



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN PARA TESIS A
NIVEL PREGRADO 2020



**Actividad inhibitoria *in vitro* de metabolitos secundarios de *Bacillus* spp. y
Burkholderia vietnamiensis sobre *Rhizoctonia* sp.**

Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo

AUTORA:

Liz Cheril Quiñones Pezo

ASESOR:

Dr. Winston Franz Ríos Ruíz

Tarapoto – Perú

2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
CONCURSO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN PARA TESIS A
NIVEL PREGRADO 2020



**Actividad inhibitoria *in vitro* de metabolitos secundarios de *Bacillus* spp. y
Burkholderia vietnamiensis sobre *Rhizoctonia* sp.**

AUTORA:

Liz Cheril Quiñones Pezo

Sustentada y aprobada el 24 de febrero del 2022, ante el honorable jurado:

.....
Dr. C. Agustín Cerna Mendoza

PRESIDENTE

.....
Dr. C. Carlos Daniel Vecco Giove

MIEMBRO

.....
Ing. M. Sc. Mike A. Corazón Guivin

SECRETARIO

.....
Dr. Winston Franz Ríos Ruíz

ASESOR

Declaratoria de autenticidad

Liz Cheril Quiñones Pezo, con DNI N° 70989874, egresada de la Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín, autora de la tesis titulada: **Actividad inhibitoria *in vitro* de metabolitos secundarios de *Bacillus spp.* y *Burkholderia vietnamiensis* sobre *Rhizoctonia sp.***

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencia de las fuentes bibliográficas consultadas.
3. Toda información que contiene la tesis no ha sido plagiada;
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados ni copiados, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por lo antes mencionado, asumo bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndome a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín.

Tarapoto, 24 de febrero del 2022.



Liz Cheril Quiñones Pezo

DNI N° 70989874



Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres:	Quinones Pego Liz Cheril		
Código de alumno :	70989824	Teléfono:	993618181
Correo electrónico :	Lizcheril2018@gmail.com	DNI:	70989824

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de:	Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de:	Agronomía

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(x)	Trabajo de investigación	()
Trabajo de suficiencia profesional	()		

4. Datos del Trabajo de investigación

Título :	Actividad inhibitoria <u>in vitro</u> de metabolitos secundarios de <u>Bacillus spp.</u> y <u>Burkholderia vietnamiensis</u> sobre <u>Rhizoctonia sp.</u>
Año de publicación:	2022

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(x)	Embargo	()
Acceso restringido **	()		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI “**Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA**”.



Firma del Autor

8. Para ser llenado en el Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto de la UNSM - T.

Fecha de recepción del documento.

10 / 05 / 2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto - UNSM.



Ing. Grecia Vanessa Fachin Ruíz
Responsable

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

**** Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

A Dios y a mi querido papá José Javier, por ser ellos la fuente primordial de mi energía y fortaleza de salir adelante.

A mi querida mamá Sofía, por su apoyo incondicional que me demuestra día a día, por su paciencia, cariño, y el sacrificio que hizo para terminar la carrera satisfactoriamente.

A mi hermano José Enrique, por ser el motivo de lograr las cosas y superación en mi vida.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de San Martín (UNSM) que a través del Instituto de Investigación y Desarrollo brindó aporte financiero para el desarrollo de la presente investigación con Resolución Nº 438-2020-UNSM/CU-R.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Agronomía, por los conocimientos recibidos durante mi trayectoria universitaria.

Al Dr. Winston Franz Ríos Ruiz, biólogo Renzo Alfredo Valdez Núñez, y a la Dra. Miriam Memenza Zegarra, por su apoyo incondicional, dedicación, y enseñanza por el apoyo constante en cada fase del desarrollo de la investigación.

Al Dr. Carlos Daniel Vecco Giove, Dr. Agustín Cerna Mendoza e Ing. M. Sc. Mike Corazón Guivin, por las sugerencias, y correcciones sobre el informe de tesis.

Índice general

Dedicatoria	vi
Agradecimientos	vii
Índice general.....	viii
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Resumen	xii
Abstract.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Antecedentes de la investigación.....	3
1.2. Bases teóricas.....	4
1.2.1. El cultivo de arroz en San Martín	4
1.2.2. Hongos patógenos que afectan al cultivo de arroz	4
1.2.3. Bacterias endofíticas asociadas al cultivo de arroz.....	6
1.3. Definición de términos básicos.....	13
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Ubicación del área de estudios	15
2.2. Diseño de investigación	15
2.2.1. Características del diseño experimental	15
2.2.2. Población y muestra	17
2.2.3. Técnicas de recolección de datos.....	18
2.2.4. Tratamientos.....	19
2.2.5. Análisis estadístico	20
2.3. Materiales	21
2.3.1. Materiales.....	21
2.4. Metodología	22
2.4.1. Preparación de medios.....	22
2.4.2. Reactivación de cepas bacterianas crio preservadas	23
2.4.3. Reactivación de cepa fúngica	24

2.4.4.	Preparación del inóculo	24
2.4.5.	Selección primaria de efecto inhibitorio sobre el crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> sp. 25	25
2.4.6.	Selección secundaria de efecto inhibitorio contra hongos fitopatógeno	25
2.4.7.	Deducción de la actividad de metabolitos secundarios volátil o no volátiles (solubles) de cepas bacterianas, con actividad inhibitoria sobre el desarrollo de <i>Rhizoctonia</i> sp.	26
2.4.8.	Evaluación de los metabolitos secundarios no volátiles (solubles) de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Burkholderia vietnamiensis</i> extraídos por separación física sobre el desarrollo de cepa de <i>Rhizoctonia</i> sp.	27
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		29
3.1.	Selección de bacterias endofíticas con efecto inhibitorio sobre el crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> sp.	29
3.2.	Actividad antifúngica de metabolitos secundarios sobre <i>Rhizoctonia</i> sp. según el método de “placas selladas”	35
3.3.	Efecto “ <i>in vitro</i> ” de metabolitos secundarios no volátiles (solubles) sobre <i>Rhizoctonia</i> sp.	35
CONCLUSIONES.....		42
RECOMENDACIONES		43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		44
ANEXOS		51

Índice de tablas

Página

Tabla 1. <i>Cepas de bacterias endofíticas de arroz (16 Bacillus spp. y 3 Burkholderia vietnamiensis) utilizadas como tratamiento inicial en el diseño experimental.....</i>	19
Tabla 2. <i>Cepas de bacterias seleccionadas que fueron inoculadas y fermentadas en medio TSB y MM, cultivadas con Rhizoctonia sp. en PDA</i>	20
Tabla 3. <i>Modelo ANVA para el experimento 2 (selección secundaria)</i>	21
Tabla 4. <i>Presencia (+) o ausencia (-) de efecto inhibitorio de 19 cepas bacterianas fermentadas y aplicadas en medios TSB y MM sobre el cultivo in vitro de Rhizoctonia sp. en medio PDA.....</i>	29
Tabla 5. <i>Análisis factorial de varianza de los medios de inoculación de las bacterias</i>	31
Tabla 6. <i>Desarrollo de Rhizoctonia sp. de cepas seleccionadas, que fueron cultivadas en medio TSB y MM</i>	32
Tabla 7. <i>Análisis de varianza de inhibición de metabolitos secundarios no volátiles (soluble) sobre Rhizoctonia sp.</i>	36
Tabla 8. <i>Desarrollo de Rhizoctonia sp. de los sobrenadantes de cepas inoculadas en medio MM</i>	37
Tabla 9. <i>Matriz de los datos de la selección de bacterias en MM (cm²) y la inhibición del hongo con metabolitos en MM (cm²) utilizadas en el análisis de correlación.....</i>	40
Tabla 10. <i>Planilla de registro de datos para la superficie de desarrollo del hongo fitopatógeno en la selección de las cepas.....</i>	51
Tabla 11. <i>Planilla de registro de datos para la superficie de desarrollo del hongo fitopatógeno en la producción de metabolitos secundario.....</i>	52

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Primer plano del crecimiento micelial a través del ensayo de antibiosis con tres repeticiones de cepa bacteriana contra <i>Rhizoctonia</i> sp.....	18
Figura 2. Procedimiento de reactivación de cepas: A) placas conteniendo cepas crío preservadas en proceso de reactivación; b) siembras sucesivas en medio TSA.....	23
Figura 3. Procedimientos para realizar cultivos puros.	24
Figura 4. Procedimiento de selección primaria de bacterias endofíticas contra el desarrollo de <i>Rhizoctonia</i> sp.....	25
Figura 5. Esquema del procedimiento de dilución del inóculo.	27
Figura 6. Actividad inhibitoria de cepas cultivadas en medio TSB y MM sobre el desarrollo de <i>Rhizoctonia</i> sp. a través de la prueba de antibiosis en PDA incubado a 72 horas.....	30
Figura 7. Prueba de Tukey ($P < 0,05$), área de desarrollo del hongo fitopatógeno (cm^2) por cepas de bacterias endofíticas inoculadas en medio TSB y MM e incubadas a 72 horas. ..	32
Figura 8. Actividad inhibitoria de metabolitos secundarios no volátiles (solubles) contra el crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> sp. incubado a 72 horas.....	36
Figura 9. Prueba de Tukey ($P < 0,05$), mostrando área de inhibición de <i>Rhizoctonia</i> sp. por sobrenadantes fermentados por cepas de <i>Bacillus</i> y <i>Burkholderia</i>	38
Figura 10. Prueba de Tukey ($P < 0,05$), comparación de medios de fermentación de bacterias sobre los mecanismos de acción de cepas contra <i>Rhizoctonia</i> sp..	39
Figura 11. Proyección gráfica del análisis de correlación, entre la selección de bacterias en MM (cm^2) y la inhibición de <i>Rhizoctonia</i> sp. con metabolitos en MM (cm^2).	41

Resumen

El “añublo de la vaina” causado por el hongo *Rhizoctonia* sp. constituye uno de los principales problemas fitosanitarios del cultivo de arroz ya que disminuye su rendimiento y la calidad de los granos. El control de esta enfermedad implica el uso excesivo de fungicidas siendo necesario la búsqueda de alternativas para aminorar el uso de estos productos. En este sentido, existen microorganismos que producen metabolitos secundarios con características antifúngicas, los cuales podrían utilizarse como un sustituto al control químico. El objetivo del trabajo fue determinar la actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios producidos por cepas de *Bacillus* spp. y *Burkholderia vietnamiensis* sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp. Se evaluó la actividad inhibitoria *in vitro* de 19 cepas bacterianas (16 *Bacillus* spp. y 3 *Burkholderia vietnamiensis*) en función del crecimiento del fitopatógeno, tanto en medio TSB como en medio mineral (MM). Se seleccionaron 5 cepas bacterianas: *B. subtilis* SM59, *B. aryabhatai* SM3 y 3 cepas de *B. vietnamiensis* T34-1, T34-2, T33-1. La evaluación del desarrollo de las cepas mostró que los tratamientos tuvieron un crecimiento diferenciado en cada uno de los medios utilizados, siendo T₁ (cepa SM 59) la que originó mayor inhibición del desarrollo de *Rhizoctonia* sp. (5,53 cm²) en el medio MM, seguido de T₂ (cepa SM 3) (11,76 cm²) en el medio TSB. Los metabolitos de las cinco cepas de bacterias, presentaron una respuesta de inhibición de *Rhizoctonia* sp. altamente significativa en medio MM. Este comportamiento de inhibición se presentó también durante el proceso de selección de las cepas cuando las bacterias estuvieron en contacto con *Rhizoctonia* sp. Los hallazgos brindan nuevas posibilidades de interés biotecnológico para desarrollar productos eficaces basados en metabolitos bacterianos secundarios no volátiles de fácil extracción, como alternativa a los fungicidas químicos aplicados al cultivo de arroz.

Palabras claves: mecanismos de control, antibiosis, compuestos no volátiles.

Abstract

Sheath blast caused by the fungus *Rhizoctonia* sp. is one of the main phytosanitary problems in rice cultivation, as it reduces yields and grain quality. The control of this disease involves excessive use of fungicides and it is necessary to look for alternatives to reduce the use of these products. In this sense, there are microorganisms that produce secondary metabolites with antifungal characteristics that could be used as a substitute for chemical control. The objective of this work was to determine the inhibitory activity of secondary metabolites produced by *Bacillus* spp. and *Burkholderia vietnamiensis* strains on the development of *Rhizoctonia* sp. The in vitro inhibitory activity of 19 bacterial strains (16 *Bacillus* spp. and 3 *Burkholderia vietnamiensis*) was evaluated according to the growth of the phytopathogen, both in TSB medium and in mineral medium (MM). Five bacterial strains were selected: *B. subtilis* SM59, *B. aryabhatai* SM3 and three strains of *B. vietnamiensis* T34-1, T34-2, T33-1. The evaluation of the development of the strains revealed that the treatments had a differentiated growth in each of the media used, with T₁ (strain SM 59) being the one that caused the greatest inhibition of the development of *Rhizoctonia* sp. (5.53 cm²) on MM medium, followed by T₂ (strain SM 3) (11.76 cm²) on TSB medium. The metabolites of the five bacterial strains showed a highly significant inhibition response of *Rhizoctonia* sp. on MM medium. This inhibition behavior was also present during the strain selection process when the bacteria were in contact with *Rhizoctonia* sp. The findings provide new possibilities of biotechnological interest to develop effective products based on easily extractable non-volatile secondary bacterial metabolites, as an alternative to chemical fungicides applied to rice cultivation.

Key words: control mechanisms, antibiosis, nonvolatile compounds.



Introducción

El arroz (*Oryza sativa*) es un producto alimenticio de gran importancia a nivel mundial. En el Perú, este producto ocupa el tercer lugar en superficie sembrada, después de la papa y el maíz, siendo la región San Martín la que produce el 23 %, cultivando al menos dos campañas por año bajo condiciones de riego, con rendimientos que bordean las 7 t/ha (cercano a la media nacional) (Ministerio de Agricultura y Riego, 2018).

Los cultivos de arroz en San Martín presentan mucha incidencia de enfermedades fúngicas, debido a sus condiciones favorables edafoclimáticas. Uno de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo de arroz es el “añublo de la vaina” causado por el hongo *Rhizoctonia* sp., ya que disminuye el rendimiento y la calidad de los granos (Sandoval *et al.* 2019; Li *et al.* 2021).

Por otro lado, existen pruebas que corroboran que el fitopatógeno adquiere resistencia a los recursos o métodos de control químico, debido al uso intensificado, que han derivado en perjuicios ambientales, afectando directamente al suelo y agua, así como en riesgos poco conocidos para la salud de los consumidores (Ariza y Sánchez, 2012).

Ante este escenario, surgen estrategias para el control del patógeno, haciendo uso de productos de origen microbiano, relativamente inocuos para el ambiente y la salud (Ariza y Sánchez, 2012), tales como: *Bacillus* y *Burkholderia* (Chung *et al.*, 2015). Estos microorganismos, producen metabolitos secundarios no volátiles (solubles) que tienen características antifúngicas contra diversos hongos fitopatógenos del cultivo de arroz, lo cual permite contribuir a disminuir el uso excesivo de fungicidas (Ariza y Sánchez, 2012).

La investigación y producción comercial de plaguicidas fabricados a partir de metabolitos bacterianos es un rubro de gran crecimiento en el mundo, pero en el Perú apenas se está desarrollando (Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila, 2019). Además de las limitaciones del conocimiento sobre la eficacia de estos compuestos biológicos, los metabolitos a producir presentan dificultades de extracción, en atención a su naturaleza y estabilidad química (Mishra *et al.* 2018; He *et al.* 2020). Al respecto, los metabolitos volátiles son difíciles de extraer, mientras que los metabolitos no volátiles (solubles) pueden mantenerse en medio acuoso y extraerse mediante técnicas físicas (Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila, 2019).

En el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de San Martín, Valdez-Núñez *et al.* (2020) realizaron estudios donde obtuvieron una colección de microorganismos de diferentes departamentos del Perú (Tumbes, Piura, Amazonas y San Martín) consistente en 189 cepas de bacterias endofíticas aisladas desde el cultivo de arroz, de las cuales 19 han sido identificadas molecularmente: 16 cepas de *Bacillus* spp. y tres de *Burkholderia vietnamiensis*.

En este contexto, el objetivo principal de la presente tesis fue determinar la actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios producidos por estas cepas de *Bacillus* spp. y *Burkholderia vietnamiensis* sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp. en laboratorio.

Los objetivos específicos fueron:

- a) Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de 19 cepas de bacterias (16 *Bacillus* spp. y 3 *Burkholderia vietnamiensis*) sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.
- b) Deducir la actividad de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles (solubles) de cepas bacterianas con actividad inhibitoria sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp., bajo condiciones de laboratorio.
- c) Evaluar el efecto *in vitro* de metabolitos secundarios solubles de *Bacillus* spp. y *Burkholderia vietnamiensis* extraídos por separación física sobre el desarrollo *Rhizoctonia* sp.

Los resultados de la presente investigación brindan nuevas posibilidades de interés biotecnológico, siendo el primer paso en aras de desarrollar a futuro productos eficaces basados en metabolitos bacterianos secundarios no volátiles (soluble) de fácil extracción como alternativa a los fungicidas químicos aplicados al cultivo de arroz. Así mismo, servirán de base para futuras validaciones y escalamientos biotecnológicos.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Antecedentes de la investigación

Valdez-Núñez *et al.* (2020) en Tarapoto, San Martín, demostraron que las bacterias endofíticas de arroz (BEA), *Bacillus* spp. y *Burkholderia vietnamiensis* tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la bacteria patógena *B. glumae* THT bajo condiciones “*in vitro*” (cepa virulenta aislada de San Martín).

Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila (2019) en Lima, Perú, aislaron una bacteria del género *Bacillus* sp. (B02) desde la rizósfera del cultivo de frijol, la cual presentó capacidad de inhibir el desarrollo de *Rhizoctonia solani*. Mediante la técnica de placas selladas determinaron la presencia de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles (solubles), los cuales extrajeron para comprobar el efecto inhibitorio de estos metabolitos sin presencia de la bacteria de origen.

Song *et al.* (2019) en China, encontraron una bacteria del género *Burkholderia* sp. aislada de la rizósfera del cultivo de arroz, el cual presentó un alto potencial de inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, que con la ayuda de un análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA, pudo determinar que JP2-270 pertenecía al complejo *Burkholderia cepacia*.

Etesami *et al.* (2018) en Karaj - Irán, identificaron 139 bacterias con potencial de inhibir el crecimiento micelial de cinco hongos patógenos del arroz: *Magnaporthe oryzae*, *M. salvinii*, *Fusarium verticillioides*, *F. fujikuroi* y *F. proliferum*. Estas bacterias fueron seleccionadas a partir de una colección de 550 bacterias aisladas de la rizósfera y endorriza del cultivo del arroz, trébol, berseem y colza oleaginosa cultivadas en rotación.

Taksaphorn *et al.* (2017) en Bangkok-Tailandia, seleccionaron cinco aislamientos de bacterias endofíticas, con capacidad de inhibir en más de 50% el crecimiento de *Magnaporthe oryzae* a través de la técnica de cultivo dual.

Entre las diversas bacterias antagonistas, *Bacillus subtilis* tiene el potencial para producir antibióticos y ha sido reconocido por más de 50 años con antibióticos

peptídicos (Sansinenea y Ortiz, 2011). Estos organismos Gram positivos son capaces de producir más de dos docenas de antibióticos con diversas estructuras (Stein, 2005).

Además, varias especies de bacterias se han desarrollado como biopesticidas comerciales. Por ejemplo, *Bacillus* puede producir endosporas y persistir con éxito en ambientes naturales durante un largo período después del tratamiento (Stein, 2005).

1.2. Bases teóricas

1.2.1. El cultivo de arroz en San Martín

En San Martín el cultivo de arroz ha evolucionado desde sistemas de cultivo tradicional en secano a irrigados. En la década del 70, se construye infraestructura de irrigación y el cultivo empieza a desarrollarse bajo riego, con el incremento de superficie del cultivo se logró posicionar a la región como una de las principales productoras a nivel nacional.

Este cultivo genera trabajo permanente para 19 mil productores y 7,3 millones de jornales, para una extensión de 101 a 106 mil hectáreas al año, es por ello, que el arroz es el principal cultivo de San Martín (DRASAM, 2019) en cuatro zonas productoras, según importancia: Huallaga Central, Alto Mayo, Bajo Mayo, y Alto Huallaga (Tocache).

1.2.2. Hongos patógenos que afectan al cultivo de arroz

Entre los principales hongos patógenos del arroz se encuentran: *Magnaporthe (Pyricularia) oryzae* Cav., *Magnaporthe (Pyricularia) griseae* Sacc. *Rhizoctonia solani* Kühn, *Rhizoctonia oryzae – sativae* (Sawada), *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) y *Sarocladium oryzae* Sawada.

Sin embargo, *Rhizoctonia* sp. patógeno que ocasiona la enfermedad “añublo de la vaina”, está considerada como una de las principales plagas fungosas

en el cultivo de arroz, esto debido a las devastadoras pérdidas mundiales (Valent, 2004) que coinciden con lo observado en San Martín.

- **Ubicación taxonómica**

Reino: Fungi

Phylum: *Basidiomycota*

Clase: *Agaricomycetes*.

Orden: *Cantharellales*.

Familia: *Ceratobasidiaceae*.

Género: *Rhizoctonia* De Candolle, 1815.

- **Ecología de *Rhizoctonia* sp.**

Infección. El patógeno sobrevive entre los cultivos como esclerocios transmitidos por el suelo y como micelio en restos de plantas y esto constituye el inóculo primario de la enfermedad (Ou, 1985).

La forma vegetativa del hongo sigue la señal química de los metabolitos liberados por la planta hospedante en crecimiento activo y por la descomposición de residuos orgánicos. Los esclerocios maduros germinan y las esporas infectan a través de la cutícula o de las estomas de la planta de arroz.

Ciclo de la enfermedad. En *Rhizoctonia solani*, la enfermedad se desarrolla más rápido durante las etapas iniciales de desarrollo y llenado del grano.

Luego de la infección, el micelio se ramifica desde la superficie exterior de la vaina hacia la superficie interna, para formar lesiones primarias. Posteriormente, el micelio crece en la parte superior de la planta y en el interior de su tejido e inicia lesiones secundarias (Kobayashi *et al.*, 1997).

Añublo de la vaina del arroz

Esta enfermedad, es agente causal de la *Rhizoctonia*, y ataca el cuello de la planta, a nivel de la superficie de agua y genera inicialmente áreas necróticas, ligeramente oscuras, oblongas (Garrido, 2004a).

En esta enfermedad, las especies que más se destacan son: *R. solani*, *R. oryzae-sativae* y *R. oryzae*. Este grupo de hongos se encuentra en cualquier parte del mundo y posee una gran variedad de hospedadores que causan la descomposición de semillas, la poda, el cancro del tallo, varias enfermedades del follaje, las pudriciones de la raíz, entre otros.

La capacidad saprófita de *R. solani*, lo vuelve un patógeno altamente destructivo. El desarrollo de esta enfermedad y la pérdida de producción en el arroz, tienen una estrecha correlación (Hashiba, 1984).

1.2.3. Bacterias endofíticas asociadas al cultivo de arroz

Las bacterias endofíticas son microorganismos que se encuentran en los tejidos internos de la epidermis de la planta de arroz. Estas bacterias no causan ningún tipo de efecto negativo ni daño a la planta (Bacon y White, 2000).

Pueden ser eventualmente beneficiosas, perjudiciales o neutras, según su especie; éstas cumplen varias funciones como favorecer el crecimiento y la productividad vegetal, por la cual se denominan PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*), actúan como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos y también ayudan a facilitar la bio remediación de los ecosistemas degradados (Pérez y Chamorro, 2013).

En la actualidad, los compuestos sintetizados por las PGPR se posicionan con potencial interés e importancia para la agricultura y la industria (Zhi-Lin *et al.*, 2012).

- **Origen y evolución de las bacterias endofíticas**

Hardoim *et al.* (2011) menciona que la agrupación planta-endófito pudo haberse originado con la presencia de las primeras especies de flora en la Tierra, como lo demuestran los primeros hallazgos de tejidos y hojas fosilizadas en el planeta (HuaWei *et al.*, 2006).

- **Diversidad de bacterias endofíticas**

Existe una gran diversidad de bacterias rizosféricas y endofíticas, la cual se asocia a diferentes taxones.

Endofíticas en el arroz (Pérez *et al.*, 2009)

Phylum α - Proteobacteria: *Azorhizobium caulinodans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Sphingomonas paucimobilis*.

Phylum β - Proteobacteria: *Azoarcus* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Burkholderia* sp., *Herbaspirillum* sp.

Phylum γ -Proteobacteria: *Klebsiella* sp., *Serratia* spp., *Pantoea* sp.

Phylum Bacteroides: *Sphingobacterium* sp.

Phylum Firmicutes: *Bacillus subtilis*, *Bacillus* spp.

- **Características promotoras del crecimiento vegetal**

Las bacterias beneficiosas pueden tener un impacto en el crecimiento y desarrollo de la planta, ya sea de manera indirecta o directa (Penrose y Glick, 2003).

Los mecanismos directos se relacionan con la adquisición de nutrientes, y se enfocan al potencial biofertilizante, sin embargo, los mecanismos indirectos se relacionan con la capacidad controladora de microorganismos fitopatógenos. Algunos mecanismos de acción en estas bacterias son los antibióticos que actúan como protectores

contra las bacterias patógenas, la supresión de nematodos, la reducción del hierro disponible para los fitopatógenos, la síntesis de enzimas fúngicas de la pared celular y la competencia con microbios perjudiciales en sitios de raíces de plantas (Lucy *et al.*, 2004).

- **Potencialidades o mecanismos de acción de bacterias como biocontrol de hongos fitopatógenos**

Diversos microorganismos, tales como virus, hongos y bacterias poseen mecanismos de acción o potencialidades que controlan biológicamente las enfermedades de diversos cultivos (Chowdhury *et al.*, 2015). En el grupo de las bacterias, existen géneros que estancan, como es el caso de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*. Los mecanismos antes mencionados, se basan en la producción de sustancias antimicrobianas, producir compuestos orgánicos volátiles; sintetizar enzimas líticas; competencia, inducción de resistencia vegetal, colonización y formación de biopelículas (Pathma *et al.*, 2011).

Producción de sustancias microbianas. La secuenciación genética de diferentes cepas de bacterias, ayudaron en la identificación de genes que están asociados a la producción de compuestos antimicrobianos (Pedraza *et al.*, 2020). Estos compuestos son antibióticos que pueden producir sustancias de distintas naturalezas, divididas en: moléculas peptídicas de síntesis no ribosomal, policétidos (PK) y péptidos de síntesis ribosomal (Sumi *et al.*, 2015).

- **Antibióticos péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal (RiPPs).** Conocidos también como bacteriocinas, se caracterizan por tener una gran diversidad estructural, comprendidos entre 12 y 50 aminoácidos, las cuales generan moléculas con carácter catiónico (Sumi *et al.*, 2015).
- **Antibióticos péptidos antimicrobianos de síntesis no ribosomal (NRP).** Caracterizados por tener estructuras lineales o cíclicas,

ramificadas, además, son definidas como enzimas modulares multidominio ya que están sintetizadas por complejos enzimáticos, es decir que evolucionaron por fusión de genes que codifican proteínas separadas (Sumi *et al.*, 2015).

Dentro de la producción de sustancias antimicrobianas destacan antibióticos lipopéptidos, divididos en tres familias: surfactinas, iturinas y fengicinas, mostrando el gran potencial para el control de fitopatógenos (Ongena y Jacques, 2008).

Competencia y colonización. La capacidad de colonización como mecanismo de acción de las bacterias, ocurre por la formación de biopelículas. Las biopelículas, son tapices bacterianos uniformes que están formados por el crecimiento organizado de bacterias y hongos las cuales permiten que los agentes de control se conviertan en buenos colonizadores (Pedraza *et al.*, 2020).

La relación que existe entre la colonización y las biopelículas puede resumirse en los siguientes aspectos importantes: exclusión de nicho a través del antagonismo directo por, dada por la competencia por nutrientes y espacio; producción de metabolitos secundarios; y la fitoestimulación de la planta (Pedraza *et al.*, 2020).

Enzimas líticas. Los microorganismos biocontroladores, demuestran su mecanismo de acción al sintetizar enzimas líticas, la cual deteriora la pared celular de los fitopatógenos, causando de esa manera lisis celular (Pedraza *et al.*, 2020).

Producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC). Se usa con el fin de determinar moléculas volátiles que presenten menor masa molecular, estos mecanismos suelen actuar de manera directa en el patógeno, a tal punto de causarle daño a su estructura genética (ADN y/o ARN) (Pedraza *et al.*, 2020).

Inducción de las defensas de las plantas. Son inducidas por microorganismos, de manera biológica y química para adquirir mecanismos de defensas contra patógenos (Pedraza *et al.*, 2020). Existen varios tipos de resistencia inducida, se mencionan dos a continuación: inducción de resistencia sistémica (ISR) e inducción de resistencia adquirida (SAR).

- **Metabolitos secundarios de las bacterias endofíticas**

Son compuestos orgánicos sintetizados por plantas, hongos y bacterias que cumplen un rol indirecto en el desarrollo o establecen interacciones benéficas o antagónicas con otros organismos.

Los metabolitos secundarios de las bacterias pueden tener un efecto “bioprotector” y constituir un elemento clave en el control biológico contra patógenos (Pérez y Chamorro, 2013; Taechowisan *et al.*, 2007). Por esta razón, los estudios sobre estos microorganismos endófitos se orientan a desarrollar la biotecnología de producción (Morath *et al.*, 2012).

Los microorganismos expresan su defensa a través de la liberación de metabolitos secundarios, cuando su actividad es alterada o cuando perciben el estímulo de algún patógeno (Suárez- Medina y Coy-Barrera, 2016).

- **Identificación de metabolitos secundarios solubles**

Los metabolitos secundarios solubles identificados en *Bacillus* por cromatografía líquida, mediante procesos de separación física y extraídos en caldos de medio de cultivo con solventes orgánicos, son mayormente los lipopéptidos (Ariza y Sánchez, 2012; Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila, 2019).

Estos son antibióticos lipopeptídicos que se dividen de acuerdo a su estructura en tres grupos principales: fenicina, iturina y surfactina,

y estos han demostrado potencial inhibitorio contra patógenos de diferentes cultivos (Ongena y Jacques, 2008).

- **Género *Bacillus* Cohan 1872**

Género conformado por una diversidad de bacterias Gram positivas en forma de bastón; resistentes a condiciones ambientales desfavorables. Entre algunas especies, tenemos: *Bacillus megaterium*, *B. velezensis*, *B. aryabhatai*, *B. subtilis*, y *B. amyloliquefaciens*. Algunos son agentes de control biológico, a través de la producción de metabolitos con efecto antibióticos (Sansinenea y Ortiz, 2011).

Además, son microorganismos muy exuberantes, con alta capacidad de colonizar la rizosfera y el tejido interno de la epidermis de la planta, permitiendo expresar acciones benéficas para el crecimiento vegetal, y está relacionada con estimular mecanismos de defensas, que trae como consecuencia reducir la incidencia y severidad de enfermedades en los cultivos (Sansinenea y Ortiz, 2011).

Se han estudiado cepas de *Bacillus* spp., como antagonistas productoras de enzimas, en cultivos de brassicáceas y solanáceas, demostrando eficacia en el control de pudrición de tallo y raíz; las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* se han utilizado exitosamente en la reducción significativa de la marchitez vascular por *Fusarium oxysporum* (Romano *et al.*, 2011).

Así mismo, se mostró fuerte actividad enzimática extracelular relacionadas directamente con la disponibilidad de fosfatos en el suelo, sugiriendo un mecanismo fitofortalecedor, mediante el efecto estimulador nutricional, contribuyendo a incrementar la resistencia a la incidencia de patógenos (Romano *et al.*, 2011).

A) *Bacillus megaterium*

Esta bacteria es un endófito con potencial de control biológico de diferentes enfermedades de cultivos, y es reconocido por

producir metabolitos secundarios como antibióticos como es la penicilina amidasa utilizada para fabricar penicilina sintética (Elmaghraby *et al.*, 2015).

B) *Bacillus velezensis*

Esta bacteria actúa como agente de control biológico en condiciones *in vitro* para patógenos de diferentes cultivos, y es capaz de producir metabolitos secundarios como son los antibióticos para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Lim *et al.*, 2017).

C) *Bacillus subtilis*

Esta bacteria es reconocida ampliamente por sintetizar antibióticos con potencial antagónica de hongos fitopatógenos y actúan como promotores de crecimiento vegetal, debido a que ayudan al desarrollo radicular, aumento de pelos absorbentes; solubilizadoras de fosfatos, y la fijación biológica del nitrógeno (Rodríguez *et al.*, 2017).

- **Género *Burkholderia* Burkholder 1942**

Género conformado por bacterias Gram negativas con un genoma formado por varios replicones, el cual proporciona la capacidad de adaptación a nuevos ambientes; lo cual explica su presencia en ambientes acuáticos, suelos ácidos, y alcalinos, y capacidad de relacionarse simbióticamente con otros microorganismos, animales y plantas (Araque *et al.*, 2008).

Entre otras especies tenemos a *Burkholderia ubonensis*, *B. vietnamiensis*, *B. cepacia*, *B. tropica*, *B. silvatlantica* y *B. bryophila*. Algunos de estos microorganismos actúan como agentes de control biológicos de fitopatógenos, y como promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016).

1.3. Definición de términos básicos

Micelio. Es el conjunto de filamentos denominado hifa, y esto se origina por una espora, la cual pueden ser cenocíticas (sin septos) o septadas (septos o tabiques) (Cundom *et al.*, 2000).

Esclerocios. Son cuerpos de resistencia, formados por un micelio endurecido que contiene reservas alimenticias que le permiten sobrevivir bajo condiciones climáticas adversas durante largos períodos (Cundom *et al.*, 2000).

Antibióticos. Son sustancias químicas producidas por ciertos hongos y otros organismos además que existen algunos que son producidos sintéticamente, que matan o inhiben el desarrollo de muchas clases de bacterias y hongos; son utilizados para tratar diferentes infecciones tanto en medicina humana, animal y en la agricultura (Ariza y Sánchez, 2012).

Antibiosis. Asociación antagónica que consiste en un proceso de interacción de organismos en detrimento de uno de ellos, en la cual uno o más metabolitos son expulsados (pequeñas moléculas tóxicas, enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios) afectando así el desarrollo de microorganismos fitopatógenos (Pathma *et al.*, 2011).

Lipopéptidos. Son sustancias producidas por hongos y bacterias, como parte de su metabolismo. Están formados por un lípido (grasa) conectado a un péptido (proteína), muchos de estos son utilizados como antibióticos ya que tiene acción antifúngica (Ariza y Sánchez, 2012).

Iturina. Es un metabolito secundario que es producido por *Bacillus*, que no involucra la vía de síntesis de aminoácidos, e involucra la formación de grandes complejos multienzimáticos llamados péptido sintetasas (NRPSs), además presenta una estructura cíclica de siete aminoácidos (Ongena y Jacques, 2008).

Surfactina. Es una sustancia que se encarga de reprimir la agrupación de proteínas, y contiene características antifúngicas, antivirales, antibacterianos, y

antitumorales. Y sobre todo tiene propiedades anfífilas, es decir que se comporta de manera distinta, en diferentes condiciones (Ongena y Jacques, 2008).

Ribosomal. Relativo al ribosoma; una partícula celular creada de ARN y proteína, la cual su función principal es sintetizar proteínas en la célula, y de leer la secuencia del ARN mensajero (ARNm) y, utilizando el código genético se traduce la secuencia del ARN a una secuencia de aminoácidos (Ongena y Jacques, 2008).

Bacteriocinas. Son péptidos de origen ribosomal, que pueden ser proteínas o toxinas sintetizadas por microorganismos como bacterias, y tienen potencial de inhibir el crecimiento de algunos fitopatógenos (Heredia-Castro *et al.*, 2017).

Lisis. Es un proceso de deterioro o ruptura de una célula, debido a una lesión en su membrana plasmática (exterior), que produce la salida del material celular (Heredia-Castro *et al.*, 2017).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui”, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín.

2.2. Diseño de investigación

2.2.1. Características del diseño experimental

Se realizaron cuatro experimentos sucesivos: dos correspondientes al primer objetivo y uno para cada uno de los objetivos 2 y 3.

a) Experimento 1: selección primaria

- Descripción: con este experimento se observó el desarrollo de *Rhizoctonia* sp. como un indicador de la presencia o la ausencia de la inhibición causada por 19 cepas bacterianas *in vitro*.
- Diseño: completo al azar.
- Número de tratamientos: 40.
- Repeticiones: 3.
- Unidad experimental (UE): cultivo de hongo fitopatógeno en PDA (cuatro UE por placa de Petri).
- Número de UE: 120 (36 placas).
- Tratamientos:
Factor A (20 niveles): bacterias endofíticas (19 cepas bacterianas más un testigo), cultivadas con *Rhizoctonia* sp. en PDA.

Factor B (2 niveles): medios de fermentación de bacterias (TSB y MM).

b) Experimento 2: selección secundaria

- Descripción: se repitió el procedimiento del experimento 1 con 5 cepas bacterianas que mostraron una probable respuesta inhibitoria *in vitro* sobre *Rhizoctonia* sp.
- Diseño: completo al azar con arreglo factorial.
- Numero de tratamientos: 10.
- Repeticiones: 3.
- Unidad experimental (UE): cultivo de hongo fitopatógeno en PDA inoculadas en medio TSB y MM.
- Número de UE: 30 placas.
- Tratamientos:
Factor A (5 niveles): bacterias endofíticas (5 cepas bacterianas).
Factor B (2 niveles): medios de fermentación de bacterias (TSB y MM).

c) Experimento 3: prueba de placa sellada

- Descripción: con este experimento se evaluó el desarrollo de *Rhizoctonia* sp. como medida de la inhibición causada por 5 cepas bacterianas *in vitro* a través de la “prueba de placas selladas”.
- Diseño: completo al azar.
- Número de tratamientos: 12.
- Repeticiones: 3.
- Unidad experimental (UE): placa de TSA y MM inoculada con bacteria endofítica invertida sobre placa de cultivo de hongo fitopatógeno en PDA.
- Número de UE: 36 placas selladas.
- Tratamientos:
Factor A (6 niveles): bacterias endofíticas (5 cepas bacterianas más un testigo) invertidas sobre *Rhizoctonia* sp.
Factor B (2 niveles): medios de cultivos de bacterias (TSB y MM).

d) Experimento 4: difusión en pozos en agar

- Descripción: con este experimento se evaluó el desarrollo de *Rhizoctonia* sp. como medida de la inhibición causada por 5 cepas bacterianas *in vitro* a través de la “prueba de difusión en pozos en agar”.
- Diseño: completo al azar.
- Número de tratamientos: 12.
- Repeticiones: 3.
- Unidad experimental (UE): cultivo de hongo fitopatógeno en PDA inoculadas en medio TSB y MM.
- Número de UE: 36 placas.
- Tratamientos:
 - Factor A (6 niveles): bacterias endofíticas (5 cepas bacterianas más un testigo).
 - Factor B (2 niveles): medios de fermentación de bacterias (TSB y MM).

2.2.2. Población y muestra

- **Población**
 - Cepas de *Bacillus* y *Burkholderia* endofíticas aisladas del cultivo de arroz de diferentes departamentos del Perú (Tumbes, Amazonas y San Martín).
 - Hongo fitopatógeno aislado del cultivo de arroz: *Rhizoctonia* sp.
- **Muestra**
 - 19 cepas de bacterias endofíticas (16 de *Bacillus* spp. y tres de *Burkholderia vietnamiensis*) obtenidas a partir de la colección conservada en laboratorio.
 - Subpoblación (cepa) de *Rhizoctonia* sp. (Sawada) (origen: Tumbes).

2.2.3. Técnicas de recolección de datos

Los ensayos de antibiosis se realizaron de acuerdo con la metodología sugerida por Castellano y Bedmar (2017) que consiste en medir el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* sp. (figura 1). Se determinó la superficie de desarrollo de los hongos a partir de la estimación de superficie con imagen digital (programa Image J).

Para diferenciar la producción de compuestos volátiles de no volátiles (solubles), se utilizó el método de “placa sellada” descrito por Fernando *et al.* (2005) que consiste en utilizar una placa inoculada con bacteria invertida sobre una placa con hongo y sellada con parafilm.

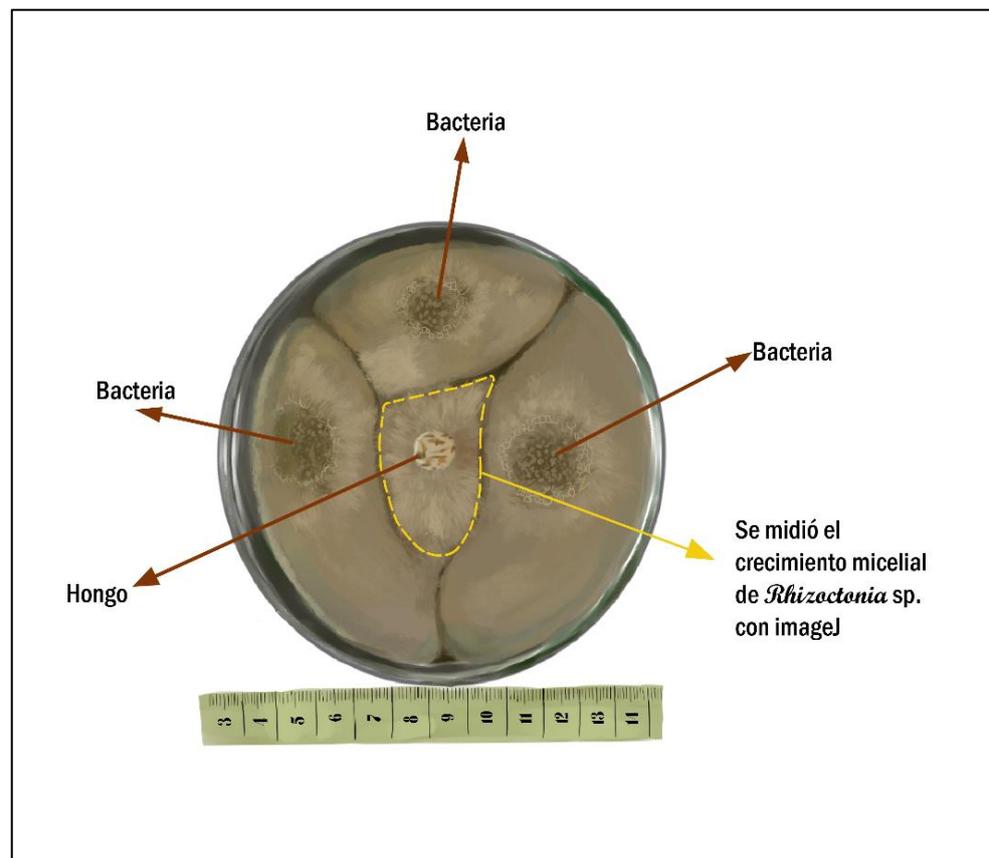


Figura 1. Primer plano del crecimiento micelial a través del ensayo de antibiosis con tres repeticiones de cepa bacteriana contra *Rhizoctonia* sp.

2.2.4. Tratamientos

Los tratamientos se agrupan en dos factores. El factor A, corresponde a las bacterias endofíticas cultivadas con *Rhizoctonia* sp. en medio PDA. El factor B, tiene dos niveles que son: medio de inoculación y fermentación en medio TSB, y MM.

Tabla 1

Cepas de bacterias endofíticas de arroz (16 Bacillus spp. y 3 Burkholderia vietnamiensis) utilizadas como tratamiento inicial en el diseño experimental

Nº	Código	Origen	Bacterias endofíticas de arroz
1	T1	Tumbes	<i>Bacillus megaterium</i>
2	T9-1	Tumbes	<i>Bacillus velezensis</i>
3	T9-2	Tumbes	<i>Bacillus</i> sp.
4	T10	Tumbes	<i>Bacillus megaterium</i>
5	T13-1	Tumbes	<i>Bacillus megaterium</i>
6	T15	Tumbes	<i>Bacillus megaterium</i>
7	T33-1	Tumbes	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
8	T34-1	Tumbes	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
9	T34-2	Tumbes	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
10	AM5-2	Amazonas	<i>Bacillus</i> sp.
11	AM8-1	Amazonas	<i>Bacillus</i> sp.
12	AM8-2	Amazonas	<i>Bacillus</i> sp.
13	AM17	Amazonas	<i>Bacillus aryabhatai</i>
14	AM20-2	Amazonas	<i>Bacillus</i> sp.
15	SM3	San Martín	<i>Bacillus aryabhatai</i>
16	SM42	San Martín	<i>Bacillus aryabhatai</i>
17	SM44	San Martín	<i>Bacillus megaterium</i>
18	SM59-1	San Martín	<i>Bacillus subtilis</i>
19	SM35-1	San Martín	<i>Bacillus</i> sp.

Tabla 2

Cepas de bacterias seleccionadas que fueron inoculadas y fermentadas en medio TSB y MM, cultivadas con Rhizoctonia sp. en PDA

Factores, niveles y tratamientos	Medio	
	TSB	Mineral
SM59 <i>Bacillus subtilis</i>	T ₁₁	T ₁₂
SM3 <i>Bacillus aryabhatai</i>	T ₂₁	T ₂₂
T34-1 <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	T ₃₁	T ₃₂
T34-2 <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	T ₄₁	T ₄₂
T33-1 <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	T ₅₁	T ₅₂

2.2.5. Análisis estadístico

Previo al análisis de varianza se aplicó la prueba de Shapiro - Wilk, para determinar si los datos evaluados de superficie cumplieron con el supuesto de normalidad (Diz, 2018).

- Análisis de varianza

Modelo estadístico lineal del experimento es:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

X_{ij} : corresponde a un resultado de la unidad experimental;

μ : la media de la población; α_i : mide los efectos de A;

β_j : mide los efectos de B;

$\alpha\beta_{ij}$: mide los efectos de la interacción AB;

ϵ_{ij} : es el error experimental.

Tabla 3

Modelo ANVA para el experimento 2 (selección secundaria)

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor de F
Tratamientos	t-1	$[\sum Y_{ij}^2/r] - [TC/t]$	SC_t / GL_t	CM_t / CM_E
Factor A	a-1	$[\sum i y_i^2 / br - (y^2 / abr)]$	SC_A / GL_A	CM_A / CM_E
Factor B	b-1	$[\sum j y_j^2 / ar - (y^2 / abr)]$	SC_B / GL_B	CM_B / CM_E
A*B	(a-1)(b-1)(c-1)	$[\sum_{i,j,k} y_{i,j,k}^2 / ar - (y^2 / abr)] - SCA \cdot SCB - SCAB$	SC_{ABC} / GL_{ABC}	CM_{ABC} / CM_E
Error	$\sum r_{ij} - pq$	SCTt- SCT	SC_E / GL_E	
Total	$\sum r_{ij} - 1$	$[\sum X_{ijk}^2] - (\sum X_{ijk})^2 / pqr$		

Se considera que el experimento pertenece al modelo I, donde A (bacterias endofíticas) y B (medios de cultivo de las bacterias) son factores fijos (Torres, 2013).

- Prueba de medias

En la separación de medias de los datos de superficie de desarrollo del hongo se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5 % ($p \leq 0,05$).

- Análisis de correlación

Se calculó y se determinó la significancia de los coeficientes de correlación lineal simple para los factores estudiados (selección de bacterias en MM e inhibición del hongo de metabolitos solubles en MM).

2.3. Materiales

2.3.1. Materiales

- Materiales biológicos

La cepa de *Rhizoctonia* sp., obtenida del cepario del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la UNSM, identificada y aislada en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Tumbes. Según

caracteres morfológicos: micelio, color, tipo de crecimiento, presencia de conidias, y presencia de septas y ancho. (Garrido-Rondoy y Vilela-Severino, 2019).

Las cepas bacterianas endofíticas que se utilizaron en el presente trabajo fueron reportadas e identificadas en los estudios realizados por Valdez-Núñez *et al.* (2020) en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de San Martín. Obtuvieron una colección de microorganismos de diferentes departamentos del Perú (Tumbes, Amazonas y San Martín) que fueron aisladas del cultivo de arroz, de las cuales 19 han sido identificadas molecularmente, siendo 16 cepas de *Bacillus* spp. y 3 cepas *Burkholderia vietnamiensis*.

- **Medios de cultivos**

Se utilizaron medios de cultivo: Tryptic Soy Agar (TSA), Papa Dextrosa Agar (PDA), Tryptic Soy Broth (TSB), medio mineral (cloruro de sodio, extracto de levadura + glucosa, KH_2PO_4 + $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).

- **Materiales de laboratorio**

Placas petri, tubos de ensayo, microtubos, asa bacteriológica o de kolle, micropipetas, sacabocado, y espátula de drigalsky.

2.4. Metodología

2.4.1. Preparación de medios

- **Medio TSA.** Para este medio se utilizaron los siguientes materiales: triptona (15g), peptona (5g), cloruro de sodio (5g), agua destilada (1 L), y agar (15g). Se procedió a mezclar los reactivos, regulando el pH (7) en todo momento. Finalmente, la solución se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

- **Medio TSB.** Para este medio se utilizaron los materiales anteriores sin agregar el agar.
- **Medio mineral.** Para este medio de cultivo se utilizaron los siguientes materiales: glucosa (10g), extracto de levadura (5g), KH_2PO_4 (1g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), cloruro de sodio (0,01g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,01g), agua destilada (1 L). Se procedió a mezclar los reactivos, regulando el pH (7) en todo momento. Finalmente, la solución se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

2.4.2. Reactivación de cepas bacterianas crio preservadas

- **Reactivación de cepas bacterianas**

Se realizaron siembras sucesivas en medio TSA, he incubadas a 30°C durante 24 horas (Brown y Smith, 2017).

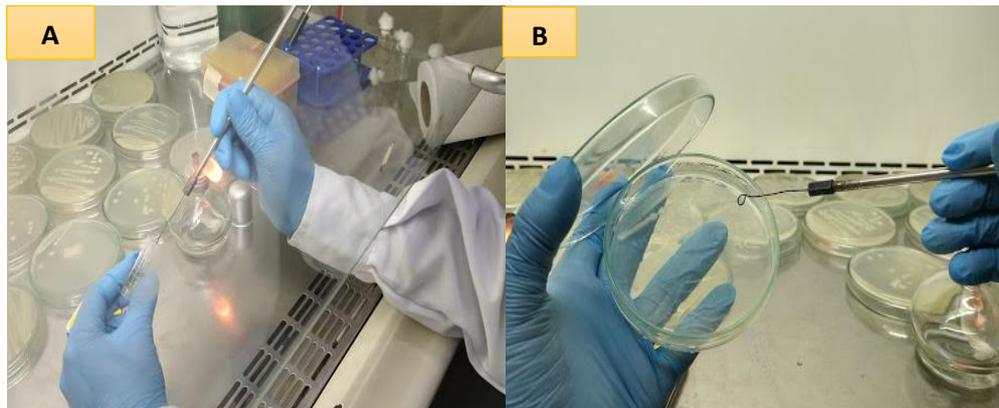


Figura 2. Procedimiento de reactivación de cepas: A) placas conteniendo cepas crio preservadas en proceso de reactivación; b) siembras sucesivas en medio TSA.

- **Cultivos puros**

Con la ayuda de una micropipeta se colocó 5 ml de medio TSA en tubos de vidrios estériles de 10 ml de capacidad. Posteriormente, los tubos se acondicionaron en ángulo de 45° para enfriarse a temperatura ambiente (12 horas). Después de este proceso, las cepas bacterianas fueron sembradas en forma de zigzag e incubadas a 30°C durante 24 horas. Concluido el periodo de crecimiento los frascos fueron tapados con tapa de jebe y conservados a 4°C (figura 3).

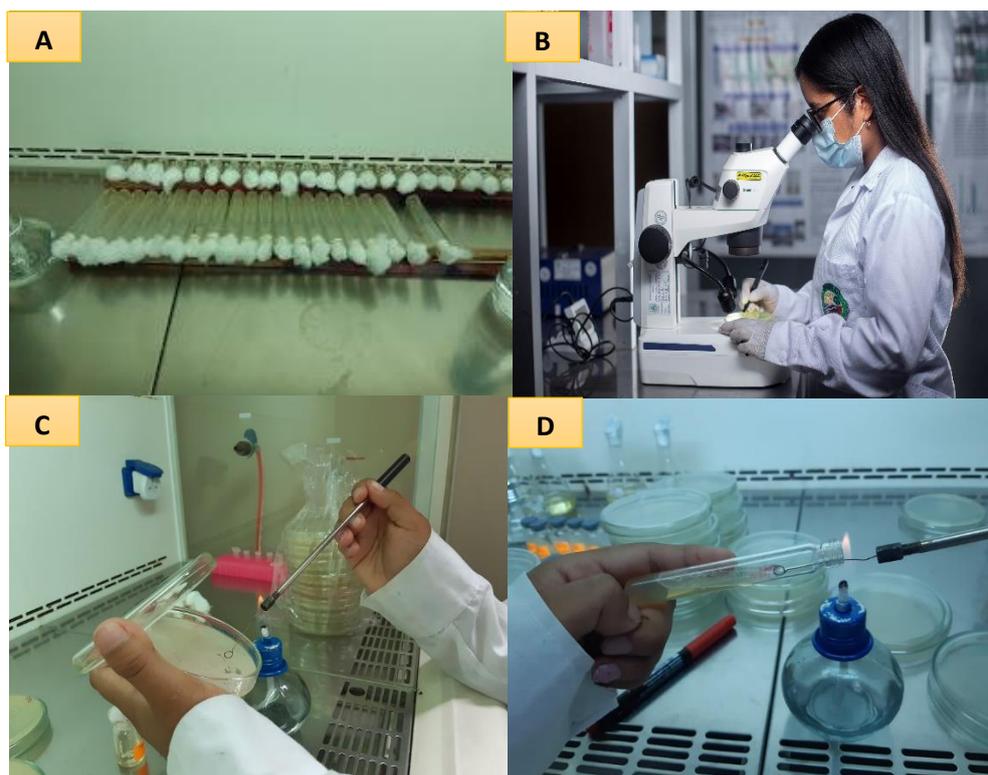


Figura 3. Procedimientos para realizar cultivos puros.

Nota: A) tubos de ensayo con medio TSA en posición de un ángulo de 45°; B) observación de colonias bacterianas a un aumento 4x; C) selección de una pequeña porción de bacteria para ser sembrada; D) bacterias sembradas en forma zigzag.

2.4.3. Reactivación de cepa fúngica

La cepa fúngica fue reactivada empleando medio PDA, este proceso consistió en sembrar una pequeña porción del micelio en el centro de la placa, incubándose a 30°C por 72 horas.

2.4.4. Preparación del inóculo

Se preparó 100 ml de medio TSB y 100 ml de medio mineral; con una micropipeta se colocó 5 ml en tubos de vidrio, para luego ser esterilizados a 121° C por 15 minutos.

Las cepas reactivadas anteriormente, fueron sembradas con el asa de kolle en los tubos conteniendo medio líquido, e incubadas en agitación constante a 30 °C por 24 horas, posterior a ello se midió su densidad optima equivalente a 1, con la ayuda de espectrofotómetro.

2.4.5. Selección primaria de efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp.

Se realizó la selección primaria de las 19 cepas sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. Esta actividad consistió en colocar 20 μ l de caldo bacteriano en cuatro lados equidistantes de la placa Petri (figura 4) y en el centro de ella el hongo fitopatógeno, para así seleccionar que bacterias inhiben su crecimiento.

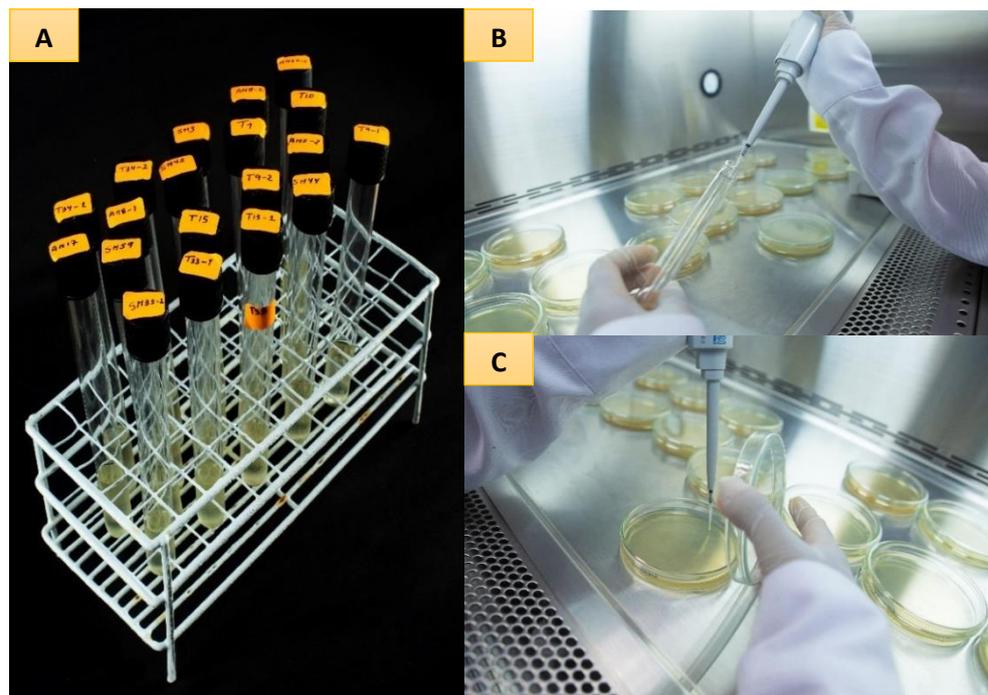


Figura 4. Procedimiento de selección primaria de bacterias endofíticas contra el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.

Nota: A) inóculos de las 19 cepas bacterianas; b) extracción de 20 μ l de caldo bacteriano; c) transferencia del caldo bacteriano en lados equidistantes.

2.4.6. Selección secundaria de efecto inhibitorio contra hongos fitopatógeno

Con las bacterias que presentaron actividad inhibitoria, se realizaron los ensayos de antibiosis.

- Prueba de antibiosis

Para este experimento, se utilizó un sacabocado estéril, para poder extraer el hongo del medio PDA donde se desarrolló, para luego ser

colocado en el centro de una segunda placa. Posteriormente, con la micropipeta se colocó el inóculo de cepas bacterianas en la placa en tres lados equidistantes. Como control, se utilizó placas PDA inoculadas solo con el hongo.

Se determinó el área de desarrollo o inhibición del hongo a partir de la estimación de superficie con imagen digital (programa Image J).

2.4.7. Deducción de la actividad de metabolitos secundarios volátil o no volátiles (solubles) de cepas bacterianas, con actividad inhibitoria sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.

Para diferenciar la producción de compuestos volátiles de no volátiles (solubles), se utilizó el método de placa sellada sugerido por Fernando *et al.* (2005).

A continuación, se realizó la dilución del inóculo (cepa bacteriana), hasta la sexta dilución (10^{-6}), ejecutándose de la siguiente manera (ver figura 5):

- Se instalaron 6 repeticiones de microtubos conteniendo 900 μ l de NaCl. Consecutivamente se colocó 100 μ l del inóculo a la primera repetición, dispersándolo con un agitador por un periodo de 20 s (dilución 1:10); posteriormente se transfirió 100 μ l del microtubo anterior para diluir en la segunda repetición, y se agitó con el vórtex (dilución 1:100), repitiendo consecutivamente el método, hasta obtener una dilución de 10^{-6} .
- Culminado el proceso anterior, se sembró 100 μ l de la dilución 10^{-6} en el centro de la placa del medio de TSA, diseminándola con la espátula de Drigalsky rotándola de adentro hacia afuera.

Por último, en el centro de una placa con medio PDA, se colocó con la ayuda de un sacabocado, 5 mm de micelio de *Rhizoctonia* sp.

Al finalizar, la placa con TSA y MM inoculada fue invertida sobre la placa de PDA con el hongo, y sellada con parafilm.

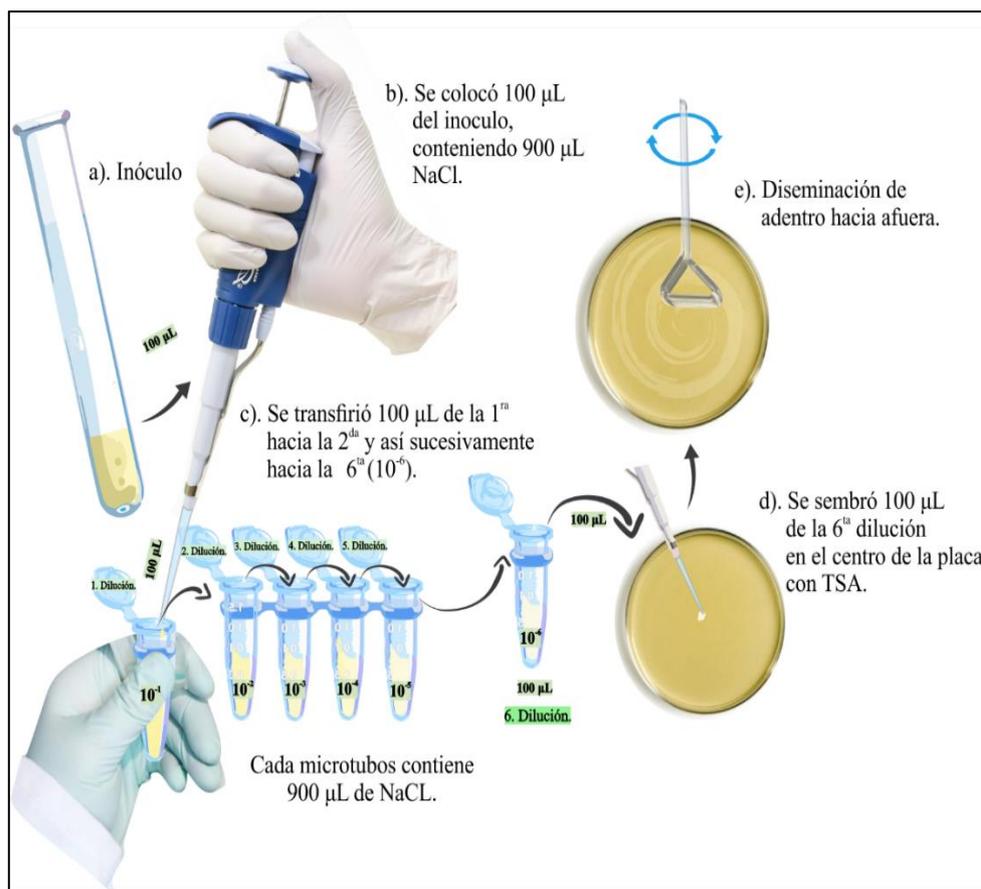


Figura 5. Esquema del procedimiento de dilución del inoculo.

2.4.8. Evaluación de los metabolitos secundarios no volátiles (solubles) de *Bacillus* spp. y *Burkholderia vietnamiensis* extraídos por separación física sobre el desarrollo de cepa de *Rhizoctonia* sp.

Para determinar si las bacterias efectivamente producían compuestos no volátiles (solubles), estas fueron evaluadas mediante el método de difusión de pozos de agar, descrito por Venkadesan y Sumathi (2015) según Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila (2019), realizando el siguiente procedimiento:

Para la producción de estos metabolitos secundarios se prepararon 100 ml de caldo de medio mineral (MN). Las cepas de bacterias T33-1, T34-1, T34-2, SM3 y SM59 fueron sembradas en Erlenmeyer conteniendo 20 ml de caldo mineral e incubadas a 30°C en movimiento constante a 180 rpm durante 36 horas. Posteriormente, volúmenes de 1 ml de caldo inoculado fueron centrifugados a 13 000 rpm por 15 minutos, a fin de obtener dos fases: la parte acuosa (biomasa bacteriana) y la parte líquida (sobrenadante). Esta

última se utilizó para evaluar la producción de metabolitos solubles. Consecutivamente, en una placa de Petri conteniendo medio PDA y con la ayuda de un sacabocado estéril, se realizaron 3 pocillos u orificios de 6 mm de diámetro. En cada uno de estos pocillos se colocaron 20 μ l del sobrenadante obtenido en la etapa anterior. Por otro lado, en el centro de la misma placa, se colocó un disco de agar de 6 mm conteniendo el hongo *Rhizoctonia* sp. Para el control se utilizó otra placa conteniendo medio PDA, realizando el mismo procedimiento que la prueba anterior, con la diferencia de que en cada uno de los pocillos se colocó 20 μ l de agua estéril.

Se determinó la superficie de desarrollo o inhibición de los hongos a partir de la estimación de superficie con imagen digital (programa Image J).

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Selección de bacterias endofíticas con efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp.

3.1.1. Selección primaria

Se seleccionaron cinco cepas por su capacidad de inhibir el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.: *Bacillus subtilis* SM59, *Bacillus aryabhattai* SM3, y tres cepas de *Burkholderia vietnamiensis* (T34-1, T34-2 y T33-1) (tabla 4, figura 6).

Tabla 4

Presencia (+) o ausencia (-) de efecto inhibitorio de 19 cepas bacterianas fermentadas y aplicadas en medios TSB y MM sobre el cultivo *in vitro* de *Rhizoctonia* sp. en medio PDA

N°	Código	Bacterias endofíticas de arroz	Efecto inhibitorio sobre <i>Rhizoctonia</i> sp. en PDA	
			Bacteria en TSB	Bacteria en MM
1	T1	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
2	T9-1	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-
3	T9-2	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
4	T10	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
5	T13-1	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
6	T15	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
7	T33-1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	+	+
8	T34-1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	+	+
9	T34-2	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	+	+
10	AM5-2	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
11	AM8-1	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
12	AM8-2	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
13	AM17	<i>Bacillus aryabhattai</i>	-	-
14	AM20-2	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
15	SM3	<i>Bacillus aryabhattai</i>	+	+
16	SM42	<i>Bacillus aryabhattai</i>	-	-
17	SM44	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
18	SM59-1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
19	SM35-1	<i>Bacillus</i> sp.	-	-

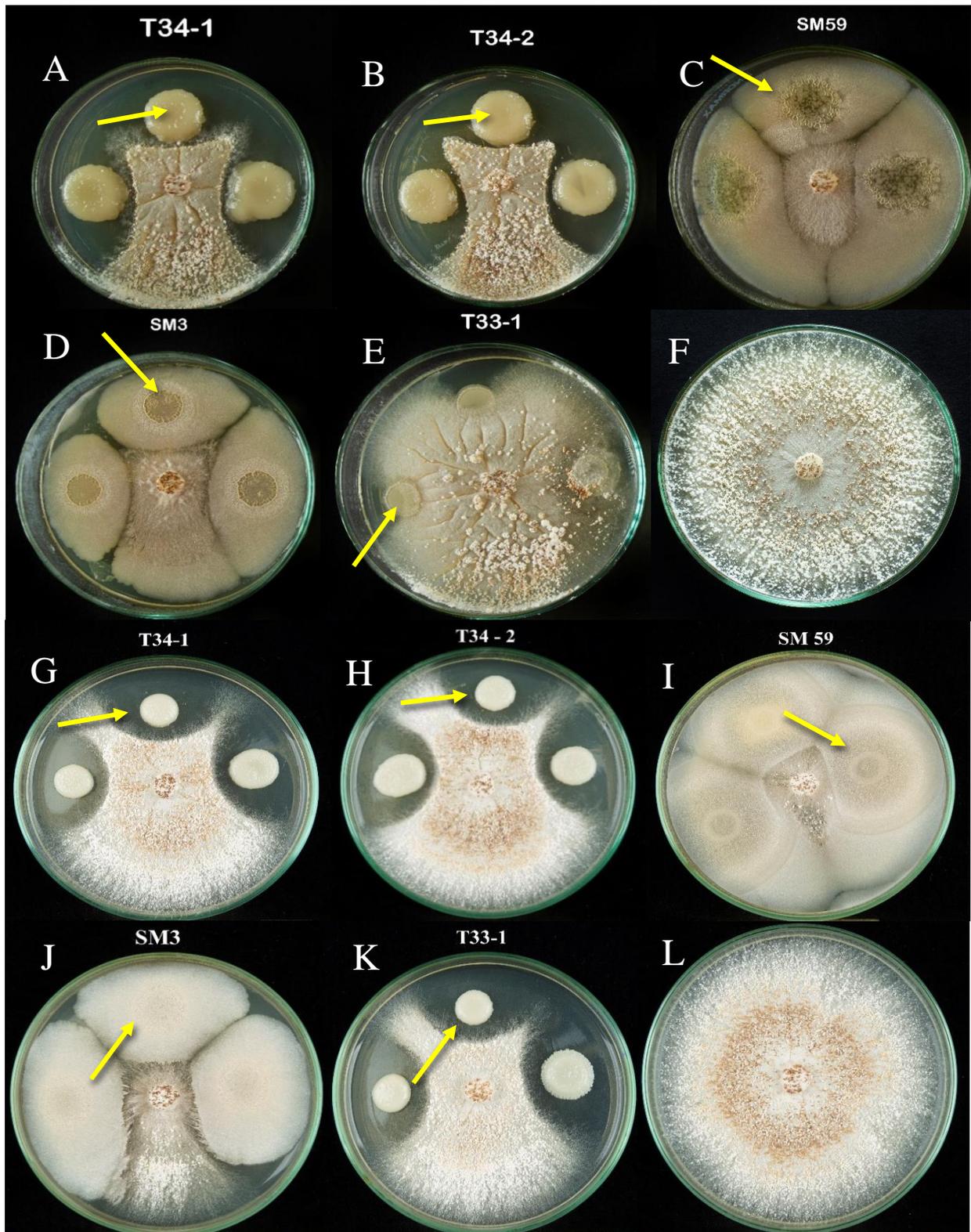


Figura 6. Actividad inhibitoria de cepas cultivadas en medio TSB y MM sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp. a través de la prueba de antibiosis en PDA incubado a 72 horas.

Nota: (A y G) cepa T34 -1 *Burkholderia vietnamiensis*, (B y H) cepa T34 -2 *Burkholderia vietnamiensis*, (C y I) cepa SM59 *Bacillus subtilis*, (D y J) cepa SM3 *Bacillus aryabhatai*, (E y K) cepa T33 -1 *Burkholderia vietnamiensis*, (F y L) cepa control de *Rhizoctonia* sp.

3.1.2. Selección secundaria

Los resultados de la selección secundaria mostraron de que las especies presentan una respuesta diferenciada hacia los medios de cultivo (tabla 6). El ANOVA mostró una respuesta altamente significativa de los tratamientos, los medios de cultivo y la interacción (p-Valor $\leq 0,01$). El coeficiente de variabilidad fue 1,16 %, y el coeficiente de determinación (R^2) alcanzó un valor cercano al 100 % (tabla 5).

Los tratamientos T₂ (SM 3), T₃ (T34-1) y T₄ (T34-2) mostraron mayor efecto de inhibición en el medio de cultivo TSB, y en medio MM los tratamientos T₁ (SM59) y T₅ (T33-1) (figuras 6 y 7).

Tabla 5

Análisis factorial de varianza de los medios de inoculación de las bacterias

F.V.	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p- Valor	Sig.
Tratamientos	11	19 589,33	1 780,85	12 538,73	0,000	**
Factor A	5	18 823,08	3 764,62	26 506,20	0,000	**
Factor B	1	77,35	77,35	544,63	0,000	**
A* B	5	688,90	137,78	970,09	0,000	**
Error	24	3,41	0,14			
Total	35	19 592,74				
$R^2 = 100 \%$		% C.V. = 1,16		$\bar{Y} = 32,55$		a=0,05

Tabla 6

Desarrollo de *Rhizoctonia* sp. de cepas seleccionadas, que fueron cultivadas en medio TSB y MM

Tratamientos (cepas bacterianas)	Medios de inoculación (cm ²)	
	MM	TSB
T ₁ (<i>Bacillus subtilis</i> SM59)	5,53 ± 0,26 a	8,54 ± 0,28 b
T ₂ (<i>Bacillus aryabhattai</i> SM3)	13,89 ± 0,02 d	11,76 ± 0,14 c
T ₃ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T34-1)	29,43 ± 0,10 f	27,03 ± 0,02 e
T ₄ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T34-2)	32,83 ± 0,03 g	30,20 ± 0,07 f
T ₅ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T33-1)	26,87 ± 0,64 e	48,88 ± 0,10 h

*Promedio y error estándar (n=3) seguido por la misma letra no son significativos al 5% de probabilidad por la prueba Tukey.

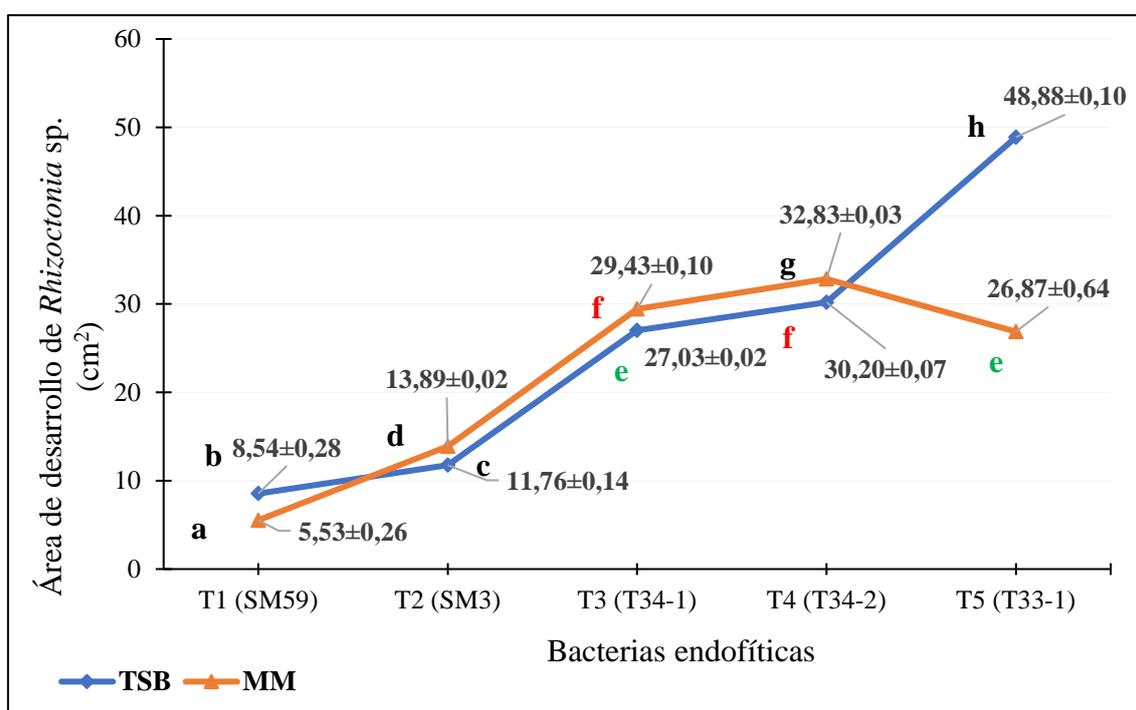


Figura 7. Prueba de Tukey ($P < 0,05$), área de desarrollo del hongo fitopatógeno (cm²) por cepas de bacterias endofíticas inoculadas en medio TSB y MM e incubadas a 72 horas.

La cepa de *Bacillus subtilis* SM59 presentó alto nivel antagónico sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp., en ambos medios de cultivo. Esto concuerda con Tejera-Hernández *et al.* (2011) quienes indicaron que el género *Bacillus* posee diferentes mecanismos de acción como la capacidad para producir antibióticos, metabolitos antimicrobianos y antifúngicos, mecanismos de competencia de espacio y nutrientes, capacidad de colonización, haciendo que suprima el desarrollo del hongo fitopatógeno.

Así mismo, a nivel *in vitro* los mecanismos de control desarrollados en diversos medios de cultivos presentaron una respuesta diferenciada de acuerdo con las especies de cepas bacterianas. Los resultados mostraron que los medios de inoculación influyen en los diferentes mecanismos de control que las cepas endofíticas ejercen sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.; esto estaría influenciado por compuestos antimicrobianos o por otros mecanismos como la formación de biopelículas, capacidad de colonización, síntesis de enzimas líticas, antagonismo directo por competencia en espacio y nutrientes, así como producción de compuestos volátiles o solubles (Pedraza *et al.*, 2020).

Un efecto similar de inhibición de fitopatógenos por la misma cepa de *Bacillus subtilis* SM59 cepa bacteriana endofítica fue observado por Valdez-Núñez *et al.* (2020), quienes utilizaron medio TSB para la inoculación de *B. subtilis* SM59 con capacidad antagonista frente a *Burkholderia glumae* cepa THT. Del mismo modo, Song *et al.* (2019), reportaron una cepa de *Burkholderia cepacea*, que fue inoculada en medio líquido de Luria Bertani (LB) y fue capaz de suprimir el desarrollo de *Rhizoctonia solani* a través de formación de biopelículas.

Pozo *et al.* (2007) utilizaron el medio de cultivo TSB para inocular y fermentar 85 cepas bacterianas, donde sólo 18 mostraron efecto antagónico en el desarrollo de *Rhizoctonia solani*; mientras que Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila (2019), utilizaron el medio MM, donde encontraron metabolitos antimicrobianos producidos por cepas de *Bacillus* spp. rizosféricos, capaces de inhibir el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.

Del mismo modo, Alviz *et al.* (2017) reportaron cepas endofíticas que inhiben el desarrollo de *Burkholderia glumae*, a través de los metabolitos solubles producidos en el medio mineral.

Saxena *et al.* (2020) mencionaron que: “el estado del arte de *Bacillus* es superior frente a *Burkholderia*, pues presenta gran diversidad genética y metabólica, en el biocontrol de los fitopatógenos”. *Bacillus* presenta diferentes mecanismos de acción involucradas en diversos efectos: competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, producción de metabolitos secundarios, producción de enzimas líticas, secreción de toxinas, e inducción de resistencia (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

Es importante conocer los mecanismos de control por el cual el antagonista ejerce su acción, ya que esto nos garantizará su efecto eficiente y el desarrollo de formulaciones comerciales, cuyo éxito radica en la creación de microambientes (temperatura, pH y medio de fermentación) que potencialice su actividad biológica (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Actualmente, existen diferentes formulaciones comerciales que presentan como ingrediente activo cepas de *Bacillus*, productoras de lipopéptidos, iturina, fenicida y surfacina. Estas formulaciones son muy comerciales debido a su capacidad de colonización, fácil reproducción, alta persistencia a condiciones de estrés abiótico, y almacenamiento durante largos periodos de tiempo (Saxena *et al.*, 2020).

El complejo *Burkholderia*, este comprende un grupo de bacterias de gran valor en el campo de la agrobiotecnología, pero su uso está limitado a ensayos en laboratorio, debido a su carácter de patógeno oportunista. El mecanismo de acción de *Burkholderia* es poco conocido, por lo que representa un campo por explorar en la búsqueda de nuevos metabolitos producidos por bacterias. Desafortunadamente, limitaciones en su uso, no permiten su empleo en biotecnología, debido a que algunas cepas producen infecciones en pacientes con fibrosis quística (FQ), que estarían relacionado con el complejo *B. cepacia* (Rojas-Rojas *et al.*, 2019).

3.2. Actividad antifúngica de metabolitos secundarios sobre *Rhizoctonia* sp. según el método de “placas selladas”

Las cinco cepas evaluadas no mostraron inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia* sp. Esto parece indicar que los efectos observados en los experimentos precedentes se debieron a la presencia de metabolitos secundarios no volátiles (solubles).

Estos resultados no siguieron la tendencia encontrada por Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila (2019) puesto que, en sus investigaciones al aplicar el método de placas selladas, encontraron 8 cepas bacterianas que inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* a través de la producción de metabolitos volátiles, y 5 cepas de *Bacillus* spp. que no inhibieron el desarrollo de *R. solani* por presentar metabolitos secundarios solubles. Loo *et al.* (2021), encontraron que todas las 8 cepas bacterianas del género de *Bacillus* produjeron compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* debido a la producción de metabolitos secundarios volátiles.

3.3. Efecto “*in vitro*” de metabolitos secundarios no volátiles (solubles) sobre *Rhizoctonia* sp.

Los resultados del efecto *in vitro* de los metabolitos secundarios no volátiles (solubles) indicaron que en el medio TSB no mostró actividad antagonista y que sólo el sobrenadante del medio MM mostró desarrollo inhibitorio de *Rhizoctonia* sp. (figura 8). El análisis factorial de varianza (ANOVA) indicó una respuesta altamente significativa para los tratamientos (p -Valor $\leq 0,01$). El coeficiente de variabilidad fue 0,35 %, y el coeficiente de determinación (R^2) alcanzó un valor cercano al 100 % (tabla 7).

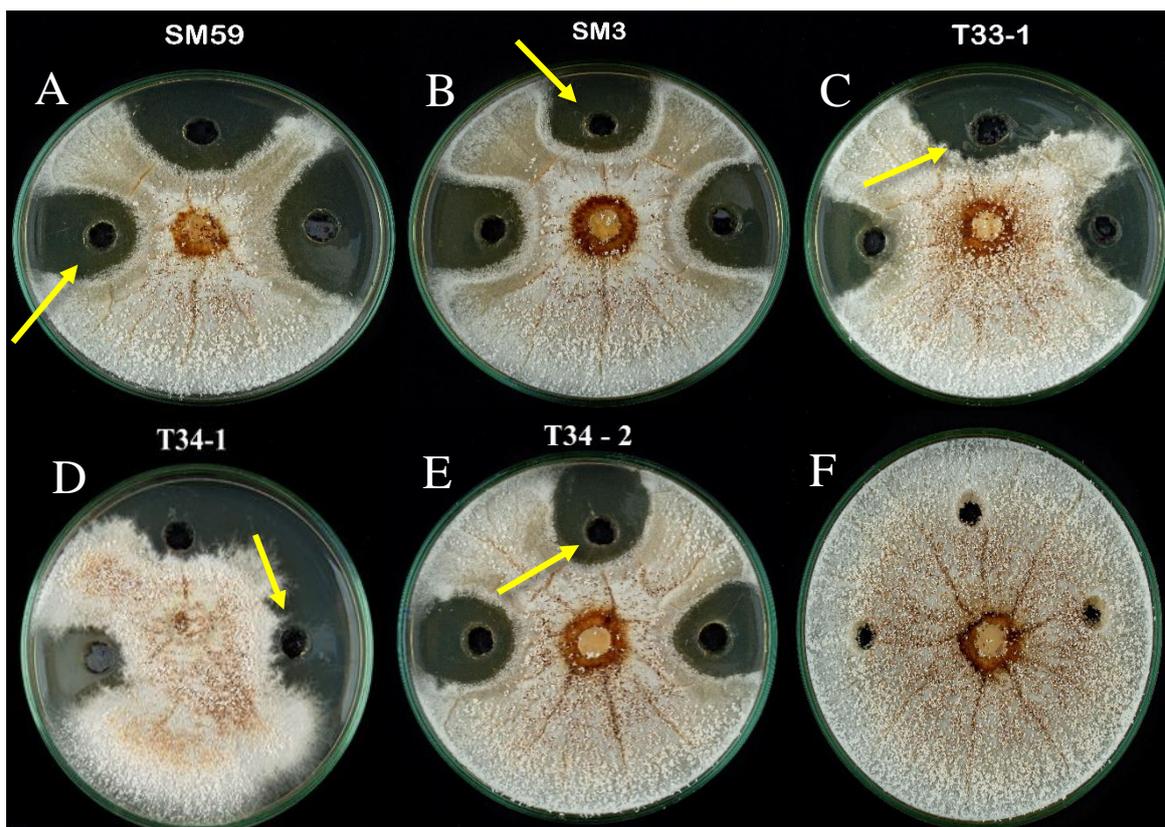


Figura 8. Actividad inhibitoria de metabolitos secundarios no volátiles (solubles) contra el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. incubado a 72 horas.

Nota: (A) cepa SM59 *Bacillus subtilis*, (B) cepa SM3 *Bacillus aryabhatai*, (C) cepa T33 -1 *Burkholderia vietnamiensis*, (D) cepa T34 -1 *Burkholderia vietnamiensis*, (E) cepa T34 -2 *Burkholderia vietnamiensis*. (F) cepa control de *Rhizoctonia* sp.

Tabla 7

Análisis de varianza de inhibición de metabolitos secundarios no volátiles (soluble) sobre Rhizoctonia sp.

F.V.	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P- Valor Sig.
T (Cepas bacterianas)	4	254,864	63,716	2 031,766	0,0001 **
Error	10	0,313	0,031		
Total	14	255,178			
$R^2 = 100 \%$		% C.V. = 0,35		$\bar{Y} = 50,24$	$\alpha = 0,05$

Todos los tratamientos inoculados en MM fueron capaces de inhibir el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.; siendo el T₁ (*Bacillus subtilis* cepa SM59) (44,07 cm²) el que obtuvo la mayor inhibición del fitopatógeno, significativa en comparación con T₂ (*B. aryabhatai* cepa SM3) (47,67 cm²), T₅ (*Burkholderia vietnamiensis* cepas T33-1) (50,07 cm²), T₃ (T34-1) (54,22 cm²) y T₄ (*B. vietnamiensis* cepa T34-2) (55,18 cm²) (P<0,05) (tabla 8 y figura 9).

Tabla 8

Desarrollo de Rhizoctonia sp. de los sobrenadantes de cepas inoculadas en medio MM

Tratamientos (cepas bacterianas)	Área de desarrollo del hongo (cm ²) *
T ₁ (<i>Bacillus subtilis</i> SM59)	44,07 ± 0,01 a
T ₂ (<i>Bacillus aryabhatai</i> SM3)	47,67 ± 0,02 b
T ₃ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T34-1)	54,22 ± 0,13 d
T ₄ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T34-2)	55,18 ± 0,00 e
T ₅ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T33-1)	50,07 ± 0,00 c

*Promedio y error estándar (n=3) seguido por la misma letra no son significativos al 5% de probabilidad por la prueba Tukey.

La figura 9, muestra el comportamiento de las cepas bacterianas sometidas a la prueba de pozo de agar en MM. En el medio TSB, luego de que el sobrenadante haya sido sometido a la misma prueba, se evidenció que las cepas pierden su potencial inhibitorio. Debido a que el medio TSB, presenta concentraciones de nitrógeno y carbono en condiciones normales a diferencia del medio MM suplementado, no promueve a que las bacterias liberen sus metabolitos de manera esperada, tal como lo manifiesta Gregori *et al.* (2007).

En la presente investigación, se evaluaron medios de cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, tales como peptona y glucosa, respectivamente; se evidenció que la actividad antagonista producida en el medio MM refleja inhibición en el desarrollo de *Rhizoctonia* sp. Esto concuerdan con Robles (2016), el cual menciona que para la biosíntesis de metabolitos secundarios el medio de cultivo cumple un rol importante.

Gregori *et al.* (2007) confirmaron que para la producción de metabolitos secundarios se requiere que el medio líquido MM este suplementado en relación carbono y nitrógeno de 1:1. Estos componentes serían de vital importancia para que las bacterias expresen la producción de metabolitos y sobre todo ejerzan influencia en el rendimiento de la biomasa obtenida. Varios factores como oxígeno, temperatura, carbono específico y nitrógeno, influenciaron en la producción de antibióticos por agentes de control biológico bacteriano, como en el caso de los lipopéptidos producidos por *Bacillus* sp. (Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila, 2019).

Estos resultados coinciden con diversos estudios en los que se ha determinado la actividad antimicrobiana de metabolitos obtenidos a partir de filtrados. Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila (2019) encontraron que los sobrenadantes fermentados por *Bacillus* sp. muestran mayor efecto inhibitorio sobre *Rhizoctonia solani*. Del mismo modo, Hernández *et al.* (2018) reportaron que la suspensión de cepas rizobacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *Bacillus subtilis* inhibieron el desarrollo de *Rhizoctonia solani*, a consecuencia de los metabolitos secundarios producidos por las bacterias.

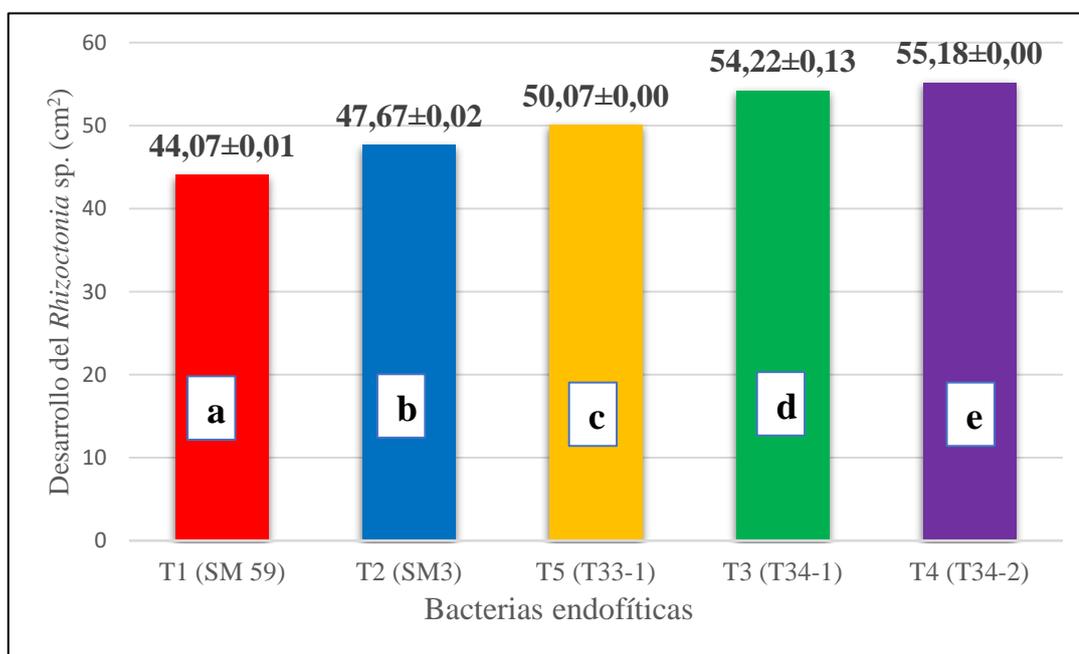


Figura 9. Prueba de Tukey ($P < 0,05$), mostrando área de inhibición de *Rhizoctonia* sp. por sobrenadantes fermentados por cepas de *Bacillus* y *Burkholderia*.

En la figura 10 se pudo observar que en la selección de bacterias con medio TSB, los tratamientos mostraron inhibición del fitopatógeno en estudio, mientras que al utilizar el sobrenadante libre de células bacterianas estos perdieron su potencial antagonico. Así mismo, en la selección de las cepas bacterianas en MM, el poder antagonista de bacteria + metabolito fue superior a comparación del sobrenadante que fue extraído por separación física de la masa bacteriana.

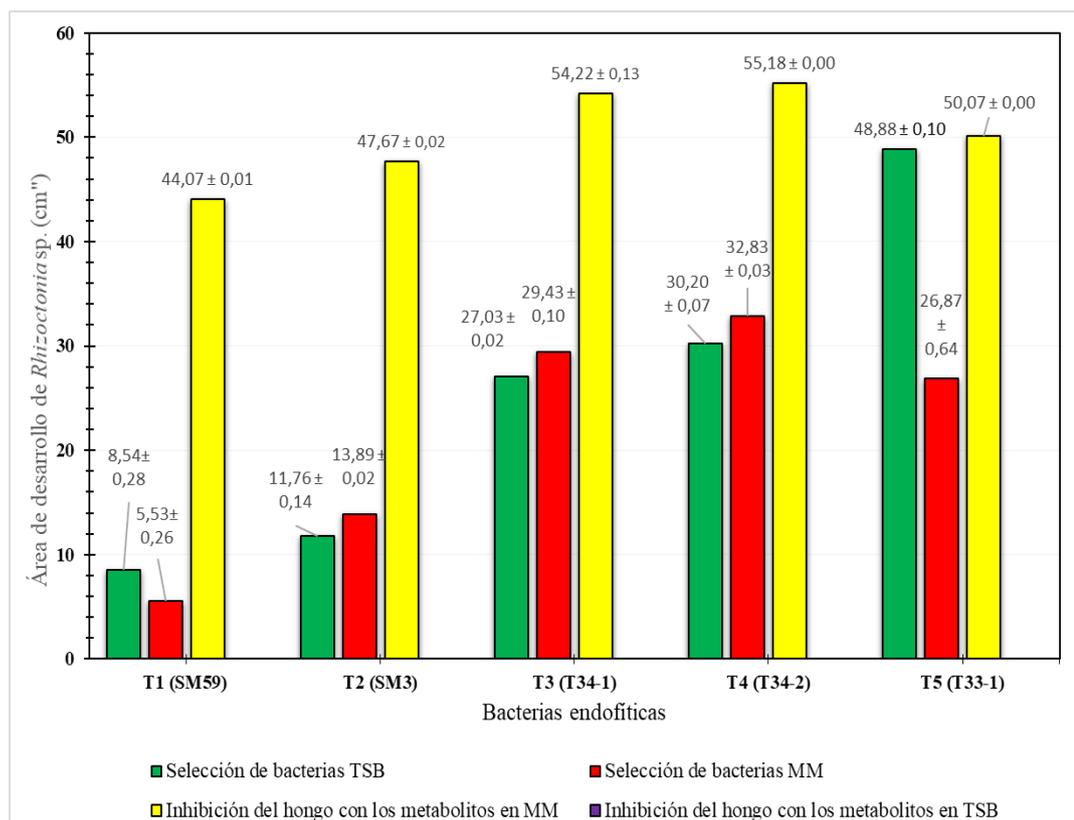


Figura 10. Prueba de Tukey ($P < 0,05$), comparación de medios de fermentación de bacterias sobre los mecanismos de acción de cepas contra *Rhizoctonia* sp.

Robles (2016) ensayó una explicación a este fenómeno, al mencionar que la generación de metabolitos bioactivos es regulada como una respuesta al estrés; es decir que el agente de control debe encontrarse en una situación de competencia para generar metabolitos. Conforme pasaría el tiempo de fermentación de las bacterias, la actividad microbiana de las cepas se modificaría, ya sea porque el metabolito bioactivo presente se degrada o se modifica el metabolismo celular con diferentes efectos sobre el desarrollo de un microorganismo. En el mismo sentido, Suárez-Medina y Coy-Barrera (2016), mencionaron que los microorganismos expresan su

defensa a través de la liberación de metabolitos secundarios, cuando su actividad es alterada o cuando perciben el estímulo de algún patógeno.

Los tratamientos con menor área del hongo fitopatógeno en la selección de bacterias en MM fueron T₁ y T₂, con 5,53 cm² y 13,89 cm² respectivamente, y el tratamiento con la mayor superficie de desarrollo fue T₄ con 32,83 cm². Respecto a las áreas en la inhibición del hongo con metabolitos en MM, también se registra el mismo patrón, siendo los T₁ y T₂ los que presentaron menor área, 44,07 cm² y 47,67 cm² respectivamente. Mientras que, T₄ tuvo la mayor área, con un valor de 55,18 cm² (Tabla 9).

Tabla 9

Matriz de los datos de la selección de bacterias en MM (cm²) y la inhibición del hongo con metabolitos en MM (cm²) utilizadas en el análisis de correlación

Tratamientos (cepas bacterianas)	Selección de bacterias en MM (cm²)	Inhibición del hongo con metabolitos en MM (cm²)
T ₁ (<i>Bacillus subtilis</i> SM59)	5,53 ± 0,26	44,07 ± 0,01
T ₂ (<i>Bacillus aryabhatai</i> SM3)	13,89 ± 0,02	47,67 ± 0,02
T ₃ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T34-1)	29,43 ± 0,10	54,22 ± 0,13
T ₄ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T34-2)	32,83 ± 0,03	55,18 ± 0,00
T ₅ (<i>Burkholderia vietnamiensis</i> T33-1)	26,87 ± 0,64	50,07 ± 0,00

Las áreas de inhibición de *Rhizoctonia* sp. registradas en el experimento 2 (selección de bacterias) y el experimento 4 (sólo metabolitos) en medio mineral (MM) presenta una correlación es altamente significativa ($r = 0,9622$; $R^2 = 92,6 \%$). Ello constituye una fuerte evidencia de la consistencia de los resultados y la conveniencia del diseño de la investigación.

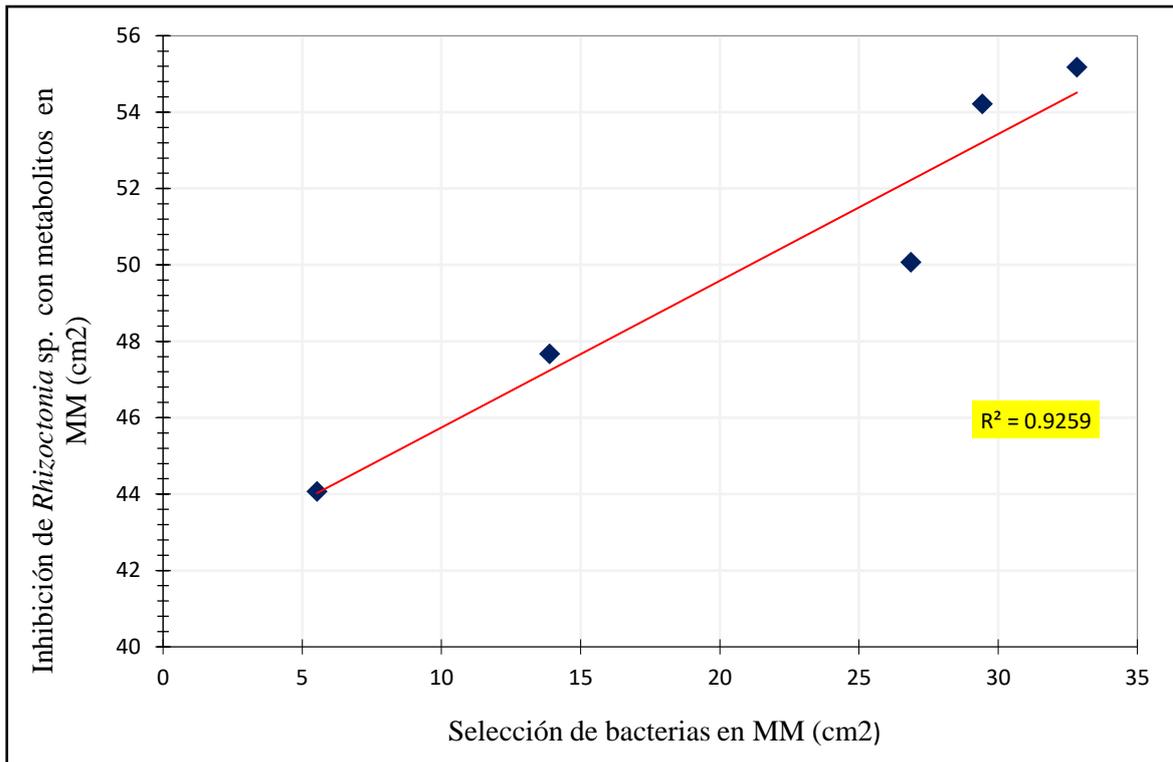


Figura 11. Proyección gráfica del análisis de correlación, entre la selección de bacterias en MM (cm²) y la inhibición de *Rhizoctonia* sp. con metabolitos en MM (cm²).

CONCLUSIONES

Cinco cepas bacterianas (*Bacillus subtilis* SM59, *Bacillus aryabhatai* SM3, y tres cepas de *Burkholderia vietnamiensis* T34-1, T34-2, T33-1) presentan actividad inhibitoria *in vitro* sobre el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.

Los resultados de la selección secundaria muestran de que los tratamientos presentan una respuesta diferenciada hacia los medios de cultivo, siendo T₁ (*Bacillus subtilis* cepa SM 59) la que presenta mayor inhibición del desarrollo de *Rhizoctonia* sp. (5,53 cm²) en el medio de cultivo MM, seguidamente de T₂ (*B. aryabhatai* cepa SM 3) (11,76 cm²) en medio de cultivo TSB.

Los metabolitos de las bacterias *Bacillus subtilis* SM59, *Bacillus aryabhatai* SM3, y *Burkholderia vietnamiensis* T34-1, T34-2 y T33-1, extraídos por separación física, presentan una respuesta altamente significativa en MM que inhibe el desarrollo *in vitro* de *Rhizoctonia* sp. Este comportamiento es consistente con la misma acción registrada durante el proceso de selección cuando las bacterias están presentes y en contacto con la cepa de referencia de *Rhizoctonia* sp.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar más estudios adicionales de las bacterias estudiadas para saber que metabolitos secundarios son los que inhiben a *Rhizoctonia* sp., y ayuden a determinar que medio específico es para su propagación.

Realizar la identificación genética de las cepas de *Bacillus* y *Burkholderia*, para la identificación de genes responsables de la expresión de metabolitos involucrados en el biocontrol de fitopatógenos de arroz.

A los investigadores, enfatizar estudios del poder antagonista de *Burkholderia* en control de fitopatógeno a través de la producción de metabolitos secundarios y poder generar estado del arte de esta especie.

Se recomienda seguir esta línea de investigación, para continuar con el siguiente paso que es probar si los metabolitos en fase invernadero, inhiben el desarrollo de *Rhizoctonia* sp.

A la Academia, incentivar este tipo de investigaciones ya que es el primer paso para desarrollar productos eficaces basados en metabolitos bacterianos secundarios de fácil extracción para controlar sosteniblemente enfermedades en el cultivo de arroz irrigado, de esa manera contribuir a la generación de productos biotecnológico de la región San Martín.

Realizar la identificación taxonómica del fitopatógeno mediante marcadores moleculares, para saber específicamente cual es la especie a estudiar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alviz, L., Pérez, A., y Pérez-Cordero, A. (2017). Efecto inhibitorio de compuestos tipo metabolitos de bacterias endófitas contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Burkholderia glumae*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 9(S1), 18-25.
- Araque, Y., Vitelli-Flores, J., Ramírez, A., Alonso, G., & Lemoine, V. R. (2008). Identificación bioquímica y PCR especie-específica de cepas de *Burkholderia cepacia* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28(2), 82-88.
- Ariza, Y., y Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 10(18), 149-155.
- Bacon, C. W.; White J. F. (2000). *Microbial endhopytes*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Bolívar-Anillo, H. J., Contreras-Zentella, M. L., & Teherán-Sierra, L. G. (2016). *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *Tip*, 19(2), 102-108.
- Brown, A y Smith, H. (2017). Benson's Laboratory Manual in General Microbiology: *Microbiological Applications*. 14th. Ed. New York, USA: McGraw– Hill Companies
- Castellano-Hinojosa, A., y Bedmar, E. J. (2017). 14 Methods for Evaluating Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Traits. *Advances in PGPR research*, 255.
- Chung, E. J., Hossain, M. T., Khan, A., Kim, K. H., Jeon, C. O., y Chung, Y. R. (2015). *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. *The plant pathology journal*, 31(2), 152 – 164.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 780.

- Cundom, M.; S. Mazza de Gaid; M. Mazzanti de Castañon & S. Gutiérrez. (2000). Actividad antagónica in vitro de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Universidad Nacional del Nordeste, Ciudad Argentina*.
- Drasam (Dirección Regional Agraria San Martín, Perú). (2019). *Diagnóstico de la cadena de valores de cultivo de arroz y maíz*. San Martín: Drasam.
- Diz, R., (2008). Métodos para evaluar normalidad y homogeneidad de varianza. *Relación con el tamaño de muestra*. *Universidad de Granma*. Bayamo. Cuba. 1: 44.
- Etesami, H., y Alikhani, A. (2018). *Bacillus* species as the most promising bacterial biocontrol agents in rhizosphere and endorhiza of plants grown in rotation with each other. *European journal of plant pathology*, 150(2), 497-506.
- Elmaghraby, I., Carimi, F., Sharaf, A., Marei, M., & Hammad, M. (2015). Aislamiento e identificación de bacteriófagos de *Bacillus megaterium* mediante la técnica AFLP. *Current Research in Bacteriology*, 8: 77-89.
- Fernando, W. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 955-964.
- Garrido, R.M. (2004a), Etiología de las pudriciones de tallos y de vainas del arroz en Tumbes y Piura. Ponencia presentada en XVIII Congreso Peruano de Fitopatología. Huaraz.
- Garrido Rondoy, M., and Vilela Severino, N. (2019). Antagonistic capacity of *Trichoderma harzianum* compared to *Rhizotecnia*, *Nakataea sigmoidea*, *Sclerotium rolfsii* and its effect in native strains of *Trichoderma* isolated from rice crops. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 199-206.
- Gregori, A., M. Svagelj, J. Pohleven, 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology* 45: 238-249.
- Hardoim, P. R., Andreote, F. D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2011). Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS microbiology ecology*, 77(1), 154-164.

- Hashiba, T. (1984). Estimation method of severity and yield loss by rice sheath blight disease. *Bulletin of Hokuriku National Agricultural Experiment Station*, 26(1), 115–164.
- He, H., Hao, X., Zhou, W., Shi, N., Feng, J., & Han, L. (2020). Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol *Actinomycete* strain A217. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1143-1152.
- Hernández Pérez, D., Díaz Castellanos, M., Quiñones Ramos, R., Santos Bermúdez, R., Portal González, N., & Herrera Isla, L. (2018). Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales. *Centro Agrícola*, 45(2), 55-60.
- Heredía-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346.
- Hua Wei Z., Youg Ch.S., Ren X.T. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*. 23(5),753-771.
- Kobayashi, T., Mew, T. W., & Hashiba, T. (1997). Relationship between incidence of rice sheath blight and primary inoculum in the Philippines: mycelia in plant debris and sclerotia. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 63(4), 324–327.
- Li, D., Li, S., Wei, S., & Sun, W. (2021). Strategies to manage rice sheath blight: Lessons from interactions between rice and *Rhizoctonia solani*. *Rice*, 14(1), 1-15.
- Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., & Kim, J. C. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *The plant pathology journal*, 33(5), 488
- Lucy M, Reed E, Glick B. (2004). Applications of free-living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86(1), 1-25.
- Loor, M. A. V., Cabrera, A. B., Coello, D. V., Mora, M. L., Aragón, A. R., & de Villegas, L. M. D. (2021). Actividad antifúngica de compuestos volátiles producidos por

- especies endófitas de *Bacillus* sobre *Moniliophthora roreri*. *Revista de Protección Vegetal*, 36(1).
- Memenza-Zegarra, M., & Zúñiga-Dávila, D. (2019). Isolation and Characterization of Antifungal Secondary Metabolites Produced by Rhizobacteria from Common Bean. In *Microbial Probiotics for Agricultural Systems* (pp. 141-153). Springer, Cham.
- Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri). (2018.) *Informe del arroz*. Lima: Minagri.
- Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 125, 35-45.
- Morath, S. U., Hung, R., y Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2-3), 73-83.
- Ongena, M., y Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Ou, S. H. (1985). Fungus diseases-foilage diseases. In *Rice diseases* (2nd ed.) (pp. 109–201). Kew,UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Pathma, J., Rahul, G. R., Kamaraj, K. R., Subashri, R., & Sakthivel, N. (2011). Secondary metabolite production by bacterial antagonists. *Journal of Biological Control*, 25(3), 165-181
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 112-125.
- Pérez C., y Chamorro A. (2013). Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - Recia*, 5(2), 439-462.
- Pérez, A., Rojas, J., y Helson, M. (2009). Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 286-301.

- Penrose D., y Glick B., (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiology Plantarum* 118(1), 10-15
- Pozo, Y. R., Flores, D. V., Romero, L. C., Pérez, E. G., & Rivera, V. P. Á. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 8(3), 35-40.
- Robles Huízar, M. D. S. J. (2016). *Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de metabolitos secundarios obtenidos a partir de pseudomonas aislados de suelos mineros de Fresnillo* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Rodríguez, L. L., Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M., Pichardo, T., Bermúdez-Carballoso, I., & Alvarado-Capó, Y. (2017). Antagonismo in vitro de cepas de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Biotecnología Vegetal*, 17(4).
- Rojas-Rojas, F. U., López-Sánchez, D., Meza-Radilla, G., Méndez-Canarios, A., Ibarra, J. A., & Estrada-de los Santos, P. (2019). El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(1), 84-92. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092018000100095&script=sci_arttext
- Romano, A., Vitullo, D., Di Pietro, A., Lima, G., & Lanzotti, V. (2011). Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7. *Journal of natural products*, 74(2), 145-151.
- Sandoval, R. F. C., & Cumagun, C. J. R. (2019). Phenotypic and molecular analyses of *Rhizoctonia* spp. associated with rice and other hosts. *Microorganisms*, 7(3), 88.
- Sansinenea E., y Ortiz A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*. 33(8), 1523-1538.
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of applied microbiology*, 128(6), 1583-1594.

- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.
- Song, D., Chen, G., Liu, S., Khaskheli, M. A., & Wu, L. (2019). Complete genome sequence of *Burkholderia* sp. JP2-270, a rhizosphere isolates of rice with antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Microbial pathogenesis*, 127, 1-6.
- Suárez-Medina, K., y Coy-Barrera, E. (2016). Diversidad de los Compuestos Orgánicos Bioactivos de Origen Natural: Una Singularidad Manifestada por la Plasticidad en el Metabolismo Secundario. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 252-269.
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., & Hahm, Y. T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian journal of microbiology*, 61(2), 93-103.
- Taechowisan, T.; Lu, C.H.; Shen, Y.M.; Lumyong, S. (2007). Antitumor activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. *Journal of Cancer and Research Treatment* 3(2) 86–91.
- Taksaphorn Changmuang, Potjana Sikhao and Prommart Koohakan. (2017). Isolation and Screening of Endophytic Bacteria against Rice Blast Pathogen. *International Journal of Agricultural Technology* 13(7.1): 1231 - 1244.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.
- Valdez-Nuñez RA, Ormeño-Orrillo E, Torres-Chávez EE, Torres-Delgado J, Ríos-Ruiz WF. (2020). Caracterización genética de bacterias endofíticas de arroz (*Oryza sativa* L.) con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Valent, B. (2004). Plant disease: Underground life for rice foe. *Nature*, 431(7008), 516–517.
- Venkadesan, D. y Sumathi, V. (2015). Detección de bacterias de ácido láctico para su antibacteriana actividad contra los patógenos transmitidos por la leche. *Revista Internacional de Investigación Aplicada*, 1 (11), 970-973

- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. Disponible en:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018533092018000100095&script=sci_arttext.
- Zhi-Lin Y., Yi-Cun C., Bai-Ge X, y Zhang C. (2012). Current Perspectives on the Volatile-Producing Fungal Endophytes. *Critical reviews in biotechnology*. 32.

ANEXOS

Tabla 10

Planilla de registro de datos para la superficie de desarrollo del hongo fitopatógeno en la selección de las cepas

Factores, niveles y tratamientos	Medio	
	TSB	Mineral
SM59 <i>Bacillus subtilis</i>	8,86	5,85
	7,98	4,98
	8,79	5,75
SM3 <i>Bacillus aryabhatai</i>	11,38	13,89
	12,05	13,76
	11,85	14,01
	27,18	29,19
T34-1 <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	26,92	30,27
	26,99	28,84
	30,15	32,89
T34-2 <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	30,48	33,09
	29,98	32,52
	49,11	26,78
T33-1 <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	48,55	26,79
	48,99	27,05

Tabla 11

Planilla de registro de datos para la superficie de desarrollo del hongo fitopatógeno en la producción de metabolitos secundario.

Repetición	Tratamientos				
	SM59	SM3	T34 -1	T34 -2	T33-1
1	44,18	47,64	53,99	55,23	50,15
2	43,98	47,82	54,06	55,12	49,99
3	44,05	47,56	54,62	55,19	50,08