie de la raíz de las plantas inoculadas en las dos variedades empleadas, bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

*Streptomyces* 5.1 no fue aislado como endófito en ningún fragmento de las plantas de arroz procesadas (raíz, tallo y hoja) para ambas variedades, por lo cual se concluye que este microorganismo no es endófito y su colonización se limita al rizoplano de las plantas de arroz, en el periodo de tiempo evaluado.

*Streptomyces* A20 fue re-aislado del interior de las muestras de raíz esterilizadas superficialmente en ambas variedades sugiriendo que este microorganismo es capaz de colonizar la endosfera de la raíz en plantas de arroz. Adicionalmente, A20 se encontró en algunas de las muestras del fragmento de 2cm del tallo en F60 y F733 (20% y 16.6% de

las muestras procesadas respectivamente). Teniendo en cuenta el bajo porcentaje de aislamiento de A20 en este fragmento se propone que la aparición de la cepa en el tallo corresponde a un evento aleatorio y no a un comportamiento habitual del aislamiento.

En el caso de la cepa 7.1, se obtuvo crecimiento en todas las muestras procesadas de la raíz en la variedad 60 y en el 83.3% de las muestras de esta sección en la variedad 733. Estos resultados indican que 7.1 también tiene el potencial de colonizar endofíticamente la raíz de las plantas de arroz.

Se debe tener en cuenta que para la clasificación de un microorganismo como endófito es necesario realizar la confirmación del tipo de colonización del microorganismo por medio de técnicas microscópicas, en este caso para los aislamientos A20 y 7.1 (Hasegawa, *et al.*, 2006, Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006, Turner, *et al.*, 2013). Para ello, deben generarse mutantes marcados con proteínas fluorescentes, con el objetivo de evaluar microscópicamente el comportamiento de las cepas tras su inoculación en planta. En el presente proyecto de investigación se inició con este ensayo realizando el marcaje con proteína verde fluorescente (EGFP) de la cepa de *Streptomyces* A20 mediante la inserción en el genoma del plasmido pIJ8641 (Anexo F). Esta mutante fue evaluada para verificar su funcionalidad en pruebas piloto *in vivo*, Sin embargo, deberá ser evaluada en experimentos *in vivo* con plantas de arroz para realizar el seguimiento mediante microscopia confocal del proceso de colonización y la confirmación del endofitismo de esta cepa en arroz.

**Tabla 4-6: Colonización de las variedades colombianas de arroz Fedearroz 60 y Fedearroz 733 por las cepas de *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 en Hoagland semisólido.** Los datos presentados en rojo no se reprodujeron en el total de muestras procesadas. Letras diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

	Aislamiento superficial	Endósfera (UFC/g peso fresco)		
	Rizoplano	Raíz	2cm	Hoja
A20 (733)	+	$1.65 \times 10^2 \pm 0.18$ a	$1 \times 10^4$	-
A20 (60)	+	$3.43 \times 10^2 \pm 0.40$ a	$1 \times 10^2$	-
7.1 (733)	+	$4.93 \times 10^2 \pm 0.3$ a	-	-
7.1 (60)	+	$1.7 \times 10^3 \pm 0.172$ b	-	-
5.1 (733)	+	-	-	-
5.1 (60)	+	-	-	-

Se ha descrito que la densidad poblacional de los microorganismos rizosféricos o endófitos varía dependiendo de diversos factores. La especie bacteriana, el genotipo de la planta huésped y su estadio fenológico son los elementos más influyentes en la composición de la comunidad microbiana. (Pillay & Nowak, 1997, Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). La influencia del genotipo y el estadio fenológico de la planta huésped sobre las comunidades bacterianas se asocia con la cantidad y composición de los exudados que se secretan al medio (Dennis, *et al.*, 2010).

Estadísticamente, los recuentos encontrados en las muestras de raíz del aislamiento 7.1 para la variedad sesenta fueron significativamente mayores al ser comparados con su contraparte en F733 y con los recuentos de la cepa A20 en F60, lo cual sugeriría la existencia de un mayor tropismo de la cepa 7.1 por la variedad F60. Considerando que en los ensayos gnotobióticos realizados en la presente investigación, el estadio fenológico para todas las plantas era el mismo al momento de procesar las muestras y que el aislamiento 7.1 en la variedad 733 no mostró diferencias significativas con respecto a la cepa A20, se propone que sea el genotipo de las plantas de arroz el que esté influyendo para generar un mayor tropismo de la cepa 7.1 por F60. Este comportamiento posiblemente este asociado a alguna diferencia en los exudados secretados por ambas variedades de arroz. Tales diferencias ya han sido evaluadas en la investigación desarrollada por Aulakh y colaboradores, en donde se demostró que tanto la cantidad de exudados como la composición de los mismos variaban significativamente entre diez diferentes variedades de arroz (*Oryza sativa*) (Aulakh, *et al.*, 2001).

El hallazgo de bacterias del género *Streptomyces* como *S. cyaneus*, *S. lanatus* y *S. galilaeus* y otras actinobacterias como endófitos de plantas de arroz fue reportado previamente en las investigaciones realizadas por Tian y colaboradores (2004 y 2007) y Knief y colaboradores (2012). Ambos autores reportaron que la diversidad de endófitos encontrados en las raíces de arroz era superior al hallado en otras partes de la planta (Tian, *et al.*, 2004, Tian, *et al.*, 2007, Knief, *et al.*, 2012), lo cual coincide con los resultados encontrados en la presente investigación, en donde la raíz fue la única zona de la planta con colonización endófito.

#### **4.3.2 Ensayo de colonización en suelo.**

A excepción de 5.1 en la variedad F60, los demás aislamientos fueron re-aislados de la superficie de la raíz de las plantas sin esterilizar como se observa en la Tabla 4-8; este mismo aislamiento en la variedad F60 presentó la menor concentración en suelo rizosférico de todos los tratamientos evaluados. Esta observación sugiere que la colonización del rizoplano es efectiva cuando una concentración de inóculo mínima se encuentra en el suelo y que las bacterias predominantes en estos nichos son aquellas

que poseen la capacidad de colonizar eficientemente lugares específicos (rizósfera o rizoplano) en donde la posibilidad de captar nutrientes necesarios para sobrevivir es mayor (Prashar, *et al.*, 2013).

La mayor concentración bacteriana en suelo rizosférico se halló en las plantas de arroz variedad F733 tratadas con *Streptomyces* 7.1, seguido por A20 (F733 y F60), 7.1 (F60) y 5.1 (F733) los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos. La adaptabilidad de la cepa 7.1 al ambiente del suelo, podría ser el factor clave en el incremento de UFC encontradas con respecto a los demás tratamientos, tal comportamiento probablemente sea reflejo de un complejo sistema metabólico característico del género *Streptomyces* (Chater, *et al.*, 2010), que le permite a la cepa ser competente en este ambiente.

**Tabla 4-7: Colonización en suelo de las variedades colombianas de arroz Fedearroz 60 y Fedearroz 733 por las cepas de *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 en suelo.** Letras diferentes en una misma columna muestran diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

	Rizoplano	Rizósfera (UFC/g suelo)	Endosfera (UFC/g Peso seco)		
			Raíz	2cm	Hoja
<b>A20 (733)</b>	+	$1.66 \times 10^6 \pm 0.21$ a	-	-	-
<b>A20 (60)</b>	+	$1.3 \times 10^6 \pm 0.43$ a	-	-	-
<b>7.1 (733)</b>	+	$4.23 \times 10^6 \pm 0.68$ c	-	-	-
<b>7.1 (60)</b>	+	$7.8 \times 10^5 \pm 1.17$ a,b	-	-	-
<b>5.1 (733)</b>	+	$2.13 \times 10^6 \pm 0.32$ a	-	-	-
<b>5.1 (60)</b>	-	$4.9 \times 10^4 \pm 2.8$ b	-	-	-

Se debe tener en cuenta que la capacidad de colonización y permanencia de una cepa promisorias en el ambiente rizosférico es un factor clave para que el microorganismo sea capaz de promover eficientemente el crecimiento de la planta de interés. La investigación realizada por El-Tarabily en 2008, comprobó que los aislamientos *S. filipinensis* no. 15 y *S. atrovirens* no. 26 generaban un efecto positivo significativo sobre el crecimiento de plantas de tomate tratadas. Estos aislamientos presentaban características como promotores de crecimiento vegetal similares, y demostraron ser capaces de colonizar eficientemente la raíz de las plantas de tomate. En contraste *S. albobinaceus* no 41 el cual no mostró capacidad para colonizar las raíces, tuvo un efecto significativamente menor al encontrado con los otros dos aislamientos sobre el crecimiento de las plantas. Estos resultados indican la importancia que tiene la capacidad de colonización rizosférica sobre los resultados de promoción de crecimiento.

Por último, la verificación de colonización endofítica en las plantas cultivadas en suelo fue negativa para todos los *Streptomyces* en ambas variedades a diferencia de lo obtenido en el medio gnotobiótico, demostrando que en matrices como el suelo, el proceso de colonización es más complejo, lo cual es asociado a la cantidad de interacciones planta-microorganismo y microorganismo-microorganismo que se dan en estos ambientes, siendo en el segundo caso de particular importancia la competencia por nichos y nutrientes (Hibbing, *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren la necesidad de re-evaluar el proceso de colonización durante un tiempo de crecimiento de la planta superior a los 31 días evaluados en el ensayo, teniendo en cuenta que en una matriz tan compleja como el suelo es posible que el proceso de colonización endófito sea más lento que el observado en el medio gnotobiótico. Adicionalmente, estos experimentos de aislamiento de endófitos pueden complementarse con metodologías de seguimiento microscópicas tal y como se planteó en el apartado anterior.

#### **4.4 Promoción de crecimiento en plantas de arroz (Objetivo 3).**

Las bacterias del género *Streptomyces* han sido ampliamente estudiadas en el campo agroindustrial, dadas sus características de colonización en diversos ambientes, su potencial biocontrolador, su diversidad metabólica y su capacidad para solubilizar fosfatos y producir compuestos como fitohormonas y ACC deaminasa (Tokala, *et al.*, 2002, El-tarabily, 2008, Chater, *et al.*, 2009, Flardh & Buttner, 2009, El-tarabily, *et al.*, 2010, Franco - Correa, *et al.*, 2010, Hayat, *et al.*, 2010, Verma, *et al.*, 2011, Jog, *et al.*, 2012, Yandigeri, *et al.*, 2012). Su uso como promotores de crecimiento vegetal ha sido evaluado con éxito en plantas de tomate (El-tarabily, 2008), trigo (Verma, *et al.*, 2011, Jog, *et al.*, 2012, Sadeghi, *et al.*, 2012, Yandigeri, *et al.*, 2012), pepino cohombro (El-tarabily, *et al.*, 2010) entre otros. En la presente investigación se usó como planta objetivo el arroz (variedad F60 y F733), evaluando el efecto de los tres *Streptomyces* de interés sobre el crecimiento y desarrollo temprano de estas plantas bajo dos condiciones de crecimiento, con el objetivo de determinar si estas cepas *in vivo* presentan la capacidad de promover el crecimiento vegetal. Los datos obtenidos de estos experimentos se presentan en el Anexo G. Teniendo en cuenta que los datos obtenidos en algunos de los tratamientos evaluados en las dos replicas realizadas para cada variedad de arroz en los ensayos gnotobióticos eran estadísticamente diferentes, se decidió presentar sus resultados como réplica uno y replica dos para cada variedad.

#### 4.4.1 Promoción de crecimiento en medio gnotobiótico.

- Variedad Fedearroz 60.

Como se observa en las figuras 4-16, 4-17 y 4-18, la inoculación de A20 en plantas de arroz F60, dio como resultado un incremento significativo en términos de longitud, peso fresco y peso seco de la planta, este efecto se reprodujo en las dos réplicas que se realizaron del ensayo. Así mismo, la cepa 7.1 mostró un efecto positivo sobre el peso fresco y seco de planta en el primer experimento. Sin embargo, tal comportamiento no se repitió en el segundo ensayo. El aislamiento 5.1 no mostró ningún efecto positivo en los ensayos realizados. Se evidenció que este microorganismo genera un efecto negativo sobre la longitud de las raíces de las plantas tratadas bajo las condiciones empleadas; tal efecto se observó también en A20 y en los tratamientos control: M3.7 y *A. chroococcum* en la primera réplica del ensayo y en 7.1 y *A. brasilense* en las réplicas 1 y 2.

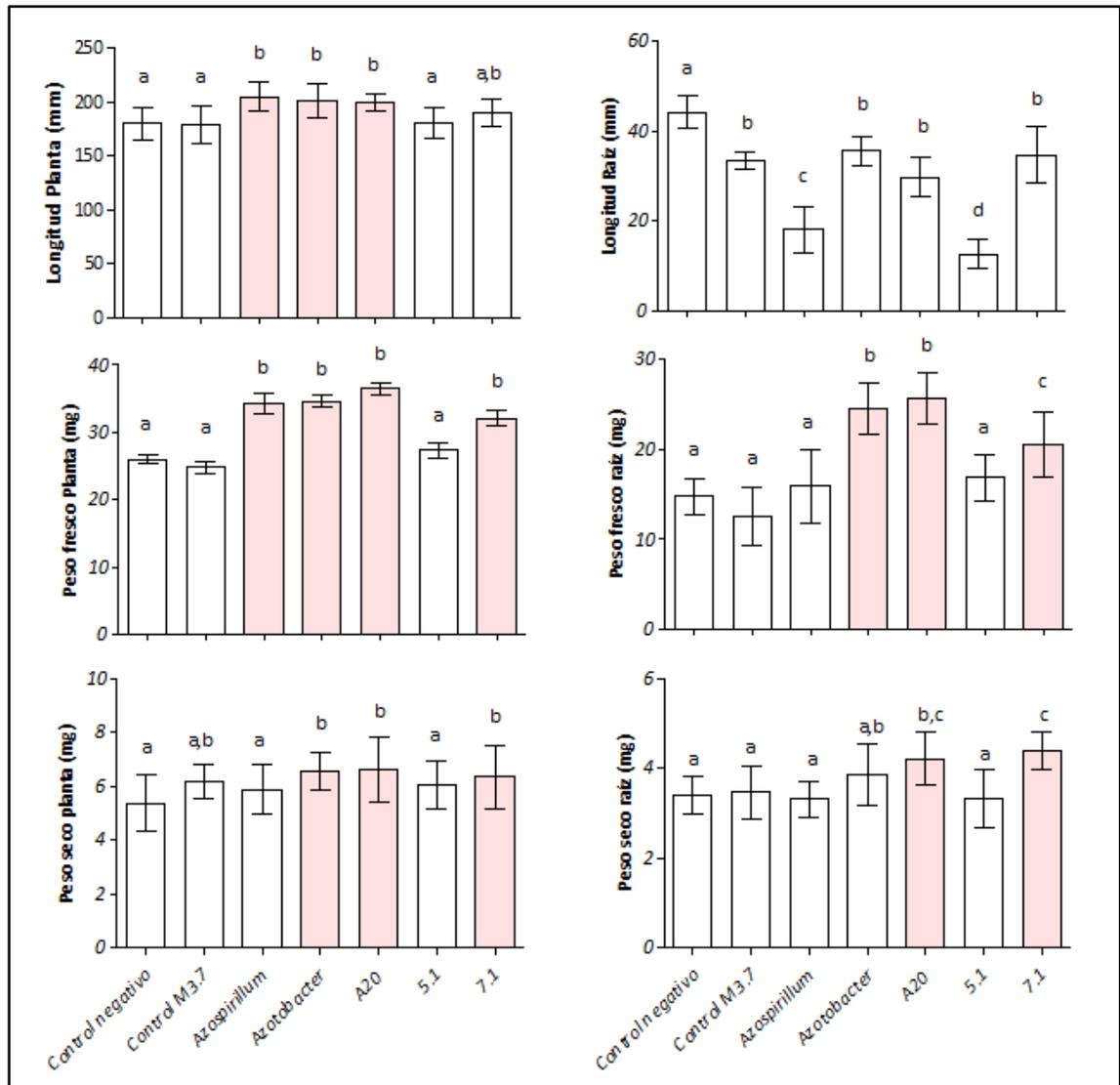
**Figura 4-14: Promoción de crecimiento vegetal en plantas de arroz variedad 60.** En la figura AC corresponde al control *A. chroococcum* y C- al control sin inocular.



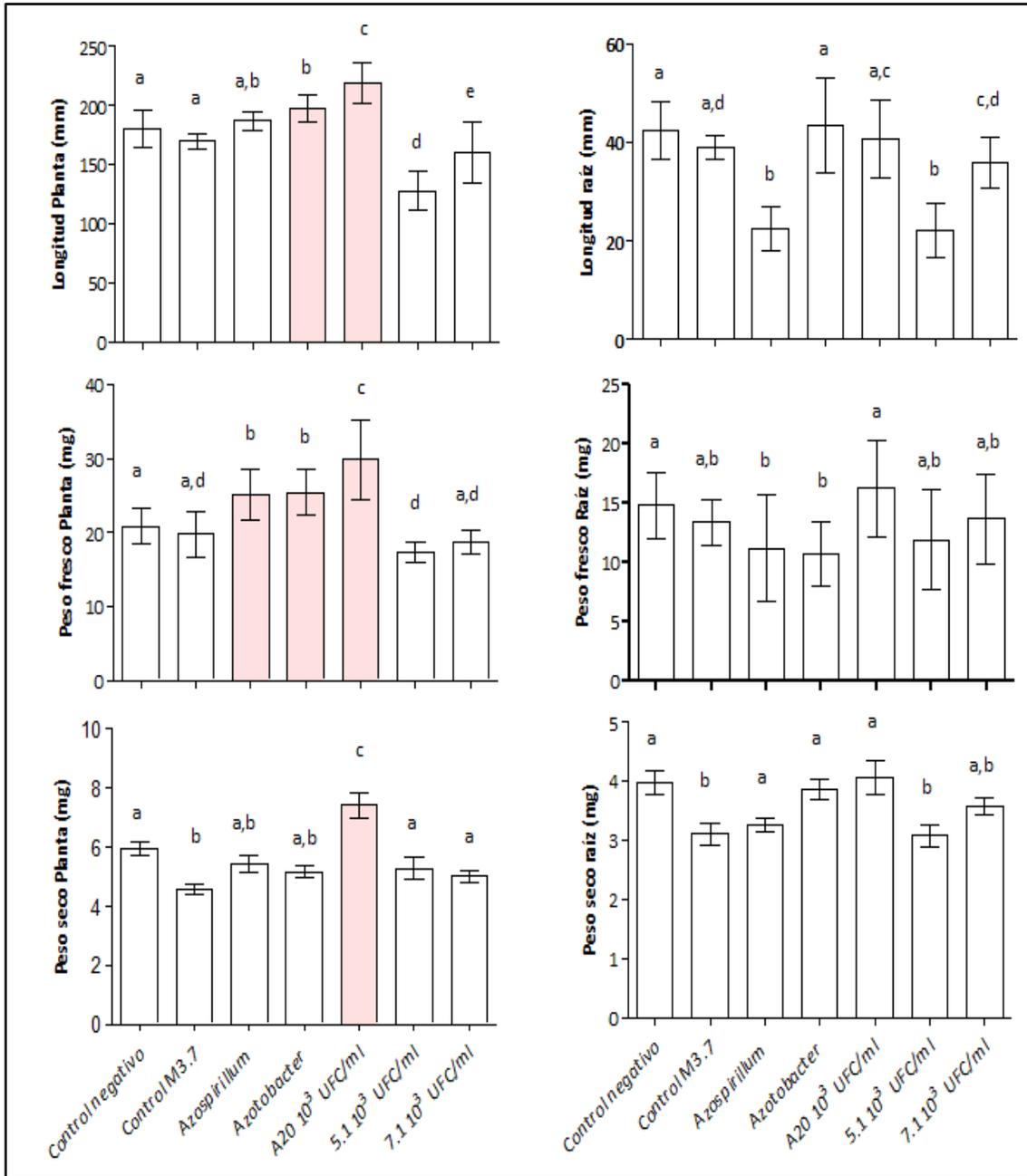
El control negativo, empleando el medio de producción M3.7 fue evaluado con el objetivo de descartar que el efecto observado tras la inoculación de cualquiera de los tres *Streptomyces* se debiera a algún componente del medio de crecimiento, lo cual quedo descartado al observar que en ninguno de los experimentos realizados existía una diferencia significativa entre este tratamiento y el control sin inocular, exceptuando el efecto negativo encontrado sobre la longitud de la raíz. El control positivo *A. brasilense*

no género el efecto positivo esperado en ninguna de las dos réplicas de este ensayo con la variedad 60. A pesar de lo anterior se evidenció que este tratamiento producía un incremento significativo en el peso fresco de la planta en ambas réplicas y en la longitud de la planta de la primera réplica. Por otra parte, *A. chroococcum*, mostró un comportamiento más favorable al incrementar significativamente la longitud y el peso fresco de la planta en las dos réplicas realizadas, y el peso seco de la planta y peso fresco de la raíz en la primera réplica.

**Figura 4-15: Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad F60 (Primera réplica).** Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de color muestran aquellos tratamientos que presentan diferencias significativas frente al control sin inocular. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  DS de dos replicas biológicas por tratamiento, cada una con diez individuos.



**Figura 4-16: Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad F60 (Segunda réplica).** Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de color muestran aquellos tratamientos que presentan diferencias significativas frente al control sin inocular. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  DS de dos replicas biológicas por tratamiento, cada una con diez individuos.



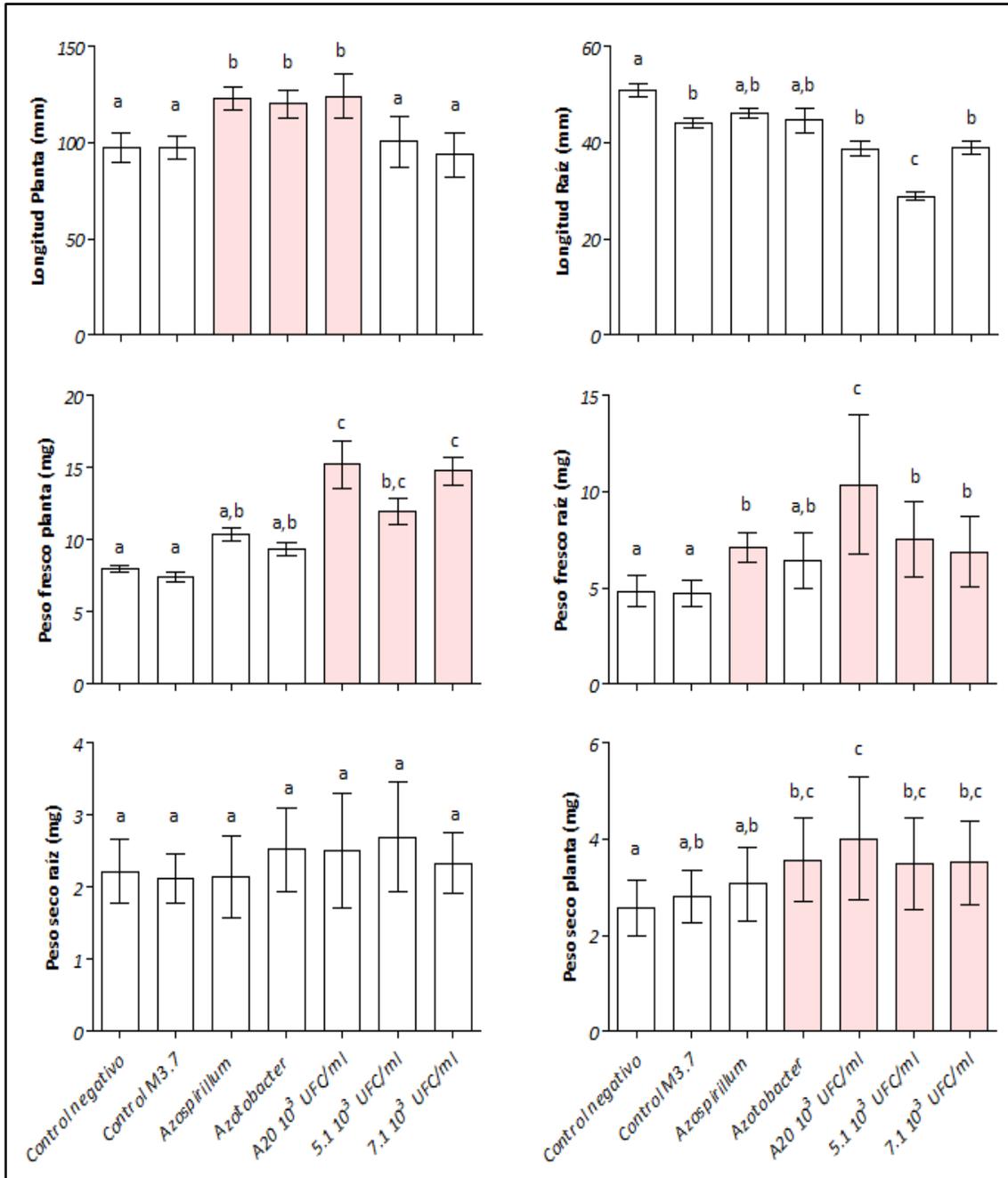
- **Variedad Fedearroz 733**

Como se observa en las figuras 4-19 y 4-20, en el caso de la variedad Fedearroz 733 se encontró que *Streptomyces* A20 generó un incremento significativo en los parámetros: longitud de planta, peso fresco y seco de planta y peso fresco de raíz en las dos replicas realizadas para este ensayo. Adicionalmente, produjo un efecto significativo sobre el peso seco de la raíz en la segunda réplica. En esta variedad, las plantas tratadas con *Streptomyces* 7.1 mejoraron en términos de peso fresco y seco de la planta y peso fresco de la raíz, efecto que fue reproducible en ambas réplicas. Un moderado incremento en la longitud de la planta fue observado en este tratamiento en la segunda réplica del ensayo. *Streptomyces* 5.1, produjo un incremento significativo en el peso fresco de la raíz y el peso seco de la planta en la primera réplica del ensayo, tal efecto no fue reproducible en la segunda réplica.

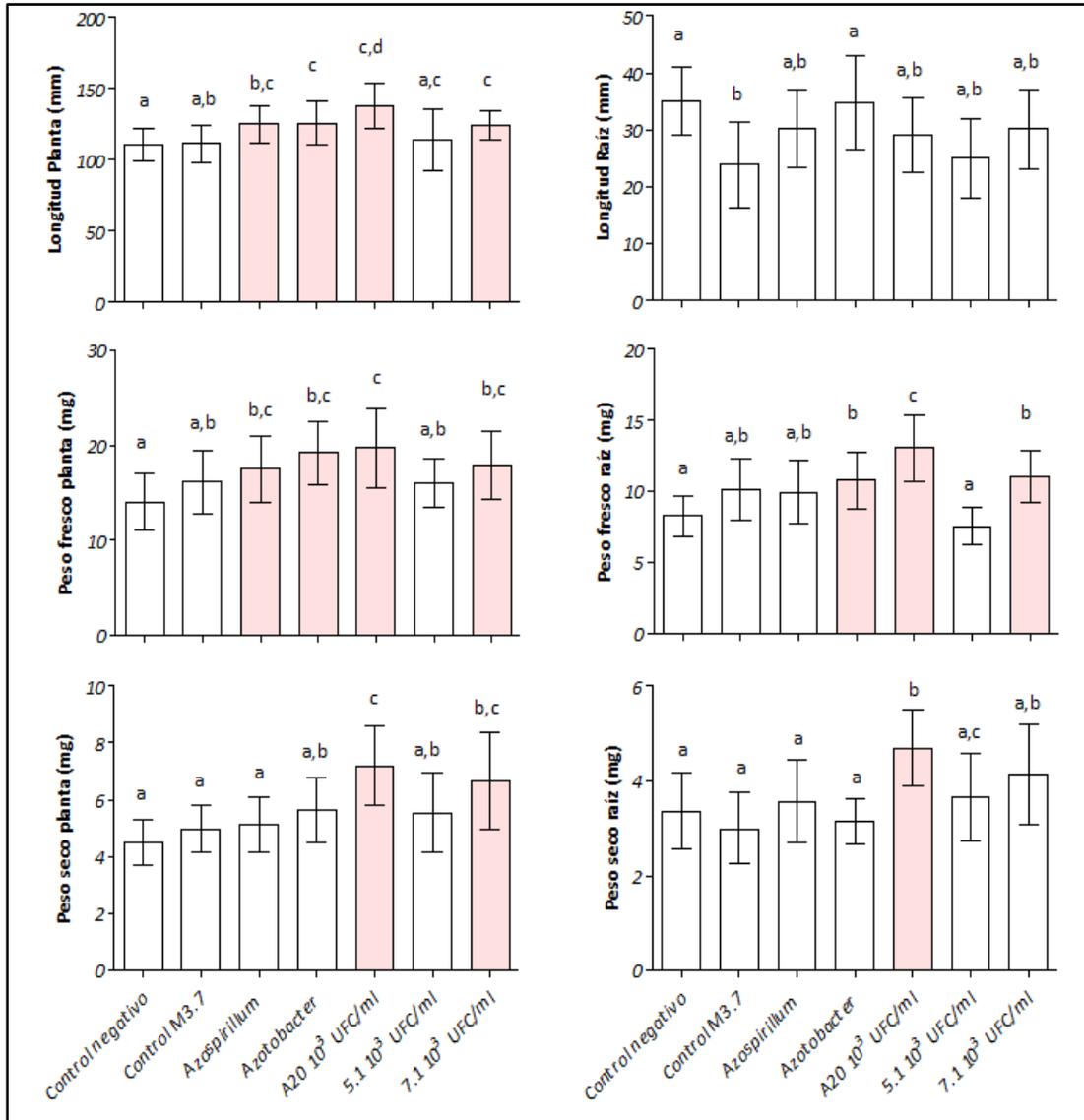
Al igual que con la variedad 60, *A. brasilense* mostró un efecto positivo reducido, incrementando los parámetros de longitud de planta (primera y segunda réplica respectivamente), peso fresco de la planta (segunda réplica) y peso fresco de raíz (primera replica). Por otra parte, *A. chroococcum* incrementó significativamente la longitud de la planta (primera y segunda réplica) el peso seco y fresco de la planta (primera y segunda réplica respectivamente) y el peso fresco de la raíz (réplica 2). El control M3.7 no generó ningún efecto positivo apreciable en el crecimiento de las plantas de esta variedad, sin embargo se encontró que reducía la longitud de la raíz de los individuos evaluados de manera significativa al igual que ocurrió en las plantas variedad F60.

De estas pruebas se concluyó que bajo condiciones gnotobióticas, la cepa de *Streptomyces* A20 fue capaz de promover el crecimiento de ambas variedades de arroz, siendo este efecto reproducible en los dos experimentos realizados. La cepa 7.1 mostró capacidad de incrementar algunos de los parámetros biométricos evaluados, sin embargo a diferencia de lo observado con A20 el efecto de 7.1 fue menos reproducible. Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó que 5.1 no presentó capacidad de promover el crecimiento de las plantas tratadas con esta cepa, por el contrario se evidenció que las plantas inoculadas con 5.1 presentaban un menor crecimiento de raíces, lo cual se considera como un efecto negativo producto de la interacción entre la planta y esta cepa bajo las condiciones evaluadas.

**Figura 4-17: Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad F733 (Primera réplica).** Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de color muestran aquellos tratamientos que presentan diferencias significativas frente al control sin inocular. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  DS de dos replicas biológicas por tratamiento, cada una con diez individuos



**Figura 4-18: Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad F733 (Segunda réplica).** Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de color muestran aquellos tratamientos que presentan diferencias significativas frente al control sin inocular. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  DS de dos replicas biológicas por tratamiento, cada una con diez individuos



Es interesante observar como *Streptomyces* A20, el cual además de la producción de sideróforos y proteasas, no presentaba ninguna otra característica que haya sido asociada a efectos de promoción de crecimiento, fue capaz de incrementar significativamente algunos de los parámetros biométricos evaluados en las plantas tratadas. Lo observado, permite pensar que esta cepa es capaz de producir algún otro compuesto como ácido giberélico o citoquininas que no fueron evaluados en el presente estudio y que actúan benéficamente sobre el crecimiento de las plantas tratadas.

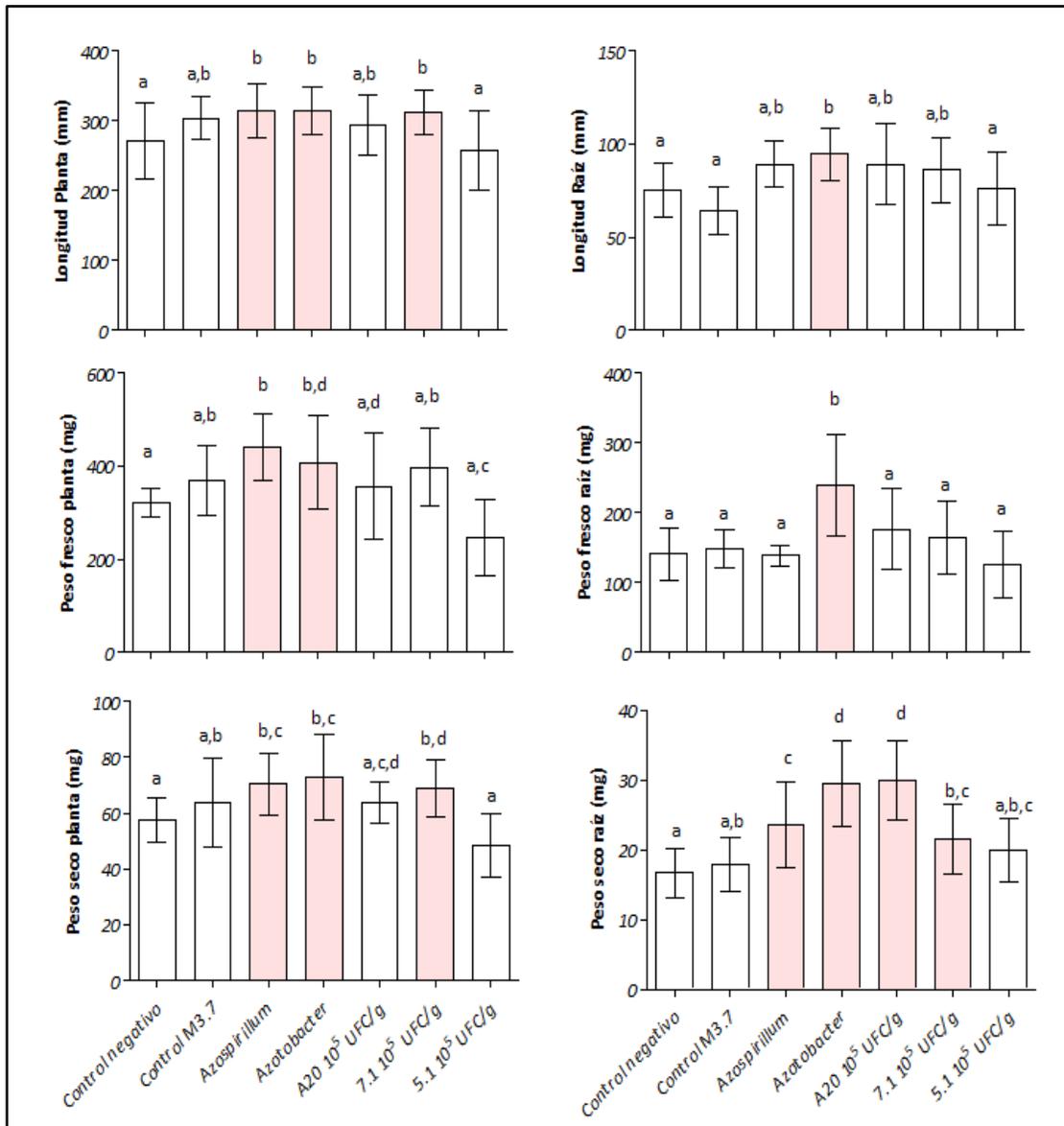
#### 4.4.2 Promoción de crecimiento en suelo.

Dentro de los procesos de formulación y control de calidad de un nuevo bioinoculante, se debe verificar que los efectos observados bajo condiciones controladas *in vitro* sean reproducibles en condiciones de campo (Herrmann & Lesueur, 2013). Para ello, se desarrollan ensayos en suelo en diferentes escalas (invernadero o campo) en donde se verifica que a una concentración específica y con un método de inoculación establecido se genera el efecto positivo esperado sobre el crecimiento de la planta de interés.

Dado que el objetivo final del macro-proyecto al cual pertenece esta investigación es desarrollar un bioinoculante de fácil manejo para ser utilizado en cultivos de arroz, se decidió simular el método de inoculación por aspersion en suelo propio de este tipo de insumos biológicos. Para tal efecto, la concentración usada de los microorganismos ( $10^5$  UFC/g de suelo) fue decidida en función de ensayos preliminares en los cuales se evidenció que los recuentos finales de cada cepa (incluyendo los controles positivos) en el día 31 de crecimiento se encontraban en el orden de  $10^1$  UFC/g de suelo cuando eran inoculados en el día cero  $10^3$  UFC/gr de cada microorganismo. Las mediciones biométricas realizadas sobre las plantas tratadas en este ensayo no presentaron diferencias significativas con respecto al control sin inocular. De esto se concluyó que la concentración de microorganismos inoculados era insuficiente para que pudieran establecerse en el suelo y por ende generar un efecto sobre el crecimiento de los individuos tratados, decidiendo aumentar la concentración de inoculo inicial usada en los ensayos y realizar recuento de los microorganismos en suelo una vez finalizado el tiempo de crecimiento de las plantas. Teniendo entonces establecida la concentración de inoculo a utilizar en los ensayos, se procedió a evaluar el efecto de los microorganismos sobre el crecimiento de las plantas de arroz variedad Fedearroz 60 y Fedearroz 733, los datos obtenidos se presentan en el anexo E.

Los resultados obtenidos del experimento de inoculación en suelo con plantas de arroz variedad 60 (Figura 4-22) indican una respuesta positiva generada por el tratamiento 7.1 sobre los parámetros de: longitud de la planta y peso seco de planta y raíz. Los tratamientos con A20 y 5.1 no generaron ningún efecto sobre el crecimiento de las plantas, mientras que las plantas tratadas con *A. brasilense* mejoraron en términos de longitud de planta, peso fresco y seco de la planta y peso seco de la raíz. El tratamiento de *A. chroococcum* generó un efecto positivo en todos los parámetros biométricos evaluados. El tratamiento M3.7 no generó ningún efecto sobre el crecimiento de las plantas de arroz.

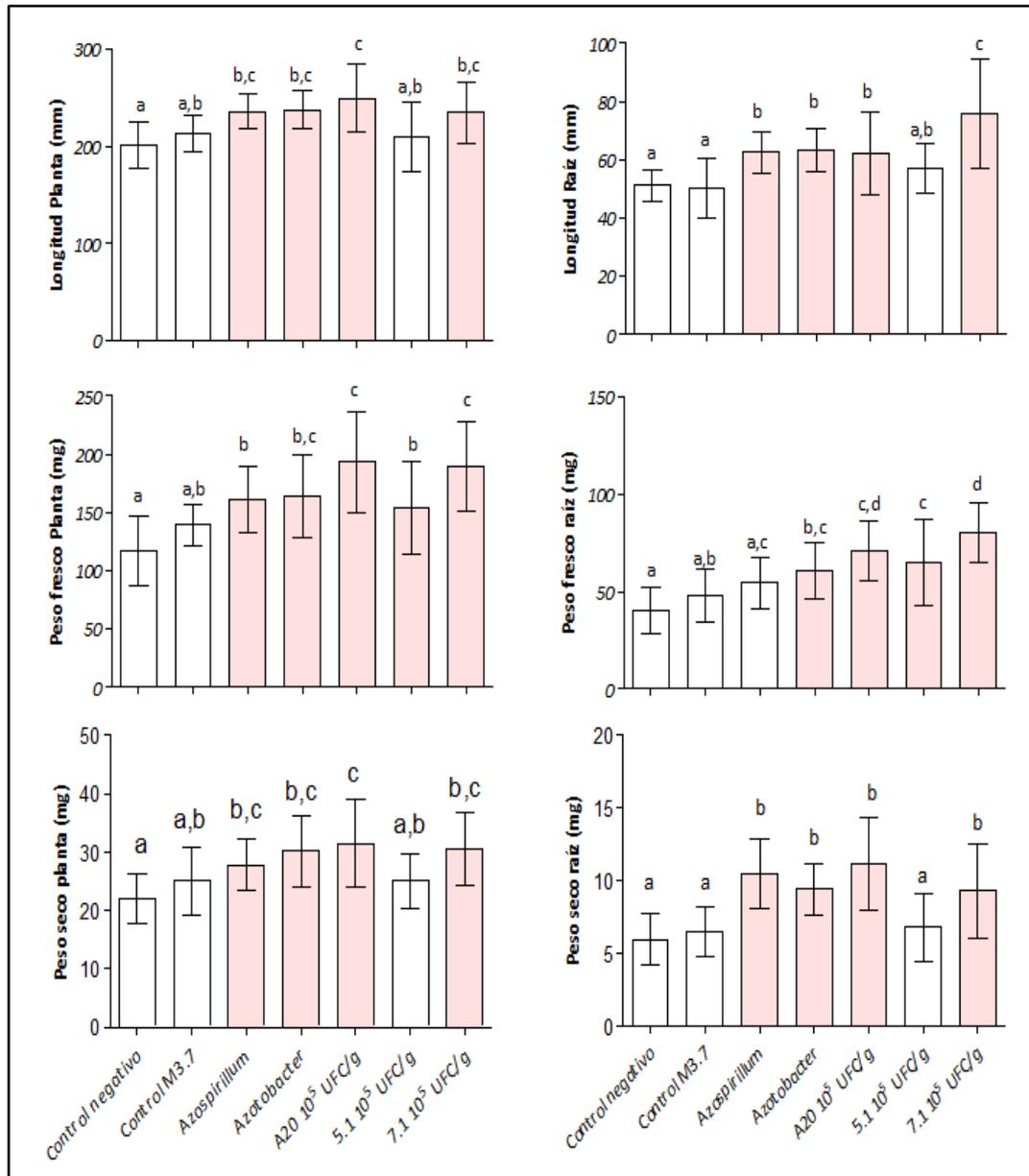
**Figura 4-19: Ensayo de promoción de crecimiento en suelo con plantas de arroz variedad F60.** Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de color muestran aquellos tratamientos que presentan diferencias significativas frente al control sin inocular.



Por otra parte, como se evidencia en la figura 4-23 las plantas de arroz variedad 733 tratadas con los *Streptomyces* A20 y 7.1 presentaron un incremento significativo en los parámetros de longitud de planta y de raíz y peso fresco y seco de planta y raíz. *Streptomyces* 5.1 generó un efecto positivo sobre el peso fresco de la planta y la raíz. Los controles *A. brasiliense* y *A. chroococcum* promovieron el crecimiento de las plantas tratadas en términos de longitud de planta, longitud de raíz y peso fresco y seco de planta; adicionalmente, *A. chroococcum* incrementó el peso fresco de la raíz en las

plantas evaluadas. Finalmente, la inoculación de las plantas de arroz F733 con el medio de producción M3.7 no generó ningún impacto su crecimiento.

**Figura 4-20: Ensayo de promoción de crecimiento en suelo con plantas de arroz variedad F733.** Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras de color muestran aquellos tratamientos que presentan diferencias significativas frente al control sin inocular.



En general, de todos los ensayos realizados durante el desarrollo de este objetivo, se evidencio la alta variabilidad de los datos obtenidos, aun cuando buena parte de las variables que influían en el crecimiento de las plantas se mantuvieron controladas, exceptuando temperatura y humedad, las cuales fueron únicamente registradas dadas las condiciones de infraestructura en donde se llevaron a cabo los ensayos. Se encontró además, que sin importar el medio usado como matriz para el crecimiento de las plantas, el medio de producción M3.7 no generaba ningún efecto sobre ellas, lo cual aseguraba que los efectos encontrados en los tratamientos con *Streptomyces* A20, 5.1 o 7.1 eran generados por el microorganismo y no por los componentes del medio en el cual eran producidos.

*Streptomyces* A20 que en los ensayos gnotobióticos presentó el mejor comportamiento en términos de promoción de crecimiento en comparación a 5.1 y 7.1, disminuyó su efectividad en los ensayos en suelo, particularmente en la variedad 60. Posiblemente, en matrices como el suelo, A20 no posee las condiciones necesarias o no se encuentra en la concentración suficiente para producir la cantidad de compuestos que generaron el efecto observado en Hoagland. Más experimentos deben realizarse para evaluar a fondo la interacción entre A20 y las plantas de arroz. Sin embargo, los resultados en Hoagland demuestran el potencial de este aislamiento para generar efectos positivos sobre el crecimiento de plantas de arroz, por ello se debe prestar atención no solo al mecanismo mediante el cual A20 generó tal resultado en Hoagland sino además a variables como concentración del inóculo, método de aplicación y formulación del producto con el fin de mejorar la estabilidad de la cepa en suelo y en consecuencia incrementar la posibilidad de lograr reproducir el efecto observado en medio Hoagland en condiciones de campo.

Por otra parte 7.1 que había mostrado resultados muy variables en los ensayos gnotobióticos, presentó un mejor papel en los ensayos en suelo en ambas variedades generando un incremento significativo en casi todos los parámetros biométricos evaluados. Teniendo en cuenta que en el medio gnotobiótico no había ningún tipo de estrés por nutrientes en la planta, a diferencia de lo que ocurriría en suelo, es posible que en este último la capacidad de 7.1 como solubilizador de fosfatos haya sido la responsable del efecto positivo observado en las plantas tratadas con este microorganismo.

Finalmente, la cepa 5.1 no mostró ningún efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas de arroz tratadas, por ello su uso como promotor de crecimiento vegetal (directo) no estaría recomendado.

## 5. Conclusiones y recomendaciones.

### 5.1 Conclusiones

- Las cepas de *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 presentan propiedades asociadas a la promoción directa e indirecta de crecimiento vegetal que podrían influir positivamente sobre el crecimiento de plantas de arroz. De los mecanismos directos evaluados, es de resaltar la capacidad de los tres *Streptomyces* de producir sideróforos, proteasas y la habilidad de la cepa 7.1 para solubilizar fosfatos y producir celulasas.
- El espectro de acción antibacteriana y antifúngica de los tres *Streptomyces* fue establecido, destacándose la cepa A20 por su amplio espectro y la cepa 5.1 por la intensidad de control sobre algunos patógenos. Por ello se proponen ambas cepas (A20 y 5.1) como biocontroladores promisorios de diversos fitopatógenos (bacterianos y fúngicos).
- Los ensayos de colonización en medio Hoagland y suelo permitieron verificar que las cepas de *Streptomyces* A20 y 7.1 son capaces de establecerse en el rizoplaneo de las variedades de arroz Fedearroz 60 y 733 y permanecer en concentraciones del orden de  $10^6$  UFC/g de suelo 31 días después de su inoculación. Este resultado constituye el primer acercamiento para estimar la capacidad de estas bacterias de permanecer viables en el suelo tras su inoculación en campo.
- La técnica de aislamiento de endófitos usada en esta investigación permitió establecer que *Streptomyces* A20 y 7.1 eran capaces de colonizar endofíticamente las raíces de plantas de arroz variedad Fedearroz 60 y Fedearroz 733 bajo condiciones gnotobióticas, sin embargo una vez se realizó este experimento en suelo no se logró re-aislar ninguna de estas cepas del interior de las plantas evaluadas. Por esta razón, la confirmación del tipo de colonización de

estas bacterias por medios microscópicos es necesaria si se quiere clasificar alguno de estos aislamientos como endófitos.

- Los ensayos de promoción de crecimiento en medio Hoagland y suelo sugieren que las cepas A20 y 7.1 poseen el potencial de promover el crecimiento de las plantas de arroz tratadas. Sin embargo, dado que en suelo 7.1 presenta un mejor efecto sobre el desarrollo de las plantas se propone esta cepa como promotor de crecimiento directo de plantas de arroz.

## 5.2 Recomendaciones

- Teniendo en cuenta que A20 y 5.1 presentan una buena actividad antimicrobiana, y que el objetivo general del macro-proyecto del que forma parte esta investigación es la producción de un bioinoculante con capacidad para controlar patógenos específicos del arroz, se sugiere realizar pruebas de biocontrol *in vivo* con plantas de arroz utilizando las cepas patógenas de interés (*B. glumae* y *P. fuscovaginae*) y los *Streptomyces* A20 y 5.1. De igual manera, es conveniente estudiar la actividad antifúngica de *Streptomyces* 7.1 sobre diferentes especies patógenas de *Colletotrichum* en base a su desempeño como biocontrolador de este género fúngico en las pruebas *in vitro*.
- Debido a que no se logró establecer el mecanismo por el cual A20 generaba el efecto positivo sobre las plantas de arroz, se propone realizar estudios complementarios que incluyan la evaluación de producción de otras fitohormonas como ácido giberélico o citoquininas en este microorganismo.
- Adicionalmente, se propone evaluar diferentes concentraciones de inoculación de *Streptomyces* A20 y 7.1 en campo teniendo en cuenta que la concentración usada en el presente estudio ( $10^5$  UFC/g de suelo) puede ser muy alta y poco viable económicamente.
- Gracias a que se logró obtener un mutante marcado de la cepa A20 con la proteína EGFP, se plantea la necesidad de realizar el experimento de seguimiento *in vivo* del proceso de colonización endofítica usando para ello microscopia de fluorescencia o microscopia confocal.

## A. Anexo: Medios de cultivo y reactivos.

- Medio de producción M3.7

	g/L
Triptosa	2 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	5 g
Almidón	10 g
Carbonato de Calcio (CaCO <sub>3</sub> )	2 g
NaCl	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
FeSO <sub>4</sub>	1 mg

Ajustar el pH a 7.2 antes de esterilizar.

- Medio LB

	g/L
Triptosa	10 g
NaCl	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Agar	13 g

- ASHBY

	g/L
Manitol	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.2 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 g
CaCO <sub>3</sub>	5 g
Extracto de levadura	0.5 g
FeCl <sub>2</sub>	0.015 g
Agar	13 g

Ajustar el pH a 7.2 antes de esterilizar.

- **Medio NFB semisólido**

	g/L
Manitol	6
Acido Málico	3
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5
NaCl	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002
Agar-Agar	1.8
Solución de microelementos	2 mL
Solución de Vitaminas	1 mL
Solución Fe-EDTA 1.64%	4 mL
Azul de bromotimol	0.005
pH	7

**Solución de Vitaminas:**

	(g)
Biotina	0.01
Piridoxina	0.02
Volumen	100 mL

**Solución de Microelementos**

	(g)
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{MnSO}_4$	0.235
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.280
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.008
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0024
Volumen	200 mL

**Solución Fe-EDTA:** Calentar  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,746g/100 mL o  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,8258g/100 mL y adicionar lentamente 0, 556 g/100 ml de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- **Medio SRS (Sundara Rao y Sinha)**

	g/L
Glucosa	10 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
KCl	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.3 g
MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.004 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.002 g
NaCl	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g
Púrpura de Bromocresol	0.1 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g
Agar	13 g

Ajustar el pH a 7.2 antes de esterilizar. El fosfato tricálcico se esteriliza en seco por separado y se adiciona al medio ya estéril.

- **NBrip**

	g/L
Glucosa	10 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 g
KCl	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g
Agar	13 g

Ajustar el pH a 7.2 antes de esterilizar. El fosfato tricálcico se esteriliza en seco por separado y se adiciona al medio ya estéril.

- **Medio CarboxiMetilCelulosa (CMC)**

	g/L
Extracto de levadura	2.5 g
Peptona	2.5 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
CMC	5 g
Agar	13 g

Se recomienda disolver antes de esterilizar el CMC en un volumen pequeño de agua destilada.

- **Medio lignina**

	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1 g
KCl	0.1 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.02 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.05 g
Extracto de Malta	2 g
Agar	13 g

Pesar 0.28g de KOH y disolverlos en 5 ml de agua destilada y adicionarse al medio antes de esterilizar. Adicionalmente, se deben disolver 0.4 ml de guayacol y 1g de lignina alcalina en 10 ml de Dioxano, la anterior solución debe adicionarse al medio cuando ya esté estéril y a una temperatura media (soporta el contacto con la piel).

- **Medio CAS**

**Solución I Fe-CAS:** Mezclar 10ml de FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 1 mmol (preparada en HCl 10 mmol) con 50 ml de una solución acuosa de CAS (1.21g/L). Agregar esta solución lentamente a una solución de 40 ml de CTAB (1.821 g/L). Esterilizar.

**Solución II Buffer:** Disolver 30.24 g de PIPES en 750 ml de una solución compuesta de 0.3 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g NaCl y 1g de NH<sub>4</sub>Cl. El pH de esta solución fue ajustado a 6.8 con KOH 50% (p/v). El volumen final de la solución deberá ser de 800 ml.

**Solución III Micro-elementos:** disolver en 70 ml de agua, glucosa 2 g, manitol 2 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 493 mg, CaCl<sub>2</sub> 11 mg, MnSO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 1.17 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1.4 mg, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.04 mg, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1.2 mg y NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 1 mg.

**Solución IV CAS aminoácidos:** Preparar una solución de 30 ml de casaminoacidos 30% (p/v). Esterilizar esta solución por filtración.

**Preparación final:** Agregar la solución 3 a la solución buffer, revolver y adicionar cuando este moderadamente frio el medio (sin llegar a solidificarse) la solución de Cas aminoácidos. La solución Fe-Cas debe ser adicionada en último lugar, mezclando vigorosamente el medio y verificando que el color sea azul-verdoso.

- **Medio DF ((Dworkin & Foster, 1958)**

**Solución de elementos traza:** Disolver en 100 ml de agua, 10 mg  $H_3BO_3$ , 11.19 mg  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 124.6 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 78.22 mg  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  y 10 mg  $MoO_3$ .

**Solución de Hierro:** disolver 100 mg de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  en 10 ml de agua destilada.

**Medio final composición por Litro**

	g/L
$KH_2PO_4$	4 g
$Na_2HPO_4$	6 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
Glucosa	2 g
Ácido glucónico	2 g
Ácido cítrico	2 g
$*(NH_4)_2 SO_4$	2 g
Solución de elementos traza	100 $\mu$ l
Solución de hierro	100 $\mu$ l

\*El sulfato de amonio se agregara solo a las cajas usadas como control positivo de la prueba, en el control negativo no se incluirá ninguna fuente de nitrógeno.

La solución stock de ACC (0.5 M) será esterilizada por filtración, y debe ser guardada en oscuridad hasta su uso.

Se debe añadir cada elemento de la composición final solo cuando el anterior este completamente disuelto. Este medio NO debe ser autoclavado por más de 20 minutos. El pH final del medio debe ser de 7.2. al finalizar la preparación, no debe observarse precipitados en el medio.

- **Medio Mínimo de Sales**

**Solución de sales 5X:** Disolver en 100 ml de agua 6.4 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.5 g  $KH_2PO_4$ , 0.25 g NaCl y 0.5 g de  $(NH_4)_2SO_4$  (a las cajas que sirven como control positivo en la prueba).

**Solución de glucosa 20%:** Diluir 20 g de glucosa en 100 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración.

**Solución de Sulfato de Magnesio 1M:** Disolver 1.23 g de  $MgSO_4$  en 5 ml de agua destilada.

**Solución de Cloruro de Calcio 1M:** Disolver 554.95 mg de  $CaCl_2$  en 5 ml de agua destilada.

**Composición final por litro**

Sales 5X	200 ml
Solución MgSO <sub>4</sub>	2 ml
CaCl <sub>2</sub>	0.1 ml
Glucosa 20%	20 ml
Agar	15 g

- **Solución de Hoagland**

	Preparación/100 ml	Concentración	Volumen final/Litro
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	24,6 g	1 M	1,0 ml
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	23,6 g	1 M	2,3 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,6 g	1 M	0,5 ml
KNO <sub>3</sub>	10,1 g	1 M	2,5 ml
Micronutrientes	-	-	0,5 ml
Fe.EDTA	-	-	1,0 ml

**Solución Fe-EDTA:** 1,21 g Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA/100 ml H<sub>2</sub>O destilada + 0,6 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O

**Solución de micronutrientes**

	g/L
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,82
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,09
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,09

- **Caldo 2 xYT**

	g/L
Triptosa	16
Extracto de levadura	10
NaCl	5

- **Medio MS**

	g/L
Harina de soya	20
Manitol	20
Agar	13

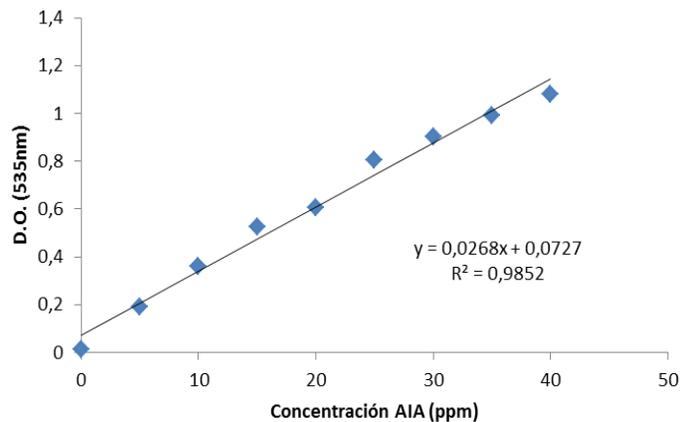
- **Reactivo de Salwkowsky**

FeCl <sub>3</sub>	12g/L
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (7.9 M)	1L

## B. Anexo: Curvas de calibración de las técnicas de solubilización de fosfatos y producción de AIA.

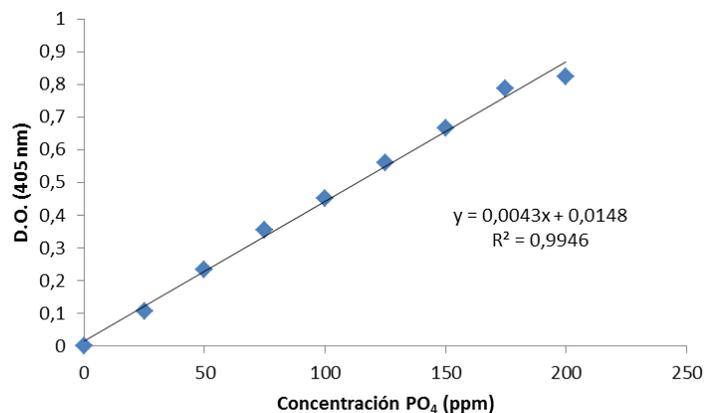
- Curva de calibración para detección cuantitativa de AIA

Concentración (ppm)	D.O. (535nm)
0	0,012
5	0,192
10	0,361
15	0,524
20	0,605
25	0,807
30	0,902
35	0,992
40	1,079



- Curva de calibración para detección cuantitativa de solubilización.

Concentración (ppm)	D.O. (405nm)
0	0
25	0,107
50	0,232
75	0,353
100	0,451
125	0,56
150	0,665
175	0,788
200	0,824



## C. Perfil de sensibilidad de *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1

Antibiótico	A20	5.1	7.1
Kanamicina (50 µg/mL)	Sensible	Sensible	Sensible
Tetraciclina (15 µg/mL)	Resistente	Resistente	Sensible
Gentamicina (15 µg/mL)	Sensible	Sensible	Sensible
Rifampicina (50 µg/mL)	Sensible	Sensible	Sensible
Ampicilina (50 µg/mL)	Resistente	Sensible	Resistente
Cloranfenicol (10 µg/mL)	Resistente	Sensible	Sensible
Ácido nalidixico (25 µg/mL)	Resistente	Sensible	Resistente
Ácido nalidixico (50 µg/mL)	Sensible	Sensible	Resistente
Ácido nalidixico (100 µg/mL)	Sensible	Sensible	Resistente
Nitrofurantoina (25 µg/mL)	Resistente	Resistente	Resistente

## D. Anexo: Secuencias del 16s rRNA de los *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1

- Secuencia del gen 16s rRNA de *Streptomyces* A20.

TGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCG  
GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTG  
GAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACTGCGGGAGGCATCTCCTGCGGTGGAAAAGCTCCGGCGGTGAA  
GGATGAGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG  
GCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT  
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAG  
GCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAAGCCCCGAGGCTTAACCTCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTA  
GAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG  
GTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT  
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCCGGTGC  
CGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGCTCAAAGGAATTGACG  
GGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG  
ACATATACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCCG  
TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCA  
TGCCCTTCGGGGTGATGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGAC  
GTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGA  
TACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCAT  
GAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA  
CCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAGCTG  
TCGAAGTGGGACTGGCGAATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCGTACCGGAAGGGTGC GGCTGG  
ATCACCTCCTTAC

- Secuencia del gen 16S rRNA de *Streptomyces* 5.1.

TGCAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT  
 GCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCTTCGAGCGCATGCTTG  
 AAGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCT  
 ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG  
 TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 AAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATT  
 ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT  
 CTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG  
 CGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA  
 AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTG  
 GGCACATTCCACGTTCGTCGGTCCGTCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  
 AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCA  
 ACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCGTGGAGACACGGTCCCCCTTGTGGTCC  
 GTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  
 GCAACCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGT  
 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTA  
 CAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCG  
 GATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTTGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGT  
 GAATACGTTCCCSGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCG  
 AGCCGGTGGCCCAACC

- Secuencia del gen 16S rRNA de *Streptomyces* 7.1

tttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcttaacacatgcaAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGG  
 CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAAT  
 ACCGGATACCACTCTCGCAGGCATCTGTGAGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGC  
 CTATCAGCTTGTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC  
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG  
 GGCAGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCA  
 GGGAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 ATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCG  
 GGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGA  
 GATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGAT  
 CTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT  
 CCACGCCGTAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTCCGCGAGCTAACGCAT  
 TAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAA  
 GCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAA  
 ACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCG  
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGT  
 GATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCAT  
 GCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGG  
 AGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTG  
 CTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGT  
 CACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCcttgtgggaggagctgtcgAgggtgggactagcgattggga  
 cgaagtcgtaacaaggtagccgtaccggaaggtgaggctggtatcac

## E. Anexo: Análisis de secuencias del gen 16S rRNA de los *Streptomyces* A20, 5.1 y 7.1 en la plataforma SeqMatch del RDP.

Match hit format: short ID, orientation, similarity score, S\_ab score, unique common oligomers and sequence full name.

---

Results for Query Sequence: U009558251|5.1 1279 unique oligos

rootrank Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum "Actinobacteria" (20)

class Actinobacteria (20)

subclass Actinobacteridae (20)

order Actinomycetales (20)

suborder Streptomycineae (20)

family Streptomycetaceae (20)

genus *Streptomyces* (20)

S000007214	0.986	0.937	1390	<i>Streptomyces rimosus</i> (T); JCM 4667; AB045883
S000270574	0.980	0.936	1411	<i>Streptomyces griseocarneus</i> (T); DSM40004; X99943
S000270584	0.984	0.937	1404	<i>Streptomyces niger</i> (T); type strain: DSM 43049; AJ621607
S000271817	0.984	0.937	1404	<i>Streptomyces olivaceiscleroticus</i> (T); type strain: DSM 40595; AJ621606
S000544228	0.984	0.944	1369	<i>Streptomyces morookaense</i> (T); type strain: LMG 20074; AJ781349
S000581553	0.988	0.948	1339	<i>Streptomyces albospinus</i> (T); JCM 3399; CSSP411; AY999753
S000581602	0.980	0.942	1384	<i>Streptomyces blastmyceticus</i> (T); NRRL B-5480; CSSP556; AY999802
S000581634	0.983	0.941	1317	<i>Streptomyces abikoensis</i> (T); KCTC 9727; CSSP699; AY999834
S000651818	0.986	0.935	1386	<i>Streptomyces ochraceiscleroticus</i> (T); NBRC 12394; AB184094
S000652360	0.980	0.941	1367	<i>Streptomyces olivovorticillatus</i> (T); NBRC 15273; AB184636
S000652477	0.983	0.948	1369	<i>Streptomyces thioluteus</i> (T); NBRC 3364; AB184753
S000652513	0.982	0.964	1365	<i>Streptomyces hiroshimensis</i> (T); NBRC 3720; AB184789
S000652543	0.984	0.955	1356	<i>Streptomyces lilacinus</i> (T); NBRC 3944; AB184819
S000652574	0.979	0.942	1374	<i>Streptomyces cinnamoneus</i> (T); NBRC 12852; AB184850
S000652588	0.981	0.940	1363	<i>Streptomyces arduus</i> (T); NBRC 13430; AB184864
S000711657	0.981	0.941	1398	<i>Streptomyces varsoviensis</i> (T); NRRL B-3589; DQ026653
S000711658	0.989	0.937	1388	<i>Streptomyces sioyaensis</i> (T); NRRL B-5408; DQ026654
S000775845	0.984	0.948	1378	<i>Streptomyces angustmyceticus</i> (T); NRRL B-2347T; DQ442509
S000775864	0.988	0.954	1432	<i>Streptomyces mobaraensis</i> (T); NRRL B-3729T; DQ442528
S000824530	0.981	0.959	1377	<i>Streptomyces caeruleus</i> (T); NRRL B-2194; EF178675
S000652429	0.986	0.970	1358	<i>Streptomyces salmonis</i> ; NBRC 15865; AB184705
S000544216	0.987	0.964	1343	<i>Streptomyces kashimirensis</i> ; type strain: LMG 19937; AJ781337

**Results for Query Sequence: U009558250 | 7.1, 1405 unique oligos**

rootrank Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum "Actinobacteria" (20)

class Actinobacteria (20)

subclass Actinobacteridae (20)

order Actinomycetales (20)

suborder Streptomycineae (20)

family Streptomycetaceae (20)

genus Streptomyces (20)

S000001869	0.984	0.936	1385	<i>Streptomyces galilaeus</i> (T); JCM 4757; AB045878
S000011834	0.994	0.977	1385	<i>Streptomyces capoamus</i> (T); JCM 4734; AB045877
S000381284	0.994	0.962	1417	<i>Streptomyces galbus</i> (T); DSM40089; X79852
S000581542	0.992	0.955	1346	<i>Streptomyces cellostaticus</i> (T); ISP 5189; CSSP188; AY999742
S000581575	0.988	0.943	1395	<i>Streptomyces canus</i> (T); NRRL B-1989; CSSP527; AY999775
S000651932	0.988	0.942	1364	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i> (T); NBRC 12872; AB184208
S000651933	0.986	0.936	1366	<i>Streptomyces griseoruber</i> (T); NBRC 12873; AB184209
S000651957	0.985	0.937	1372	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> (T); NBRC 12904; AB184233
S000651991	0.999	0.993	1375	<i>Streptomyces corchorusii</i> (T); NBRC 13032; AB184267
S000652003	0.988	0.939	1371	<i>Streptomyces lincolnensis</i> (T); NBRC 13054; AB184279
S000652012	0.998	0.983	1379	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> (T); NBRC 13066; AB184288
S000652052	0.984	0.935	1377	<i>Streptomyces bobili</i> (T); NBRC 13199; AB184328
S000652081	0.984	0.942	1377	<i>Streptomyces novaecaesareae</i> (T); NBRC 13368; AB184357
S000652120	0.999	0.987	1379	<i>Streptomyces canarius</i> (T); NBRC 13431; AB184396
S000652304	0.994	0.971	1328	<i>Streptomyces longwoodensis</i> (T); NBRC 14251; AB184580
S000652420	0.994	0.965	1379	<i>Streptomyces bungoensis</i> (T); NBRC 15711; AB184696
S000652565	0.988	0.957	1377	<i>Streptomyces curacoi</i> (T); NBRC 12761; AB184841
S000775858	0.985	0.943	1376	<i>Streptomyces lucensis</i> (T); NRRL B-5626T; DQ442522
S000775905	0.988	0.945	1423	<i>Streptomyces niveoruber</i> (T); NRRL B-2724; DQ445796
S001577351	0.988	0.948	1313	<i>Streptomyces caeruleatus</i> (T); GIMN4.002; GQ329712

**Results for Query Sequence: U009558249 | a20, 1408 unique oligos**

rootrank Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum "Actinobacteria" (20)

class Actinobacteria (20)

subclass Actinobacteridae (20)

order Actinomycetales (20)

suborder Streptomycineae (20)

family Streptomycetaceae (20)

genus Streptomyces (20)

S000008954	0.994	0.962	1315	<i>Streptomyces lavendulae</i> (T); IFO 12789; D85116
S000381289	0.994	0.953	1413	<i>Streptomyces subutilus</i> (T); DSM 40445; X80825
S000544209	0.995	0.953	1376	<i>Streptomyces globosus</i> (T); type strain:LMG 19896; AJ781330
S000544234	0.995	0.967	1375	<i>Streptomyces nojiriensis</i> (T); type strain:LMG 20094; AJ781355
S000544249	0.995	0.967	1375	<i>Streptomyces spororaveus</i> (T); type strain:LMG 20313; AJ781370
S000581594	0.994	0.965	1388	<i>Streptomyces cirratus</i> (T); NRRL B-3250; CSSP547; AY999794
S000581715	0.998	0.981	1240	<i>Streptomyces flavotricini</i> (T); NRRL B-5419; B5419; AY999915
S000651899	0.994	0.970	1361	<i>Streptomyces virginiae</i> (T); NBRC 12827; AB184175
S000652010	0.990	0.930	1362	<i>Streptomyces nashvillensis</i> (T); NBRC 13064; AB184286
S000652016	1.000	0.990	1360	<i>Streptomyces polychromogenes</i> (T); NBRC 13072; AB184292
S000652118	0.994	0.966	1367	<i>Streptomyces vinaceus</i> (T); NBRC 13425; AB184394
S000652119	0.992	0.953	1372	<i>Streptomyces avidinii</i> (T); NBRC 13429; AB184395
S000652133	0.994	0.976	1358	<i>Streptomyces katrae</i> (T); NBRC 13447; AB184409
S000652431	0.994	0.970	1364	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> (T); NBRC 15873; AB184707
S000711650	0.993	0.960	1421	<i>Streptomyces colombiensis</i> (T); NRRL B-1990; DQ026646
S000711660	0.999	0.978	1383	<i>Streptomyces racemochromogenes</i> (T); NRRL B-5430; DQ026656
S000775884	0.994	0.949	1380	<i>Streptomyces toxytricini</i> (T); NRRL B-5426T; DQ442548
S000775896	0.995	0.957	1379	<i>Streptomyces xanthophaeus</i> (T); NRRL B-5414T; DQ442560
S000824548	0.995	0.966	1376	<i>Streptomyces goshikiensis</i> (T); NRRL B-5428; EF178693
S001044307	0.992	0.956	1396	<i>Streptomyces sporoverrucosus</i> (T); NRRL B-16379T; DQ4425

## **F. Anexo: Elaboración de un mutante marcado con EGFP de la cepa de *Streptomyces* A20.**

Para confirmar la capacidad de colonización endofítica de las cepas de *Streptomyces* en plantas de arroz, era necesario el uso de técnicas microscópicas que soportaran los resultados de aislamiento descritos anteriormente, con el ánimo de hacer un seguimiento más detallado de los procesos de colonización por microscopia (Hasegawa, *et al.*, 2006). Para ello, se generó un mutante de la cepa A20 marcado con la proteína verde fluorescente (EGFP), mediante conjugación con el vector conjugativo e integrativo pIJ8641, el cual contiene el gen *egfp* que codifica para la proteína verde fluorescente y permite la integración de genes en el cromosoma de *Streptomyces* porque porta el gen  $\phi$ C31*int* y el sitio *attP* (Sun, *et al.*, 1999, Coombs & Franco, 2003). Este procedimiento se realizó por conjugación biparental intergenérica de acuerdo al protocolo de Flett y colaboradores (1997) descrito en *Practical Streptomyces Genetics* (Flett, *et al.*, 1997, Kieser, *et al.*, 2000). Este vector fue generosamente proporcionado por la Dra Maureen Bibb del Departamento de Microbiología Molecular del John Innes Centre (Reino Unido).

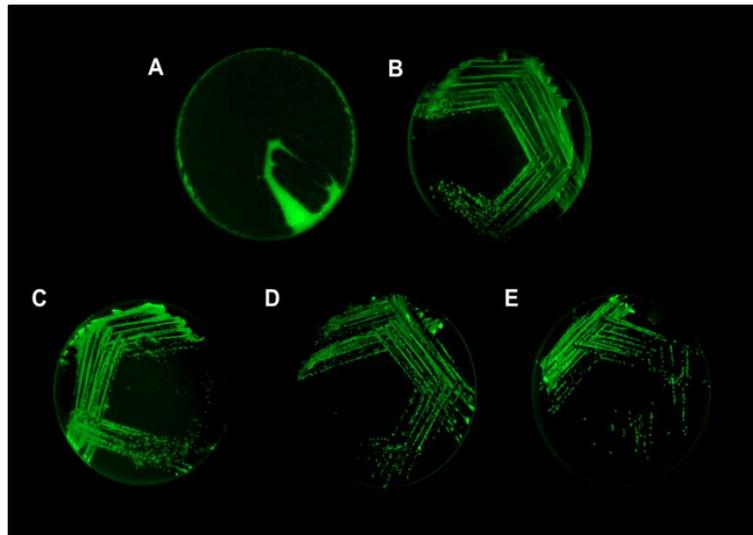
Para la obtención del mutante de A20, se prepararon células competentes de *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir mediante el método de cloruro de rubidio (Hanahan, *et al.*, 1991) y se transformaron con 100 ng del vector pIJ8641; las transformantes se seleccionaron en agar LB suplementado con Apramicina 100 $\mu$ g/ml (marcador de resistencia del plásmido pIJ8641). Posteriormente, una colonia individual de *E. coli* S17S17-1  $\lambda$ pir pIJ8641 se inoculó en 5ml de LB Apramicina y se creció por 24 horas con agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se ajustó la densidad óptica (600nm) de los cultivos a 0.4-0.6. Las células fueron centrifugadas (10000rpm por 5 minutos) y se realizaron dos lavados con caldo LB estéril para retirar los remanentes de antibiótico del pellet, el cual fue re-suspendido en 500 $\mu$ l de caldo LB.

Paralelo a este procedimiento, 2 viales de esporas de A20 de 500  $\mu$ l con una concentración de  $1.2 \times 10^8$  esporas/ml fueron reactivados por 10 minutos a 50°C, transcurrido este tiempo se añadieron 500  $\mu$ l de caldo 2YT (Anexo A) a cada vial.

Posteriormente, se adicionaron 25µl de la suspensión activada de esporas a 50µl de las células de *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir pIJ8641, y se mezclaron por inversión. La mezcla se centrifugó por 2 minutos a 5000rpm descartando el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en el líquido remanente de sobrenadante y se sembró en agar MS (Anexo A) para ser incubada por 16 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo, se añadió 1ml de Apramicina (100 µg/ml) y Ácido nalidixico (20 µg/ml) a la superficie de las placas de agar, las cuales se re incubaron hasta la aparición de colonias de A20 resistentes a Apramicina.

Estas colonias fueron seleccionadas y resembradas en agar ISP3 y LB suplementados con Apramicina (100 µg/ml). Las colonias que crecieron en estos medios fueron observadas en el ChemiDoc™ (MP System) del laboratorio del grupo de Inmunología Evolutiva del Instituto de genética de la Universidad Nacional. Las colonias que presentaran fluorescencia verde serian aquellas que exitosamente introdujeron el plásmido pIJ8641 en el cromosoma de la cepa A20, mediante eventos de *double crossover*. De estos ensayos se obtuvieron un total de 12 colonias que presentaron resistencia a Apramicina y fluorescencia al ser observadas en el ChemidoC BioRad®, lo cual confirmo la exitosa integración del plásmido en el genoma de A20 (Figura F-1).

**Figura F- 1 Colonias de A20 transformadas con el plásmido pIJ 8641.** En la imagen se muestran la cepa original de A20 en medio ISP3 (A), *E. coli* S17 pIJ8641 (B) y las colonias de A20 pIJ8641 número 1 (C) 2 (D) y 3 (E) en medio LB Apramicina (100µg/ml).



Futuros experimentos con estas mutantes bajo condiciones gnotobióticas deberían realizarse para contemplar el proceso completo de colonización incluyendo el seguimiento a la colonización endofítica tal como demostraron Coombs y Franco (2003) al realizar el seguimiento de la colonización endofítica de *Streptomyces* sp EN27 en trigo.

## G. Anexo: Datos de parámetros biométricos evaluados en los ensayos de promoción de crecimiento vegetal.

**Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad 60.** Los datos representan la media  $\pm$  DS de dos réplicas biológicas realizadas para cada tratamiento. El número de individuos por réplica biológica fue de diez (10). Datos subrayados en verde presentan diferencias significativas positivas frente al control sin inocular. Los tratamientos AZPP010 y AZFN010 corresponden a *A. brasilense* y *A. chroococcum* respectivamente.

Tratamiento	Longitud planta (mm)		Longitud Raíz (mm)		Peso fresco planta (mg)		Peso fresco Raíz (mg)		Peso seco planta (mg)		Peso seco Raíz (mg)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
C Neg	180 $\pm$ 15,29	180,5 $\pm$ 15,47	44,17 $\pm$ 3,601	42,45 $\pm$ 5,7	26 $\pm$ 2,9	20,88 $\pm$ 2,4	14,75 $\pm$ 1,9	14,77 $\pm$ 2,7	5,35 $\pm$ 1,04	5,03 $\pm$ 0,99	3,39 $\pm$ 0,43	3,97 $\pm$ 0,92
C M3.7	178,3 $\pm$ 17,47	169,9 $\pm$ 6,31	33,31 $\pm$ 1,85	38,94 $\pm$ 2,41	24,82 $\pm$ 4,2	19,76 $\pm$ 3,1	12,52 $\pm$ 3,25	13,33 $\pm$ 1,91	6,16 $\pm$ 0,61	4,55 $\pm$ 0,77	4,36 $\pm$ 0,58	3,105 $\pm$ 0,82
AZPP010	204,6 $\pm$ 13,95	187,2 $\pm$ 7,44	18 $\pm$ 5,23	22,44 $\pm$ 4,42	34,21 $\pm$ 6,5	25,22 $\pm$ 3,45	15,91 $\pm$ 4,12	11,11 $\pm$ 4,5	5,88 $\pm$ 0,91	5,4 $\pm$ 1,26	3,31 $\pm$ 0,41	3,261 $\pm$ 0,52
AZFN 010	201 $\pm$ 16,08	197,1 $\pm$ 11,56	35,58 $\pm$ 3,27	43,45 $\pm$ 9,61	34,58 $\pm$ 3,9	25,42 $\pm$ 3,07	24,56 $\pm$ 2,8	10,66 $\pm$ 2,7	6,56 $\pm$ 0,68	5,16 $\pm$ 0,95	3,85 $\pm$ 0,68	3,86 $\pm$ 0,81
A20	200 $\pm$ 7,73	219,2 $\pm$ 17,76	29,7 $\pm$ 4,28	40,72 $\pm$ 7,95	36,49 $\pm$ 5,6	29,86 $\pm$ 5,4	25,63 $\pm$ 2,86	16,19 $\pm$ 4,04	6,62 $\pm$ 1,2	7,4 $\pm$ 1,85	4,21 $\pm$ 0,58	4,05 $\pm$ 1,15
5.1	179,9 $\pm$ 14,2	127,8 $\pm$ 16,69	12,61 $\pm$ 3,11	22,06 $\pm$ 5,51	27,42 $\pm$ 4,8	17,31 $\pm$ 1,3	16,86 $\pm$ 2,62	11,85 $\pm$ 4,24	6,01 $\pm$ 0,88	5,27 $\pm$ 1,67	3,31 $\pm$ 0,64	3,07 $\pm$ 0,78
7.1	190,4 $\pm$ 12,5	160,3 $\pm$ 25,38	34,65 $\pm$ 6,21	35,9 $\pm$ 5,28	32,13 $\pm$ 5,5	18,68 $\pm$ 1,6	20,58 $\pm$ 3,6	13,67 $\pm$ 3,81	6,33 $\pm$ 1,18	5 $\pm$ 0,78	4,4 $\pm$ 0,41	3,57 $\pm$ 0,58

**Ensayo de promoción de crecimiento en Hoagland semisólido con plantas de arroz variedad 733.** Los datos representan la media  $\pm$  DS de dos réplicas biológicas realizadas para cada tratamiento. El número de individuos por réplica biológica fue de diez (10). Datos subrayados en verde presentan diferencias significativas positivas frente al control sin inocular. Los tratamientos AZPP010 y AZFN010 corresponden a *A. brasilense* y *A. chroococcum* respectivamente.

Tratamiento	Longitud planta (mm)		Longitud Raíz (mm)		Peso fresco planta (mg)		Peso fresco Raíz (mg)		Peso seco planta (mg)		Peso seco Raíz (mg)	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
C Neg	97,31 $\pm$ 7,92	110,4 $\pm$ 11,28	50,89 $\pm$ 5,77	35,15 $\pm$ 6	7,98 $\pm$ 1,01	14,04 $\pm$ 3	4,28 $\pm$ 0,83	8,27 $\pm$ 1,4	2,56 $\pm$ 0,58	4,5 $\pm$ 0,81	2,218 $\pm$ 0,44	3,37 $\pm$ 0,79
C M3.7	97,24 $\pm$ 6,06	111,4 $\pm$ 13,58	44,16 $\pm$ 4,94	23,85 $\pm$ 7,42	1,41 $\pm$ 1,49	16,16 $\pm$ 3,25	4,71 $\pm$ 0,68	10,13 $\pm$ 2,17	2,816 $\pm$ 0,53	4,97 $\pm$ 0,82	2,12 $\pm$ 0,34	2,99 $\pm$ 0,75
AZPP010	123,2 $\pm$ 6,05	125,4 $\pm$ 12,86	46,12 $\pm$ 4,4	30,2 $\pm$ 6,8	10,34 $\pm$ 1,91	17,51 $\pm$ 3,52	7,11 $\pm$ 0,79	9,92 $\pm$ 2,21	3,07 $\pm$ 0,75	5,24 $\pm$ 0,96	2,13 $\pm$ 0,57	3,56 $\pm$ 0,86
AZFN 010	120,3 $\pm$ 7,36	125,7 $\pm$ 15,41	44,61 $\pm$ 11,24	34,8 $\pm$ 8,23	9,34 $\pm$ 1,85	19,23 $\pm$ 3,36	6,41 $\pm$ 1,45	10,82 $\pm$ 1,99	3,57 $\pm$ 0,85	5,64 $\pm$ 1,11	2,52 $\pm$ 0,57	3,14 $\pm$ 0,477
A20	124,3 $\pm$ 11,47	137,9 $\pm$ 15,46	38,8 $\pm$ 6,55	29,15 $\pm$ 6,48	15,22 $\pm$ 7,04	19,71 $\pm$ 4,14	10,37 $\pm$ 3,63	13,05 $\pm$ 2,28	4,01 $\pm$ 1,28	7,19 $\pm$ 1,38	2,5 $\pm$ 0,79	4,69 $\pm$ 0,8
5.1	100,5 $\pm$ 13,39	114,3 $\pm$ 21m58	28,9 $\pm$ 3,81	25,1 $\pm$ 6,95	11,98 $\pm$ 3,95	16,06 $\pm$ 2,54	7,51 $\pm$ 1,96	7,537 $\pm$ 1,3	3,47 $\pm$ 0,95	5,55 $\pm$ 1,4	2,69 $\pm$ 0,75	3,65 $\pm$ 0,91
7.1	93,69 $\pm$ 11,3	124,2 $\pm$ 10,28	39,1 $\pm$ 5,92	30,2 $\pm$ 6,95	14,77 $\pm$ 4,21	17,95 $\pm$ 3,6	6,88 $\pm$ 1,85	11,04 $\pm$ 1,85	3,51 $\pm$ 0,87	6,66 $\pm$ 1,68	2,33 $\pm$ 0,41	4,13 $\pm$ 1,06

**Ensayo de promoción de crecimiento en suelo con plantas de arroz variedad 60.** Los datos representan la media  $\pm$  DS de dos réplicas biológicas realizadas para cada tratamiento. El número de individuos por réplica biológica fue de diez (10). Datos subrayados en verde presentan diferencias significativas positivas frente al control sin inocular. Los tratamientos AZPP010 y AZFN010 corresponden a *A. brasilense* y *A. chroococcum* respectivamente.

Tratamiento	Longitud planta (mm)	Longitud Raíz (mm)	Peso fresco planta (mg)	Peso fresco Raíz (mg)	Peso seco planta (mg)	Peso seco Raíz (mg)
C Neg	270,9 $\pm$ 54,16	75,45 $\pm$ 14,77	322,1 $\pm$ 29,74	141,3 $\pm$ 37,81	57,37 $\pm$ 7,96	16,65 $\pm$ 3,42
C M3.7	303,4 $\pm$ 30,53	64,45 $\pm$ 12,8	368,9 $\pm$ 76	148,5 $\pm$ 28,37	63,86 $\pm$ 15,88	17,84 $\pm$ 3,9
AZPP010	314,8 $\pm$ 38,01	89,11 $\pm$ 12m22	439,9 $\pm$ 72,16	138,4 $\pm$ 13,77	70,48 $\pm$ 11,26	23,58 $\pm$ 6,13
AZFN 010	314,9 $\pm$ 34,69	94,67 $\pm$ 14	407,8 $\pm$ 101,1	239,6 $\pm$ 72,74	72,84 $\pm$ 15,43	29,55 $\pm$ 6,18
A20	293,3 $\pm$ 43,15	89,35 $\pm$ 21,79	357,4 $\pm$ 114,8	176,1 $\pm$ 58,01	63,88 $\pm$ 7,58	29,92 $\pm$ 5,59
5.1	258 $\pm$ 56,6	76,05 $\pm$ 19,37	247,7 $\pm$ 82,11	125,1 $\pm$ 47,9	48,48 $\pm$ 11,22	21,51 $\pm$ 4,94
7.1	312,9 $\pm$ 31,77	86 $\pm$ 17,35	396,9 $\pm$ 83,27	163,5 $\pm$ 52,31	68,73 $\pm$ 10,27	19,92 $\pm$ 4,61

**Ensayo de promoción de crecimiento en suelo con plantas de arroz variedad 733.** Los datos representan la media  $\pm$  DS de dos réplicas biológicas realizadas para cada tratamiento. El número de individuos por replica biológica fue de diez (10). Datos subrayados en verde presentan diferencias significativas positivas frente al control sin inocular. Los tratamientos AZPP010 y AZFN010 corresponden a *A. brasilense* y *A. chroococcum* respectivamente.

Tratamiento	Longitud planta (mm)	Longitud Raíz (mm)	Peso fresco planta (mg)	Peso fresco Raíz (mg)	Peso seco planta (mg)	Peso seco Raíz (mg)
C Neg	201 $\pm$ 23,53	51,19 $\pm$ 5,54	117,3 $\pm$ 29,41	40,23 $\pm$ 11,8	22,08 $\pm$ 4,14	5,965 $\pm$ 1,794
C M3.7	212,5 $\pm$ 18,68	50,4 $\pm$ 10,14	139,4 $\pm$ 17,28	47,9 $\pm$ 13,42	25,08 $\pm$ 5,89	6,49 $\pm$ 1,75
AZPP010	235,7 $\pm$ 18,16	62,63 $\pm$ 7,03	160,6 $\pm$ 28,27	54,38 $\pm$ 12,89	27,84 $\pm$ 4,35	10,47 $\pm$ 2,36
AZFN 010	237,4 $\pm$ 19,72	63,25 $\pm$ 7,52	163,4 $\pm$ 35,59	60,55 $\pm$ 14,46	30,14 $\pm$ 6,15	9,39 $\pm$ 1,73
A20	249,5 $\pm$ 34,78	62,2 $\pm$ 14,01	193,5 $\pm$ 43,31	70,9 $\pm$ 15,09	31,52 $\pm$ 7,5	11,18 $\pm$ 2,18
5.1	209,3 $\pm$ 36,1	57,1 $\pm$ 8,71	153,4 $\pm$ 39,86	65,24 $\pm$ 21,98	25,17 $\pm$ 4,69	6,81 $\pm$ 2,32
7.1	234,8 $\pm$ 31,24	75,98 $\pm$ 18,83	189,4 $\pm$ 38,37	80,39 $\pm$ 15,68	30,44 $\pm$ 6,25	9,27 $\pm$ 3,20

## Bibliografía

Adesemoye AO & Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 1-12.

Adesemoye AO, Torbert HA & Kloepper JW (2008) Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can J Microbiol* **54**: 876-886.

Adesemoye AO, Torbert HA & Kloepper JW (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* **58**: 921-929.

Alvarez JG, Daza MC & Mendoza C (2008) Aplicación de un fertilizante enriquecido con silicio y materia orgánica en arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado en Ibagué y el Guamo (Tolima, Colombia). . *Revista Facultad Nacional de Agronomía* **61**: 4605-4617.

Amela FA (2008) Determinación de los parámetros genéticos del carácter longitud de panícula en arroz, *Oryza sativa* L. Thesis, Universidad Nacional de Colombia, Palmira.

Anderson AS & Wellington EM (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 797-814.

Andrews SC, Robinson AK & Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215-237.

Aulakh MS, Wassmann R, Bueno C, Kreuzwieser J & Rennenberg H (2001) Characterization of Root Exudates at Different Growth Stages of Ten Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Plant Biology* **3**: 139-148.

Baker KF (1987) Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **26**: 67-85.

Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva TA, *et al.* (2001) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 642-652.

Bernis JMF & Pamies CB (2004) Generalidades sobre el arroz y su cultivo. *Variedades y mejora del arroz (Oriza sativa,L)*, Vol. 1 ed.^eds.), p.^pp. 9-58. CopyRapid Tortosa, España.

Betancur LG (2011) Manejo integrado del añublo bacterial de la Panícula del arroz (*Oryza sativa l.*) Causado por *Burkholderia glumae* kurita & tabei: una revisión. *Revista Agronomía* **19**: 79-90.

Bhattacharyya PN & Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* **28**: 1327-1350.

Bloemberg GV & Lugtenberg BJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 343-350.

Bohlool BB, Ladha JK, Garrity DP & George T (1992) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Developments in plant and soil Sciences* **49**: 1-11.

Caballero-Mellado J, Martinez-Aguilar L, Paredes-Valdez G & Santos PE (2004) *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1165-1172.

Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de Los Santos P & Martinez-Aguilar L (2007) The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5308-5319.

Cao L, Qiu Z, You J, Tan H & Zhou S (2004) Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett Appl Microbiol* **39**: 425-430.

Caro OFC (2012) Aporte a la fitosanidad del cultivo de arroz en Colombia. *Revista Arroz* **58**: 12-15.

CIAT (2005) Morfología de la planta de arroz. Vol. 2013 ed.^eds.), p.^pp. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- Coenye T & Vandamme P (2003) Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* **5**: 719-729.
- Compant S, Clement C & Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry* **42**: 669-678.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C & Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4951-4959.
- Coombs JT & Franco CM (2003) Visualization of an endophytic Streptomyces species in wheat seed. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4260-4262.
- Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM & Ousley MA (1993) Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3899-3905.
- Cui XL, Mao PH, Zeng M, Li WJ, Zhang LP, Xu LH & Jiang CL (2001) Streptimonospora salina gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 357-363.
- Chater KF (2006) Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 761-768.
- Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T & Schrempf H (2009) The complex extracellular biology of Streptomyces. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 171-198.
- Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T & Schrempf H (2010) The complex extracellular biology of Streptomyces. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 171-198.
- Choudhary DK (2012) Microbial rescue to plant under habitat-imposed abiotic and biotic stresses. *Applied Microbiology Biotechnology* **96**: 1137-1155.
- Choudhury TMA & Khanifb YM (2001) Evaluation of effects of nitrogen and magnesium fertilization on rice yield and fertilizer nitrogen efficiency using <sup>15</sup>N tracer technique. *Journal of Plant Nutrition* **24**: 855-871.
- Dalrymple DG (1986) Rice and Rice Breeding. *Development and spread of high yielding rice varieties in developing countries*, Vol. 1 (Development Afl, ed. ^eds.), p. ^pp. 4-15. METROTEC, Inc., Washington, D.C.

DANE (2012) Encuesta calidad de vida 2012. Vol. 2013 (DANE, ed.^eds.), p.^pp. Departamento Administrativo Nacional de Estadística.

DANE & FEDEARROZ (2013) Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado, Primer semestre de 2013. ed.^eds.), p.^pp. 4-15. Departamento Administrativo Nacional de Estadística, Bogotá D.C.

Dennis PG, Miller AJ & Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* **72**: 313-327.

Diago M, Ospina JO, Pérez CR, *et al.* (2009) Un buen manejo del cultivo, verdadera barrera contra el añublo bacterial. *Revista Arroz* **57**: 30-38.

Dimkpa C, Svatos A, Merten D, Buchel G & Kothe E (2008) Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can J Microbiol* **54**: 163-172.

Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Buchel G & Kothe E (2009) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol* **107**: 1687-1696.

Dimkpa CO, Svatos A, Dabrowska P, Schmidt A, Boland W & Kothe E (2008) Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere* **74**: 19-25.

Dixon R & Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 621-631.

Doumbou CL, Salove MK, Crawford DL & Beaulieu C (2001) Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* **82**.

Duveiller E (1990) Bacterial sheath rot of wheat caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the highlands of Mexico. *Plant Disease* **74**: 932-935.

Duveiller E, Snacken F & Maraite H (1989) First detection of *Pseudomonas fuscovaginae* on maize and sorghum in Burundi. *Plant Disease* **73**: 514-517.

Dworkin M & Foster JW (1958) Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J Bacteriol* **75**: 592-603.

El-tarabily KA (2008) Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase - producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* **308**: 161-174.

El-tarabily KA, Hardy GE & Sivasithamparam K (2010) Performance of three endophytic actinomycetes in relation to plant growth promotion and biological control of *Phytophthora aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. *European Journal of Plant Pathology* **128**: 527-539.

Emmert EA & Handelsman J (1999) Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett* **171**: 1-9.

FEDEARROZ (2008) III Censo Nacional Arroceros. (Produmedios, ed.), p. 9-11. Federación Nacional de Arroceros

Fondo Nacional del Arroz, Bogotá D.C.

Flardh K & Buttner MJ (2009) Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7**: 36-49.

Flett F, Mersinias V & Smith CP (1997) High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from Escherichia coli to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* **155**: 223-229.

Flórez NMV & Uribe D (2011) Determination of the Infection of Burkholderia glumae in Comercial Colombian Rice Varieties. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* **64**.

Fones H & Preston GM (2013) The impact of transition metals on bacterial plant disease. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 495-519.

Foster RC (1988) Microenvironments of soil microorganisms. *Biol Fertil Soils* **6**: 189-203.

Franco - Correa M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodriguez M & Barea J (2010) Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* **45**: 209-217.

Franco C, Michelsen P, Percy N, et al. (2007) Actinobacterial endophytes for improved crop performance. *Australasian Plant Pathology* **36**: 524-531.

Getha K, Vikineswary S, Wong W, Seki T, Ward A & Goodfellow M (2005) Evaluation of *Streptomyces* sp. strain G10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot grown banana plantlets. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **32**: 24-32.

Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica* 1-15.

Glick BR, Penrose DM & Li J (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol* **190**: 63-68.

Glick BR, Cheng Z, Czarny J & Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* **119**: 329-339.

Goodfellow M (2012) Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 5 (Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W & Suzuki K-i, ed.^eds.), p.^pp. 34-2028. Springer science Business Media, New York.

Gopalakrishnan S, Pande S, Sharma M, et al. (2011) Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop protection* **30**: 1070-1078.

Gordon SA & Weber RP (1951) Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiol* **26**: 192-195.

Gulati A, Rahi P & Vyas P (2008) Characterization of Phosphate-Solubilizing Fluorescent Pseudomonads from the Rhizosphere of Seabuckthorn Growing in the Cold Deserts of Himalayas. *Current Microbiology* **56**: 73-79.

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF & Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 895-914.

Ham JH, Melanson RA & Rush MC (2011) Burkholderia glumae: next major pathogen of rice? *Molecular Plant Pathology* **12**: 329-339.

Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ & Ouhdouch Y (2008) Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**: 2565-2575.

Hanahan D, Jessee J & Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**: 63-113.

Hardoim PR, van Overbeek LS & Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* **16**: 463-471.

Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK & Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for n(2) fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* **43**: 1185-1207.

Hasegawa S, Meguro A, Shimizu M, Nishimura T & Kunoh H (2006) Endophytic Actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica* **20**: 72-81.

Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R & Ahmed I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* **60**: 579-598.

Herrmann L & Lesueur D (2013) Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 8859-8873.

Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR & Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* **8**: 15-25.

Honma M & Shimomura T (1978) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* **42**: 1825-1831.

Hopwood DA (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology* **145 ( Pt 9)**: 2183-2202.

Igual JM, Valverde A, Cervantes E & Velasquez E (2001) Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Journal University of Chemical Technology and Metallurgy* **41**: 297-302.

IRRI (2013) Site Specific Nutrient Management. Vol. 2013 ed.^eds.), p.^pp. Web page. International Rice Research Institute.

James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Research* **65**: 197-209.

Jaunet T, Notteghem JL & Rapiily F (1996) Pathogenicity Process of *Pseudomonas fuscovaginae*, the Causal Agent of Sheath Brown Rot of Rice. *Journal of Phytopathology* **144**: 425-430.

Javid MG, Sorooshzadeh A, Moradi F, Sanavy SAMM & Allahdadi I (2011) The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants *Australian Journal of Crop Science* **5**: 726-734.

Jog R, Nareshkumar G & Rajkumar S (2012) Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. *J Appl Microbiol* **113**: 1154-1164.

Kanini G, Katsifas E, Savvides A, Hatzinnikolau D & Karagouni A (2013) Greek indigenous *streptomyces* as biocontrol agents against the soil-borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal Applied Microbiology* **114**: 1468-1479.

Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S & Gulati A (2008) A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology* **57**: 503-507.

Katiyar V & Goel R (2004) Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluprescent pseudomonad. *Plant Growth Regulation* **42**: 239-244.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner KF & Hopwood DA (2000) Introduction of DNA into *Streptomyces*. *Practical Streptomyces genetics*, ed. eds.), p. pp. 249. The John Innes Foundation, Norwich, England.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner KF & Hopwood DA (2000) General introduction to actinomycete biology. *Practical Stretomyces gentics*, ed. eds.), p. pp. 2-6. The John Innes Foundation, Norwich, England.

Kinkel LL, Schlatter DC, Bakker MG & Arenz BE (2012) *Streptomyces* competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. *Res Microbiol* **163**: 490-499.

Kloepper JW & Schroth MN (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. ed. eds.), p. pp. Agers, France Tours, France.

Kloepper JW, Ryu CM & Zhang S (2004) Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* **94**: 1259-1266.

Kloepper JW, A G-E & Mcinroy JA (2007) Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 159-167.

Kloepper JW, Leong J, Tenitze M & Schroth MN (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**: 885-886.

- Knief C, Delmotte NI, Chaffron S, *et al.* (2012) Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME Journal* **6**: 1378-1390.
- Labeda DP, Goodfellow M, Brown R, *et al.* (2011) Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek* **101**: 73-104.
- Lambrecht M, Vande Broek A, Dosselaere F & Vanderleyden J (1999) The ipdC promoter auxin-responsive element of *Azospirillum brasilense*, a prokaryotic ancestral form of the plant AuxRE? *Mol Microbiol* **32**: 889-891.
- Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A & Vanderleyden J (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol* **8**: 298-300.
- Legault GS, Lerat S, Nicolas P & Beaulieu C (2011) Tryptophan regulates thaxtomin A and indole-3-acetic acid production in *Streptomyces scabiei* and modifies its interactions with radish seedlings. *Phytopathology* **101**: 1045-1051.
- Leisso RS, Miller PR & Burrows ME (2009) The influence of biological and fungicidal seed treatments on chickpea (*Cicer arietinum*) damping off. *Canadian Journal of Plant Pathology* **31**: 38-46.
- Lin L & Xu X (2013) Indole-3-acetic acid production by endophytic *Streptomyces* sp. En-1 isolated from medicinal plants. *Curr Microbiol* **67**: 209-217.
- Lindow SE & Brandl MT (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1875-1883.
- Loper JE & Buyer JS (1991) Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant Microbe Interactions* **4**: 5-13.
- Lugtenberg B & Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* **63**: 541-556.
- Maheshwari DK, Hardoim P, Nissinen R & Elsas J (2012) Ecology of Bacterial Endophytes in Sustainable Agriculture. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*, ed. eds.), p. pp. 97-126. Springer Berlin Heidelberg.

Mahmoud ALE & Abdallah MA (2001) Siderophores production by some microorganisms and their effect on Bradyrhizobium-mungbean symbiosis. *Int. J. Agric. Biol.* **3**: 157-162.

Maksimov IV, Abizgil'dina RR & Pusenkova LI (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Alternative to Chemical Crop Protectors from Pathogens. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2011**: 333-345.

Mattiuzzo M, Bertani I, Ferluga S, *et al.* (2011) The plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* contains two conserved quorum sensing systems involved in virulence and negatively regulated by RsaL and the novel regulator RsaM. *Environmental Microbiology* **13**: 145-162.

Medina JH (2009) Buen comportamiento de las variedades Fedearroz 60, Fedearroz 369 y Fedearroz 733 en Sabana de Torres. *Boletín Informativo de la Federación Nacional de Arroceros* **218**: 3-4.

Mendez del Villar P (2011) Una visión del mercado mundial del arroz. Situación y perspectivas. . ed.^eds.), p.^pp. San Carlos, Chile.

Merzaeva OV & Shirokikh IG (2006) [Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera]. *Mikrobiologiya* **75**: 271-276.

Miransari M (2013) Soil microbes and the availability of soil nutrients. *Acta Physiol Plant in press*.

Miyazaki J, Higa R, Toki T, *et al.* (2009) Molecular characterization of potential nitrogen fixation by anaerobic methane-oxidizing archaea in the methane seep sediments at the number 8 Kumano Knoll in the Kumano Basin, offshore of Japan. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7153-7162.

Moldenhauer KaK & Gibbons JH (2003) Rice morphology and Development. *Rice. Origin, history, technology and production.*, Vol. 1 (Smith CW & Dilday RH, ed.^eds.), p.^pp. 103-125. Jhon wiley & sons, Inc New Jersey.

Nandakumar R, Rush MC & Correa F (2007) Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with Panicle Blight Symptoms on Rice in Panama. *Plant Disease* **91**: 767.

Nandakumar R, Shahjahan AKM, Yuan XL, *et al.* (2009) *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States *Plant Disease* **93**: 896-905.

Neilands JB (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**: 26723-26726.

Nimnoi P, Pongsilp N & Lumyong S (2010) Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World J Microbiol Biotechnol* **26**: 193-203.

Patil HJ, Srivastava AK, Singh DP, Chaudhari BL & Arora DK (2011) Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. *Crop protection* **30**: 1269-1273.

Penrose DM & Glick BR (2001) Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Can J Microbiol* **47**: 368-372.

Pérez CR (2010) Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae*. *Revista Arroz* **58**: 4-8.

Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P & van der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol*.

Pillay VK & Nowak J (1997) Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 354-361.

Pospiech A & Neumann B (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet* **11**: 217-218.

Prasha P, Kapoor N & Sachdeva S (2013) Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* **In press**.

Prashar P, Kapoor N & Sachdeva S (2013) Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* **In press**.

Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH & Li WJ (2011) Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 457-473.

Radzki W, Mañero FJG, Algar E, García JAL, García-Villaraco A & Solano BR (2013) Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek* **104**: 321-330.

Rajkumar M, Ae N, Prasad MN & Freitas H (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol* **28**: 142-149.

Reinhold-Hurek B & Hurek T (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 435-443.

Ribbe M, Gadkari D & Meyer O (1997) N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J Biol Chem* **272**: 26627-26633.

Richardson AE, Barea JM, McNeill AM & Pringent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant soil* **321**: 305-339.

Roberts DP & Lohrke SM (2003) United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research programs in biological control of plant diseases. *Pest Manag Sci* **59**: 654-664.

Rodriguez H & Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* **17**: 319-339.

Rosenblueth M & Martinez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 827-837.

Rubio LM & Ludden PW (2005) Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J Bacteriol* **187**: 405-414.

Ryan AD & Kinkel LL (1997) Inoculum Density and Population Dynamics of Suppressive and Pathogenic *Streptomyces* Strains and Their Relationship to Biological Control of Potato Scab. *Biological Control* **10**: 180-186.

Sadeghi A, Karimi E, Dahaji PA, Javid MG, Dalvand Y & Askari H (2012) Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World J Microbiol Biotechnol* **28**: 1503-1509.

Saha R, Saha N, Donofrio RS & Bestervelt LL (2013) Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol* **53**: 303-317.

Salazar JCR & López RS (2011) Perspectivas agropecuarias. Primer semestre de 2012. Vol. 1 (Rural MdAyD, ed. eds.), p. pp. 2-76. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá D.C.

Samac DA & Kinkel LL (2001) Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. *Plant and Soil* **235**: 35-44.

Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47-56.

Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U & Wilhelm E (2002) Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* **39**: 23-32.

Sessitsch A, Hardoim P, Doring J, *et al.* (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 28-36.

Shirling E & Gottlieb D (1968) Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* III. Additional species descriptions from first and second studies. *International Journal of Systematic Bacteriology* **18**: 279-392.

Solans M, Vobis G, Cassaín F, Luna V & Wall LG (2011) Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant *Ochetophila trinervis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 2195-2202.

Spaepen S & Vanderleyden J (2010) Auxin and Plant-Microbe interactions *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1-13.

Spaepen S, Versees W, Gocke D, Pohl M, Steyaert J & Vanderleyden J (2007) Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* **189**: 7626-7633.

Stoop WA, Adam A & Kassam A (2009) Comparing rice production systems: A challenge for agronomic research and for the dissemination of knowledge-intensive farming practices. *Agricultural Water Management* **96**: 1491-1501.

- Sun J, Kelemen GH, Fernandez-Abalos JM & Bibb MJ (1999) Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **145** ( Pt 9): 2221-2227.
- Taechowisan T, Peberdy JF & Lumyong S (2003) Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Ann Microbiol* **53**: 447-461.
- Tang YW & Bonner J (1947) The enzymatic inactivation of indole-acetic acid. *Arch. Biochem.* **13**.
- Tanii A, Miyajima K & Akita T (1976) The sheath brown rot disease of rice and its causal bacterium *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **42**: 540-548.
- Thamdrup B (2012) New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **43**: 407-428.
- Tian X, Cao L, Tan H, Han W, Chen M, Liu Y & Zhou S (2007) Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microbial Ecol* **53**: 700-707.
- Tian XL, Cao LX, Tan HM, Zeng QG, Jia YY, Han WQ & Zhou SN (2004) Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**: 303-309.
- Tokala R, Strap J, Jung C, et al. (2002) Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). *Appli. Environ. Microbiol.* **68**: 2161-2171.
- Torres MA (2013) Demostrativos en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*). ed.^eds.), p.^pp. Biocultivos S.A., <http://biocultivos.com.co/dctos/demostrativos%20en%20el%20cultivo%20de%20arroz.pdf>.
- Turner TR, James EK & Poole PS (2013) The plant microbiome. *Genome Biol* **14**: 209.
- Uren NC (2007) Types, Amounts, and possible fuctions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *The Rhizosphere. Biochemistry and*

*Organic Substances at the soil-Plant interface.* ,(Pinton R, Varanini Z & Nannipieri P, ed.^eds.), p.^pp. 1-23. Taylor and Francis Group, Boca ratón, Florida.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF & van Sinderen D (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 495-548.

Verma VC, Singh SK & Prakash S (2011) Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Basic Microbiology* **51**: 550-556.

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant soil* **255**: 571-586.

Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **10**: 828-840.

Yandigeri MS, Meena KK, Singh D, *et al.* (2012) Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions. *Plant Growth Regulation* **2012**.

Zarandi ME, Bonjar GHS, F. Padasht Dehkaei, Moosavi SAA, Farokhi PR & Aghighi S (2009) Biological Control of Rice Blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in Greenhouse. *American Journal of Applied Sciences* **6**: 194-199.

Zeigler RS & Alvarez E (1987) Bacterial sheath brown rot of rice by *Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America. *Plant disease* **71**: 592-597.

Zeigler RS & Alvarez E (1990) Characteristics of *Pseudomonas* spp. Causing grain Discoloration and sheath Rot of Rice, and Associated Pseudomonad Epiphytes. *Plant Disease* **74**: 917-922.