

## Identificación molecular de bacterias asociadas a la filosfera de plantas de arroz (*Oryza sativa* L), mediante técnicas de cultivo microbiano.

Molecular identification of bacteria associated with the phyllosphere of rice plants (*Oryza sativa* L), through microbial culture techniques.

Carlos Deza N.<sup>1</sup>, Dicson. Sánchez A<sup>2</sup>, Jean Silva A<sup>3</sup>, Ramón García<sup>1</sup>, Eric Mialhe<sup>2</sup>.

### Resumen

Las plantas albergan una gran diversidad de microorganismos, como hongos, bacterias, etc., que interactúan con ella y tienen una funcionalidad que va desde la patogenicidad, hasta la protección de la misma. Se ha estudiado parte de esta diversidad microbiana a nivel de la filosfera en plantas de *Oryza sativa* (L) "arroz"; mediante microbiología molecular se ha caracterizado siete especies bacterianas entre las cuales sobresalieron especies Uncultured, es decir no cultivadas, además de *Bacillus amyloliquefasciens*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pantoea* sp., todas ellas con un alto porcentaje de identidad; asimismo, mediante metagenómica dirigida se caracterizó trescientos ochenta y cinco especies bacterianas, de las que sobresalen pertenecen a los generos *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Clostridium*, *Methylobacterium* y *Pantoea*. Las familias que más destacan son *Enterobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Microbacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Nocardiaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Clostridiaceae* y *Methylobacteriaceae*; no se encontró *Burkholderia glumae*,

**Palabras claves:** Filosfera, *Oryza sativa*, metagenómica, microbiología molecular

### Abstract

Plants are home to a great diversity of microorganisms; such as fungi, bacteria, etc., that interact with it and have a functionality ranging from the pathogenicity, to the protection of the same. Has been part of this microbial diversity at the level of phyllosphere in *Oryza sativa* (L) "rice plant"; using molecular microbiology has characterized seven bacterial species among which stood out, Uncultured species that is to say not cultivated, in addition of *Bacillus amyloliquefasciens*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pantoea* sp., all them with a high percentage of identity; three hundred eighty five bacterial species was characterized through directed metagenomics, the species belonging to the genera *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Clostridium*, *Methylobacterium* and *Pantoea* more they stand out. The families that stand out most are *Enterobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Microbacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Nocardiaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Clostridiaceae* and *Methylobacteriaceae*; we did not find *Burkholderia glumae*.

Key words: Phyllosphere, *Oryza sativa*, metagenomics, molecular microbiology

---

1. Departamento Acad. Producción Agrícola, Universidad Nacional de Tumbes

cadn\_2006@hotmail.com

2. Inca' Biotec SAC.

dickson\_sa@hotmail.com

3. Escuela de Postgrado, Maestría Biotecnología Molecular, Universidad Nacional de Tumbes jcsa\_jean@hotmail.com

## Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L), es el segundo cereal más producido en el mundo, ocupa el cuarto lugar en Perú y en Tumbes es el principal cultivo con mayor capacidad de generar empleo. Actualmente, enfrenta serios problemas de carácter fitosanitario, dentro de los que destaca el “añublo bacterial de la panícula” causada por la bacteria patógena *Burkholderia glumae*, que provoca grandes pérdidas y preocupa al sector agrícola. Una de las estrategias que se debe utilizar, para solucionar esta problemática, es la del control biológico; en ese propósito

destaca el uso de algunas técnicas dependientes e independientes de cultivo microbiano. En tal sentido y con el objetivo de identificar las bacterias cultivadas y no cultivadas asociadas a la filosfera de plantas de arroz, se realizó esta investigación utilizando herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la amplificación del gen 16S ARN ribosomal y la secuenciación del metagenoma obtenido en la filosfera de las plantas de arroz.

## Material y métodos

### Población, muestra y muestreo

La población estuvo compuesta por las bacterias presentes en la filosfera de las plantas de arroz de la parcela seleccionada, ubicada en el sector “La Variante”, distrito de San Pedro de los Incas - Tumbes; la muestra estuvo constituida por las bacterias que habitaban en la filosfera de las plantas de arroz (*Oryza sativa*), variedad Tinajones; para el muestreo se hizo una prospección en zigzag, se seleccionaron plantas de arroz de las que se obtuvieron las muestras.

### Microbiología molecular:

#### Aislamiento de bacterias

Las muestras de filosfera, se depositaron en tubos falcon de 50 ml conteniendo *buffer tween* al 0,1%, y se colocaron en un *shaker*, para su inmediata agitación, a 130 rpm por 24 horas. Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados como soluciones madre para realizar diluciones decimales, las que fueron depositadas en tubos eppendorf. Se plaquearon los medios de cultivo en placas petri, donde se adicionaron 75 µl de cada dilución que se extendió por toda la placa. Las placas fueron dejadas a temperatura ambiente por 24 horas, para el desarrollo de microorganismos. Luego se realizaron tres purificaciones de las colonias bacterianas en nuevos medios de cultivo.

#### Extracción de ADN

Las colonias bacterianas puras obtenidas de los diferentes medios de cultivo se pusieron a crecer, por 48 horas, en tubos de 1,5

ml conteniendo LB caldo; para luego ser centrifugadas a 10 000 rpm por dos minutos. El sobrenadante fue descartado; al sedimento se le hizo la extracción de ADN bacteriano mediante el método del shock térmico, según se indica: el sedimento se resuspendió en 500 µl de solución A (PBS 1X), se vortexeo por 1 minuto, se microcentrifugo a 10 000 rpm por dos minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 200 µl de solución B (TE 1X). Se llevó a ebullición por 10 minutos e inmediatamente se colocó sobre hielo por cinco minutos. Se microcentrifugo el sobrenadante a 10 000 rpm por un minuto y se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml. Se hizo diluciones decimales del sobrenadante, para la PCR. Se agregó un µl de ARNasa a todas las diluciones y se incubó a 65 °C por 15 minutos, obteniendo así las muestras de ADN de cada colonia pura bacteriana. Se almacenaron las muestras de ADN a 20 °C, quedando listas para ser utilizadas en la: PCR, electroforesis y secuenciación.

#### Reacción en cadena de la polimerasa

Para comprobar la presencia de ADN bacteriano cultivable, en las muestras de filosfera, se realizó una PCR dirigida a la amplificación del gen 16S ADN ribosomal con los primers universales (Tabla 1); y para identificar la presencia o ausencia de la bacteria *B. glumae*, se realizó la PCR dirigida a la amplificación del gen *gyrB* de la sub-

unidad D de la girasa con primers específicos (Tabla 2).

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los primers 27-f y 492-r para amplificar el gen 16S ADN ribosomal, en la filósfera de *O. sativa*.

Primers	Sentido	Secuencia nucleotídica
27-f	Forward	5' - AGAGTTTGATCMTGGCTC - 3'
1492-r	Reverse	5' - TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3'

M: Adenina o Citosina

Y: Timina o Citosina.

Para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal y del gen *gyrB* de la subunidad D de la girasa se utilizó un mix de reacción (Tabla 3).

Se desarrollaron protocolos de replicación artificial para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal y del gen *gyrB* de la subunidad de la D de la girasa (Tablas 4 y 5), los mismos que sirvieron para la obtención final de los amplicones.

Volumen de reacción de 23 µl para muestras, incluyendo un control (+) de extracción más un control (-) de PCR y un control (-) de extracción (\*) Se adiciona en el momento de desarrollar el protocolo de replicación artificial para la amplificación.

Tabla 4. Protocolo de replicación artificial para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal, en la filósfera de *Oryza sativa*.

Fase	Tiempo (min.)	Ciclos	Temperatura (°C)
Desnaturalización del ADN	1	35	94
Hibridación	1	35	58
Polimerización	1	35	72

### Electroforesis.

Los amplicones de las bacterias cultivables asociadas a la filósfera, obtenidos en la PCR, fueron observados en gel de migración, preparado mezclando 1,8 g de agarosa con 120 ml de TAE, la solución se calentó hasta que la agarosa se disolvió, se agregaron 6 µl de bromuro de etidio, se dejó enfriar y se depositó la solución en la cubeta de electroforesis. Se mezcló 2 µl de azul de bromofenol con 8 µl de los amplicones, la mezcla se puso en los pocillos, luego se ubicó el gel sobre el transluminador y se observó la migración de moléculas de ADN. Para obte

Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los primers Glu-Fw y Glu-Rw dirigidos al gen *gyrB* de la subunidad D de la girasa, en filósfera de *O. sativa*.

Primers	Sentido	Secuencia nucleotídica
Glu-Fw	Forward	5'-GAA GTG TCG CCG ATG GAG- 3'
Glu-Rw	Reverse	5'-CCT TCA CCG ACA GCA CGC AT- 3'

Tabla 3. Composición del mix de reacción para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal y del gen *gyrB* de la subunidad D de la girasa, en la filósfera de *O. sativa*.

Insumo	Volumen (µl)
AUP	16,2
Buffer	2,5
Cl <sub>2</sub> Mg	2,5
DNTPs	0,5
Iniciador Fower	0,6
Iniciador Rever	0,6
Taq polimerasa	0,1
ADN (*)	2 µl por muestra
Total	25

Tabla 5. Protocolo de replicación artificial para la amplificación del gen *gyrB* de la subunidad D de la girasa, en la filósfera de *O. sativa*.

Fase	Tiempo (s)	Ciclos	Temperatura (°C)
Desnaturalización del ADN	45	40	94
Hibridación	45	40	55
Polimerización	45	40	72

ner el tamaño del amplicon se usó un marcador de peso molecular.

### Secuenciación.

Los amplicones obtenidos en la PCR, de las bacterias cultivables asociadas a la filósfera, se enviaron a secuenciar. Las bandas fuertes y medianamente fuertes fueron previamente diluidas en agua ultra pura.

### Caracterización molecular por metagenómica dirigida:

#### Extracción de ADN total.

Las muestras de filósfera se colocaron en tubos Falcon de 50 ml conteniendo *buffer tween* al 0,1%, los tubos fueron sellados con papel de aluminio y parafilm, luego se agitaron en un *shaker* a 130 rpm por 24 hs. Las muestras se centrifugaron a 14 000 g por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, el sedimento fue lavado con agua destilada, se eliminó el sobrenadante para luego resuspender el sedimento en 500 µl de agua destilada autoclavada y se depositó en tubos de 1,5 ml, quedando listas las muestras para la extracción de ADN; lo cual se hizo mediante el kit de aislamiento de ADN Power Soil (MO BIO. 2016).

Tabla 6. Composición del mix de reacción para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal, en la filósfera de *O. sativa*.

Insumo	Volumen (µl)	Muestras	Volumen (µl)
AUP	16,2	7	113,4
Buffer	2,5	7	17,5
Cl2Mg	2,5	7	17,5
dNTPs	0,5	7	3,5
Iniciador Fower	0,6	7	4,2
Iniciador Rever	0,6	7	4,2
Taq polimerasa	0,1	7	0,7
ADN (*)	1 µl por muestra		
Total	24		161

Volumen de reacción de 24 µl para siete muestras, incluyendo un control (+) de extracción, más un control (-) de PCR y un control (-) de extracción.

(\*) Se adiciona en el momento de desarrollar el protocolo de replicación artificial para la amplificación.

Los protocolos de replicación artificial para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal y del gen *gyrB* de la subunidad D de la girasa, son los mismos que se desarrollan para microbiología molecular y se detallan en las Tablas 4 y 5. Los amplicones obtenidos se usaron en la electroforesis y la secuenciación.

### Electroforesis.

Los amplicones de las bacterias cultivables y no cultivables asociadas a la filósfera, obtenidos en la PCR, fueron observados en gel de migración, siguiendo el mismo protocolo que se utilizó en microbiología molecular.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para comprobar la presencia de ADN bacteriano total, así como para identificar la presencia o ausencia de la bacteria patógena *B. glumae* en las muestras de filósfera, se realizaron PCRs, de manera similar a lo realizado en microbiología molecular (Tablas 1 y 2). Para la amplificación del gen 16S ADN ribosomal y del gen *gyrB* de la subunidad D de la girasa, se utilizó un mix de reacción, parecido al que se manejó en microbiología molecular (Tablas 6 y 7).

Tabla 7. Composición del Mix de reacción para la amplificación del gen *gyrB* de la subunidad D de la girasa, en la filósfera de *O. sativa*.

Insumo	Volumen (µl)	Muestras	Volumen (µl)
AUP	16,2	5	81
Buffer	2,5	5	12,5
Cl2Mg	2,5	5	12,5
dNTPs	0,5	5	2,5
Iniciador Fower	0,6	5	3
Iniciador Rever	0,6	5	3
Taq polimerasa	0,1	5	0,5
ADN (*)	1 µl por muestra		
Total	24		115

Volumen de reacción de 24 µl para cinco muestras, incluyendo un control (+) de extracción, más un control (-) de PCR y un control (-) de extracción.

(\*) Se adiciona en el momento de desarrollar el protocolo de replicación artificial para la amplificación.

### Secuenciación.

Los amplicones, con el ADN de las bacterias cultivables y no cultivables, asociadas a la filósfera, obtenidos en la PCR, se enviaron a secuenciar. Las bandas fuertes y medianamente fuertes fueron previamente diluidas en agua ultra pura.

### Procesamiento y análisis de datos.

El análisis de las secuencias obtenidas, por microbiología molecular, de las bacterias cultivables, se realizó mediante el uso de una herramienta de acceso libre en la Internet llamada Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) que se enlaza con el Centro

Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI 2016), que tiene a disposición las secuencias génicas de los organismos existentes.

Para el análisis de la metagenómica se utilizó el Software MG-RAST (Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Tech

nology) un servidor de aplicaciones web de código abierto que realiza el análisis filogenético y funcional de metagenomas (MG RAST. 2007.). Se utilizó la fuente de anotación Greengenes, con un e-Value Cutoff de - 30, un 95% de identidad mínima y una longitud de alineamiento de 20 nucleótidos.

## Resultados

Mediante microbiología molecular se identificaron siete bacterias cultivables asociadas a la filosfera del arroz, resaltando *Pantoea*

sp.; pero dos especies fueron no cultivadas, todas ellas con un alto porcentaje de identidad (Tabla 8).

Tabla 8. Bacterias cultivables asociadas a la filosfera de *O. sativa*, caracterizadas mediante el gen 16S ARN ribosomal.

Nº	Bacterias Cultivables	Referencia(*)	Identidad %	Código de Acceso
1	<i>Pantoea</i> sp. LS-123	Soil and genetic effect on cultivable rice endophytes	100	KR067595.1
2	<i>Enterobacter asburiae</i> strain 35734	Direct Submission	99	CP012162.1
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Direct Submission	99	AP014950.1
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ICBB 200	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> as plant inoculant	98	KP681701.2
5	<i>Uncultured bacterium</i> clone 1.2	16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult <i>Anopheles darlingi</i> (Diptera: Culicidae) mosquitoes	99	EF179807.1
6	<i>Uncultured bacterium</i> clone SHCB1150	Field-rice roots host diverse endophyte communities, which are dominated by nitrogen-fixing <i>Enterobacter</i> strains	99	N698215.1
7	<i>Uncultured bacterium</i> clone SHCB0588	Field-rice roots host diverse endophyte communities, which are dominated by nitrogen-fixing <i>Enterobacter</i> strains	99	JN697822.1

\* NCBI. 2016b.

La distribución del dominio bacteriano asociado a la filosfera, obtenido mediante metagenómica dirigida, fue de 385 especies, agrupadas en 125 familias, 59 órdenes y 13 filum (Figura 1). En el género *Burkholderia*, no se encontró *B. glumae*, pero sí pequeñas fracciones de *B. pseudomallei*, *B. fungorum*, *Burkholderia* sp. JPY479 y la no cultivadas *Burkholderia* sp.

*riaceae*, *Clostridiaceae* y *Methylobacteriaceae* (Tabla 9).

Las especies que más sobresalen pertenecen a los generos *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardioide*, *Clostridium*, *Methylobacterium* y *Pantoea*. Las familias que más destacan son *Enterobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Microbacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Nocardiaceae*, *Mycobacte*

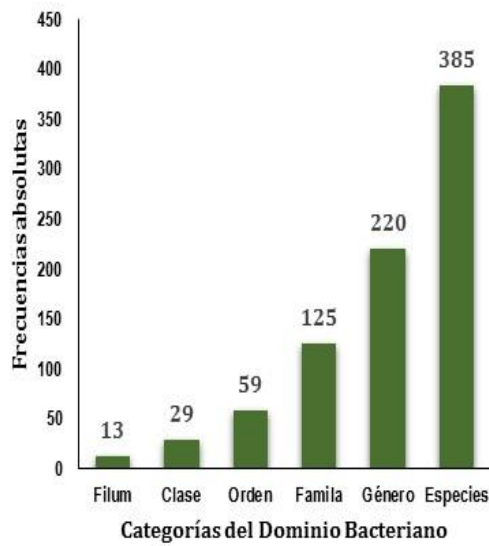


Figura 1. Distribución del dominio bacteriano asociado a la filósfera de *Oryza sativa*.

Tabla 9. Distribución del dominio bacteriano, hasta especie en la filósfera de *O. sativa*.

Phyla

1 Acidobacterias	2 Bacteroidetes	3 Chloroflexi	4 Cyanobacteria
5 Deinococcus-Thermus	6 Firmicutes	7 Nitrospirae	8 Planctomycetes
9 Proteobacteria	10 Tenericutes	11 Verrucomicrobia	12 y 13 Unclassified (derived from Bacteria)

Clases

1 Acidobacteriia	2 Solibacteres	3 Actinobacteria (class)	4 Bacteroidia
5 Cytophagia	6 Flavobacteriia	7 Sphingobacteriia	8 Chloroflexi (class)
9 Deinococci	10 Bacilli	11 Clostridia	12 Negativicutes
13 Nitrospira (class)	14 Planctomycetia	15 Alphaproteobacteria	16 Betaproteobacteria
17 Deltaproteobacteria	18 Epsilonproteobacteria	19 Gammaproteobacteria	20 Mollicutes
21 Opitutae	22 Spartobacteria	23 Verrucomicrobiae	24 Unclassified (derived from Acidobacteria)
25 Unclassified (derived from Bacteroidetes)		26 Unclassified (derived from Cyanobacteria)	
27 Unclassified (derived from Proteobacteria)		28 Unclassified (derived from Verrucomicrobia)	
29 Unclassified (derived from bacteria)			

Familias

1 Acidobacteriaceae	2 Solibacteraceae	3 Acidimicrobiaceae	4 Bogoriellaceae
5 Brevibacteriaceae	6 Cellulomonadaceae	7 Corynebacteriaceae	8 Dermacoccaceae
9 Dermatophilaceae	10 Frankiaceae	11 Geodermatophilaceae	12 Intrasporangiaceae
13 Kineosporiaceae	14 Microbacteriaceae	15 Micrococcaceae	16 Micromonosporaceae
17 Mycobacteriaceae	18 Nocardiaceae	19 Nocardiodiaceae	20 Nocardiopepsaceae
21 Promicromonosporaceae	22 Pseudonocardiaceae	23 Streptomycetaceae	24 Streptosporangiaceae
25 Thermomonosporaceae	26 Bifidobacteriaceae	27 Rubrobacteraceae	28 Bacteroidaceae
29 Porphyromonadaceae	30 Rikenellaceae	31 Cytophagaceae	32 Flavobacteriaceae
33 Sphingobacteriaceae	34 Rhodothermaceae	35 Chloroflexaceae	36 Oscillochloridaceae
37 Nostocaceae	38 Rivulariaceae	39 Scytonemataceae	49 Deinococcaceae
41 Bacillaceae	42 Paenibacillaceae	43 Planococcaceae	44 Staphylococcaceae
45 Thermoactinomycetaceae	46 Carnobacteriaceae	47 Enterococcaceae	48 Lactobacillaceae
51 Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	52 Clostridiales Family XII. Incertae Sedis	53 Clostridiales Family XVII. Incertae Sedis	59 Thermoanaerobacterales Family III. Incertae Sedis
49 Streptococcaceae	50 Clostridiaceae	54 Eubacteriaceae	55 Lachnospiraceae
57 Peptostreptococcaceae	58 Ruminococcaceae	56 Peptococcaceae	60 Veillonellaceae
61 Nitrospiraceae	62 Planctomycetaceae	63 Caulobacteraceae	64 Bartonellaceae
65 Beijerinckiaceae	66 Bradyrhizobiaceae	67 Brucellaceae	68 Methylobacteriaceae
69 Phyllobacteriaceae	70 Rhizobiaceae	71 Rhodobiaceae	72 Xanthobacteraceae
73 Rhodobacteraceae	74 Acetobacteraceae	75 Rhodospirillaceae	76 Anaplasmataceae

77 Rickettsiaceae	78 Erythrobacteraceae	79 Sphingomonadaceae	80 Aeromonadaceae
81 Alcaligenaceae	82 Burkholderiaceae	83 Comamonadaceae	84 Oxalobacteraceae
85 Methylophilaceae	86 Neisseriaceae	87 Rhodocyclaceae	88 Bdellovibrionaceae
89 Desulfobacteraceae	90 Desulfobulbaceae	91 Cystobacteraceae	92 Myxococcaceae
93 Polyangiaceae	94 Aeromonadaceae	95 Ectothiorhodospiraceae	96 Enterobacteriaceae
97 Coxiellaceae	98 Legionellaceae	99 Halomonadaceae	100 Moraxellaceae
101 Pseudomonadaceae	102 Xanthomonadaceae	103 Mycoplasmataceae	104 Opitutaceae
105 Verrucomicrobia subdivision	106 Verrucomicrobiaceae	107 Unclassified (derived from Acidobacteria)	
108 Unclassified (derived from Sphingobacteriales)		109 Unclassified (derived from Bacteroidetes)	
110 Unclassified (derived from Chroococcales)		111 Unclassified (derived from Oscillatoriales)	
112 Unclassified (derived from Cyanobacteria)		113 Unclassified (derived from Bacillales)	
114 Unclassified (derived from Rhizobiales)		115 Unclassified (derived from Rhodobacterales)	
116 Unclassified (derived from Alphaproteobacteria)		117 Unclassified (derived from Burkholderiales)	
118 Unclassified (derived from Betaproteobacteria)		119 Unclassified (derived from Deltaproteobacteria)	
120 Unclassified (derived from Epsilonproteobacteria)		121 Unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	
122 Unclassified (derived from Proteobacteria)		123 Unclassified (derived from Spartobacteria)	
124 Unclassified (derived from Verrucomicrobia)		125 Unclassified (derived from Bacteria)	

### Género y Especies

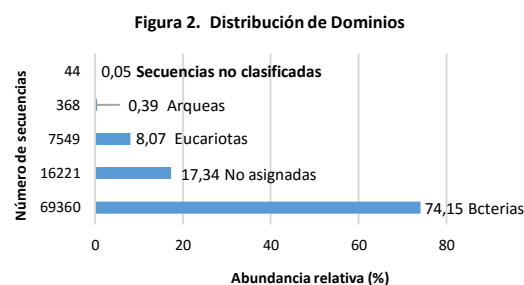
1 Acidobacterium capsulatum	2 Candidatus Solibacter usitatus	3 Candidatus Koribacter versatilis
4 Acidimicrobium ferrooxidans	5 Bogoriella caseolytica	6 Brevibacterium casei
7 Cellulomonas bogoriensis	8 Cellulomonas fimi	9 Cellulomonas sp. GM13
10 Corynebacterium cyclohexanicum	11 Corynebacterium durum	12 Kytococcus sedentarius
13 Dermatophilus congolensis	14 Frankia sp.	15 Geodermatophilus obscurus
16 Janibacter sp. BY48	17 Terrabacter sp. YK1	18 Terrabacter sp. YK3
19 Terrabacter tumescens	20 Tetrasphaera japónica	21 Tetrasphaera jenkinsii
22 Kineococcus aurantiacus	23 Agrococcus jenensis	24 Agromyces cerinus
25 Cryobacterium psychrophilum	26 Curtobacterium albidum	27 Curtobacterium flaccumfaciens
28 Curtobacterium oceanosedimentum	29 Glaciibacter superstes	30 Leifsonia aquatica
31 Leifsonia poae	32 Leifsonia xyli	33 Microbacterium aurum
34 Microbacterium oxydans	35 Pseudoclavibacter helvolus	36 Subtercola frigoramans
37 Arthrobacter citreus	38 Arthrobacter crystallopoietes	39 Arthrobacter oxydans
40 Arthrobacter sp.	41 Kocuria rosea	42 Rothia dentocariosa
43 Rothia mucilaginosa	44 Actinoplanes liguriensis	45 Actinoplanes philippinensis
46 Micromonospora chokoriensis	47 Micromonospora echinospora	48 Micromonospora pattaloongensis
49 Micromonospora peucetia	50 Mycobacterium farcinogenes	51 Mycobacterium gilvum
52 Mycobacterium haemophilum	53 Mycobacterium intracellulare	54 Mycobacterium petroleophilum
55 Mycobacterium sp. CH-2	56 Mycobacterium sp. JS621	57 Mycobacterium sp. SPYrGe1
58 Nocardia vaccinii	59 Rhodococcus erythropolis	60 Rhodococcus rhodnii
61 Aeromicrobium marinum	62 Nocardioides albus	63 Nocardioides sp.
64 Nocardioides sp. AN3	65 Nocardioides sp. CF8	66 Nocardioides sp. DN36
67 Nocardioides sp. JS614	68 Nocardioides sp. MTD22	69 Pimelobacter simplex
70 Nocardiosis composta	71 Cellulosimicrobium sp. HY-13	72 Amycolatopsis methanolica
73 Lentzea violácea	74 Pseudonocardia saturnea	75 Streptomyces acrimycini
76 Streptomyces aureus	77 Streptomyces clavuligerus	78 Streptomyces violaceolatus
79 Microbispora rosea	80 actinomycete 7501	81 Bifidobacterium pseudolongum
82 Rubrobacter xylanophilus	83 Bacteroides intestinalis	84 Parabacteroides distasonis
85 Parabacteroides goldsteinii	86 Parabacteroides gordonii	87 Porphyromonas macacae
88 Alistipes finegoldii	89 Cytophaga sp.	90 Flexibacter elegans
91 Flexibacter flexilis	92 Hymenobacter aerophilus	93 Hymenobacter antarcticus
94 Hymenobacter fastidiosus	95 Hymenobacter ocellatus	96 Hymenobacter sp. VUG-A141a
97 Capnocytophaga gingivalis	98 Chryseobacterium formosense	99 Chryseobacterium gleum
100 Chryseobacterium soldanellicola	101 Flavobacterium johnsoniae	102 Flavobacterium psychrophilum
103 Flavobacterium sp.	104 Flavobacterium sp. SOC A4(12)	105 Myroides odoratimimus
106 Riemerella columbina	107 Riemerella sp. IPDH 98/90	108 Tenacibaculum amyolyticum
109 Pedobacter heparinus	110 Pedobacter sp. 4236	111 Pedobacter sp. MJ11
112 Sphingobacterium multivorum	113 Sphingobacteriaceae bacterium SOC A20(36)	114 Terrimonas ferruginea
115 Salinibacter ruber	116 Candidatus Amoebophilus asiaticus	117 Prolixibacter bellariivorans
118 marine CFB-group bacterium MBIC01599	119 Chloroflexus aurantiacus	120 Oscillochloris trichoides
121 Cyanothece sp. WH 8902	122 Cyanothece sp. WH 8904	123 Microcystis aeruginosa
124 Synechococcus sp. PCC 7920	125 Synechococcus sp. UH7	126 Nostoc carneum
127 Nostoc sp. PCC 7423	128 Calothrix sp. PCC 7101	129 Calothrix sp. PCC 7103
130 Scytonema sp. IAM M-262	131 Leptolyngbya foveolarum	132 Lyngbya majuscula

133 <i>Lyngbya wollei</i>	134 <i>Microcoleus chthonoplastes</i>	135 <i>Oscillatoria</i> sp. PCC 7112
136 <i>Planktothrix rubescens</i>	137 <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	138 <i>Spirulina laxissima</i>
139 <i>Oscillatoriales cyanobacterium</i> JSC-1	140 <i>Deinococcus deserti</i>	141 <i>Deinococcus fucus</i>
142 <i>Deinococcus geothermalis</i>	143 <i>Deinococcus grandis</i>	144 <i>Bacillus aquimaris</i>
145 <i>Bacillus azotoformans</i>	146 <i>Bacillus cereus</i>	147 <i>Bacillus firmus</i>
148 <i>Bacillus flexus</i>	149 <i>Bacillus megaterium</i>	150 <i>Bacillus methanolicus</i>
151 <i>Bacillus simplex</i>	152 <i>Bacillus</i> sp.	153 <i>Bacillus</i> sp. BT97
154 <i>Bacillus</i> sp. JL-26	155 <i>Bacillus</i> sp. MB-11	156 <i>Bacillus</i> sp. m3-13
157 <i>Paenibacillus alginolyticus</i>	158 <i>Kurthia sibirica</i>	159 <i>Planomicrobium chinense</i>
160 <i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	161 <i>Staphylococcus cohnii</i>	162 <i>Laceyella putida</i>
163 <i>Exiguobacterium acetylicum</i>	164 <i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	165 <i>Exiguobacterium sibiricum</i>
166 <i>Exiguobacterium</i> sp. CNU020	167 <i>Exiguobacterium undae</i>	168 <i>Trichococcus pasteurii</i>
169 <i>Enterococcus silesiacus</i>	170 <i>Pediococcus acidilactici</i>	171 <i>Lactococcus lactis</i>
172 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	173 <i>Clostridium baratii</i>	174 <i>Clostridium botulinum</i>
175 <i>Clostridium disporicum</i>	176 <i>Clostridium drakei</i>	177 <i>Clostridium</i> sp. Kas107-1
178 <i>Clostridium taeniosporum</i>	179 <i>Sarcina ventriculi</i>	180 <i>Anaerococcus prevotii</i>
181 <i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	182 <i>Fusibacter paucivorans</i>	183 <i>Thermaerobacter marianensis</i>
184 <i>Acetobacterium woodii</i>	185 <i>Eubacterium rectale</i>	186 <i>Butyrivibrio fibrilvolvens</i>
187 <i>Desulfosporosinus orientis</i>	188 <i>Desulfotomaculum sapomandens</i>	189 <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
190 [ <i>Clostridium</i> ] <i>lituseburense</i>	191 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	192 <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>
193 <i>Veillonella montpellierensis</i>	194 <i>Candidatus Magnetobacterium</i> <i>bavaricum</i>	195 <i>Isosphaera pallida</i>
196 <i>Pirellula staleyii</i>	197 <i>Planctomyces limnophilus</i>	198 <i>Planctomyces maris</i>
199 <i>Rhodopirellula báltica</i>	200 <i>Asticcacaulis biprosthecium</i>	201 <i>Brevundimonas bacteroides</i>
202 <i>Brevundimonas bullata</i>	203 <i>Brevundimonas intermedia</i>	204 <i>Brevundimonas</i> sp. Gc-2-c
205 <i>Caulobacter fusiformis</i>	206 <i>Caulobacter vibrioides</i>	207 <i>Phenylobacterium lituiforme</i>
208 <i>Methylocapsa acidiphila</i>	209 <i>Blastobacter aggregatus</i>	210 <i>Bosea</i> sp. CRIB-12
211 <i>Bosea</i> sp. CRIB-13	212 <i>Bosea vestrisii</i>	213 <i>Bradyrhizobium elkanii</i>
214 <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	215 <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	216 <i>Ochrobactrum</i> sp. CCBAU 61222
217 <i>Pseudochrobactrum</i> sp. KSS 7.8	218 <i>Methylobacterium aquaticum</i>	219 <i>Methylobacterium hispanicum</i>
220 <i>Methylobacterium komagatae</i>	221 <i>Methylobacterium radiotolerans</i>	222 <i>Methylobacterium rhodinum</i>
223 <i>Methylobacterium</i> sp. CBMB38	224 <i>Methylopila capsulata</i>	225 <i>Methylosinus trichosporium</i>
226 <i>Mesorhizobium alhagi</i>	227 <i>Mesorhizobium camelthorni</i>	228 <i>Agrobacterium larrymoorei</i>
229 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	230 <i>Agrobacterium vitis</i>	231 <i>Ensifer adhaerens</i>
232 <i>Rhizobium etli</i>	233 <i>Rhizobium gallicum</i>	234 <i>Rhizobium huautlense</i>
235 <i>Rhizobium leguminosarum</i>	236 <i>Rhizobium oryzae</i>	237 <i>Rhizobium</i> sp. J3-AN59
238 <i>Rhizobium</i> sp. NCHA22	239 <i>Rhizobium</i> sp. YAS34	240 <i>Rhizobium tropici</i>
241 <i>Rhizobium yanglingense</i>	242 <i>Sinorhizobium fredii</i>	243 <i>Sinorhizobium meliloti</i>
244 <i>Sinorhizobium xinjiangense</i>	245 <i>Rhodobium orientis</i>	246 <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i>
247 <i>Azorhizobium caulinodans</i>	248 <i>Paracoccus</i> sp. R-24652	249 <i>Rhodobacter azotoformans</i>
250 <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	251 <i>Acetobacter indonesiensis</i>	252 <i>Azospirillum lipoferum</i>
253 <i>Nisaea denitrificans</i>	254 <i>Anaplasma centrale</i>	255 <i>Erythromicrobium ramosum</i>
256 <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	257 <i>Novosphingobium capsulatum</i>	258 <i>Sphingomonas agrestis</i>
259 <i>Sphingomonas azotifigens</i>	260 <i>Sphingomonas melonis</i>	261 <i>Sphingomonas</i> sp.
262 <i>Sphingomonas</i> sp. A01	263 <i>Sphingomonas</i> sp. Alpha4-2	264 <i>Sphingomonas</i> sp. BR12254
265 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	266 <i>Burkholderia fungorum</i>	267 <i>Burkholderia pseudomallei</i>
268 <i>Burkholderia</i> sp. JPY479	269 <i>Pandoraea pnomenus</i>	270 <i>Ralstonia solanacearum</i>
271 <i>Acidovorax facilis</i>	272 <i>Pelomonas puraquae</i>	273 <i>Pseudacidovorax intermedius</i>
274 <i>Herbaspirillum huttiense</i>	275 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	276 <i>Massilia timonae</i>
277 <i>Oxalobacter formigenes</i>	278 <i>Roseateles depolymerans</i>	279 <i>Roseateles terrae</i>
280 <i>Methylophilus</i> sp. Ship	281 <i>Chromobacterium violaceum</i>	282 <i>Laribacter hongkongensis</i>
283 <i>Azospira oryzae</i>	284 <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	285 <i>Desulfonema magnum</i>
286 <i>Angiococcus disciformis</i>	287 <i>Melittangium lichenicola</i>	288 <i>Myxococcus fulvus</i>
289 <i>Chondromyces apiculatus</i>	290 <i>Aeromonas caviae</i>	291 <i>Aeromonas salmonicida</i>
292 <i>Alkalispirillum</i> sp. ACO3	293 <i>Thioalkalivibrio halophilus</i>	294 <i>Citrobacter amalonaticus</i>
295 <i>Citrobacter farmeri</i>	296 <i>Citrobacter youngae</i>	297 <i>Cronobacter sakazakii</i>
298 <i>Enterobacter cloacae</i>	299 <i>Enterobacter pyrinus</i>	300 <i>Erwinia amylovora</i>
301 <i>Erwinia toletana</i>	302 <i>Escherichia coli</i>	303 <i>Escherichia fergusonii</i>
304 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	305 <i>Klebsiella</i> sp. TT001	306 <i>Lonsdalea quercina</i>
307 <i>Pantoea agglomerans</i>	308 <i>Pantoea ananatis</i>	309 <i>Pantoea oleae</i>
310 <i>Pantoea</i> sp. A0301	311 <i>Pantoea</i> sp. A0305	312 <i>Pantoea</i> sp. P0359
313 <i>Pantoea stewartii</i>	314 <i>Salmonella bongori</i>	315 <i>Samsonia erythrinae</i>
316 <i>Serratia ficaria</i>	317 <i>Serratia marcescens</i>	318 <i>Serratia proteamaculans</i>
319 <i>Shigella flexneri</i>	320 <i>Coxiella burnetii</i>	321 <i>Legionella anisa</i>
322 <i>Halomonas salina</i>	323 <i>Acinetobacter baylyi</i>	324 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
325 <i>Acinetobacter</i> sp.	326 <i>Azotobacter beijerinckii</i>	327 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
328 <i>Pseudomonas cichorii</i>	329 <i>Pseudomonas fluorens</i>	330 <i>Pseudomonas jessenii</i>
331 <i>Pseudomonas monteilii</i>	332 <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	333 <i>Pseudomonas putida</i>
334 <i>Pseudomonas</i> sp. R21-1	335 <i>Pseudomonas</i> sp. RW10S2	336 <i>Pseudomonas</i> sp. c306
337 <i>Pseudomonas viridiflava</i>	338 <i>Dyella ginsengisoli</i>	339 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>



340 <i>Xanthomonas translucens</i>	341 <i>Mycoplasma capricolum</i>	342 <i>Diplosphaera colitermitum</i>
343 <i>Opiritutus</i> sp. VeGlc2	344 <i>Opiritutus terrae</i>	345 <i>Chthoniobacter flavus</i>
346 <i>Pedospaera párvula</i>	347 <i>Prostheco bacter debontii</i>	348 <i>Prostheco bacter dejongeii</i>
349 <i>Prostheco bacter vanneervenii</i>	350 <i>Verrucomicrobium spinosum</i>	351 <i>Bacterium enrichment culture clone N47</i>
352 <i>Bacterium rj10</i>	353 Unidentified cyanobacterium CLg1	354 Uncultured cyanobacterium
355 Uncultured <i>Bartonella</i> sp.	356 Uncultured <i>Bosea</i> sp.	357 Uncultured <i>Ochrobactrum</i> sp.
358 Uncultured <i>Methylobacterium</i> sp.	359 Uncultured <i>Rhizobium</i> sp.	360 Uncultured <i>Rhizobiales bacterium</i>
361 Uncultured <i>Rhodobacteraceae bacterium</i>	362 Uncultured <i>Rhodobacterales bacterium</i>	363 Uncultured <i>Rickettsia</i> sp.
364 Uncultured alpha proteobacterium	365 Uncultured <i>Achromobacter</i> sp.	366 Uncultured <i>Burkholderia</i> sp.
367 Uncultured <i>Ralstonia</i> sp.	368 Uncultured <i>Verminephrobacter</i> sp.	369 Uncultured <i>Burkholderiales bacterium</i>
370 Uncultured beta proteobacterium	371 Uncultured <i>Desulfobulbus</i> sp.	372 Uncultured delta proteobacterium
373 Uncultured epsilon proteobacterium	374 Uncultured <i>Enterobacter</i> sp.	375 Uncultured <i>Serratia</i> sp.
376 Uncultured <i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	377 Uncultured gamma proteobacterium	378 Uncultured proteobacterium
379 Uncultured <i>Verrucomicrobia bacterium</i>	380 Uncultured bacterium	381 Uncultured forest soil bacterium
382 Uncultured marine bacterium	383 Uncultured rumen bacterium	384 Uncultured soil bacterium
385 Unidentified marine eubacterium		

En la distribución de dominios asociados a la filosfera del arroz se encontró, como producto de la secuenciación de los amplícones obtenidos en la PCR, que el 74,15% fueron bacterias, el 17,34% secuencias no asignadas, es decir que no tienen un patrón de asignación en la región 16S ARNr; 8,07% de secuencias que corresponden a organismos eucariotas, 0,39% a arqueas y el 0,05% a secuencias no clasificadas (Figura 2).



## Discusión

Se ha identificado molecularmente bacterias asociadas a la filosfera, lo que significa, según Arjun *et al.* (2011), que existe un nicho ecológico favorable para una actividad microbiana muy importante, coincidiendo con lo manifestado por Okubo *et al.* (2014) y Sessitsch *et al.* (2012) quienes señalan que las plantas de *O. sativa* representan un hábitat para diversos microorganismos, que colonizan las partes aéreas, referidas como filosfera.

La homología de secuencia de la primera cepa bacteriana cultivable, es del 100% con *Pantoea* sp LS-123, cepa que ha sido caracterizada por Hameed *et al.* 2015. El género *Pantoea* se reporta como endofítico de *O. sativa*, con actividad ligninolítica, degradador de pajilla de arroz (Xiong *et al.* 2014), en Rusia, India, Korea, etc., este género ha sido reportado como patógeno de plantas de arroz, causando decoloración del grano

o el tizón foliar en arroz (Egorova, Mazurin and Ignatov 2015; Mondal, Mani and Singh. 2011 y Lee and Hong 2010).

La homología de secuencia de la segunda cepa bacteriana cultivable, es del 99% con *Enterobacter asburiae* strain 35734, cuyo genoma ha sido secuenciado por McCorrison *et al.* 2015. Esta especie bacteriana ha mostrado ser estimuladora de crecimiento en plantas debido a su potencial para degradar el fosfato (Abraham and Silambarasan 2015, Munees and Khan 2008). Además, ha mostrado tener un compuesto llamado acil-homoserina lactona, involucrado en el sistema de comunicación "quorum sensing" (Lau *et al.* 2013).

La homología de secuencia de la tercera cepa bacteriana cultivable, es del 99% con *Klebsiella pneumoniae*, cepa que ha sido caracterizada por Iwase, *et al.* 2015. En el

cultivo de arroz se ha estudiado la actividad de fijación de nitrógeno y colonización de una cepa promotora de crecimiento, *Klebsiella pneumoniae* NG14, que ha sido aislada de la superficie de raíces de plantas de arroz, mostrando tener actividad nitrogenasa, fijadora de nitrógeno y fue capaz de colonizar las raíces de plantas de arroz (Liu *et al.* 2011).

La homología de secuencia de la cuarta cepa bacteriana cultivable, es del 98% con *Bacillus amyloliquefaciens* strain ICBB 200, cuyo genoma ha sido secuenciado por Paz and Matsumura, 2015. *B. amyloliquefaciens*, ha mostrado tener potencial de control biológico, en arroz, contra *Rhizoctonia solani*, *Burkholderia glumae* (Shrestha, *et al.* 2016) y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo, Wu *et al.* 2015), *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Bipolaris sorokiniana* (Benitez *et al.* 2010). *B. amyloliquefaciens*, puede llegar a tener hasta seis genes que codifican a péptidos antimicrobianos como el surfactin, bacA (bacylisin), fenD (fengycin), bmyB (bacylomicin), spaS (subtilin), and ituC (iturin) (Mora, Cabrefiga and Montesinos 2011).

La homología de secuencia de las tres últimas cepas bacterianas asociadas a la filósfera, es del 99% con cepas bacterianas no cultivables.

El metagenoma obtenido de la filósfera de plantas de *O. sativa* determina una gran diversidad bacteriana en este hábitat, siendo del 98,2% en comparación con las bacterias cultivadas obtenidas por microbiología molecular. En relación a ello Arjun *et al.* (2011), mencionan que menos del 1% del total de poblaciones microbianas en medio ambiente terrestre, han sido aisladas con éxito en cultivo puro; en ese sentido se explica la poca cantidad de bacterias cultivables. Este metagenoma tiene, además, según la distribución de dominios un 17,34% de secuencias no asignadas y el 0.05% de secuencias no clasificadas, es decir que no se encuentran en la base de datos NCBI.

La diversidad bacteriana en la filósfera de arroz ha sido antes caracterizada a nivel metaproteogenómico, encontrándose Alpha proteobacteria (35%) y Actinobacteria (38%) además de Bacteroidetes, Firmicutes, Beta y Gammaproteobacteria. La clase Alphaproteobacteria está representada por los géneros *Rhizobium* y *Methylobacterium*, mientras que en el filum Actinobacteria, el género *Microbacterium* fue predominantemente detectado (Knief *et al.* 2012).

Algunas de las bacterias identificadas han sido anteriormente descritas por otros investigadores, como ligadas a las plantas de arroz, así tenemos; *Exiguobacterium acetyllicum* con 4492 HITS, ha sido reportada por Mwashasha *et al.* 2014 y Bart 2003; *Pseudomonas fluorescens*, caracterizada como inductora de resistencia en arroz contra *Magnaporthe oryzae* (De Vleeschauwer *et al.* 2008); *Sinorhizobium meliloti*, reportada por Chi *et al.* (2010), infectando plántulas de arroz; *Sphingomonas azotifigens*, bacteria fijadora de nitrógeno, aislada de raíces de arroz (Xie y Yakota, 2006). *Methylobacterium aquaticum*, promotora del crecimiento vegetal, solubilizadora de fosfatos y productora AIA; puede crecer hasta en concentraciones 800 mM de NaCl y se ha observado que inhibe el desarrollo de hongos y que promueve el desarrollo de raíces a corto y a largo plazo (Gallegos *et al.* 2014).

Si consideramos que la ausencia de bacteria patógena *Burkholderia glumae*, se debería a la menor producción de toxoflavin, que es dependiente del sistema de "quorum sensing" (Chen *et al.* 2012, Karki *et al.* 2012, Goo *et al.* 2010, Karki 2010 y Devescovi *et al.* 2007) y que algunas bacterias tendrían un potencial como agentes de control biológico (Shrestha *et al.* 2016); diríamos que los resultados, sobre la no presencia de *Burkholderia glumae*, pero sí de otras especies de este mismo género, se explican con lo expresado anteriormente.

## Conclusiones

1. A nivel de filósfera se aislaron y caracterizaron siete bacterias cultivables por

- microbiología molecular (1,82%) y 385 bacterias, entre cultivables y no cultivables, por metagenómica dirigida (98,18%)
2. La filosfera de plantas de arroz, ofrecen una gran diversidad bacteriana, la cual ha sido identificada mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo microbiano.
3. Las bacterias identificadas están ligadas a plantas de arroz y si bien no se ha encontrado la bacteria *Burkholderia glumae*, si se ha podido identificar cuatro especies del mismo género: *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia sp.* JPY479 y *Uncultured Burkholderia sp.*

### Referencias Bibliográficas

- Abraham J., and S. Silambarasan. 2015. "Plant growth promoting bacteria *Enterobacter asburiae* JAS5 and *Enterobacter cloacae* JAS7 in mineralization of endosulfan." *Appl Biochem Biotechnol.* 175(7):3336-48. doi: 10.1007/s12010-015-1504-7.
- Arjun, J. and K. Harikrishnan. 2011. "Metagenomic analysis of bacterial diversity in the rice rhizosphere soil microbiome." *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.*, 1(3): 361-367.
- Bart Cottyn. 2003. *Bacteria Associated with Rice Seed* *Bacteria Associated with Rice Seed from Philippine Farmers' Fields from Philippine Farmers' Fields*. <https://biblio.ugent.be/publication/521724/file/1874748.pdf>.
- Benitez LB, R.V. Velho, M.P. Lisboa, L.F. Medina, and A. Brandelli. 2010. "Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006." *J Microbiol.* Dec; 48(6):791-7. doi: 10.1007/s12275-010-0164-0. Epub 2011 Jan 9. PubMed PMID: 21221936.
- Chen, R., I. Barphagha, H. Karki and J. Ham. 2012. "Dissection of quorum-sensing genes in *Burkholderia glumae* reveals non-canonical regulation and the new regulatory gene *toxFM* for toxoflavin production." *PLoS ONE* 7(12): e52150.
- Chi F., P. Yang, F. Han, Y. Jing, and S. Shen. 2010. Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Proteomics*. May; 10(9):1861-74. doi: 10.1002/pmic.200900694.
- De Vleeschauwer, D. Djavaheri, M. Bakker, P. A. H. M. & Höfte, M. 2008. "Pseudomonas fluorescens WCS374r-Induced Systemic Resistance in Rice against Magnaporthe oryzae Is Based on Pseudobactin-Mediated Priming for a Salicylic Acid-Repressible Multifaceted Defense Response". *Plant Physiology*, 148(4), 1996–2012. <http://doi.org/10.1104/pp.108.127878>.
- Devescovi, G., J. Bigirimana, G. Degrassi, L. Cabrio, J. LiPuma, J. Kim, I. Hwang and V. Venturi. 2007. Involvement of a quorum-sensing regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15): 4950–4958.
- Egorova M., E. Mazurin and A. N. Ignatov. 2015. "First report of *Pantoea ananatis* causing grain discoloration and leaf blight of rice in Russia." *New Disease Reports* (2015) 32, 21. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.032.021>.
- Goo, E., Y. Kang, H. Kim and I. Hwang I. 2010. "Proteomic analysis of quorum sensing-dependent proteins in *Burkholderia glumae*." *Journal of Proteome Research*, 9(6): 3184–3199.
- Gallegos J.J., C. Alías Villegas, I.M. Díaz Olivares, R. Gutiérrez Alcántara, N. Madinabeitia Peiró, R.A. Bellogín, and M.R. Espuny. 2014. *Caracterización de una metilobacteria aislada de la superficie del grano de arroz*. 10,13140/2.1.3698.1767. Sevilla. España.
- Hameed A., S. Y. Lin, W. A. Lai, C. C. Young, L. S. Young and Y. T. Hsieh. 2015. *Pantoea sp. CC-10P1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/910268732/>
- Iwase, T., Y. Ogura, K. Ishiwata, T. Hayashi, M. Yoneda, and Y. Mizunoe. 2015. *Complete genome sequence of Klebsiella pneumoniae YH43*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AP014950.1>.
- Karki, H. 2010. *Physiological, biochemical and molecular characteristics associated with virulence of Burkholderia glumae: the major causative agent of bacterial panicle blight of rice*. Thesis of Master of Science. Department Plant Pathology and Crop Physiology. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

- Karki, H., B. Shrestha, J. Han, D. Groth, I. Barphaga, M. Rush, R. Melnason, B. Kim and J. Ham. 2012. *Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA pingerprint among strains of Burkholderia glumae*. *PLoS ONE* 7(9): e45376.
- Knief, C., N. Delmotte, S. Chaffron, M. Stark, G. Innerebner, R. Wassmann, and J. A. Vorholt. 2012. "Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice." *The ISME Journal*, 6(7), 1378–1390. [http://doi.org/10,1038/ismej.2011.192](http://doi.org/10.1038/ismej.2011.192). Liu
- Lau, Y. Y., J. Sulaiman, J. W. Chen, W. F. Yin & K.G. Chan. 2013. Quorum Sensing Activity of *Enterobacter asburiae* isolated from Lettuce Leaves. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(10), 14189–14199. <http://doi.org/10.3390/s131014189>.
- Lee H. B. and J. P. Hong. 2010. First Report of Leaf Blight Caused by *Pantoea agglomerans* on Rice in Korea. *APS Journals*, 94, (11). [http://dx.doi.org/10,1094/PDIS-05-10-0374](http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0374).
- Liu Y., H. Wang, X. Sun, H. Yang, Y. Wang, and W. Song. 2011. Study on mechanisms of colonization of nitrogen-fixing PGPB, *Klebsiella pneumoniae* NG14 on the root surface of rice and the formation of biofilm. *Curr Microbiol. Apr*; 62(4):1113-22. doi: 10.1007/s00284-010-9835-7.
- McCorrison J., R. Sanka, M. Adams, L. Brinkac, G. Sutton, B. Kreiswirth and L. Chen. 2015. *Enterobacter asburiae* strain 35734, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP012162.1>.
- MG RAST. 2007. Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology. <http://metagenomics.anl.gov/>
- MO BIO. 2016. PowerSoil® DNA Isolation Kit. Instruction Manual. Mo Bio, Laboratories Inc., Saving You Time For Life <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>
- Mondal K. K., C. Mani, and J. Singh. 2011. A New Leaf Blight of Rice Caused by *Pantoea ananatis* in India. *APS Journals* 95(12) [http://dx.doi.org/10,1094/PDIS-06-11-0533](http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0533).
- Mora I., J. Cabrefiga, and E. Montesinos. 2011. "Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments." *Int Microbiol. Dec*; 14 (4):213-23. PubMed PMID: 22569759.
- Munees A. and M. S. Khan. 2008. "Plant growth promoting activities of phosphatesolubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides." *EurAsian Journal of BioSciences*. DOI:10.5053/ejobios.2010.4.0,1 1.
- Mwashasha R. M., Hunja Murage, Akio Tani, Esther M. Kahangi, and Huxley Mae Makonde. 2014. "Molecular characterization of bacteria and fungi from rice growing regions in Kenya" *International Journal of Biosciences*, 5(3): 7-14.
- NCBI. 2016. *Nucleotide*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>
- Okubo T., S. Ikeda, K. Sasaki, K. Ohshima, M. Hattori, T. Sato and K. Minamisawa. 2014. "Phylogeny and functions of bacterial communities associated with field-grown rice shoots." *Microbes Environmental*, 29(3): 329-332. Accedido el 2 de junio 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25130883>.
- Paz and Matsumura, A.T.S (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* as plant inoculant. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP681701.2>
- Sessitsch A, P. Hardoim, J. Döring, A. Weilharter, A. Krause, T. Woyke, B. Mitter, L. Hauberg-Lotte, F. Friedrich, M. Rahalkar, T. Hurek, A. Sarkar, L. Bodrossy, L. Van Overbeek, D. Brar, JD. Van Elsas and B. Reinhold-Hurek. 2012. "Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis." *APS Journal*, 25(1):28–36. Los Banos, Laguna, Philippines.
- Shrestha B. K., H. S. Karki, D. E. Groth, N. Jungkhun & J. H. Ham. 2016. "Biological Control Activities of Rice-Associated *Bacillus* sp. Strains against Sheath Blight and Bacterial Panicle Blight of Rice." *PLoS ONE*, 11(1), e0146764. [http://doi.org/10,1371/journal.pone.0146764](http://doi.org/10.1371/journal.pone.0146764).
- Wu, L., H. Wu, L. Chen, X. Yu, R. Borriss & X. Gao. 2015. "Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens." *Scientific Reports*, 5, 12975. [http://doi.org/10,1038/srep12975](http://doi.org/10.1038/srep12975).
- Xie CH., and A. Yokota. 2006. "*Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*" *Int J Syst Evol Microbiol. Apr*; 56 (Pt 4):889-93. PubMed PMID: 16585711.
- Xiong XQ, HD Liao, JS Ma, XM Liu, LY Zhang, XW Shi, XL Yang, XN Lu, and YH Zhu. 2014. "Isolation of a rice endophytic bacterium, *Pan-*

*toea* sp. Sd-1, with ligninolytic activity and characterization of its rice straw degradation ability. *Lett Appl Microbiol.* Feb; 58 (2):123

-9. doi: 10.1111/lam.12163. Epub 2013 Oct 31. PubMed PMID: 24111687.