

**Evaluación de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en el Biocontrol de *Pyricularia oryzae*, Agente Causal de la *Piriculariosis* en el Cultivo de Arroz (*Oryza sativa* L.)**

**Belkis Liliana Bolaño Gnecco y MaríaJosé Gómez Ramírez**

**Universidad Popular del Cesar  
Facultad Ciencias de la Salud  
Programa de Microbiología  
Valledupar, Colombia  
2023**

**Evaluación de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en el Biocontrol de *Pyricularia oryzae*, Agente Causal de la *Piriculariosis* en el Cultivo de Arroz (*Oryza sativa* L.)**

**Belkis Liliana Bolaño Gnecco y MaríaJosé Gómez Ramírez**

**Trabajo de Titulación Presentado en Conformidad con los Requisitos  
Establecidos Para Optar por el Título de Microbiólogo**

**DIRECTOR**

**Aldo Jesús Ibarra Rondón**

**Microbiólogo**

**CODIRECTORA**

**Carla Cecilia Bolaños Contreras**

**Microbióloga**

**Universidad Popular del Cesar  
Facultad Ciencias de la Salud  
Programa de Microbiología  
Valledupar, Colombia  
2023**

**Nota de aceptación**

---

---

---

**Presidente del jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

---

***Dedicatoria Belkis Bolaño***

*Dedico esta tesis a Dios, fuente de sabiduría y guía en cada paso de mi vida. Agradezco por la fortaleza que me has brindado en este camino académico.*

*A mis queridos padres, Edgardo Bolaño Escobar y Belkis Gnecco Aragón, les agradezco por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificio para que pudiera llegar hasta aquí.*

*Ustedes son la inspiración detrás de mis logros.*

*A mi hermano, Edgardo Alonso Bolaño Gnecco, gracias por ser un pilar de apoyo y por alentarme en todo momento. Tu presencia ha sido fundamental en mi vida.*

*A mi amiga Yessica Saenz le agradezco por su constante ánimo, orientación y colaboración fueron fundamentales en este proceso. Gracias por estar a mi lado y ser una fuente de inspiración en este desafío académico. Tu amistad y ayuda han sido invaluableles.*

*Esta tesis es el resultado del esfuerzo y dedicación de toda mi familia. Con amor y gratitud, les dedico este logro, en reconocimiento a su influencia positiva en mi desarrollo académico y personal.*

*Con mucho amor y cariño, Belkis...*

### ***Dedicatoria María José Gómez***

*Dedico esta tesis a las fuentes de amor, apoyo y fortaleza en mi vida. A Dios, quien ha sido mi guía en cada paso de mi existencia, agradezco por iluminar mi camino con su divina inteligencia, su templanza inquebrantable y su inmenso amor. Su sabiduría ha sido la brújula que me ha dirigido hacia la consecución de mis metas.*

*A mis amados padres, María Ligia Ramírez y Níger José Gómez, les agradezco por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificio para que pudiera llegar hasta aquí. Ustedes son mi inspiración y mi mayor orgullo.*

*A mis queridas hermanas, Karen Gómez y Kelly Salazar, agradezco por ser mi apoyo inquebrantable y compañía en este viaje. Su aliento y amor son invaluableles.*

*A mi mejor amiga Carolay Bracho, por estar a mi lado en los momentos de desafío, por brindarme apoyo incondicional y por ser fuente de inspiración constante, cada gesto de su amistad ha sido un impulso esencial en este viaje.*

*A mis queridas amigas y compañeras, Dariana López y Veruzka Liliana De la Ossa, les agradezco sinceramente por cada enriquecedora conversación, cada gesto de amistad y cada sonrisa compartida. Valoro profundamente su inquebrantable apoyo, que ha sido fundamental en este proceso.*

*Esta tesis es el resultado del esfuerzo y la dedicación de mi familia y mis seres queridos. Con gratitud y amor, les dedico este logro, en reconocimiento a su influencia positiva en mi desarrollo académico y personal. Su presencia en mi vida es un regalo que atesoro.*

*Con amor y cariño, MaríaJosé...*

### ***Agradecimientos***

A la Universidad Popular Del Cesar y de manera especialmente al programa de Microbiología y a todos los profesores que lo integran, por habernos proporcionado una educación académica inmaculada e inquebrantable.

A nuestra codirectora Carla Bolaños por el tiempo, la dedicación, disciplina, esfuerzo y, sobre todo, por la confianza de principio a fin puesta en nosotras.

A nuestro compañero Ricardo Pizarro, que fue un pilar fundamental con su guía en la realización de la parte experimental de este proyecto.

A la Federación de arroceros Fedearroz por brindarnos la cepa de *Pyricularia Oryzae* y las semillas de Arroz con la que se llevo a cabo esta investigación.

A el Laboratorio de Servicios de análisis farmacéuticos (SAF) por habernos cedido sus cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* y también por prestarnos sus instalaciones para realizar la parte *in vitro* de esta investigación.

## Resumen

Esta investigación se centra en la importancia del cultivo global de arroz y su impacto económico en regiones como el departamento del Cesar, Colombia. Se destaca la amenaza de enfermedades fúngicas, en particular la Piriculariosis, que causa pérdidas económicas significativas. Se exploró el potencial biocontrolador de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias que producen metabolitos antimicrobianos, para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno. Los tratamientos incluyeron *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y una combinación de ambos microorganismos, evaluándose su crecimiento en cajas Petri después de un período de observación. Los resultados revelaron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cuanto a su efecto en el crecimiento de microorganismos. Los promedios de crecimiento fueron 75% para *Bacillus subtilis*, 27% para *Pseudomonas aeruginosa* y 77% para la combinación, con desviaciones estándar aproximadas de 2.65%, 5.66% y 3.61% respectivamente. Adicionalmente, los experimentos de invernadero demostraron un crecimiento más saludable en las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* en comparación con *Pseudomonas aeruginosa*. Estos resultados subrayan la promisoriosa capacidad biocontroladora de las bacterias, con importantes implicaciones para la seguridad alimentaria y la producción agrícola sostenible en la región. En resumen, este estudio no encontró diferencias significativas en el crecimiento de microorganismos entre los tratamientos de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y la combinación de ambos en cajas Petri. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento en microbiología y sugieren que estas bacterias podrían desempeñar un papel crucial en el control de enfermedades fúngicas en cultivos de arroz, ofreciendo perspectivas alentadoras para la agricultura en la región del departamento del Cesar, Colombia.

**Palabras claves:** Arroz, Biocontroladores y Piriculariosis.

## Abstract

This research focuses on the importance of global rice cultivation and its economic impact in regions such as the department of Cesar, Colombia. It highlights the threat of fungal diseases, in particular Piriculariosis, which causes significant economic losses. The biocontrolling potential of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria that produce antimicrobial metabolites, was explored to inhibit the growth of the phytopathogenic fungus. Treatments included *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and a combination of both microorganisms, and their growth in petri boxes was evaluated after a period of observation. The results revealed that there were no statistically significant differences between

treatments in their effect on the growth of microorganisms. Growth averages were 75% for *Bacillus subtilis*, 27% for *Pseudomonas aeruginosa* and 77% for the combination, with standard deviations of approximately 2.65%, 5.66% and 3.61% respectively.

Additionally, greenhouse experiments demonstrated healthier growth in plants treated with *Bacillus subtilis* compared to *Pseudomonas aeruginosa*. These results underline the promising biocontrol capacity of bacteria, with important implications for food security and sustainable agricultural production in the region. In summary, this study didn't find significant differences in the growth of microorganisms between the treatments of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and the combination of both in petri boxes. These findings contribute to knowledge in microbiology and suggest that these bacteria could play a crucial role in the control of fungal diseases in rice crops, offering encouraging prospects for agriculture in the Cesar department region, Colombia.

**Keywords:** Rice, Biocontrollers and Piriculariosis

# 1 Tabla de Contenido

<b>2 Planteamiento del Problema</b> .....	<b>11</b>
<b>3 Justificación</b> .....	<b>13</b>
<b>4 Objetivos</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 Objetivo General</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>5 Marco Teórico</b> .....	<b>17</b>
<b>5.1 Antecedentes</b> .....	<b>17</b>
<b>5.2 Bases Teóricas</b> .....	<b>20</b>
5.2.1 Taxonomía .....	23
5.2.2 Ciclo de Vida del Hongo .....	23
<b>5.3 Bases Legales</b> .....	<b>24</b>
<b>6 Metodología</b> .....	<b>24</b>
6.1.1 Tipo de Estudio y Línea de Investigación .....	24
6.1.2 Universo y Población .....	25
<b>6.2 Fases Experimentales</b> .....	<b>25</b>
<b>6.2.1 Metodología del objetivo específico 1: Analizar la capacidad antagonista <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al hongo <i>Pyricularia oryzae</i></b> .....	<b>25</b>
6.2.2 Metodología del objetivo específico 2: Determinar el efecto biocontrolador y promotor de crecimiento vegetal de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en plántulas de arroz inoculadas con <i>Pyricularia oryzae</i> bajo condiciones de invernadero .....	27
<b>7 Resultados</b> .....	<b>31</b>
<b>7.1 Identificación de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	<b>31</b>
7.1.1 Identificación de <i>Pyricularia oryzae</i> .....	32
<b>7.2 Competencia <i>in vitro</i> Entre Microorganismos</b> .....	<b>32</b>
<b>7.3 Competencia en Invernadero Entre Microorganismos</b> .....	<b>35</b>

<b>8</b>	<b><i>Discusión de Resultados</i></b> .....	<b>43</b>
<b>9</b>	<b><i>Recomendaciones</i></b> .....	<b>45</b>
<b>10</b>	<b><i>Conclusiones</i></b> .....	<b>47</b>
<b>11</b>	<b><i>Referencias Bibliográficas</i></b> .....	<b>48</b>
<b>12</b>	<b><i>Anexos</i></b> .....	<b>50</b>

## Lista De Figuras

Ilustración 1: Daños causados por <i>Pyricularia oryzae</i> a las plantas de arroz .....	29
Ilustración 2: <i>Oryza sativa</i> , planta de arroz .....	29
Ilustración 3: Diseño para la prueba de antagonismo de cepas <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i> frente al hongo <i>Pyricularia oryzae</i> .....	32
Ilustración 4: Prueba de antagonismo .....	33
Ilustración 5: Germinación de las semillas de arroz en casa malla.....	34
Ilustración 6: Aplicación del hongo a las plantas a una concentración del hongo: $2 \times 10^{-9}$ esporas .....	35
Ilustración 7: Daños causados a las plantas de arroz por el hongo <i>P.oryzae</i> .....	36
Ilustración 8: Dilución de las bacterias <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. subtilis</i> en caldo TSB .....	37
Ilustración 9: Aplicación de los tratamientos de bacterias a las plantas. ....	37
Ilustración 10: Grupo de plantas de arroz con tratamientos y controles positivos y negativos	38
Ilustración 11: Morfología macroscópica y microscópica de <i>Bacillus subtilis</i> .....	39
Ilustración 12: Morfología macroscópica y microscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
Ilustración 13: Morfología macroscópica y microscópica de <i>Pyricularia oryzae</i> .....	40
Ilustración 14: competencia entre microorganismos en comparación con el control positivo .	40

## Lista De Tablas

<b>Tabla 1</b> .....	Número de tratamientos	36
<b>Tabla 2</b> Porcentajes de inhibición de los tratamientos utilizados .....		41
<b>Tabla 3</b> Comportamiento de los tratamientos y controles en casa malla .....		43
<b>Tabla 4</b> Crecimiento de las plantas por tratamiento .....		47

## Anexos

Anexo 1: Carta de solicitud presentada a la Señora Olga Higuera para realizar la solicitud de la cepa del hongo ante Fedearroz .....	59
Anexo 2: Preparación de los tratamientos. ....	60
Anexo 3: Medios de cultivo utilizados .....	61
Anexo 4: Recuperación del hongo en semillas de arroz .....	61
Anexo 5: Diluciones de los tratamientos .....	62

## Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.), un cultivo de gran relevancia económica en Colombia desempeña un papel fundamental en la economía agrícola del país. Su extensa área cultivada, que abarca aproximadamente 460,000 hectáreas en el departamento del Cesar, refleja su alta importancia. (DANE - Encuesta Nacional De Arroz Mecanizado (ENAM), n.d.) A pesar de su prominencia, el cultivo de arroz se enfrenta a desafíos significativos, principalmente relacionados con enfermedades fúngicas, que amenazan su rendimiento y generan pérdidas considerables. (RedAgricola, 2023)

La producción de arroz en Colombia ha experimentado un crecimiento notable en las últimas décadas. Según datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en el año 2020, se superaron las 2.5 millones de toneladas de arroz producidas en el país. Este aumento no solo ha fortalecido la seguridad alimentaria de los colombianos, sino que también ha contribuido a la generación de empleo y al desarrollo económico en las zonas rurales. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, 2021).

Sin embargo, el incremento en la producción de arroz también ha traído consigo desafíos. La brecha entre la producción y el crecimiento poblacional, combinada con la variabilidad climática y la humedad, ha favorecido la aparición de plagas y enfermedades fúngicas. Entre ellas, la Piriculariosis, causada por el hongo fitopatógeno *Pyricularia oryzae*, destaca debido a su alta patogenicidad y susceptibilidad a factores climáticos. La resistencia a los fungicidas agrava aún más el problema. (Parra-Peña, R., et al, 2022)

Este contexto agrícola demanda soluciones sostenibles. La investigación se enfoca en abordar estas enfermedades fúngicas en los cultivos de arroz mediante soluciones ecofriendly. Una propuesta clave es el uso de bacterias beneficiosas, como *Pseudomonas aeruginosa* y el

género *Bacillus*, como agentes de biocontrol. (Chica et al.2016) Estas bacterias han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos, ofreciendo una alternativa ambientalmente sostenible para preservar la seguridad alimentaria y el equilibrio ecológico en la región del Cesar.

El estudio se centra en el efecto antagonista de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* contra la Piriculariosis, buscando mitigar el crecimiento del hongo fitopatógeno *Pyricularia oryzae*. Se espera que estos hallazgos no solo enriquezcan el conocimiento sobre el control biológico, sino que también contribuyan a proteger la producción de arroz y fortalecer la seguridad alimentaria en un mundo en constante evolución.

El cultivo de arroz en Colombia es una parte vital de la economía agrícola del país, pero enfrenta desafíos que requieren soluciones innovadoras y sostenibles. La investigación y el uso de bacterias como agentes de biocontrol ofrecen esperanzadoras perspectivas para asegurar la continuidad y la prosperidad de este cultivo esencial en el departamento del Cesar y en toda Colombia. (Ministerio de agricultura y desarrollo rural.2021)

## **2 Planteamiento del Problema**

En el cultivo del arroz las enfermedades de origen microbiano constituyen uno de los factores que inciden en la obtención de bajos rendimientos y manchado de los granos. Estas enfermedades pueden ser provocadas por diversos microorganismos como hongos (Ebbole, 2008), bacterias (Ali *et al.*, 2009) y virus (Xiao *et al.*, 2010), siendo las de origen fúngico las más frecuentes en el cultivo como es el caso de Piriculariosis también conocida como quemazón o añublo del arroz, es la principal enfermedad encontrada en estos cultivos a nivel mundial y puede ocasionar pérdidas por su alto grado de patogenicidad cuando se hace presente en la cosecha. Logra provocar severas reducciones de los rendimientos dependiendo del grado de susceptibilidad de la variedad, la tecnología de cultivo empleada (se ha observado mayor severidad de la enfermedad en arroz seco, ya que este tipo de arroz es aquel donde el agua únicamente proviene de las lluvias, y normalmente dispone de canales de drenaje.) y de la incidencia durante el ciclo vegetativo de factores climáticos y nutricionales favorables al desarrollo de la enfermedad (Thuan *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*,2010)

El Hongo Piricularia (*Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc.) produce daños en hojas, nudos y granos, lo que puede resultar en pérdidas significativas si no se controla adecuadamente. (Zambrano *et al.*, 2006) Plantea la complejidad del control de esta enfermedad y la necesidad de buscar nuevas estrategias, que no impliquen el uso de productos químicos, pues ya son sabidos los problemas que pueden causar al medio ambiente a largo plazo; Por esto se busca como alternativa el uso de bacterias biocontroladores, para combatir este hongo de manera sostenible en la producción de arroz.

El problema se centra en la necesidad de abordar los desafíos que enfrenta la producción de arroz en Colombia ya que es un cultivo de alta importancia económica, que ha fortalecido la seguridad alimentaria, la generación de empleos y contribución del desarrollo económico en áreas rurales. Donde se destaca el impacto económico significativo que tiene el arroz en el departamento del Cesar, Colombia. Según (RedAgricola,2018) este cultivo abarca más de 500,000 hectáreas y produce alrededor de 1.7 millones de toneladas de arroz, generando empleo en la región. Los ingresos derivados de la venta de arroz representan una parte sustancial de la economía local. Sin embargo, se han identificado problemas relacionados con la brecha entre la producción y el crecimiento poblacional, la variabilidad climática y la humedad que favorecen la aparición de plagas y enfermedades fúngicas, como la Piriculariosis, que amenazan la producción de arroz. (Acebo *et al.*,2011)

*De modo que se pretenden realizar estudios con el fin de evitar pérdidas agroeconómicas en el departamento del Cesar, puesto que en los últimos 10 años se ha tenido un crecimiento promedio en cuanto a exportaciones mayor al nacional en la última década, según el Informe de Coyuntura Regional del Banco de la República, ya que en cuanto a cultivos la actividad agrícola del departamento esta se centra en el cultivo de palma de aceite, arroz riego, yuca y maíz, otros bienes que se producen son algodón, ñame, cacao, maíz tecnificado y frutos. También se destacan la ganadería, la producción de café y de lácteos. (PROCOLOMBIA, 2013)*

Por lo tanto, esta tesis se enfocará en investigar y proponer soluciones sostenibles para abordar las enfermedades fúngicas en los cultivos de arroz, centrándose en el uso de bacterias

beneficiosas como agentes de biocontrol, tales como *Pseudomonas aeruginosa* y el género *Bacillus*. El objetivo es enriquecer el conocimiento sobre el control biológico y contribuir a la protección de la producción de arroz y la seguridad alimentaria en un entorno en constante cambio.

### 3 Justificación

El arroz (*Oryza sativa* L) es un alimento básico para más de la mitad de la población mundial, ocupa el segundo lugar de importancia entre los cereales del planeta, después del trigo (*Triticum aestivum* L.) La importancia del arroz como uno de los cereales fundamentales en la alimentación humana a lo largo de la historia es innegable. Su valor nutricional, su capacidad para sustentar a una gran parte de la población mundial y su papel en la economía agrícola hacen del arroz un recurso invaluable (Vanegas, WLE, 2017). En la agricultura su cultivo genera una importante fuente de empleo, ingresos y nutrición de muchas regiones pobres y con una alimentación precaria. La diferencia entre el aumento de la producción y el rápido crecimiento de la población en los países consumidores de arroz es notable, lo que trae consigo la misión consagrada de investigadores para obtener mayores rendimientos de este grano (FAO, 2016).

Según datos de la federación nacional de arroceros Fedearroz Colombia tiene 460.000 hectáreas con cultivos de arroz. De ellas, 217.000 están en los Llanos Orientales, 55.000 en el Caribe seco, 58.000 en el Caribe húmedo y 140.000 hectáreas en la zona centro, básicamente los departamentos de Tolima, Huila y aledaños. (DANE, 2020) En el segundo semestre de 2019 el área total nacional sembrada en arroz mecanizado fue 186.703 hectáreas. Esto corresponde a 19.557 hectáreas más que el área sembrada en el segundo semestre de 2018 (167.146 hectáreas), indicando una variación positiva de 11,7%. El área cosechada de arroz mecanizado aumentó 5,5% a nivel nacional, pasando de 333.377 hectáreas en el segundo semestre de 2018, a 351.838 hectáreas en el segundo semestre de 2019. Los principales departamentos arroceros que presentaron un aumento de áreas cosechadas en el segundo semestre de 2019 fueron Meta, con una variación positiva de 16,1%, Casanare 7,6% y Resto Departamentos 11,9%. (DANE, 2020).

El arroz es uno de los principales cereales sembrados en el departamento del Cesar (Colombia), hace parte principal de su economía por lo que representa una producción

aproximada de 125.000 toneladas por año, pero a pesar de los incrementos en los rendimientos logrados en sus cultivos, como consecuencia del uso de mejores técnicas agrícolas, estos se ven afectados hasta en un 40% por la incidencia de enfermedades fúngicas por lo que frecuentemente se establecen grandes contrastes biológicos en la producción arrocerá, resultando en la reducción de la calidad y cantidad de la cosecha, (FEDEARROZ, 2008; ICA, 2011). amenazando la sostenibilidad de su producción y el mantenimiento de la seguridad alimentaria en regiones como el departamento del Cesar, Colombia. Esta justificación se enfoca en los puntos clave que impulsan la necesidad de investigar y abordar estas problemáticas, (Acebo et al.,2011)

Las enfermedades fúngicas, en particular la Piriculariosis, representan una amenaza significativa para los cultivos de arroz. Estas enfermedades pueden reducir los rendimientos de manera drástica, afectando la productividad y la economía agrícola de regiones como el departamento del Cesar. La comprensión de los mecanismos de acción de estas enfermedades y la búsqueda de soluciones efectivas son cruciales para mitigar sus efectos perjudiciales.

La dependencia de fungicidas químicos para el control de enfermedades fúngicas plantea preocupaciones ambientales y de salud, así como la posibilidad de desarrollar resistencia a los patógenos. La búsqueda de alternativas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente es imperativa para garantizar la seguridad alimentaria a largo plazo y la conservación de los recursos naturales, es por esto que se buscan alternativas como el control biológico, ya que es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo de microorganismos patógenos puede ocurrir por diferentes mecanismos de acción, tales como la competencia por nutrientes, minerales y espacio; la síntesis de metabolitos y la inducción de resistencia sistémica en la planta (Viera, et al, 2020). Entre estos metabolitos se destacan los sideróforos, que hacen al hierro inaccesible para los patógenos; los antibióticos, tales como 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), pioluteorina, pirrolnitrina y derivados de fenazina (Hernández, et al, 2014) y lipopéptidos cíclicos ( Raaijmakers J). La detoxificación de factores de virulencia de los patógenos constituye otro mecanismo de control biológico que puede incluir la producción de una proteína que se une, reversiblemente, a la toxina, la detoxificación irreversible mediada por una esterasa y la hidrólisis (Acebo, Y 2011).

Estudios realizados en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana (Cuba), demostraron que las cepas de *Pseudomonas*

*aeruginosa*. Presenta genes que codifican para la producción de sideróforos y antibióticos. Las cepas de *Pseudomonas* son utilizadas debido a su gran cantidad de compuestos y nutrientes, su efectividad produce un impacto positivo a nivel económico y desde la dimensión biológica un control y efectividad o resistencia en los cultivos (Pérez, et al, 2015). No obstante, así como se presencian elementos positivos, existen también hongos que afectan cultivos como en el caso de la *Pyricularia oryzae*, que afecta tanto las panículas como los granos y conlleva a una disminución del rendimiento agrícola o en su defecto a la pérdida de la cosecha, razón por la cual es fundamental la implementación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Por su parte, el género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido en los agrosistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas, Una gran diversidad de especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz, frutales, entre otros (Wang et. Al, 2013. Li et al., 2015). El estudio de esta capacidad de *Bacillus* se inició por el descubrimiento de la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis*; en la actualidad diversas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) son ampliamente estudiadas para mitigar la incidencia de enfermedades de importancia agrícola (Raaijmakers y Mazzola, 2012).

Una de las características más importantes del género *Bacillus* es su capacidad de producir una gran variedad de antibióticos con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, entre éstos, los lipopéptidos cíclicos no ribosomales han sido los más estudiados. Los lipopéptidos (LPs), estructuralmente consisten en un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxi o  $\beta$ -amino. (Ongena & Jaques,2008; Falardeau et al.2013).

Por lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta que este tipo de enfermedades en cultivos han sido consideradas de incidencia primaria en el departamento del Cesar , y que muchos de los métodos empleados para combatir este hongo ; como es el caso del uso de fungicidas no han sido suficientemente efectivos para contrarrestarlas, se hace necesario la realización de investigaciones enfocadas al desarrollo de nuevos métodos de control que contribuyan a disminuir el uso de químicos, conservar la calidad del medio ambiente y aseguren que la producción de arroz sea segura e inocua mediante la implementación de estrategias de agricultura sostenible (Rivera & Gómez, 2012)

En consecuencia, esta investigación se presenta como una respuesta necesaria a los desafíos planteados por la intersección de la seguridad alimentaria, la sostenibilidad agrícola y el impacto económico en regiones como el departamento del Cesar. A través del estudio del efecto biocontrolador de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* contra la Piriculariosis, se busca contribuir al desarrollo de soluciones innovadoras y sostenibles que puedan preservar tanto los cultivos de arroz como el equilibrio ecológico en la región y más allá.

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo General

Evaluar la efectividad de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en el biocontrol de *Pyricularia oryzae*, agente causal de la Piriculariosis en el cultivo del arroz.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Analizar la capacidad antagonista “*in vitro*” de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* frente al hongo *Pyricularia oryzae*
- Determinar el efecto biocontrolador y promotor de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en plántulas de arroz inoculadas con *Pyricularia oryzae* bajo condiciones de invernadero.

## 5 Marco Teórico

### 5.1 Antecedentes

El tizón de arroz es una patología causada por el hongo *Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe oryzae*. Según Turcios (2016), el género *Pyricularia* perjudica un extenso entorno de especies, principalmente cereales y otras especies de gramíneas. Por lo tanto, se ha establecido que los recursos provenientes del arroz y otros cereales deben ser denominados como *Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe oryzae*, mientras que los aislamientos de *Digitaria sanguinalis* se refieren como *Pyricularia grisea*, *Magnaporthe grisea*. Estos nombres son sinónimos, por lo que en la literatura se utilizan los cuatro nombres para referirse al agente causal del tizón del arroz.

Según Rodríguez (2016) en su investigación *Magnaporthe oryzae*, un hongo de difícil control y de efectos devastadores en nuestros cultivos de arroz desarrollado bajo el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA. El Parque Científico y Tecnológico de la UPM, tiene como objetivo conocer más acerca de la biología del hongo y de la planta y a su vez tener nociones claras a nivel molecular de las distintas fases de los mecanismos de la enfermedad para encontrar las mejores vías para combatir el hongo.

*Magnaporthe oryzae* es un hongo patógeno de arroz que produce la enfermedad denominada Piriculariosis. Es el patógeno de plantas que mayores pérdidas produce mundialmente. El control de la enfermedad es altamente complejo y requiere la búsqueda de nuevas estrategias. La investigación tomó como base teórica artículos e investigaciones

realizadas por: Rodríguez-Romero, J., Franceschetti, M., Bueno, E., Sesma, A. & RodríguezRomero, J. (2014), Yu, F., Gu, Q., Yun, Y., Yin, Y., Xu, J.-R., Shim, W.-B. & Ma, Z. (2014), entre otros.

El artículo fue desarrollado bajo una aproximación metodológica cuali- cuantitativa, la cual permite un análisis más amplio e integral de la evolución y desarrollo del hongo. Gracias a eso se llegó a la conclusión de que se deben unificar bases de datos y catalogar todas las infecciones que se produzcan en las distintas regiones. Tener datos más exactos de las condiciones del cultivo y de las variedades de arroz infectadas. A su vez, hacer estudios genéticos tanto con los ‘patotipos’ de los distintos aislados como con las variedades de arroz. Por supuesto un incremento en el apoyo de las instituciones y de las cooperativas de agricultores para llevar a cabo más proyectos de I+D+i dentro de esta área ayudaría enormemente a encontrar soluciones a más corto plazo.

El estudio de Rais et al. (2017) titulado "*Bacillus spp.*, un agente de biocontrol que mejora la actividad de las enzimas de defensa antioxidantes en el arroz contra *Pyricularia oryzae*" tiene como objetivo principal investigar la inducción de la actividad de las enzimas relacionadas con la defensa en el arroz y la secreción de su potencial inductor en la rizosfera durante la interacción entre *Bacillus subtilis*. y *P. oryzae* en diversas variedades de arroz. El estudio aborda la observación de que las bacterias antagonicas promueven significativamente la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en comparación con el control negativo (*P. oryzae*), registrando un aumento de 1.7 a 1.9 veces en ambas condiciones, hidropónicas y de suelo.

La inducción de la actividad de SOD en las hojas fue mayor (1.3-1.9 veces) en comparación con la de las raíces (1.1-1.7 veces) en todas las variedades. La actividad máxima de SOD se observó en basmati-385 (1.8-1.9 veces) seguida de la de basmati-515 (1,2-1,6 veces) y basmatisuper (1,2-1,4 veces). *Bacillus subtilis sp* KFP-17 provocó la mayor actividad de SOD (1,2 a 1,9 veces) seguida por la de *Bacillus subtilis sp* KFP5 y *Bacillus subtilis sp* KFP-7 (1,1-1,8 veces). Como resultados se establecieron hallazgos que presentan en primer lugar la secreción de sideróforos, proteasa y glucanasa en la rizosfera del arroz. Existe una correlación significativa entre las cantidades de proteasa, sideróforos, glucanasa se recuperó de la rizosfera y las actividades de las enzimas antioxidantes indican el papel de estos metabolitos en la activación del sistema de la enzima antioxidante.

Shafi et al (2017) en su revisión científica Especies de *Bacillus* como armas versátiles

para patógenos vegetales: una revisión tiene como objetivo general presentar el potencial de biocontrol de las especies de *Bacillus* en relación con sus atributos antagonistas frente a patógenos vegetales. Estos atributos incluyen la producción de lipopéptidos, antibióticos y enzimas, así como la promoción del crecimiento de las plantas y la resistencia sistémica inducida. Aborda la situación de que los pesticidas químicos son altamente efectivos y convenientes de usar, pero son una amenaza potencial para el medio ambiente y todo tipo de vida en la tierra. Por lo tanto, el uso de agentes de control biológico para el manejo de patógenos vegetales se considera una estrategia más segura y sostenible para una productividad agrícola segura y rentable.

El artículo tomó como base teórica investigaciones realizadas por: Microbiología UDoPa. Base de datos de Antimicrob Pept. (2016); Gong AD, Li HP, Yuan QS y col (2015), entre otros. fue desarrollado bajo una aproximación metodológica cuali- cuantitativa, la cual permite un análisis más amplio e integral del funcionamiento de los microorganismos de biocontrol. Se han descrito varios microorganismos como posibles agentes de control biológico como *Hypericum gramineum*, *Pseudomonas fluorescens* y algunas especies de *Streptomyces*. Además, *Ulocladium atrum* y *Trichoderma* tienen la capacidad de controlar diversas enfermedades bacterianas y fúngicas. Por lo general, muestran una eficacia de control que oscila entre el 30% y el 50%.

Las especies de *Bacillus subtilis* se han convertido en atractivos agentes de control biológico debido a su capacidad para producir endosporas duras y resistentes y antibióticos que controlan una amplia gama de patógenos vegetales. En conclusión, la diversidad en las cepas de *Bacillus* brinda protección, resistencia inducida sistémicamente y la promoción del crecimiento de las plantas juegan un papel principal en la protección biológica de las plantas. La mayoría de las investigaciones científicas se realizan sobre las vías de transducción de señales en plantas tratadas con la especie *Bacillus*.

Thierry et al (2017) Un enfoque genómico para desarrollar una nueva prueba de qPCR que permita la detección del linaje *Pyricularia oryzae* que causa la explosión del trigo tiene como objetivo el desarrollo de una prueba pcr que les permita la detección de *Pyricularia* tempranamente, además se evaluó el rendimiento de la prueba para medir su especificidad analítica, sensibilidad analítica y robustez. Utilizaron como referentes teóricos artículos publicados por: Castro Agudín et al. 2016; Ceresini et al. 2019, etc., el. El artículo fue desarrollado bajo una aproximación metodológica cuali- cuantitativa, la cual permite un análisis más amplio de las elecciones al linaje *Triticum* y obtuvieron la prueba de PCR

cuantitativa C17 detectó aislamientos pertenecientes al linaje *Triticum* con alta sensibilidad, hasta 13 copias de plásmido o 1 pg de ADN genómico por tubo de reacción.

## 5.2 Bases Teóricas

En el cultivo del arroz, la principal enfermedad y la mayor causante de pérdidas económicas es conocida como Piriculariosis, causada por el hongo *Pyricularia oryzae* Cavara (forma sexual de *Magnaporthe grisea*). Esta enfermedad puede afectar hasta un 100% de la plantación y causar daños económicos considerables. (Cambroner, & Orozco, 2021). Según la sintomatología que presentan las plantas de arroz atacadas por este patógeno *Pyricularia oryzae* ataca hojas, tallos, inflorescencias y ocasionalmente al grano. Los momentos en que la planta es más susceptible, son en el estado de plántula y durante la floración, incluso las raíces pueden infectarse. Sin embargo, el síntoma más común y que sirve como diagnóstico, son lesiones en forma de diamante que ocurren en las hojas.

La enfermedad se presenta generalmente, a partir de los 35 días de la siembra, incidiendo durante la fenofase de ahijamiento activo, disminuyendo en la fase de cambio de primordio e incide nuevamente en la paniculación (Pincirolí, et.al 2006) *P. oryzae* puede permanecer en los residuos de cosecha, las semillas y en otras plantas hospedantes. En los residuos de cosecha, es probable encontrar inóculo del patógeno hasta después de dos años de ser eliminadas las plantas. Almaguer et al, (2012). demostraron que la temperatura y la humedad relativa, influyen positivamente en la concentración de propagar *P. oryzae* en el aire.

Los síntomas que se pueden presentar en las hojas pueden variar de acuerdo con algunas condiciones ambientales como edad de la planta, las lesiones pueden aparecer inicialmente con un color verde grisáceo, con un borde verde más oscuro y se expanden rápidamente a varios centímetros de longitud. En los cultivos que ya fueron atacados las lesiones más viejas toman un color marrón con apariencia tostada con bordes necróticos; mientras que los síntomas que aparecen entre la unión de la hoja y la vaina del tallo consiste en presencia general de necrosis en la unión entre los dos tejidos (Acebo, et al 2011).

En el cuello y panículas de la planta de arroz, *Pyricularia* los infecta en el nódulo y la infección conduce a una afección llamada cuello podrido o explosión del cuello. La infección de los cuellos puede ser muy destructiva, causando que las semillas no se llenen, o haciendo que toda la panícula se caiga como si estuviera podrida. El hongo también puede infectar las panículas a medida que forman las semillas. Las lesiones se pueden encontrar en las ramas de

la panícula, estas lesiones son decoloraciones de color marrón grisáceo, y con el tiempo si las ramas presentan varias lesiones pueden romperse.

A menudo se ha aislado el hongo de los pedicelos de las semillas, estas no producen cuando los pedicelos son infectados, esto es una condición llamada cegamiento. Los síntomas de la explosión del arroz en las semillas mismas consisten en manchas marrones, y ocasionalmente, la lesión clásica en forma de diamante en las hojas. El proceso y el tiempo durante el cual ocurre la infección de las semillas por esporas del patógeno no se ha descrito completamente, pero hay información que afirma que el hongo puede infectar semillas. El hongo *Pyricularia oryzae* afecta a un amplio espectro de especies de las gramíneas, pero el principal daño económico lo provoca en arroz (Kunova, et al 2014).

Las condiciones necesarias para el desarrollo del hongo deben ser, una alta humedad relativa (90-92%), gran intensidad lumínica, periodos largos de fotoperiodismo, tiempo ventoso, temperaturas nocturnas rondando los 20°C alternando con temperaturas diurnas entre 30 - 35°C.

El ciclo de la enfermedad y su epidemiología son aspectos algo complejos, pues el hongo que causa el añublo del arroz se llama *Magnaporthe oryzae* (anteriormente *Magnaporthe grisea*). Es un ascomiceto porque produce esporas sexuales (ascosporas) en estructuras llamadas ascas, y se clasifica en la familia Magnaporthaceae de nueva construcción. Las ascas se encuentran dentro de estructuras especializadas llamadas peritecios. El micelio de *M. oryzae* es septado y los núcleos en el micelio y las esporas de este hongo son haploides. (Long, et al 2001)

Teniendo en cuenta lo anterior, se presentan hongos como el *Ascomycete*, el cual produce ascosporas hialinas, de forma fusiforme (con forma de huso con extremos decrecientes) con tres tabiques. Las ascas son unitunicadas. Se considera que este es heterotálico con un sistema de acoplamiento dipolar (apareamiento controlado por dos alelos diferentes en un único locus) con genes adicionales que controlan el ciclo sexual. (Acebo, et al 2011)

La etapa asexual de *Magnaporthe oryzae* está descrita por el nombre de *Pyricularia oryzae* (anteriormente llamado *P. grisea*) y es la forma más común de esporas del hongo. Estas esporas, llamadas conidias, se producen en los llamados conidióforos. Las conidias son generalmente de tres celdas. Las colonias esporuladas en placas de agar pueden tener un aspecto grisáceo lanudo.

En condiciones favorables, el hongo hace el proceso de esporulación en el centro de

las lesiones en cultivares susceptibles. También puede esporular en las lesiones de la semilla y estas producen una extensión más que en las hojas infectadas a las superficies de las lesiones, las cuales se presentan en color gris polvoriento. Por su parte, se encuentran los conidios, producidos después de horas en alta humedad, estos pueden ser liberados teniendo en cuenta las condiciones del viento, ya que puede ser cerca del mediodía o llevarlo a distancias considerables.

La infección del arroz ocurre cuando los conidios se depositan en los tejidos de arroz y germinan al producir un tubo germinativo y un apresorio. El apresorio es una estructura melanizada, y de ella se desarrolla una clavija de infección que penetra el tejido. El hongo penetra directamente por la cutícula. Después de la penetración, la hifa de infección primaria crece rápidamente y se ramifica dentro de los tejidos susceptibles. (Lu, et al. 2019).

En general, el tizón del arroz se ve favorecido por temperaturas moderadas (24° C) y períodos de alta humedad que son de 12 horas o más, condiciones fácilmente alcanzables en campos de arroz inundados.

Las fuentes de esporas invernantes que comprenden el inóculo primario consisten en hierbas, plantas voluntarias, rastros infectados y semillas infestadas en la superficie del suelo después de la siembra mecánica. Las semillas infestadas que quedan en la superficie del suelo pueden producir fácilmente esporas de *P. oryzae* durante más de varias semanas después de la siembra, mucho después de que hayan surgido las plántulas. En invernadero, el hongo también esporula sobre los coleóptilos muertos o moribundos de plantas que crecen a partir de semillas infectadas. (Long, et al 2001).

Las esporas producidas como inóculo primario en los tejidos que invernan producen las infecciones iniciales en plántulas jóvenes, al depositarse en las hojas, germinando e invadiendo los tejidos de las hojas. La gravedad de la enfermedad a menudo se correlaciona con la cantidad de material infestado (densidad de inóculo). Las lesiones en las plántulas jóvenes aparecen unos días después de la infección. Estas lesiones secundarias producen más esporas y estas esporas se diseminan fácilmente por el viento a los tejidos de hojas sanas y cercanas. La esporulación ocurre cuando la humedad relativa alcanza el 100% (Lu, et al. 2019).

Los ciclos secundarios pueden repetirse muchas veces durante la temporada de crecimiento, con el potencial de generar una gran cantidad de infecciones dentro de la estación de cultivo. El número de ciclos y el número de esporas que se producen en cada lesión individual pueden verse influenciados por muchos factores, que incluyen la temperatura, la lluvia, la profundidad del agua en el arrozal, la cantidad de nitrógeno utilizada para fertilizar el arroz y el nivel de resistencia genética en el cultivar que está infectado. (Chuwa, et. al 2013).



Ilustración 1: Daños causados por *Pyricularia oryzae* a las plantas de arroz

### 5.2.1 Taxonomía

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida **Orden:**  
Poales **Familia:** Poaceae

**Género:** *Oryza*

**Especie:** *Oryza sativa* L.



Ilustración 2: *Oryza sativa*, planta de arroz

### 5.2.2 Ciclo de Vida del Hongo

La *Pyricularia oryzae* es un hongo que se desarrolla en condiciones de alta humedad relativa y temperaturas entre 22° y 29° grados Celsius. Su crecimiento se ve favorecido por la presencia de altas concentraciones de nitrógeno en el agua de riego. Se ha observado una reciente infección en la Albufera de Valencia que podría estar relacionada con esta causa.

Este hongo produce una gran cantidad de esporas, lo que hace necesario implementar estrategias para inhibir su formación. Para lograrlo, se requiere analizar la regulación genética de la esporulación, identificando el gen responsable de este proceso y neutralizándolo mediante métodos de control químico o biológico. Las esporas que quedan en los restos de cosechas anteriores o de malas hierbas constituyen la principal fuente de inóculo para el inicio de esta enfermedad.

La propagación de la *Pyricularia oryzae* se debe a diversos factores, como la aparición de nuevas variedades de arroz con altos rendimientos y escasa variabilidad genética en los últimos 30 años. También influyen los cambios en los sistemas de cultivo, la falta de rotación de cultivos y las alteraciones en las prácticas culturales. Las nuevas variedades de arroz requieren una cantidad sustancial de nitrógeno, lo que favorece el crecimiento del hongo.

### 5.3 Bases Legales

La siguiente investigación se encuentra soportada en las siguientes Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIIF, 2010):

Bases legales

1. “ **Marco para el análisis de riesgo de plagas** “ NIMF Número 02. (2007): “ Esta normativa describe el proceso para el análisis de riesgo de plagas, abarcando la evaluación del riesgo y el manejo de la enfermedad.

” 2.’ **Glosario de términos fitosanitarios** “ NIMF, Número: 05 (2010). “ La norma NIMF, describe un vocabulario con definiciones y términos orientado a todos los sistemas fitosanitarios. “

**Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas.** “ NIMF Número: 27 (2006), “ Esta norma describe los requisitos principales que se deben tener en cuenta para un diagnóstico confiable.” (NIMF, 2010)

**Normas que rigen el cultivo de *Oryza sativa* en Colombia**

1.**Decreto 3081 de 2005.**’. Establece las buenas prácticas agrícolas, para el arroz en el territorio nacional

## 6 Metodología

### 6.1.1 *Tipo de Estudio y Línea de Investigación*

Es un estudio experimental, pues en esta investigación se evaluaron distintos tratamientos la línea de investigación es Bioprospección.

### **6.1.2 Universo y Población**

La parte experimental de este proyecto se llevó a cabo en la región del Caribe colombiano en la ciudad de Valledupar; en los laboratorios de Microbiología de la Universidad Popular del Cesar; y en una Casa malla ubicada en el barrio Sicarare ubicado entre latitud 10°28'08.9"N Longitud 73°14'19.1 Latitud 10° 4' 4'' Longitud 73° 10' 9''

## **6.2 Fases Experimentales**

**6.2.1 Metodología del objetivo específico 1:** Analizar la capacidad antagonista *in vitro* de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* frente al hongo *Pyricularia oryzae*.

### **6.2.1.1 Recuperación e Identificación de Microorganismos.**

Las cepas de los microorganismos *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* se encontraban conservadas en el cepario del laboratorio de microbiología de análisis farmacéuticos SAF SAS en presentación Kwik stik, que es un método que permite adquirir y conservar microorganismos genéticamente estables ; por lo que solo se procedió a sembrar los microorganismos en medios de cultivos selectivos para su recuperación; *P.aeruginosa* fue sembrado en agar Cetrimide y *B. subtilis* fue sembrado en agar Plate count y R2A simultáneamente; ambos microorganismos fueron incubados a 32°C durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas de incubación, se les realizó una tinción de Gram y posteriormente una identificación macroscópica y microscópica de ambas cepas.

La cepa del hongo *Pyricularia oryzae* fue suministrada por la Federación Nacional de arroceros Fedearroz, en donde ya había sido sometida a pruebas de serología; por lo que solo se sembró nuevamente en agar Sabouraud y agar PDA, y se les hizo una tinción con azul de lactofenol para confirmar sus características morfológicas.

### **6.2.1.2 Prueba de antagonismo *in vitro***

Para evaluar el efecto antagónico de las bacterias frente al hongo *P. oryzae* se utilizó un diseño completamente aleatorizado, en cajas de Petri de 90mm de diámetro, formando un triángulo equilátero (Figura 2) en donde en la mitad se sembró el hongo *P. oryzae* y con las bacterias *P. aeruginosa* y *B. subtilis* se formó el triángulo, de este modo se ensayaron cuatro tratamientos (1. Interacción *Bacillus subtilis* x *Pyricularia oryzae*, 2. *Pseudomona aeruginosa* x *Pyricularia oryzae*, 3. *Bacillus subtilis* x *Pseudomona aeruginosa* x *Pyricularia oryzae* y 4. Control (*Pyricularia oryzae*)), replicados 3 veces cada uno con el fin de determinar qué tratamiento resulta mejor, si se potencia o disminuye su efecto contra *Pyricularia oryzae*. Se midió con una regla graduada el crecimiento radial de las colonias del agente causal en interacción con el antagonista y del control a partir de las 24 h.

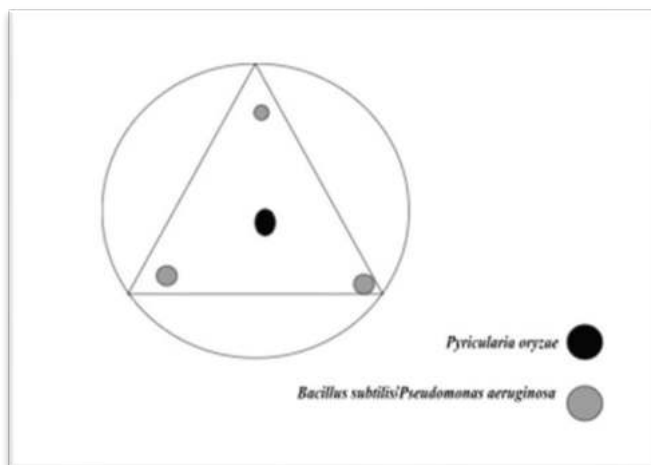


Ilustración 3: Diseño para la prueba de antagonismo de cepas *Pseudomonas* y *Bacillus* frente al hongo *Pyricularia oryzae*



#### Ilustración 4: Prueba de antagonismo

**6.2.2 Metodología del objetivo específico 2:** Determinar el efecto biocontrolador y promotor de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en plántulas de arroz inoculadas con *Pyricularia oryzae* bajo condiciones de invernadero.

##### 6.2.2.1 Siembra de las Plantas de Arroz

En una casa malla adecuada con las condiciones de humedad y temperatura que requieren las plantas de arroz, se sembraron las semillas, una vez ya germinadas fueron separadas cada una en bolsas independientes, y a todas se les suministró la misma cantidad de abono, semanalmente se les agregaba la misma cantidad de un fertilizante rico en fosforo y potasio potencializado con algas marinas *Ascophyllum nodosum* y *sargassum* sp , conocido comercialmente como (R-llenitos) ; y a diario la misma cantidad de agua para que todas las plantas tuvieran las mismas condiciones de crecimiento.



Ilustración 5: Germinación de las semillas de arroz en casa malla

##### 6.2.2.2 Inoculación del Hongo *Pyricularia oryzae* a las Plantas de Arroz.

La inoculación del hongo *Pyricularia oryzae* se hizo cuando las semillas germinaron y las plantas se encontraban en condición de plántula, es decir, a los 70 días después de su siembra, que es cuando las plantas se encuentran más susceptibles, se sembró el hongo en caldo Sabouraud y se hicieron diluciones seriadas hasta  $10^{-2}$  con una concentración de  $2 \times 10^9$  esporas /ml y esta última dilución se esparció con un atomizador previamente estéril sobre 4 grupos de

5 plantas, dejando un grupo sin inocular para usarlo como control negativo y comparar el daño causado por el hongo.



*Ilustración 6: Aplicación del hongo a las plantas a una concentración del hongo:  $2 \times 10^{-9}$  esporas*

### **6.2.2.3 Identificación de los Daños Producidos por *Pyricularia oryzae* a las Plantas de Arroz**

Una vez infectadas las planta se empezaron a monitorear semanalmente ,con el fin de identificar los síntomas característicos causados por el hongo, que normalmente suelen manifestarse como manchas o lesiones en las hojas, con forma alargada y color un color marrón, a medida que va avanzando la infección, a colores grisáceos y bordes de color marrón, estas lesiones se encontraban presentes en los 4 grupos de plantas de arroz que fueron infectados; lo que quiere decir es que la inoculación del hongo a las plantas fue efectivo.



*Ilustración 7: Daños causados a las plantas de arroz por el hongo P. oryzae*

#### 6.2.2.4 Aplicación de los Tratamientos

Para aplicar los tratamientos se tomaron las bacterias *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en Caldo Soja Trypticaseína (TSB) a una concentración  $10^{-8}$  de y se le aplicaron con un atomizador previamente estéril a los 3 grupos de plantas que iban a ser tratados, estos tratamientos se definieron de la siguiente manera:

#### **Tabla**

**1**

#### *Número de tratamientos*

Tratamiento 1	Plantas sin inocular
Tratamiento 2	Plantas + <i>Pyricularia</i>
Tratamiento 3	Plantas + <i>Pyricularia</i> + <i>Bacillus</i>
Tratamiento 4	Plantas + <i>Pyricularia</i> + <i>Pseudomonas</i>
Tratamiento 5	Plantas + <i>Pyricularia</i> + <i>Bacillus</i> + <i>Pseudomonas</i>
Tratamiento 6	Plantas + <i>Bacillus</i>
Tratamiento 7	Plantas + <i>Pseudomonas</i>
Tratamiento 8	Plantas + <i>Bacillus</i> + <i>Pseudomonas</i>

**Nota.** Fuente Bolaño y Gómez (2023)



Ilustración 8: Dilución de las bacterias *P. aeruginosa* y *B. subtilis* en caldo TSB

A las primeras 5 plantas se le suministró un tratamiento solo de *Bacillus subtilis*, al segundo grupo se le aplicó el tratamiento con solo *Pseudomonas aeruginosa*, y al tercer grupo se le suministró un tratamiento que combina ambos géneros de bacterias.



Ilustración 9: Aplicación de los tratamientos de bacterias a las plantas.

#### 6.2.2.5 Diseño Experimental

Se realizó la aplicación de 3 tratamientos en grupos de 5 plantas más un control de plantas sin inoculación del hongo que fue tomado como control negativo y un grupo de plantas al que solo se aplicó el hongo, es decir sin ningún tipo de tratamiento como control positivo



Ilustración 10: Grupo de plantas de arroz con tratamientos y controles positivos y negativos

#### 6.2.2.6 Variables de Rendimiento Evaluadas.

Las variables para analizadas fueron: inhibición del crecimiento de *Pyricularia oryzae*, longitud de raíces, largo de los tallos, peso fresco y peso seco.

#### 6.2.2.7 Diseño Experimental y análisis estadístico

Se realizó la aplicación de 3 tratamientos en grupos de 5 plantas más un control de plantas sin inoculación del hongo que fue tomado como control negativo y un grupo de plantas al que solo se aplicó el hongo, es decir, sin ningún tipo de tratamiento como control positivo. Las variables fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA), usando el programa estadístico R studio (2017), versión 3.6.1 a través de un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 3 tratamientos cada uno con 3 réplicas. Las diferencias significativas entre tratamientos fueron comparadas mediante la prueba de Duncan, con un nivel de significancia del 5% ( $p \leq 0.05$ ).

## 7 Resultados

### 7.1 Identificación de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*

Macroscópicamente *B. subtilis* se observó como colonias circulares planas; amarillentas o anaranjadas y mucosas; microscópicamente se observaron bacilos Gram positivos; mientras que *Pseudomonas aeruginosa* se observó macroscópicamente como colonias circulares, planas y mucosas de color amarillo o verdoso, y microscópicamente como bacilos Gram negativos.



Ilustración 11: Morfología macroscópica y microscópica de *Bacillus subtilis*



Ilustración 12: Morfología macroscópica y microscópica de *Pseudomonas aeruginosa*

### 7.1.1 Identificación de *Pyricularia oryzae*

Macroscópicamente se presentaron colonias lanosas o algodonosas de color verde oscuro o marrón con bordes blancos; y microscópicamente se presentaron conidióforos simples, que llevan conidios hialinos, piriformes a aclavelados, con septos.

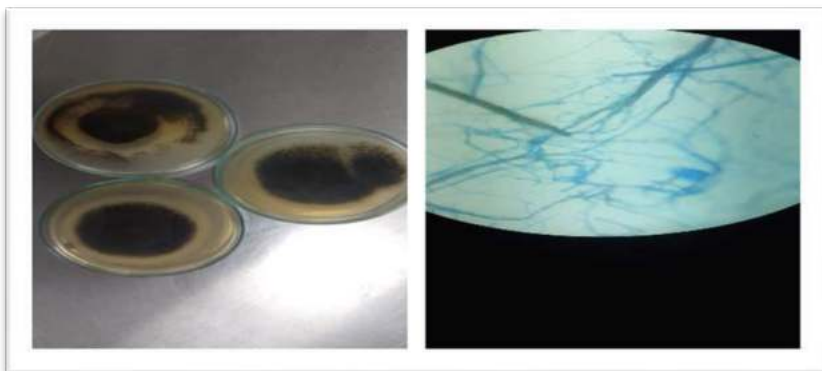


Ilustración 13: Morfología macroscópica y microscópica de *Pyricularia oryzae*

## 7.2 Competencia *in vitro* Entre Microorganismos

Para calcular el porcentaje de inhibición en las cajas de Petri se empleó la siguiente fórmula:

Inhibición (%) =  $\frac{DCC - DTC}{DTC} \times 100$  Donde:

DCC: Diámetro de la colonia control.

DCT: Diámetro de la colonia tratada.



*Ilustración 14: competencia entre microorganismos en comparación con el control positivo*

*Bacillus subtilis* presentó un porcentaje de inhibición aproximado del 75% contra el hongo *Pyricularia oryzae*, es decir, que en las cajas Petri en donde fueron sembradas *P. oryzae* y *B. subtilis* era más notorio el crecimiento de *Bacillus*, donde se observa una disminución del crecimiento micelial del hongo por debajo de 40 mm si es comparado con el control negativo (sin *Bacillus*). Fueron sembradas 3 cajas Petri con *Bacillus x Pyricularia* y en las 3 cajas se observó inhibición del crecimiento del hongo, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* presentó un porcentaje de inhibición aproximado del 27% contra el hongo *Pyricularia oryzae*, es decir que en las cajas Petri donde fueron sembradas *P. oryzae x B. subtilis* el crecimiento de la bacteria no fue tan notorio y no se mostró una inhibición considerable del hongo.

En este caso, el ANOVA se utilizará para evaluar si las diferencias observadas entre los tratamientos son estadísticamente significativas.

La hipótesis nula ( $H_0$ ) en el ANOVA es que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, y la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) es que al menos un tratamiento es diferente de los demás.

Los datos se ven de la siguiente manera:

**Tabla 2** *Porcentajes de inhibición de los tratamientos utilizados*

Tratamientos	Caja 1	Caja 2	Caja 3
<i>Bacillus subtilis</i>	75%	73%	77%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21%	32%	28%
<i>Bacillus subtilis</i> x <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80%	78%	73%

**Nota.** Fuente Bolaño y Gómez (2023)

1. Primero, calculamos el promedio y la desviación estándar de cada tratamiento:

$$\text{Promedio de } B. \text{ subtilis} = (75\% + 73\% + 77\%) / 3 = 75\%$$

$$\text{Promedio de } P. \text{ aeruginosa} = (21\% + 32\% + 28\%) / 3 = 27\%$$

$$\text{Promedio de } B. \text{ subtilis} \times P. \text{ aeruginosa} = (80\% + 78\% + 73\%) / 3 = 77\%$$

$$\text{Desviación estándar de } B. \text{ subtilis} \approx 2.65\%$$

$$\text{Desviación estándar de } P. \text{ aeruginosa} \approx 5.66\%$$

$$\text{Desviación estándar de } B. \text{ subtilis} \times P. \text{ aeruginosa} \approx 3.61\%$$

2. Calculamos la suma de cuadrados entre los grupos (SSG) y la suma de cuadrados dentro de los grupos (SSE):

$$\text{SSG} = [(3 * (75\% - 75\%)^2) + (3 * (27\% - 27\%)^2) + (3 * (77\% - 77\%)^2)] = 0$$

$$\text{SSE} = [(2.65\%^2 * (3 - 1) * 3) + (5.66\%^2 * (3 - 1) * 3) + (3.61\%^2 * (3 - 1) * 3)] \approx 0.0885$$

3. Calculamos la estadística de prueba F:

$$F = (\text{SSG} / 2) / (\text{SSE} / (3 * 3 - 3)) \approx 0 / 0.0885 \approx 0$$

4. Ahora, calculamos el valor p utilizando la distribución F con 2 y 6 grados de libertad:

$$\text{Valor } p \approx P(F \leq 0) \approx 1$$

Dado que el valor p es igual o mayor que 0.05 (un nivel de significancia comúnmente utilizado), no podemos rechazar la hipótesis nula. Esto sugiere que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

En resumen, según el análisis de varianza (ANOVA), no hay diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y la combinación de ambos en las tres cajas Petri evaluadas.

Sin embargo, en la caja 3, el tratamiento combinado es ligeramente menos efectivo que *B. subtilis* solo, pero aún es mejor que *P. aeruginosa* por sí solo. La inhibición promedio del 77% en todas las cajas sugiere que el tratamiento con *P. oryzae* no parece potenciar ni disminuir significativamente los dos tratamientos anteriores en estas condiciones específicas.


### 7.3 Competencia en Invernadero Entre Microorganismos

Al igual que en la prueba in vitro, en esta prueba de invernadero se demostró que *Bacillus subtilis* tiene una mayor capacidad inhibitoria frente al hongo *Pyricularia oryzae* en comparación con *Pseudomonas aeruginosa*, ya que a partir de las 3 semanas de haber esparcido el tratamiento de las bacterias, el grupo de plantas que mostraba menos manchas amarillentas y cafés fueron las plantas tratadas con *Bacillus subtilis*, el grupo de este tratamiento estaba conformado por 10 plantas de las cuales entre 5-6 presentaban pocas hojas amarillas con tonos grisáceos, tallos amarillentos y secos; mientras que las plantas que fueron tratadas con la solución que combinaba *Pseudomonas aeruginosa* todas las plantas presentaban lesiones en tallos y hojas y el grupo de plantas que combinaba *Bacillus* y *Pseudomonas* tuvo un comportamiento similar al grupo que fue tratado solo con *Bacillus*.

Se notó también que aquellas plantas que fueron tratadas con la solución que contenía *Bacillus* y la mezcla entre *Bacillus* y *Pseudomonas* mostraba mayor crecimiento de sus plántulas en comparación con aquellas plantas que solo se trataron con *Pseudomonas* y con el grupo de plantas que se usó como control negativo y control positivo, así que se podría concluir

que *Bacillus subtilis* además de tener capacidad inhibitoria contra el hongo *Pyricularia oryzae* es también un promotor de crecimiento en las plantas de arroz

**Tabla 3** Comportamiento de los tratamientos y controles en casa malla


<p>Tratamiento 1 <i>Bacillus subtilis</i></p>	<p>En este grupo cada bolsa contiene 10 plantas de las cuales entre 5-6 presentan hojas amarillas con tonos grisáceos, tallos amarillentos y secos</p>
	

## Tratamiento 2

*Pseudomonas aeruginosa*

En este grupo cada bolsa contiene 10 plantas de las cuales entre 7-8 presentan una coloración amarillenta anaranjada con las puntas color marrón y blanco, manchas en las hojas de color marrón.



<p>Tratamiento 3</p> <p><i>Bacillus subtilis.</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa.</i></p> 	<p>En este grupo cada bolsa contiene 10 plantas de las cuales entre 5-6 presenta hojas secas color verde amarillento su tallo es delgado color gris.</p>
<p>Control positivo</p>	<p>En este grupo cada bolsa contiene 10 plantas de las cuales entre 8-9 presenta</p>



tallos color marrón y sus hojas son de un verde claro.

Control Negativo



En este grupo cada bolsa contiene 10 plantas de las cuales entre 9-10 presenta una coloración marrón en sus tallos y verde con algo anaranjado en sus hojas, con manchas de un color gris en el centro con un borde marrón rojizo.



**Nota.** Fuente Bolaño y Gómez (2023)

**Tabla**

**4**

*Crecimiento de las plantas por tratamiento*

Tratamientos	Bolsa 1	Bolsa 2	Bolsa 3	Bolsa 4	Bolsa 5
<i>Pseudo monas aeruginosa</i>	7	20			23
	20 24	2			21
	20 20	25			18
	22 20				20
	20 21	21	21 21	26 22	19
	21	8 8	21 22	19 18	21
			23 18	21 20	20
			18 20	19 19	19
				19 21	17
				18	18
			20	17	
				21	

---

<i>Bacillus</i>					
<i>subtilis</i>			19		19
	23 21	20 19	17	23 20	10
	18 20	20 22	8 9	25 18	18
	19	17	10	22	20
					17

---

	21 20				
	19 17				21
	18		13		
		22 21	7 8	21 21	16
		21 18	25	19 20	13
		17	21	20	15
					16

---

<i>Bacillus</i>					
<i>subtilis</i>	<i>x</i>				23
<i>Pseudomonas</i>					18
<i>aeruginosa</i>	24 18	20 25	25 22	24 19	25
	12 20	19 22	23 20	21 21	21
	21 23	23 23	21 25	22 21	22
	23 18	19 23	22 23	16 18	21
	20	21	24	17	23
	18	21	22	18	20
					18
					19

---

---

Control												
Positivo												24
												22
			23 22		25 25		24 23		22 21			21
			23 21		25 23		19 18		21 19			22
			20 19		23 22		21 22		18 20			22
			19 23		20 21		22 20		20 21			19
			24		21		20		19			18
			18		22		22		18			20
												20
												20

---

Control	20	22	23	22	23 negativo	20	21	22	21	22	
20	20	21	20	20 19	20	21	20	21 19	19	20	19
19 18	19	19	18	17 18	20	18	18	19 21	20	22	17
							22 22	18	21	21	20
			19		21		18		22		21

---

**Nota.** Fuente Bolaño y Gómez (2023)

## 8 Discusión de Resultados

En las tablas 1 y 2 se muestran los resultados de los ensayos tratados en los que se evidencian efectos positivos, ya que se demuestran que *Bacillus subtilis* tiene un efecto biocontrolador del 75% frente a *Pseudomonas aeruginosa* contra el hongo *Pyricularia oryzae*, estos resultados eran los esperados ya que según X,Wang y otros autores afirman que una gran diversidad de especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz, frutales, entre otros Wang et al.,2014; Li et al.,2015 .Sin embargo a pesar de que el autor Hofte M afirma que La efectividad de cepas de *Pseudomonas* poseen actividad antagonista, frente a fitopatógenos que afectan a cultivos de importancia económica en este caso no se observó una actividad antagónica representativa para considerar a este microorganismo como biocontrolador (Hofte,M 2010) , es por esto que Hernández-Rodríguez A y otros autores afirman que este género bacteriano constituye un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos a través de los cuales ejerce un efectivo control biológico, incluyendo el antagonismo directo y la inducción de resistencia en la planta sin embargo, *Pseudomonas* no tiene la capacidad de producir esporas de resistencia, lo que limita su formulación para uso comercial (Hernández a.,et al.2014)

Sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* no logró el efecto esperado de inhibir el crecimiento del hongo *Pyricularia oryzae*, se ha demostrado su capacidad como promotor de crecimiento en el contexto de la interacción planta-microorganismo. Los autores Lugtemberg, Teale y Spaepen han afirmado que el género *Pseudomonas* es un productor de una fitohormona conocida como ácido indolacético (AIA), la cual desempeña un papel fundamental en la regulación de diversos procesos fisiológicos, incluyendo la división celular y la diferenciación de tejidos en las plantas.

Esta hormona, el AIA, ejerce una influencia significativa en el alargamiento de las raíces, así como en el desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares. Estas características, a su vez, contribuyen al mejor anclaje de las plantas en el suelo y a una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes y agua. Este aumento en la capacidad de supervivencia de las plantas es crucial para su desarrollo y crecimiento óptimos (Lugtemberg et al., 2002; Teale, 2006; Spaepen et al., 2007).

Estos hallazgos respaldan la importancia de la interacción entre *Pseudomonas aeruginosa* y las plantas, subrayando cómo la producción de AIA por parte de este microorganismo puede tener un impacto positivo en el bienestar y la salud de las plantas al mejorar su capacidad para adaptarse y prosperar en su entorno.

#### 6.4. Resultados de la Investigación/Producto Esperado y Potenciales Beneficiarios

Con este estudio se esperaba evidenciar el efecto antagonista que *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* ejercen sobre *Pyricularia oryzae* teniendo en cuenta que estos géneros de bacterias en diversas investigaciones hablan sobre la producción de metabolitos antimicrobianos generados por *Pseudomonas aeruginosa* ocasionando mecanismos para el biocontrol de hongos fitopatógenos, lo cual da lugar a la evaluación de cepas antagonistas de hongos fitopatógenos, debido a que las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* inhiben el crecimiento micelial del hongo entre el 60 y 90 % indicando que excretan sideróforos y metabolitos antifúngicos, es por esto que se podría observar una disminución significativa en el crecimiento micelial del hongo.

Además, con *Bacillus subtilis* también se espera obtener resultados satisfactorios, ya que este género es conocido por producir distintos tipos de metabolitos, algunos poseen actividad antifúngica como es el caso de micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, micosubtilinas con efecto antifúngico, lo que podría explicar el hecho de algunos de los aislados bacterianos; en este orden de ideas, se espera demostrar la capacidad biocontroladora de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a *Pyricularia oryzae* agente causal de la Piriculariosis o quemazón de las plantas de arroz

Fueron obtenidos los resultados esperados, pues se logró demostrar el efecto antagonista de estos microorganismos frente a este tipo de hongo patógeno como lo es *Pyricularia oryzae*, que representa una amenaza para los cultivos de arroz que son de gran importancia económica; se espera que los futuros beneficiarios de esta investigación sean los agricultores del departamento del Cesar, que en un futuro tengan conocimiento de este tipo de investigaciones y sean capacitados para hacer uso de ellas.

## 9 Recomendaciones

Basándose en los resultados obtenidos y en la literatura científica relevante, se presentan las siguientes recomendaciones para fortalecer y mejorar la efectividad de los tratamientos de biocontrol y promoción de crecimiento en plantas de arroz frente al hongo *Pyricularia oryzae*:

- **Optimización de la Aplicación de Tratamientos:** Dada la mayor capacidad inhibitoria observada en *Bacillus subtilis*, se sugiere priorizar este microorganismo en la formulación de tratamientos biocontroladores. Además, se recomienda investigar la

posibilidad de ajustar las concentraciones y frecuencias de aplicación para maximizar la inhibición del hongo, teniendo en cuenta las condiciones específicas del cultivo y del invernadero.

- **Exploración de Coadyuvantes:** Considerando la efectividad de *Bacillus subtilis* como promotor de crecimiento, se sugiere investigar la inclusión de coadyuvantes naturales que potencien su acción en la promoción de desarrollo vegetal. La utilización de sustancias como hormonas vegetales y compuestos orgánicos puede mejorar aún más el crecimiento y vigor de las plántulas de arroz.

- **Estudios de Interacción Microbiana:** Dado que la competencia entre *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* demostró resultados prometedores, se recomienda profundizar en la investigación de las interacciones entre estos microorganismos y su efecto conjunto en el control biológico de *Pyricularia oryzae*. Se podrían explorar las posibles sinergias o antagonismos que puedan surgir al combinar estos dos agentes de control.

- **Evaluación en Campo:** Para validar la efectividad de los tratamientos en condiciones de campo, se sugiere realizar ensayos a gran escala en cultivos de arroz reales. Estos ensayos permitirán evaluar cómo se comportan los tratamientos en condiciones más cercanas a las situaciones de cultivo reales y cómo afectan a la producción de arroz y la calidad de los granos.

- **Capacitación y Transferencia de Conocimientos:** Es fundamental brindar capacitación a los agricultores sobre la aplicación correcta de los tratamientos y su importancia para el manejo sostenible de enfermedades en cultivos. Se recomienda establecer programas de extensión agrícola para difundir los resultados de esta investigación y promover la adopción de prácticas de biocontrol en la comunidad agrícola.

- **Monitorización Continua:** Una vez implementados los tratamientos en campo, se sugiere llevar a cabo un monitoreo regular y sistemático de las parcelas tratadas para evaluar su eficacia a lo largo del ciclo de cultivo. Esto permitirá ajustar las estrategias en caso de ser necesario y brindará información valiosa para futuros estudios y mejoras en el manejo fitosanitario.

En conclusión, la combinación de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* como agentes de control biológico y promotores de crecimiento en el manejo de *Pyricularia oryzae* ofrece un enfoque prometedor para mejorar la salud de los cultivos de arroz. La implementación de estas recomendaciones puede contribuir significativamente a la mitigación de los efectos de la piriculariosis y a la promoción de prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

## 10 Conclusiones

Esta investigación exhaustiva y prometedora ha explorado el uso de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y el género *Bacillus* como agentes de control biológico para enfrentar los desafíos de las enfermedades fúngicas en los cultivos de arroz, especialmente la Piriculariosis causada por el hongo fitopatógeno *Pyricularia oryzae*. Los resultados respaldan la capacidad de estas bacterias para ejercer un efecto antagonista sobre el hongo, abriendo oportunidades de control ambientalmente sostenible y efectivo en la preservación de la seguridad alimentaria y el equilibrio ecológico.

La relevancia de esta investigación trasciende los límites del departamento del Cesar, Colombia, y podría tener un impacto en regiones agrícolas que enfrentan desafíos similares en todo el mundo. La aplicación de estas soluciones biocontroladoras podría significar un paso importante hacia prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente, reduciendo la dependencia de fungicidas y minimizando las pérdidas económicas asociadas a las enfermedades fúngicas en los cultivos de arroz.

Los hallazgos de esta investigación no solo contribuyen al conocimiento científico de los mecanismos de control biológico en los cultivos de arroz, sino que también ofrecen una alternativa esperanzadora a los enfoques convencionales basados en fungicidas. La implementación de los tratamientos propuestos podría no solo reducir las pérdidas económicas y mejorar los rendimientos, sino también impactar positivamente la calidad de vida de los agricultores y la seguridad alimentaria local.

Esta investigación abre la puerta a futuras exploraciones y aplicaciones prácticas en la lucha contra las enfermedades fúngicas en los cultivos de arroz y otros cultivos agrícolas. Continuar esta línea de investigación podría resultar en soluciones aún más efectivas y sostenibles para enfrentar los desafíos fitopatológicos en un mundo en constante evolución.

En resumen, este estudio representa un paso significativo hacia la protección y promoción de la salud de los cultivos de arroz, además de contribuir al avance científico en la fitopatología y el control biológico. A medida que trabajamos juntos para enfrentar los desafíos agrícolas del siglo XXI, estas investigaciones nos orientan hacia prácticas agrícolas más resilientes, sostenibles y alineadas con la conservación del medio ambiente y la seguridad alimentaria global.

## 11 Referencias Bibliográficas

Acebo Guerrero, Y., Hernández-Rodríguez, A., Rives Rodríguez, N., & HernándezLauzardo, A. N. (2011). Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de

*Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Colombiana de*

Almaguer-Chávez M, Rojas TI, Dobal V, Batista A, Rives N, Aira MJ, et al. Aerobiological dynamics of potentially pathogenic fungi in a rice agroecosystem in La Habana. *Aerobiología*. 2012; 28:177-183.

*Biotecnología*, 13(1), 16-22. Recuperado a partir de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22920>

Cambroner, G. C., & Orozco, A. Z. (2021). Evaluación de tolerancia a *Pyricularia oryzae* en híbridos de arroz obtenidos bajo cruzamientos dialélicos. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 25(3), 7-25. blast fungus». *Science* 359 (6382): 1399-1403. Bibcode:2018Sci...359.1399S. PMID 29567712. doi:10.1126/science.aaq0892.

Chuwa, C. J., Mabagala, R. B., & Reuben, M. S. (2013). Pathogenic Variation and molecular characterization of *Pyricularia oryzae*, Causal agent of rice blast disease in Tanzania. *Int. J. Sci and Res*, 4(11), 1131-1139.

Falardeau J, Wise C, Novitsky L and Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*. 39:869-878. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>

Hernández-Rodríguez, A., Rives-Rodríguez, N., Acebo-Guerrero, Y., Diaz-de la Osa, A., Heydrich-Pérez, M., & Divan Baldani, V. L. (2014). Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 1-10.

Kunova, A., Pizzatti, C., Bonaldi, M., & Cortesi, P. (2014). Sensitivity of nonexposed and exposed populations of *Magnaporthe oryzae* from rice to tricyclazole and azoxystrobin. *Plant Disease*, 98(4), 512-518.

*La pyricularia oryzae del arroz.* (s. f.). [https://www.infoagro.com/documentos/la\\_pyricularia\\_oryzae\\_del\\_arroz.asp](https://www.infoagro.com/documentos/la_pyricularia_oryzae_del_arroz.asp)

Li Y, Gu Y, Li J, Xu M, Wei Q and Wang Y. 2015. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*. 6:883. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>

Long, D. H., Correll, J. C., Lee, F. N., & TeBeest, D. O. (2001). Rice blast epidemics initiated by infested rice grain on the soil surface. *Plant disease*, 85(6), 612-616.

Lu, L., Wang, Q., Jia, Y., Bi, Y. Q., Li, C. Y., Fan, H. C., & Li, J. B. (2019). Selection and mutation of the avirulence gene AVR-Pii of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Pathology*, 68(1), 127-134.

Ongena M and Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiolgy*. 16:115-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

Pérez Álvarez, S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., & Ávila Quezada, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿ control biológico o patógeno?: *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen?. *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 225-234.

Pincirolì M, Cordo MC, Bezus R, Vidal AA, Delucis M. (2006) Development of rice blast under two nitrogen availability conditions. *Summa Phytopathologica*. 2006;32(3):280282.

Raaijmakers JM and Mazzola M. 2012. Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annual Reviews of Phytopathology*. 50:403-424. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>

Rivera, M. V., & Gómez, L. C. (2012). Identificación y patogenicidad de *Fusarium* spp y *Rhizoctonia solani* en cultivos de arroz del Cesar. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*. Vol, 2(1)

Turcios, M., Esker, P., Arrieta-Espinoza, G., & Barboza-Barquero, L. *Desarrollo de una escala de severidad de Pyricularia en arroz mediante análisis de imágenes* (No. A50/10882).

Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., ... & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.

Wang W, Chen LN, Wu H, Zang H, Yang Y, Xie S and Gao X. 2013. Comparative proteomic analysis of rice seedlings in response to inoculation with *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*. 56(3):208-215. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12035>

Sakulkoo, Wasin; Osés-Ruiz, Miriam; Oliveira Garcia, Ely; Soanes, Darren; Littlejohn, George; Hacker, Christian; Correia, Ana; Valent, Barbara *et al.* (23 de marzo de 2018). «A single fungal MAP kinase controls plant cell-to-cell invasion by the rice blast fungus». *Science* 359 (6382): 1399-1403. Bibcode:2018Sci...359.1399S. PMID 29567712. doi:10.1126/science.aag0892.

Wang X, Wang L, Wang J, Jin P, Liu H and Zheng Y. 2014. *Bacillus cereus* AR156-Induced Resistance to *Colletotrichum acutatum* Is Associated with Priming of Defense Responses in Loquat Fruit. PLoS ONE. 9(11):e112494. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112494>

Hofte M, Altier N. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*. 2010;161:464-471

Hernández-Rodríguez A, Ruíz-Beltrán Y, Acebo-Guerrero Y, Miguélez-Sierra Y, Heydrich-Pérez M. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Rev Protección Veg*. 2014;29(1):11-19.

## 12 Anexos



*Anexo 1: Carta de solicitud presentada a la Señora Olga Higuera para realizar la solicitud de la cepa del hongo ante Fedearroz*



*Anexo 2: Preparación de los tratamientos.*



*Anexo 3: Medios de cultivo utilizados*



*Anexo 4: Recuperación del hongo en semillas de arroz*



*Anexo 5: Diluciones de los tratamientos*