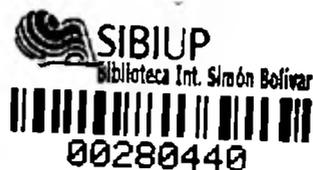


UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
PROGRAMA DE MAestrÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL



“ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
***Burkholderia glumae* y *B. gladioli* EN LAS PRINCIPALES ZONAS**
ARROCERAS DE PANAMÁ”.

Por:
ALEXIS DE LA CRUZ LOMBARDO
Cédula: 8-707-1000

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2015



Título de la Tesis: "Estudio Epidemiológico y Diagnóstico Molecular de *Burkholderia glumae* y *B. gladioli* en las principales Zonas Arroceras de Panamá"

TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Microbiología Ambiental

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:

Doctor Abby Guerra
Presidente

Profesor Humberto Cornejo
Miembro

Profesora Brenda Mayorga
Miembro

REFRENDADO POR:

**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

Agradecimientos y Dedicatoria

Agradezco a Dios Padre Todopoderoso a la Virgen del Carmen, a mi madre, por darme la fortaleza, salud y sabiduría necesaria, para lograr concluir esta investigación, por otro lado debo darle mérito al Dr. Abby Said Guerra Moreno, Jefe del Laboratorio de Biotecnología del Grupo CALESA, y su grupo de colaboradores, por darme la oportunidad de conocerlo como profesional de la investigación, científico dedicado y persona de grandes valores, que fue y será un ejemplo a seguir en su mística por las ciencias; a los profesores Blanca Hernández, Humberto Cornejo, Margarita Cornejo y todos los profesores del programa de la Maestría mil bendiciones.

Dedico el trabajo a todos aquellos deseosos de aprender y descubrir más allá de lo que puede plantear esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	..ii
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN...	vi
SUMMARY .	vii
INTRODUCCIÓN. ..	ix
CAPÍTULO 1: GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1 Antecedentes.	16
1.2 Justificación de la investigación.	.19
1.3 Planteamiento de la problemática.	22
1.4 Hipótesis de investigación.	.23
1.5 Objetivos de la investigación	
1.5.1 General.	23
1.5.2 Específicos .	25
CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Generalidades del cultivo de arroz y la pudrición bacteriana de los granos..	26
2.2 Etapas fenológicas del cultivo de arroz.	.30
2.3 Factores abióticos y bióticos a los cultivos de arroz	...31
2.4 Síntomas de la Enfermedad bacteriana en el arroz..	33
2.5 Epidemiología de la enfermedad.	.34
2.6 Clasificación, características y nomenclatura de <i>Burkholderia spp</i>	.36
2.7 Características fenotípicas de <i>Burkholderia spp</i> .	.37
2.7.1 <i>B. glumae</i> .	..38
2.7.2 <i>B. gladioli</i> .	..39
2.8 Características moleculares de <i>Burkholderia spp</i>	.41
2.9 Métodos fenotípicos de detección e identificación del género <i>Burkholderia</i> en arroz.....	42
2.9.1 Pruebas Bioquímicas para la identificación de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i>	45
2.10 Métodos moleculares de diagnóstico de <i>Burkholderia spp</i>	47

2 11 Virulencia de las Cepas de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .	.49
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Ubicación y delimitación del estudio.	.52
3.2 Diseño del estudio ..	53
3.3 Hipótesis de la investigación.	.54
3.4 Variables del Estudio	54
3.5 Procedimientos..	.55
3.5.1 Etapa de registro, almacenamiento de muestras y tejidos.	..55
3.5.2 Etapa de validación de protocolos para PCR.	.62
3.5 3 Etapa de diagnóstico molecular de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .	64
3.5.4 Pruebas adicionales de identificación..	.65
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y	
DISCUSIÓN.	. 67
CONCLUSIONES.	.92
RECOMENDACIONES.	.96
BIBLIOGRAFÍA	
CONSULTADA.	.99
ANEXOS..	108

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.1: Muestras colectadas de los 4 posibles agentes diseminadores procedentes de las 4 zonas arroceras a nivel de fincas de cultivo de arroz en Panamá.....	56
Cuadro No 2 Registro de Muestras Totales por Etapas Fenológicas obtenidas de los campos en Natá, Coclé.....	57
Cuadro No.3: Muestras de Tejidos (Vaina y Espigas), procedentes de las 3 zonas arroceras en Panamá .	58
Cuadro No.4. Validación de distintos protocolos para la extracción de ADN de los agentes diseminadores, tejidos y optimización del PCR.....	59
Cuadro.5: Preparación del Master Mix para la amplificación de las muestras de ADN obtenidas a partir de los agentes diseminadores, tejidos y etapas fenológicas.....	66
Cuadro No. 6. Registro de muestras totales para posibles agentes diseminadores de las patologías bacterianas por fincas y zonas arroceras.....	70
Cuadro No 7: Registro de las cantidades totales de muestras de tejido obtenidos a nivel de cada zona arroceras para la determinación de las dos patologías bacterianas.....	71
Cuadro No.8: Comparación de los diferentes métodos para la extracción de ADN, a partir de cada posible agente diseminador de <i>B glumae</i> y <i>B gladioli</i>	72
Cuadro No.9: Métodos seleccionados para la extracción de ADN de <i>B glumae</i> y <i>B gladioli</i> , de los posibles agentes diseminadores y de tejidos de cultivos de arroz....	73
Cuadro No.10: Características de las colonias sospechosas de las dos patologías bacterianas obtenidas de los diferentes aislamientos de tejidos de arroz con sintomatología.....	77
Cuadro No.11: Diferenciación Bioquímica de las distintas cepas obtenidas a partir de los aislados de semillas, vainas y espigas.....	79
Cuadro No.12: Diferenciación Bioquímica de las bacterias aisladas de vainas y espigas, de muestras procedentes de Chiriquí.....	80
Cuadro No.13: Ocurrencia de muestras positivas de los agentes diseminadores, para las zonas arroceras en sus respectivas fincas evaluadas para las dos patologías bacterianas.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No 1 Fenología del Cultivo de arroz	32
Figura No.2 Ubicación de las zonas arroceras bajo estudio en la República de Panamá.	53
Figura No.3. Electroforesis de amplicones de regiones universales para procariontas y eucariotas.	74
Figura No.4. Electroforesis de amplicones de regiones universales para procariontas de la región IGS del ARNr, a partir de ADN extraídos de suelo y agua.....	75
Figura No 5 Resultados de PCR, de la región IGS del ARNr en procariontas, a partir de muestras de ácaro.....	75
Figura No.6 Resultados de extracción de ADN a partir de semillas y malezas utilizando los primers de Actina.....	76
Figura No. 7 Proceso de aislamiento de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> a partir de muestras de tejidos y semillas	77
Figura No. 9 Identificación de bacterias aisladas a partir de tejido de espiga con sintomatología para <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i>	83
Figura No. 10 Identificación de <i>B. gladiolis</i> aisladas a partir de tejido de espiga y vainas con sintomatología.....	84
Figura No.11 Identificación de <i>B. glumae</i> aisladas a partir de tejidos de espigas y vainas con sintomatología.....	84
Figura No.12 Determinación de <i>B. gladioli</i> usando los primers específicos (GlaFw – GlaRv, 471 nt).....	85
Figura No.13 Determinación de <i>B. glumae</i> usando los primers específicos (GluFw – GluRv, 528 nt), en la etapa fenológica de semillas.....	87

Figura No 14 Determinación de <i>B. gladioli</i> y <i>B. glumae</i> , mediante electroforesis usando primers específicos.	89
Figura No.15 Electroforesis de muestras de Plántulas, para el diagnóstico de <i>B. gladioli</i>	90
Figura No.16 Electroforesis de muestras de Semilla del campo 922 (CEGRACO), para la determinación de <i>B. gladioli</i>	90
Figura No. 17 Resultados de electroforesis de muestras de la etapa de germinación del campo 922.....	91
Figura No.18 Electroforesis de la etapa de la etapa de plántula, para el campo 922, con resultados positivos para <i>B. gladioli</i> y negativo para <i>B. glumae</i>	91
Figura No.19 Resultados negativos de electroforesis de la etapa de Macollamiento, para el campo 922, para el caso de <i>B. glumae</i>	91
Figura No.20 Resultados negativo de electroforesis para las patologías de <i>B. gladioli</i> y <i>B. glumae</i> , de muestras procedentes del campo 943.....	92
Figura No.21 Porcentaje de presencia de las dos patologías bacterianas, para muestras de semillas y muestras de tejidos (vaina y espigas), en 3 zonas arroceras.....	92
Figura No. 22. Toma y almacenamiento de muestras de agentes diseminadores...	112
Figura No.23 Etapas de aislamiento de las patologías bacterianas (<i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i>).....	113
Figura No. 24 Bacterias aisladas a partir de tejido de espiga con sintomatología para <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i>	113

RESUMEN

Los grandes campos de cultivo de arroz a nivel mundial y en Panamá, reportan para la década de los 90' pérdidas económicas, por la amenaza de la combinación *Spinky* y la asociación de bacterias como *Burkholderia glumae* y *B. gladioli*, provocando el vaneamiento de la panícula. Con el objetivo de evaluar los posibles agentes diseminadores de dos patologías bacterianas: *Burkholderia glumae* y *B. gladioli* y su presencia en tejidos de la planta de arroz en algunas zonas arroceras de Panamá, se tomaron muestras de 5 posibles agentes diseminadores (agua, suelo, maleza, ácaro y semilla), y muestras de tejido de arroz (vainas y espigas), así como algunas etapas fenológicas, de 3 zonas arroceras (Natá, Alanje y Chepo), para determinar la presencia de *B. glumae* y *B. gladioli*, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usando protocolos validados de extracción de ADN, resultando los mejores (método Poutouet *al.*, 2001, Yeates *et al.*, 1998, Desloire *et al.*, 2006, Doyle & Doyle, 1987). Los resultados del diagnóstico molecular, arrojaron mayor ocurrencia de *B. gladioli*, en dos de los 5 posibles diseminadores, como lo fue el ácaro y las malezas, lo que concuerda con la literatura. De las etapas fenológicas, la de semilla presentó mayor ocurrencia de *B. gladioli*, las otras etapas resultaron con muy baja presencia, en las muestras de espigas y vainas se detectó ambas patologías bacterianas. Respecto a la zona arroceras, la de Natá, arrojó mayor ocurrencia, para ambas patologías bacterianas, seguido de la zona arroceras de Alanje, principalmente en los campos 907 y 922. Finalmente, se concluye, que las muestras de agua y suelo resultaron negativas a la presencia de las dos bacterias, mientras que las muestras de ácaro y semillas concuerdan con lo encontrado en la literatura científica de esta línea de investigación, siendo *B. gladioli* la de mayor frecuencia de detección.

SUMMARY

The large fields of rice globally and in Panama, reported for the Decade of the 90' lost economic, because of the threat of *Spinky* combination and the Association of bacteria as *Burkholderia glumae* and *B. gladioli*, resulting in the vaneamiento of the panicle. In order to evaluate the possible disseminating agents of two bacterial diseases: *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* and its presence in tissues of the plant of rice in some rice-growing areas of Panama, samples were taken from 5 possible disseminating agents (water, soil, weed, mite and seed), and rice (sheath and spike) tissue samples, as well as some phenological stages, 3-zone rice cooker (Natá, Alanje and Chepo), to determine the presence of *B. glumae* and *B. gladioli*, using the technique of reaction the polymerase (PCR) chain, using Protocol validated DNA extraction, the following being the best (method Poutou et al, 2001, Yeates et al, 1998, Desloire et al., 2006, Doyle & Doyle, 1987.)

In this regard, the results of the molecular diagnosis of the presence, threw more occurrence of one of the diseases *B. gladioli*, for two of the possible 5 disseminators, as did the mite and weeds, which is consistent with the literature, in the first case, the higher occurrence of both bacteria is attributed to *B. gladioli*; of the phenological stages of seed present greater occurrence of *B. gladioli*, the other stages were with little presence, samples of spikes and pods were detected both bacterial diseases, while the rice area with greater occurrence was cream and subsequently Alanje, resulting 907 and 922 with greater occurrence field.

Finally, it is concluded that potential disseminators water and soil resulted negative to the presence of these two diseases, while mite and seeds reaffirm what was reported in the scientific literature, however *B. gladioli* is reported in this study with the greatest presence.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales rubros agrícolas de sustentación alimentaria a nivel mundial, lo constituye el arroz, Panamá, posee el mayor consumo per cápita de arroz en Latinoamérica., es un producto de importancia para la exportación e importación (La Prensa, 2010)

La seguridad fitosanitaria de este rubro es de importancia, para la década de los 90', sobretudo, con la aparición del complejo ácaro-hongo-bacteria, considerado como una plaga en los países asiáticos de China, Tailandia, Corea, India, Filipinas y Taiwán, provocando daños de vaneamiento y esterilidad de los granos hasta un 70% (Nandakumar *et al.*, 2009). En América Central y el Caribe, se registraron pérdidas entre un 30% a 90%. (Correa, 2006). En el sur de los Estados Unidos, se ha tenido una larga historia del vaneamiento de la panícula en la producción de arroz, cuyo agente etiológico se desconocía, estos reporte de pérdidas de cosecha en un 40% en Louisiana se dio entre 1995 a 1998, atribuyéndose principalmente a factores ambientales como la temperatura, estrés químicos y del agua (Rush *et al.*, 2009). La Federación Nacional de Arroceros, Fedearroz, en Tolima de México confirmó el ataque del microorganismo, *B. glumae*, el cual estaría siendo estimulado por el cambio climático y por las malas condiciones agronómicas de algunos productores (Varón, 2009).

El principal hospedero del ácaro *Steanothersonemus pinky*, es el arroz, reportándose como estrictamente fitófago. Algunas malezas también se han reportado como hospederas. Mientras que en Costa Rica y Panamá se han reportado que el ácaro también completa su ciclo biológico sobre la especie silvestre *Oryza latifolia*. (Castellanos, 2001)

Esta problemática, de la baja producción de arroz, fue reportada por primera vez en Panamá, en el año de 2003, con la asociación del ácaro y el hongo *S. oryzae*; para el 2004, las pérdidas llegaron a ser del 60%, provocando un impacto económico para el país (Rolim, 2006).

patógenas del arroz: *Burkholderia glumae* y *B. gladioli*, en algunas zonas arroceras de Panamá.

En los últimos años, los grandes campos de cultivos agrícola de arroz a nivel internacional y en Panamá, han sufrido serias pérdidas anuales, constituyéndose en una grave problema socioeconómico, por la amenaza principal de *S. spinki*, hasta ahora reportado en las investigaciones como el agente causal de las pérdidas en las fincas arroceras (Mendoza, 2004).

Recientemente, se encontró que las bacterias, *B. glumae* y *B. gladioli*, resultaron predominantes y afectaron severamente los cultivos de arroz, atacando los órganos aéreos de la planta entre ellos las hojas, frutos, peciolos, pedúnculo y cáliz (Hevesi *et al.*, 2001). De acuerdo a Nalimova y García (2007), las semillas de arroz constituían la principal vía de transmisión de estas bacterias. Toda esta sintomatología fue llamada el vaneamiento de la panícula, y se ha presentado en varios países como Estados Unidos, Japón y Corea, con un incremento en los últimos años (Viallard *et al.*, 1998).

El presente trabajo está estructurado en un primer capítulo , que aborda las generalidades de la investigación, donde plasmamos los antecedentes, la justificación, se plantean los objetivos y la problemática central, así como la hipótesis de trabajo; en el segundo capítulo, se hace una revisión bibliográfica, donde señalamos las generalidades del cultivo de arroz a nivel mundial, y su asociación con el problema de la producción bacteriana de los granos de arroz, los principios teóricos de diagnóstico de estas patologías bacterianas que afectan este rubro; en un tercer capítulo los materiales y métodos, donde se desarrollan cada uno de los protocolos que se usaron para el diagnóstico fenotípico y molecular de estas dos patologías bacterianas; un cuarto capítulo donde se plasman los hallazgos y resultados encontrados y la ocurrencia de estas patologías a través de los posibles diseminadores y etapas del cultivo de arroz, finalmente el quinto capítulo que recoge las conclusiones y recomendaciones de esta investigación, y los anexos que evidencian el trabajo realizado durante esta investigación. **El objetivo de este trabajo fue identificar los posibles agentes diseminadores de dos bacterias**

Capítulo 1

GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

Es importante señalar, que uno de los más grandes problemas fitosanitarios para la década de los noventa, a nivel mundial de los cultivos de arroz, lo fue el complejo ácaro-hongo-bacteria, considerado como una plaga en los países asiáticos de China, Tailandia, Corea, India, Filipinas y Taiwán, provocando daños de vaneamiento y esterilidad de los granos hasta un 70% (Nandakumar *et al.*, 2009).

En América Central y el Caribe, se registraron pérdidas entre 30 y hasta 90 (Correa, 2006). En el sur de los Estados Unidos, se ha tenido una larga historia del vaneamiento de la panícula en la producción de arroz, cuyo agente etiológico se desconocía, estos reportes de pérdidas de cosecha en un 40% en Luisiana, se dio entre 1995 a 1998, atribuyéndose principalmente a factores ambientales como la temperatura, estrés químicos y del agua (Rush *et al*, 2009) La Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz), en Toluca de México, confirmaron el ataque del microorganismo, *Burkholderia glumae*, el cual estaría siendo estimulado por el cambio climático y por las malas condiciones agronómicas de algunos productores de arroz de la región (Varón, 2009).

En América Central y El Caribe, la producción de arroz se vio afectada por la aparición de la plaga del acaro; desde entonces la enfermedad de la pudrición de granos en cultivos de arroz, se ha reportado en República

Dominicana, Haití, Costa Rica, Colombia, Nicaragua, Venezuela, Guatemala, Honduras, México y Puerto Rico (Quintero, 2003).

La podredumbre bacteriana del grano o panícula del arroz, así llamada , se reportó en Japón, principiando la década de los cincuenta, con problema sobre las hojas y espigas, provocando aborto, esterilidad y decoloración de las semillas (Sayler *et al.*, 2006).

Mientras que en Colombia, se presentó una cuarentena de un campo de arroz afectado por la bacteria *B. glumae* (Suárez, 2009). En otros países como Venezuela y Ecuador, se ha comprobado que las semillas no certificadas, son los agentes diseminadores de la bacteria.

Así el estado de Luisiana, Estados Unidos, se presentó la enfermedad del vaneamiento de la panícula de arroz, donde se aislaron dos bacterias *B. glumae* y *B. gladiolis* (Correa, 2006; Urakami *et al.*, 1995; Yuan, 2004).

En tanto que el problema del vaneamiento del arroz, causado por *B. glumae*, se ha convertido en un serio problema en China, desde el año de 1955, y el mismo se ha reportado en la producción de arroz alrededor del mundo (Nadankumar y Rush, 2007).

En el Sur de Corea, la presencia de *B. glumae*, ha sido prevalecte durante periodos de altas temperaturas, debido principalmente al calentamiento global, con incrementos de temperaturas climáticas de 32 a 36 grados centígrados, hasta arriba de 41 grados centígrados, en estos países el incremento de las condiciones de humedades, olas de calor, largos periodos de lluvias, y tormentas como huracanes, favorecen las altas tasas de multiplicación y ataque de estas bacterias (Schaad, 2008).

Igualmente, se menciona que esta bacteria causó estragos en los campos de arroz en Bengala, finalizando la década de los noventa, con una reducción de acres de arroz, a raíz de esto se realizó una investigación en los campos de Luisiana, con unas variedades resistentes a las bacterias, los experimentos consistieron en inocular la bacteria *B. glumae* en tres variedades : Bengala, Júpiter y Trenasa, a campos arroceros durante el 2005 y 2006, resultando la variedad Júpiter con una resistencia parcial (Rush *et al* , 2007).

Sin embargo, el principal hospedero del ácaro *S. spinky*, es el arroz, reportándose que es estrictamente fitófago. Algunas malezas también se han reportado como hospederas. Mientras que en Costa Rica y Panamá se han reportado que el ácaro también completa su ciclo biológico sobre la especie silvestre *Oryza latifolia* (Castellanos, 2001). En Panamá, se realizaron algunas evaluaciones de semillas y vainas, con el problema del complejo, en la que el ácaro no se halló, sino que se aisló la bacteria *B. glumae* (Correa, 2006).

Esta problemática, de la baja producción de arroz, fue reportada por primera vez en Panamá, en el año de 2003, con la asociación del ácaro y el hongo *S. Oryzae*. Para el 2004, ya las pérdidas llegaron a ser arriba del 60%, provocando un impacto económico de mucha importancia para el país (Correa, 2006)

1.2 Justificación de la Investigación

En los últimos años, los grandes campos de cultivos de arroz a nivel internacional y en Panamá, han sufrido serias pérdidas anuales, constituyéndose en un grave problema socioeconómico, por la amenaza principal del ácaro *S. spinki*, hasta ahora reportado en las investigaciones como el agente causal de las pérdidas en las fincas arroceras (Mendoza, 2004).

Recientemente, se encontró que las bacterias, *B. glumae* y *B. gladioli*, resultaron predominantes y afectaron severamente los cultivos de arroz, atacando los órganos aéreos de la planta entre ellos, las hojas, frutos, peciolo, pedúnculo y cáliz (Hevesi *et al.*, 2001). De acuerdo con Nalimova y García (2007), las semillas de arroz constituían la principal vía de transmisión de estas bacterias. Toda esta sintomatología, fue llamada como el vaneamiento de la panícula, y se ha presentado en varios países como Estados Unidos, Japón y Corea, con un incremento en los últimos años (Viallard, *et al.*, 1998).

En este mismo sentido, se detectaron problemas durante los procesos de floración y germinación del grano de arroz, con la presencia de la melioidosis, no asociado al ácaro, indicando que estas bacterias podrían estar contribuyendo al problema de la baja producción de este rubro y que pudiera estar relacionados a otros factores de transmisión de estos microorganismos (Balandreau *et al.*, 2001). De acuerdo con Saylor *et al.*, (2005), muestras de granos y vainas presentaron síntomas que permitieron identificar a la bacteria *B. glumae*, como el agente causal, con la producción de toxinas, que causó taponamiento de los haces vasculares y marchitamiento de la planta. Igualmente un estudio en la India, reportó que los granos de arroz infectados por ácaros presentaron un aspecto descolorido o manchado, en una asociación compleja con una serie de hongos patogénicos como *S. oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Curvularia lunata*, *Alternaria padwickii*, asociados con la bacteria *B. glumae* (Correa, 2006).

B. gladioli, se ha visto asociada principalmente en agua y suelo con alta humedad lo que pudiera ser un indicio de un vehículo transmisor de esta, y se han encontrado en otros tipos de cultivos tales como el maíz y cebolla (Dobereiner, 1993).

Las manifestaciones fitopatológicas, por las bacterias *B. glumae* y *B. gladioli*, pueden ser detectadas en semillas o tejidos infectados, a través del uso de medios bacteriológicos tradicionales selectivos o mediante el uso de primer o cebadores, usando la técnica de PCR (Sánchez *et al.*, 2002).

Nandakumar, (2009), correlacionó las bacterias arriba mencionadas, con las sintomatologías del vaneamiento de la panícula (manchado de la hoja), como el principal problema de las enfermedades presentes en el sureste de los Estados Unidos. Este estudio reportó que las afectaciones se presentaron en granos, hojas y espigas, colectados en campos de Luisiana, Arkansas, Texas y Mississippi.

Un estudio en Luisiana, que consistió en la evaluación fitopatológica, en donde aplicaron, inóculos bacterianos a 362 plantas de arroz, de los cuales 292 de estos, resultaron positivas para las cepas de *B. glumae* y *B. gladiolis*, en semillas, usando la técnica de PCR (Rush, 2009).

De acuerdo con recientes estudios, el agua y el suelo podrían ser considerados como posibles agentes diseminadores, sin embargo, se ha encontrado en plantas, en un papel benéfico, como también fitopatológico, por lo que el diagnóstico molecular mediante PCR, se hace necesario. (Yeates, *et al.*, 1997; More *et al.*, 1994).

La epidemiología tanto de *B. glumae* y *B. gladioli*, permitirá establecer de manera precisa donde y cuando se presenta este problema con el arroz, tomando en cuenta los factores ambientales diseminadores y las etapas fenológicas del cultivo. La conveniencia de este trabajo investigativo, es que, con los datos que se generen se podrá desarrollar en un futuro un programa de prevención y control de

estas dos patologías, en los diferentes campo de cultivos, lo que pudiera significar un aumento en la producción anual de arroz

1.3 Planteamiento de la Problemática

En Panamá se siembran anualmente 400,000 hectáreas de arroz, situados en las zonas de Chiriquí, Coclé, Veraguas, Herrera y Panamá principalmente. Pero en el 2004, muchos de estos campos se vieron seriamente afectado por el ataque de la plaga del ácaro *S. spinky*. Con pérdidas arriba del 60%, en donde posteriormente, se aislara, el verdadero agente etiológico, asociado en el complejo acaro-bacteria, en este caso la bacteria *B. glumae* (Hummel *et al.*, 2009).

Desde la perspectiva fitosanitaria, Panamá era vulnerable a esta bacteria emergente, el cual ya había sido reportado en otros países, sin embargo no se tenían conocimiento de la misma, ya que las zonas arroceras panameñas, son propicias por las condiciones ambientales, y debido a la falta o desarrollo de un efectivo programa fitosanitario de erradicación y control de esta enfermedad.

Ante lo anteriormente señalado y todo lo relacionado con el problema de la baja producción de arroz, nos avocamos en determinar la principal meta de esta investigación que es evaluar los posibles agentes diseminadores de dos patologías bacterianas: *Burkholderia glumae* y *B. gladioli* y su presencia en tejidos de la planta de arroz en algunas zonas arroceras de Panamá. Lo que servirán para un posterior programa de control fitosanitario más específico en cultivo de arroz.

1.4 HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación está dirigida a encontrar si existe una relación en la asociación entre *B. gladiolis* y *B. glumae* con 5 posibles agentes diseminadores (agua, suelo, maleza, ácaro y semilla), así como la relación de la presencia o ausencia de estas dos patologías bacterianas durante las distintas etapas fenológicas del cultivo de arroz, a nivel de algunas zonas arroceras de Panamá.

1.5 Objetivos de la Investigación

1.5.1 General:

Identificar los posibles agentes diseminadores de dos patologías bacterianas: *Burkholderia glumae* y *B. gladioli*, en algunas zonas arroceras de Panamá.

1.5.2 Específicos:

- 1.5.2.1 Diagnosticar molecularmente mediante PCR, la presencia de *B. glumae* y *B. gladioli* en muestras ambientales de agua, suelo, semillas de arroz, malezas y ácaros del genero *Spinky* colectadas de zonas arroceras.
- 1.5.2.2 Validar los protocolos de extracción y amplificación ADN de muestras ambientales, y el diagnóstico molecular de *B. glumae* y *B. gladioli*.

- 1.5.2.3 Diagnosticar molecularmente mediante PCR, la presencia de *B. glumae* y *B. gladioli* en tejidos (vainas y espigas) del cultivo de arroz
- 1.5.2.4 Caracterizar cepas nativas de *B. glumae* y *B. gladioli*, aisladas de las muestras ambientales, a través de pruebas bioquímicas y moleculares.

CAPÍTULO No.2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades del cultivo de arroz y la pudrición bacteriana de los granos

El arroz (*Oryza sativa L*) es considerado como uno de los más importantes alimentos a nivel mundial (Lu & Chang, 1990; Subudh *et al.*, 2006). Aunque América Latina y el Caribe sólo contribuyen con cerca del 3.9% de la producción mundial, el arroz representa para la región un sustento económico y alimenticio (Zea, 2009). El arroz, junto con el trigo y el maíz, proveen alrededor de dos tercios de la energía en las dietas y son la base de la alimentación de la humanidad.

El arroz es un cultivo que presenta una gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, lo que lo ubica como el de mayor difusión mundialmente. En la actualidad el arroz se cultiva mediante cuatro agro ecosistemas principales denominados, arroz irrigado, arroz de secano, arroz de tierras bajas lluviosas y arroz de tierras inundadas. Aproximadamente el 55% del arroz sembrado en el mundo, pertenece al agro ecosistema de arroz irrigado, representando el 75% de la producción mundial (Quintero, 1990).

El arroz desempeña un papel estratégico para la región tanto a nivel económico como social, sin embargo existen factores bióticos y abióticos que afectan los rendimientos del cultivo, representando una amenaza para la seguridad alimentaria (Da. Silva, 2001).

Es importante señalar, que uno de los más grandes problemas fitosanitarios para la década de los noventa, a nivel mundial de los cultivos de arroz, lo fue el complejo

ácaro-hongo-bacteria, considerado como una plaga en los países asiáticos de China, Tailandia, Corea, India, Filipinas y Taiwán, provocando daños de vaneamiento y esterilidad de los granos hasta un 70% (Nandakumar *et al.*, 2009). En América Central y el Caribe, se registraron pérdidas de este rubro entre un 30 y hasta un 90% (Correa, 2006).

Panamá, es uno de los países con mayor consumo per cápita de arroz, la cual debe estar cerca de 165 lb. de arroz por persona por año, con 65 mil 672 hectáreas, no solo en América Latina sino a nivel mundial, (MIDA, 1990). El grano de arroz constituye el principal rubro de la canasta básica panameña, provee el 14% de la dieta energética y el 12% de la dieta proteínica de la población (Revista Arroz, 2005).

Para el 2004, la producción de arroz en Panamá, se vio altamente afectada por la aparición del ácaro *S. spinky*, plaga que bajó drásticamente su producción a un 70.4% (Hevesi *et al.*, 2001). Por otro lado la aparición del ataque de los ácaros coincidió con condiciones de altas temperatura y contenido de humedad, las cuales favorecieron el desarrollo de bacterias, entre ellas *B. glumae* y *B. gladiolis*, que se han asociado en varios estudios, como las bacterias que afectan de manera severa los cultivos de arroz (Nalinova & García, 2007). En este mismo sentido Giulia *et al.*, (2007), reportaron a *B. glumae* como un patógeno emergente del arroz en varias partes del mundo.

Mientras que en el sur de los Estados Unidos, se ha tenido una larga historia del vaneamiento de la panícula en la producción de arroz, cuyo agente etiológico se desconocía, estos reportes de pérdidas de cosecha en un 40% en Luisiana se dio entre

1995 a 1998, atribuyéndose principalmente a factores ambientales como la temperatura, estrés químicos y del agua (Rush *et al*, 2009) Por otra parte la Federación Nacional de Arroceros(Fedearroz), en Tolima de México confirmó el ataque del microorganismo *B. glumae*, el cual estaría siendo estimulado por el cambio climático y por las malas condiciones agronómicas de algunos productores de arroz (Varón, 2009).

El vaneamiento de la panícula o espigas, ha sido un problema esporádico de mucha importancia, en el sureste de la producción arroceros de Estados Unidos. Similares sintomatología se han designado para esta patología como: vaneado de la oreja, decoloración de los granos, los cuales se atribuyeron a hongos como agentes causales (Lee, 1992). Específicamente este problema se caracteriza por una decoloración del grano y la panícula, con distintas lesiones (Lee, 1992b). La sintomatología es caracterizada por presentar un color chocolate oscuro o decoloración, afectando la floración y causando aborto de los granos de arroz, cuando la enfermedad es severa, esto hace que los granos no se llenen. En 1996, que se reconoció a *B. glumae* como el agente causal del síndrome del vaneado de la espiga (Rush, 1998; Shahjahan, 1998, 2000a, 2000b.).

De acuerdo con Suquilanda, (2003), en sus diferentes estados fenológicos (germinación, etapa de plántula, macollamiento, máximo macollamiento, primordio floral, desarrollo de la panícula, etapa floral grano lechoso, grano pastoso y grano maduro o maduración), el cultivo de arroz puede verse afectado por insectos, ácaro, patógenos como bacterias, virus, hongos y vertebrados como pájaros y ratas; de no

manejarse adecuadamente pueden volverse una plaga y causar serios deterioros al cultivo

La aparición de *B. glumae* sugiere a esta bacteria como el tercer componente del complejo, siendo el ácaro-hongo, el primer y segundo componente respectivamente, apoyando su identificación como complejo ácaro-hongo-bacteria (Prado *et al.*, 2009). En años anteriores, *B. glumae* fue reportada asociada a daños causados por el ácaro *Spinki* en India. Sin embargo en los campos de ese país, en donde se presentó la enfermedad no se encontró al ácaro, solamente a la bacteria (Correa, 2006).

Rush & Shahjahan (1998) revelaron que *Burkholderia glumae*, llamada antes *Pseudomonas glumae*, fue el agente causal del vaneado de la panícula de cultivos de arroz que se presentara en Luisiana y estados adyacentes.

Esta enfermedad ha sido reportada en varios países alrededor del mundo, incluyendo Corea (Jeong *et al.*, 2003), Taiwán (Chien & Chang, 1987), en América Latina (Zeigler *et al.*, 1997), Vietnam (Trung *et al.*, 1993), Philippines (Cottyn *et al.*, 1996) y en el Golfo de México (Rush, *et al.*, 1998).

Está claro que esa enfermedad, tiene sus desventajas en la economía mundial, las consecuencias directa en el campo de la agronomía, trae el daño de muchos campos de cultivos, reduciendo su potencial agrícola a un 75%, en donde se observa esterilidad de las flores, pérdida de peso en los granos, inhibición de la germinación de las semillas, como la transmisión de los agentes de semillas en semillas.

En los últimos años, los grandes campos de cultivos agrícolas de arroz a nivel internacional y en Panamá, han sufrido serias pérdidas anuales, constituyéndose en un grave problema socioeconómico

2.2 Etapas Fenológicas del Cultivo de Arroz:

La fenología o etapas de crecimiento de la planta de arroz, se divide en tres fases, los cuales son (ver figura No.1):

2.2.1 La Fase Vegetativa que comprende la germinación, etapa de plántula, macollamiento y máximo macollamiento, esta fase tiene una duración de 44 a 51 días

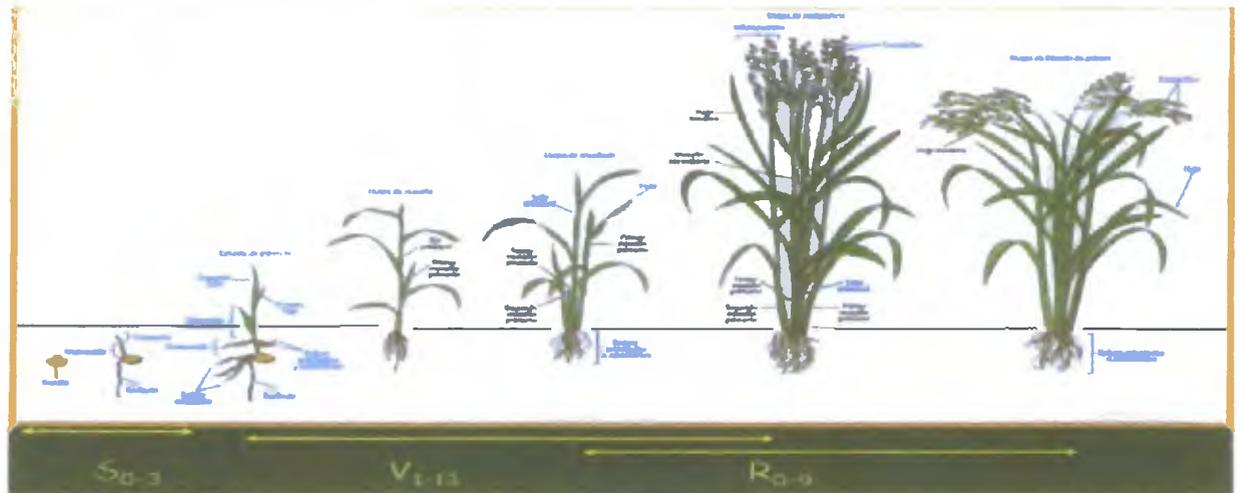
2.2.2 La Fase Reproductiva que comprende la etapa de inicio de primordio floral, el desarrollo de la panícula, y la etapa de floración, esta fase tiene una duración de 31 días aproximadamente.

2.2.3 La Fase de Maduración (llenado de granos), que comprende la etapa de grano lechoso, grano pastoso y grano maduro o maduración, suelo durar 30 días (Hernández, 2007).

Los componentes que determinan el rendimiento son el desarrollo de la panícula, el porcentaje de espiguillas llenas y peso de los granos. El principal componente que afecta el rendimiento es el número de panojas por superficie, que se establece durante el periodo vegetativo. En esta etapa el nitrógeno es fundamental para lograr un alto macollaje y acumulación de biomasa, el tamaño de la panoja es determinado durante el periodo reproductivo y el peso de los granos durante el llenado. Los estreses bióticos y

abióticos en los distintos periodos reducen los rendimientos, sin embargo el periodo reproductivo es considerado el más sensible y las limitaciones en esta etapa causan los mayores perjuicios (Fageria, 2007).

Figura No1: Fenología del Cultivo de arroz



Fuente: Quintero, 2007

2.3 Factores Abióticos y Bióticos asociado a los cultivos de arroz:

El arroz es un cultivo que presenta una gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, lo que lo ubica como el de mayor difusión en el mundo. El cultivo puede desarrollarse en condiciones de secano, inundación, se cultiva a 3000 msnm, puede adaptarse a las diferentes áreas de implantación, ajustándose a múltiples condiciones de adversidad ambiental.

Tradicionalmente el arroz, ha sido cultivado por inundación, siembra directa con maquinaria sobre suelo seco, existen muchos factores bióticos y abióticos involucrado en la transmisión de patologías microbianas que pueden afectar la producción de

arroz, uno de los más estudiados es el ácaro del vaneó, que ataca de manera exclusiva este rubro, descrito por primera vez por Smiley en 1967, en el Estado de Luisiana, E.U.A. Actualmente está reportado en países de Asia entre ellos China y Taiwán, de donde proceden los primeros registros. En Centroamérica se presentó en Cuba, República Dominicana, Haití, Nicaragua, Honduras, Guatemala, Costa Rica y Panamá. (Hernández, 2007). Los daños ocasionados por el ácaro, son al momento de la alimentación, por la extracción del contenido de las células de la vaina de las hojas, produciendo necrosis y muerte del tejido, así como la parte central de este trabajo, el atribuirse la transmisión de fitopatógenos.

Es importante señalar aquí que las condiciones que favorecen la presencia de estos ácaros son el clima cálido y húmedo, con temperaturas elevadas (superior a 25°C). Hay reportes que concluyen que periodos secos seguidos de lluviosos durante las fases de crecimientos son factores que merman la producción de este rubro, y principalmente las etapas de embuchamiento y granos lechosos donde se presentan los problemas (Quintero, 2008).

Hay diversos factores abióticos asociado a la transmisión del ácaro y por supuesto los fitopatógenos, entre ellos están los fuertes vientos, a través de las aguas de riego, las malezas asociadas a los cultivos, los equipos agrícolas, los trabajadores, las aves migratorias y otros insectos (Hernández, 2007).

En los siguientes apartados se tratara la parte medular que sostiene este estudio investigativo, en donde, ya se tiene evidenciado en estudio previos que el agente

causal del problema del vaneamiento de la panícula es el agente microbiano perteneciente al género *Burkholderia spp*

2.4 Síntomas de la Enfermedad Bacteriana en el Arroz.

Los síntomas de esta enfermedad, fueron observados en la epidemia reportada en Luisiana, EEUU, en las hojas de las semillas, en las espigas, describiéndose a nivel de las raíces, con lesiones necróticas con márgenes de color chocolate, es decir lesiones verticales rodeados con márgenes oscuros chocolates alrededor, con decoloraciones que van de un grisáceo a un color oscuro, se da una esterilidad y un vaneamiento de la semilla (Yuan, 2004). La bacteria *B. glumae*, es productora de una fitotoxina llamada toxoflavina, que es esencial para la virulencia, cuando no se produce la toxoflavina la bacteria se hace avirulenta (Chien, 1987; Saylor, 2006, Tsushima, 1995)

La enfermedad se caracteriza por que en la parte de arriba de la panícula, hay una decoloración que contiene las flores con una base de color oscuro y unos márgenes rojizos chocolates que cruzan las flores entre el área oscura y el área decolorada, lo que resulta en el aborto de las mismas, esto afecta severamente las espigas y los granos no se llenan completamente. Varias bacterias se han propuesto son causantes de estos síntomas. Las bacterias están distribuidas en dos géneros taxonómicos y fisiológicos, que son *Pseudomonas* y *Burkholderia*. La *B. glumae* causas síntomas parecidos en el arroz. Esto se le atribuye también a *Pseudomonas avenae* (Ohuchi, 1993). Otras bacterias que causan síntomas similares son *P. syringae* y *P. fluorescens*.

2.5 Epidemiología de la Enfermedad

Los patógenos de plantas se encuentran de manera ubicua, en el aire, suelo y agua. La distribución en el suelo de estos patógenos se afectan por el tipo de suelo, valor de pH; cultivo de plantas y cualquiera otra condición. Se ha establecido que los patógenos bacterianos coexisten en la rizófera (Rush, 2009)

Para que la enfermedad se pueda manifestar, se toman en cuenta factores como: el inoculo bacteriano, la susceptibilidad del hospedero, factores abióticos como el clima y la patogenicidad del microorganismo, que juegan un rol importante (Tsuschima, 1996).

Esta enfermedad tiende a desarrollarse bajo condiciones de altas temperaturas, especialmente durante las noches, con frecuentes lluvias (Álvarez, 1990). A partir de 1995 a 1998, se presentaron severas incidencias del vaneamiento en Luisiana como también al sureste de áreas productoras de arroz en Los Estados Unidos, con el 40% de pérdidas en los campos (Shahjahan, 2000). Otro factor que favoreció la aparición de la enfermedad lo fue los altos niveles de humedad, en el estado de afloramiento en Louisiana de los Estados Unidos, siendo el más susceptible estado de infección en la emergencia de la panícula (Hikichi, *et al.*, 1994).

El término **panicle blight**, ha sido usado en Los Estados Unidos por más de 50 años, y es el nombre de esta enfermedad. (Nandakumar, 2008; Sayler, 2006; Shahjahan, 2000).

Esta enfermedad ha causado severas pérdidas en los tres últimos años, en países como Cuba, Haití y en República Dominicana, cuyo daños también se atribuyeron al ácaro **Spinki** (Bernal *et al.*, 2002)

La amplia distribución mundial de esta enfermedad, en donde los estudios epidemiológicos, la etiología y el control de esta enfermedades, han puesto la atención en la patología de la planta de arroz. De acuerdo con S.H Ou (1995), la bacteria del vaneado de la panícula y la raíces se presentó primero en Hungría, y la misma fue descrita causada por *Pseudomona oryzicola*, que fue sinónimo de *Pseudomonas syringae pv. Syringae*. Luego de investigaciones en Japón analizando las raíces de arroz, encontraron daños que fueron reportados causados por bacterias como *B. glumae* (Schaad, 2008).

Se reportaron cepas resistentes de *B. glumae*, al tratamiento químico de control con ácido oxolínico, aisladas de arroz en Japón, sin embargo el uso de este tratamiento no ha sido aprobado en Los Estados Unidos, en este contexto el uso de semillas libres de patógenos es una práctica para reducir o manejar la incidencia de esta enfermedad (Hikichi *et al.*, 2001).

Es importante señalar que el vaneamiento de la panícula causada por *B. glumae*, constituyó un serio problema de los cultivos de arroz en Japón, desde 1955. En Panamá, se han asociado las pérdidas de las cosechas de arroz debido a la asociación de esta enfermedad con el cultivo (Nandakumar, 2007)

El Instituto Agrícola Colombiano (ICA), cercó un cordón sanitario de 3,000 hectáreas de arroz en el departamento de Huila, la cual había sido afectada por la bacteria *B. glumae*. Esta bacteria también se presentó en América Central y países de América del Sur (Suarez, 2008). Igualmente semillas de Venezuela y Ecuador, fueron evaluadas por la bacteria, las cuales fueron puestas en vigilancia (Cottyn *et al* , 2009).

2.6 Clasificación, Características y Nomenclatura de Burkholderia spp.

Existe muchas bacterias patógenas que afectan a las plantas como *Ralstonia*, *Acidovorax*, y *Burkholderia spp.*, que han sido un serio problema a nivel mundial, una de las más perjudiciales es *R. solanacearum*, que atacan otros cultivos distintos del arroz. *B glumae* se ha convertido en una bacteria emergente, reportado en el sureste de Estados Unidos y ahora de manera prevaleciente en el Sur de Korea, durante periodos de altas temperatura (Norman, 2007).

Se han asociado perteneciendo en un tiempo al género de *Pseudomonas sp.*, como patógenos de plantas, de acuerdo a Burkholder , en los años de 1921 *Pseudomonas gladiolis* se identificó como el agente causal de los síntomas del gladiolos de las

flores, posteriormente se describió una nueva cepa bacteriana que afecta la piel y raíces de las cebollas , llamada *Pseudomona cepacia*.

Recientemente se confirmó que *B. cepacia* y *B. gladioli* pueden producir problemas asociados con la salud del hombre, el género *Burkholderia* no se estableció, sino hasta 1992, en donde se propuso la agrupación de las siete especies de *Pseudomonas*, por su homología al nuevo género (Yabuuchi, 2000). Los patógenos de arroz, incluyen a *P. avenae*, *P. fuscovaginae*, *P. syringae*, *B. glumae*, *B. plantari* (Cheng *et al.*, 2003)

2.7 Característica fenotípicas de *Burkholderia spp*:

Las especies bacterianas pertenecientes al género de *Burkholderiaspp.* , son reconocidas por su patogenicidad tanto en plantas como en las persona, sin embargo, también se reconoce los detalles de su patogenicidad y su capacidad de adaptación a un hospedero potencialmente susceptible.

Un examen de la morfología colonial de las especies de *Burkholderia*, podría no ser distinguible, sin embargo todas las especies, forman colonias convexas con márgenes enteros o márgenes cerrados; en agar King B, liberan un pigmento amarillo, muchas colonias toman una coloración blancuzca grisácea a blanco cremoso.

271 *B. glumae*

Fue reconocida como patógeno de cultivo de arroz en el género *Pseudomonas spp.*, y es considerada como el agente causal de los daños a la germinación, raíces y semillas de arroz en Japón. Los típicos síntomas son el aspecto de líneas chocolates en el margen de las hojas del arroz, la decoloración (Cottyn *et al.*, 1996). *B. glumae* es una bacteria no fluorescente que produce un pigmento amarillo verdoso soluble en varios medios. Es un bacilo, Gram negativo con uno a 3 flagelos polares. Su crecimiento se expresa con colonias de color blanco grisáceo o amarillo debido al pigmento. Desde el punto de vista de su caracterización bioquímica, es negativa a la arginina dihidrolasa, oxidasa y la reacción de reducción de nitrato. Produce lecitinasa y es positivo a la L- arginina e inositol.

B. glumae causa la enfermedad a las semillas, y su emergencia ha estado por 10 años como una importante bacteria patógena de arroz en Japón, Corea, Taiwán y Estados Unidos (Sayler *et al.*, 2006).

La identificación de bacterias patógenas basada en la morfología colonial o síntomas de la enfermedad es muy difícil y consume tiempo, sin embargo la identificación puede y debiera ser confirmada con dos o más métodos de detección, para su validación (Salm, 2004). Muchas pruebas bioquímicas, fisiológicas y patológicas se han usado para identificar y caracterizar bacterias patógenas de plantas (Schaad, 2001). Estos métodos no identifican al patógeno en

la planta y requiere de cultivo puro, sin embargo los métodos moleculares como el PCR convencional y PCR en tiempo real, que es una técnica bien sensible, permiten identificar y cuantificar patógenos tanto en cultivos como en la planta (Kokkinos *et al.*, 2006; Lehman, 2008).

2.7.2 *B. gladioli*

B. gladioli es una bacteria de amplia distribución, y se ha aislado de suelo, agua, raíces de plantas, en la rizófera, y también en pacientes hospitalizados (Segonds, *et al.*, 1999). Pueden colonizar superficies de arroz, maíz y girasoles. En nichos naturales coexisten con otras bacterias como *B. glumae*, o pueden estar en la forma híbrida, estas formas híbridas juegan un papel importante en los procesos de patogenicidad (Baxter *et al.*, 1997).

B. gladiolis, es una β -proteobacteria, que fue inicialmente identificado como un patógeno de gladiolus (Matsuyama, 1998). Luego se le asoció con enfermedades en otras plantas, como cebollas, tulipanes, y arroz.

Cheng *et al.*, (2001), revelaron que *B. gladioli* fue una de los agentes causales del fenómeno del vaneamiento del arroz en Louisiana. En Japón, los síntomas de la infección del arroz, fue reportado como una necrosis o manchas cloróticas en las hojas (Furuya *et al.*, 1997), donde revelaron que esta bacteria tiene una amplia variedad de hospederos.

B. gladioli, originalmente conocida como *Pseudomonas gladioli*, fue descrita como una bacteria fitopatogénica. Luego de estudios de hibridación ADN-ADN, se propuso finalmente, el nombre de *B. gladioli*, esta bacteria tiene tres patovares y son principalmente bacterias fitopatógenas, ellas son: *B. gladiolipatovar gladioli*, *B. gladiolipatovar allicolay* *B. gladiolipatovar agaricicola* (Yabucchi, 2002).

Son bacterias Gram negativas, que responde a la oxidasa e indol de manera negativa, no producen fluorescencia en agar King B, con colonias blancas no mucosa en agar YDC. Es característico en estas bacterias cuando crecen en agar King B, el color amarillo o blanco grisáceo de las colonias. Son positivas a las reacciones de hipersensibilidad en hojas de tabaco, crecen aeróbicamente y reducen nitratos, poseen actividad B galactosidasa, B- glucosidasa y proteasa, y utilizan la D- arabinosa, ácido caproico, usan la esculina, gelatina, glucosa, arabinosa, D manosa, D-manitol, N acetil glucosamina, gluconato, caproato, malato, citrato, ácido fenil acético, citrato trisodium y gluconato de potasio (Schaad, 2001). Todas las cepas de *Burkholderia* no fermentan la glucosa u otro carbohidrato, tienen actividad positiva respecto a la arginina dihidrolasa y actividad de la ureasa son incapaces de usarlo.

2.7 Características Moleculares de *Burkholderia*

Las especies de *Burkholderia* están ampliamente distribuidas en la naturaleza, recientemente las investigaciones han evaluado el gene *recA*, para identificar a estos géneros, que están muy estrechamente relacionados (Alicce, *et al* , 2006)

Los genes de ARN ribosomales de las bacterias, especialmente el ARNr 16S y el ARNr 23S, son excelentes marcadores moleculares para los estudios de filogenia, porque son constantes, altamente distribuidas y regiones conservadas, con regiones variables dentro de la secuencia (Ludwing *et al* , 1998), esto permite identificar cepas puras aisladas y verificar la diversidad entre las bacterias. Lo que ha permitido disponer de más de 16,000 secuencias parciales completas y que se encuentran en el banco de datos de NCBI. (Park *et al.*, 2008)

La diversidad de especies de *Burkholderia*, se ha trabajado usando el análisis del ARNr 16S, para su definición taxonómica, usando la alta especificidad de los primers, lo que proveen información para los análisis de distancia filogenética y relaciones entre los microorganismos (Maeda *et al.*, 2006).

Es importante señalar que el grado de resolución con el análisis de la secuencia genética no es lo suficientemente discriminatorio, lo que es necesario la evaluación de la región intergénica, los genes codificados por *Burkholderias* son

la subunidad β , Del polipéptido de girasa (*gyrB*) y el factor σ (*rpoD*), que se estima está relacionado con el gen del ARNr 16S) (Yamamoto & Harayama, 1998).

En caso de una estrecha relación filogenética, hay una gran información contenida en el espacio intergénico del operón ADN_r (IGS) o en el ADN_r 23 S.

En una evaluación molecular realizada por Maeda (2006), encontraron en el análisis de secuencias nucleotídica de los genes *gyrB* y *rpoD*, que no hay diversidad entre 41 cepas de *B. glumae*, lo que indica que la secuencia genética entre estas cepas está muy restringida. En tanto que para *B. gladioli*, los diferentes patovares (*B. gladioli pv. agaricola*, las que afectan los tulipanes y el maíz), existen ciertas diferencias (Maeda, *et al* , 2006)

2.8 Métodos fenotípicos de detección e identificación del género *Burkholderia* en arroz

Se han evaluados varios métodos, lo que hace importante esto para la identificación y diagnóstico de las bacterias. Un buen esquema de identificación depende no solamente de un métodos con una buena resolución de detección, sino también del grupo bacteriano que se estudia (Welch, 1991). Es difícil diferenciar patógenos, que están estrechamente relacionadas fisiológicamente y de manera taxonómica por los síntomas que producen y por su crecimiento en los medios de cultivos.

Se han desarrollado diversidad de medios de cultivos para el aislamiento de *Burkholderia spp* A partir de muestras ambientales. El medio semiselectivo desarrollado por Tsuschima *et al.*, (1986), el medio SP-G, el cual pueden crecer otras especies de *Burkholderia*, permite aislar y permitir la diferenciación de las diferentes especies de Burkholderias.

Un nuevo medio selectivo fue desarrollado para el aislamiento de *B. glumae*, el cual tiene una simple composición y una gran selectividad comparado por el desarrollado por Tsushima's S-PG, este medio conocido como CCNT, el cual contiene extracto de levadura, polipeptona, inositol, cetrimida, cloranfenicol, novobiocina, clorotaronil mas agar, en donde las colonias de *B. glumae* producen colonias redondas, con aspecto mucoso, de color blanco amarillentas con un pigmento difundible en el medio, el cual se puede distinguir de otras bacterias cuando son incubadas a 41°C por 2 a 4 días. En tanto que las colonias de *B. gladiolis*, producen colonias con un pigmento amarillo oscuro, a altas concentraciones cuando son incubada por dos días (Kawaradani *et al* , 2000).

Existen otros medios para el aislamiento selectivos de estas bacterias como el agar selectivo de BCSA, como también el medio de oxidación fermentación, basado en un medio de lactosa-polimixina y B-bacitracina (OFPBL; Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany), una vez cultivadas las cepas de *Burkholderias*, las mismas exhiben color amarillo con el indicador de azul de bromotimol (Pelt, *et al.*, 1999).

También existe el medio de Agar King A y King B, donde las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*, exhiben una pigmentación difusa de color amarillo, en el medio de agar King B, y no presenta fluorescencia, cuando las cepas son sometidas a 40°C, en tanto que *B. gladiolis* no exhibe esta característica, sus colonias son de aspecto puntiforme blanquecino (Keith, 2005). Esto denota la producción de toxinas de las cepas bacterianas virulentas.

Cuando un cultivo bacteriano no produce pigmentos, se dice que es avirulento, varias cepas no patógenas y que no producen pigmentos que pertenecen a estas especies bacterianas se han aislado en muchos experimentos, lo que podría determinar procesos de transferencias de genes de plásmidos entre los géneros de *Burkholderia spp* (Schaad, 2007).

Por otro lado, es importante que a partir de semillas infectadas y con la sintomatología de manchas chocolates oscuras, deben ser desinfectadas previamente en cloro y alcohol, para luego realizar una mezcla homogénea de la semilla con agua destilada estéril, o realizar diluciones del extracto obtenido en caldo Luria Bertani (caldo LB), que luego es sembrada por esparcido en medio solido semi o selectivo, para cuantificación de bacterias *B. glumae* o *B. gladioli*.

En agar Extracto de Levadura (NBY), las colonias de *Burkholderia spp*, crecen con color amarillo pálido, opaco, forma redondas con márgenes enteros, bajo la

tinción de Gram son bacilos Gram negativos., en tanto que en agar Dextrosa Levadura-carbonato de calcio, las colonias aisladas producen color amarillo chocolatoso, con aspecto no mucoso, con un pigmento amarillo difundible, que caracteriza a *B. gladioli* (Keith, 2005).

2.8.1 Pruebas Bioquímicas para la identificación de *B. glumae* y *B. gladioli*.

Para el caso de las pruebas bioquímicas, las cepas de *Burkholderia spp.*, se caracterizan por ser oxidasa positiva. En el caso de los azúcares utiliza la glucosa, manosa y adipato de manera oxidativa, desde el punto de sustratos como fuente de carbono utiliza el citrato y el fenil acetato, sin embargo no son productoras de indol, ni fermentan la glucosa, se caracterizan por reducir el nitrato a nitrito, son negativos a las pruebas de rojo metilo-vogues proskauer, no hidrolizan el almidón, producen amonio en agua peptonada, no producen reacción en la prueba de la leche Litmus, son positivo a la catalasa (Urakami *et al* , 1994).

Utilizan la D-fructosa, L-leucina, ácido succínico, ácido acético, ácido adípico, pero no usan la maltosa. De alguna manera solubilizan el metanol, el mono, di y trimetilamina. Para estas bacterias no son necesarios los suplementos esenciales. Las cepas de *Burkholderia spp.*, crecen a pH 5.0 a 7.5, pero no a pH por debajo de 3.0 o por arriba de 9.5.

Es preciso señalar que se pueden realizar tradicionales pruebas bioquímicas y serológicas, sin embargo hay esquemas rápidos de identificación como la prueba

de Biolog, consiste en un sistema de diferenciación por azúcares al que se expone la bacteria, de igual forma está la prueba de API miniaturizada de manera rápida para bacilos Gram negativo no entéricos que resultan negativos a la fermentación, y en la cual es factible la comparación fenotípica de diferentes pruebas bioquímicas.

Por otro lado dentro de las pruebas bioquímicas a la que se expone las cepas de *B. glumae* específicamente, es la producción de toxoflavina, estas bacterias sintetizan una variedad de toxinas desde fitotoxinas a toxoflavinas, los cuales reducen el crecimiento de las hojas y las raíces de cultivos de arroz, produciendo manchas cloróticas en la panícula y en los granos (Liyama *et al.*, 1995). La síntesis de la toxoflavina ocurre a temperaturas por arriba de 30°C, este es un compuesto amarillo, responsable de la pérdida alimentaria en Java, este puede actuar como un potente tóxico y antibiótico. Esta toxina produce peróxido de hidrógeno y afecta el sistema citocromo oxidasa.

También se cuenta con los métodos serológicos, para la diferenciación de *Burkholderia spp.* Así Cottyn *et al.*, (1996), detectó 204 cepas patógenas distribuidas entre 7 especies usando un esquema que incluía el uso de antisuero y el uso de la tipificación de los ácidos grasos de éster de metilo.

2.9 Métodos moleculares de diagnóstico de *Burkholderia spp*

Los métodos moleculares usados para confirmar la identificación, se basan en la utilización de ADN molde que se prepara a partir de colonias bacterianas debidamente aisladas en agar y luego son re suspendidas en 50 µl de agua destilada estéril, el cual se coloca a temperatura de ebullición a 5 minutos para ser usado por la técnica en reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), las extracciones de ADN se pueden dar a partir de tejidos de la plantas, que estén infectados con la bacteria de este estudio (Keith, 2005).

El uso convencional de la técnica PCR, el cual requiere pasos previos de calentamientos, para la extracción del ADN de la planta de arroz, antes del proceso de amplificación, lo que incrementa el proceso, es por ello que se usan primers específicos, que amplifiquen fragmentos de determinados pares de bases en longitud.

Igual, está el método de PCR en tiempo real, en el que se permite determinar la carga bacteriana infectiva en tejidos de arroz, esta tecnología es capaz de detectar e identificar este patógeno en plantas, de una manera más sensible y rápida, basada en una técnica de detección real por fluoresceína, amplificación y señales de número de ciclos específicos, en la que hay un incremento estadísticamente significativo en la fluorescencia, el cual es detectado y analizado por el equipo. Esta técnica provee una real cuantificación, en una fase exponencial, y hay un

punto de fusión de los productos de la PCR, la cuales son medidos, asegurando la especificidad del amplicón. La técnica de PCR en tiempo real, tiene la ventaja de ser más rápida y menos laboriosa que el PCR convencional

La utilización de la técnica del PCR anidado o semianidado, es útil para la diferencia entre las estrechas relaciones filogenéticas de las cepas de *Burkholderia spp.* Para el caso específico de las cepas de *B. glumae* los diseños de primer específicos para los estudios confirmatorios de esta cepa patógena en arroz, se basan en la utilización de primer específicos tales como BGF 5'-ACACGGAACACCTGGGTA-3' Y BGR 5'-AGACTCGAAGAGAT-3' y para el caso específico de *B. gladioli* serían, BLF 5'-CGAGCTAATACCGCGAAA-3', y el primer reverso BLR 5'-AGACTCGAGTCAACTGA-3'. Se pueden usar primers universales para identificación de ambas patologías bacterianas, a partir del ADNr 16 S (16SF 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3' y 16SR 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'). Un análisis en BLAST de la secuencias 16S ADNr, de secuencias almacenadas en el Genbank, habla de un 99% de secuencias similares para estas dos especies bacterianas (Nandakumar *et al.*, 2007).

El uso de los métodos basados en la tipificación del ADN, tanto en su conservación como en su varianza de los genes del ADNr entre las especies y patovares y otras técnicas moleculares, han cobrado importancia debido a su rapidez, precisión, y relativa simplicidad en su uso, por lo que son herramientas útiles en la clasificación e identificación de los microorganismos (Furuya *et al.*, 2002).

Existen otros métodos moleculares como la técnica PCR-RFLP, de amplificación de los genes ARNr 16S, seguido de un corte por enzimas de restricción, y los fragmentos del amplicón o fragmentos de restricción de longitud polimórfica, lo que resulta en bandas con patrones específicos de aproximadamente 50 nanogramos de ADN, esta técnica demuestra heterogeneidad intraespecífica, en este caso primero se aplica una PCR, y luego se trata con cuatro enzimas de restricción, estas son seleccionadas tomando en cuenta su homología de la región de secuencias específicas en el ARNr 16S, que se encuentra disponible en el GenBank.

2.10 Virulencia de las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*

Las cepas de *B. glumae* y *B. gladioli* han sido una de las más estudiadas demostrándose su alta capacidad virulenta, son grandes productoras de pigmentos que se difunden en medios de cultivos como la fitotoxinas y toxoflavinas, la cual es la causa de la sintomatología del vaneamiento de la panícula en las espigas de los cultivos de arroz (Shaad, 2008).

Estas toxinas reducen el crecimiento tanto de la hoja como de las raíces de los cultivos, produciendo síntomas cloróticos, algunas cepas no toxigénicas se han obtenido de mutaciones espontáneas durante el pase de subcultivos, específicamente del trasposón 5

(Tn5) (Suzuki, 1998). Aparentemente la biosíntesis de la toxoflavina, está relacionada con una proteína, cuyo genes codifican para un polipéptido de 244 aminoácidos, esta proteína denominada TRP-1 y TRP-2, que se expresa en fase exponencial de crecimiento de las bacterias, justo cuando se da la iniciación de la producción de toxoflavina (Heinemann, 2009).

Capitulo No.3
MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Ubicación y Delimitación del Estudio:

El proyecto de investigación abarcó 4 principales zonas arroceras las cuales fueron: Alanje en Chiriquí, Natá en Coclé, Santa María en Herrera, Chepo en Panamá. De cada zona arrocerá se seleccionó al azar 3 fincas (Alanje: Alanje 1, Alanje 2 y Cabezona; Santa María: El Rincón, Rodeo y Santa Rita; Natá: Sierra, Margaría y Ganaco y en Chepo: Conagro, Francia Ferrabone y Bayano). En cada finca se tomaron muestras de los 5 posibles agentes diseminadores para la evaluación de las dos patologías bacterianas (ver figura No.2 de mapa político de Panamá). Además se evaluaron 3 campos de cultivo en el área de Nata, para muestras de tejidos de algunas etapas fenológicas de arroz.

Figura No2: Ubicación de las zonas arroceras bajo estudio en la República de Panamá



Fuente: IDIAP-2008.

3.2 Diseño del Estudio

El estudio contempló la toma y almacenamiento de muestras de 5 posibles diseminadores de las patologías bacterianas en cultivos de arroz, los cuales fueron: agua, suelo, maleza, ácaro y semilla. Las muestras de los posibles agentes diseminadores fueron tomadas de las 4 principales zonas arroceras bajo estudio. Alajé en Chiriquí, Natá en Coclé, Santa María en Herrera y Chepo en Panamá. Se seleccionaron 3 fincas de cada zona, de las cuales se tomaron 4 muestras por finca de cada uno de los diseminadores, totalizando 240 muestras para los análisis de 2 patologías bacterianas: *B. glumae* y *B. gladiolus* utilizando la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés). El estudio contempló 480 diagnósticos por PCR, para ambas bacterias en cada una de las muestras.

Paralelamente se tomaron muestras de tejidos de cultivo de arroz, específicamente vaina y espigas, con sospechas de la presencia de las patologías bacterianas, para aislar el agente etiológico a partir de estos tejidos, como también en algunas de las etapas fenológica o de crecimiento del cultivo de arroz, principalmente a nivel de 3 campos del área de Nata, para su detección.

Igualmente, previo al diagnóstico se realizó una etapa de validación de protocolos para la extracción y amplificación eficiente de ácidos nucleicos, de los 5 posibles agentes diseminadores, por PCR, basado en publicaciones anteriores (Yeates *et al.*, 1998; Poussier *et al.*, 2002; Purdy *et al.*, 2005; Porteous *et al.*, 1995; Tsai & Olson, 1992; Mummy & Findlay, 2004; Sagova-Mareckova *et al.*, 2008; Desloire *et al.*, 2006). Se usaron controles positivos y negativos de extracción usando bacterias aisladas de tejidos con

sintomatología, al igual que de PCR, usando primer universales y específicos para cada una de las patologías bacterianas

3.3 Hipótesis de investigación.

El proyecto investigativo, contempló, la evaluación de 2 patologías bacterianas (*B. glumae* y *B. gladioli*), las cuales pueden ser diseminadas por 5 agentes que están relacionados con los cultivos de arroz, arriba mencionados.

La investigación está dirigida a plantear y encontrar si existe una relación en la asociación entre *B. gladiolis* y *B. glumae* con sus 5 posibles agentes diseminadores (agua, suelo, maleza, ácaro y semilla), así como, su relación de la presencia o ausencia en algunas etapas fenológicas del cultivo de arroz, en algunas zonas arroceras.

3 4 Variables del Estudio

Las **variables** de este estudio fueron las siguientes

3.4 1 Patologías bacterianas *B. glumae* y *B. gladioli*

3 4.2 Posibles agentes diseminadores: muestras de agua, suelo, ácaro, malezas, y semillas

3.4 3 Zonas arroceras (Alanje-Chiriquí, Nata-Coeló, Chepo-Panamá)

3.4.4 Etapas fenológicas del cultivo de arroz. (Germinación, Plántula, inicio de macollamiento), y muestras de semillas, vaina y espigas.

3.5 Procedimientos

La investigación estuvo dividida en **3 etapas** las cuales se describen a continuación

3 5 1 Etapa de registros, almacenamiento de muestras, de los posibles agentes diseminadores (agua, suelo, ácaros, semillas y malezas), tejidos (vaina y espigas) y etapas fenológicas de arroz (Ver cuadro No.1, 2 y 3, Anexos (cuadro No.).

3.5.1.1. **Obtención, Registro y almacenamiento de muestras:** En esta etapa, las muestras de los posibles diseminadores, tejidos y algunas etapas fenológicas fueron tomadas al azar de los campos de cultivos en cada zona arrocera, se registraron y almacenaron en congelador; es necesario aclarar que de acuerdo al diseño de esta investigación, no se lograron coleccionar todas las muestras de los posibles diseminadores de suelo, agua, ácaro y malezas, esto fue el caso de la finca de la zona Santa María de Herrera, que no se muestreo para estos 4 posibles diseminadores, lo que podemos observar en el cuadro No. 1.

Cuadro No.1: Muestras coleccionadas de los 4 posibles agentes diseminadores procedentes de las 4 zonas arroceras a nivel de fincas de cultivos de arroz en Panamá

ZONA	FINCA	DISEMINADORES					TOTAL POR FINCA
		Agua	Suelo	Acaro	Maleza	Semilla	
Nata Coclé	Sierra	2	4	8	60	60	94
	Margarita	3	3	3	21	60	90
	Nata	2	2	3	12	60	79
Santa Maria Herrera	El Rincón	4	4	2	25	0	35
	Rodeo	4	4	5	18	0	31
	Santa Rita	0	0	0	0	0	
Alanje-Chiriquí	Alanje 1	4	4	4	15	30	57
	Alanje 2	4	4	4	12	0	24
	Cabezona	4	4	4	10	0	22
Chepo-Panamá	CONAGRO	4	4	4	25	30	67
	Francia Ferrabone	4	4	4	23	30	65
	Bayano	4	4	4	10	30	52
Total por Agente		39	41	45	191	300	616

Fuente: De La Cruz, 2009

Igualmente se colectaron muestras de tejidos de algunas etapas fenológicas del cultivo de arroz, a nivel de la Finca de la empresa GANACO, como se muestra en el cuadro No.2.

Cuadro No.2 Registro de Muestras Totales por Etapas Fenológicas obtenidas de los campos en Natá, Coclé

FINCA	CAMPO	TOTAL POR CAMPO	OBSERVACION
Natá-Coclé	1	960	Muestreo completado de las 16 etapas fenológicas
	2	780	
	3	960	
Total de muestras		2700	

Fuente: **De La Cruz, 2009.**

De manera similar se registraron la totalidad de muestras de tejidos (vainas y espigas), procedentes de 3 zonas arroceras en sus respectivas fincas, como se muestra en el cuadro No.3.

Cuadro No.3: Muestras de Tejidos (Vaina y Espigas), procedentes de las 3 zonas arroceras en Panamá

Zona	Campo	Tejido-Vaina	Tejido-Espiga	Total por campo
Natá-Coclé	I	10	10	20
	II	10	10	20
	III	10	10	20
Alanje-Chiriquí	I	NC	NC	NC
Chepo-Panamá	I	10	10	20
	II	10	10	20

	III	10	10	20
Total por tejido		60	60	120

NC: no completado.

Fuente: De La Cruz, 2009.

Todas las muestras colectadas fueron conservadas en frío principalmente las de agua y ácaro y en congelación las muestras de suelo, maíezas, semillas y tejidos.

3.5.2 Etapa de validación de Protocolos para extracción de ácidos nucleicos, (ADN) y optimización de PCR en la investigación, de los posibles agentes diseminadores, tejidos y etapas fenológicas:

Para la extracción de ácidos nucleicos, para cada uno de los posibles agentes diseminadores, tejidos, y etapas fenológicas, se procedió a utilizar la literatura previa donde se plasma la estandarización de esos protocolos, a continuación en el cuadro No. 4, se muestra un resumen de los diferentes protocolos que fueron validados, los cuales se describen en el siguiente cuadro.

Cuadro No.4: Validación de distintos protocolos para la extracción de ADN de los agentes diseminadores, tejidos y optimización del PCR.

Possible Diseminador y tejido	Método Evaluado (siglas)	Descripción	Referencia
Agua	AP	Buffer de lisis y TE-sucrosa con proteínasa K	Modificación de Poutou <i>et al.</i> , 2001

	AM	Filtro de membrana y buffer de lisis sin TE-sucrosa	Modificación de Poutou <i>et al</i> , 2001
Suelo	BC	Bead beating con CaCl ₂	Sagova-Mareckova <i>et al</i> , 2008
	B	Bead beating	Modificación Yeates <i>et al</i> , 1998
	SC1	Sucrosa y CaCl ₂ con 1 g suelo	Pepper & Pillai, 1994
	SC2	Sucrosa y CaCl ₂ con 0.05 g de suelo	Modificación de Pepper & Pillai, 1994
	K1	Proteinasa K	Modificación de Yeates <i>et al</i> , 1998
Acaro	K2	Proteinasa K	Modificación de Ausubel <i>et al</i> , 1992
	K3	Proteinasa K+fenol-cloroformo-alcohol isoamílico	Modificación de Ausubel <i>et al</i> , 1992.
	BL1	Buffer de lisis con CTAB	Modificación de Desloire <i>et al</i> , 2006

Semillas, maleza y tejido	BL2	Buffer de lisis con CTAB para tejidos	Modificación de Doyle & Doyle, 1987
	T	Trizol	Modificación and Sachi, 1987

Fuente: De La Cruz, 2014

Observación: (AP) Buffer lisis-proteinasas, (AM) Buffer lisis-sucrosa, (BC) Bead Beating-cloruro calcio (B) sin cloruro de calcio, (SC1) y (SC2) sucrosa y cloruro de calcio, (K1) protocolo modificado para suelo, (K2 y K3) proteinasas y fenol, (BL1 y BL2) buffer de lisis con CTAB y (T) protocolo con trizol

3.5.2.1 **Protocolo para agua.** se probaron 2 métodos (métodos concentración Buffer lisis y proteinasas K, (AP) y extracción de ADN en muestras de agua de riego (AM) (según Poutou *et al.*, 2001), donde se hicieron ensayos con los métodos de filtración con membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm, que sirven para atrapar bacterias, las cuales fueron descartadas por las altas turbiedades presentadas de las muestras de aguas de riego traídas como ensayo para la optimización, este paso se trató de incluir para retener solamente las bacterias y aumentar las posibilidades de obtención de bacterias. El método que resultó de acuerdo a las pruebas de electroforesis para las muestras de agua fue el protocolo de Extracción de ADN en muestras de agua de riego según Poutou *et al.*, 2001

Extracción con buffer de lisis y proteinasas K (AP), modificación de Poutou *et al.*, (2001)
Se tomó 2 ml de muestra de agua y se centrifugó a 12000 x g por 10 min. Se resuspendió el precipitado recuperado con 100 µl de una solución de TE sucrosa (Tris-HCl 10 mM, EDTA sódico 1 mM; pH 8; 25% de sucrosa). Se agregó 100 µl de lisis (EDTA 1 mM, SDS al 1%, Tris-HCl 10 mM), 10 µl de proteinasas K y 5 µl de RNasa. Se incubó a 65°

C por 30 min. Luego se agregó 60 µl de CTAB al 10%, 300 µl de acetato de potasio 8M y 80 µl de cloruro de sodio 5 M y se incubó nuevamente a 65°C, pero esta vez por 15 min. Se añadió 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI 25.24 1), se centrifugó a 12000 x g por 5 min. Al sobrenadante recuperado se le agregó 2X volumen de isopropanol y se incubó toda la noche en frío (-20 °C). Se centrifugó a 12000 x g por 3 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar y se resuspendió con 500 µl etanol al 70%. Luego se centrifugó a 12000 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Este se resuspendió con 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA sódico 1 mM; pH 8).

3.5.2 2 Protocolo para suelo se probaron 5 métodos como sigue: Método de Bead-beating con cloruro de calcio (BC) y sin cloruro de calcio (B) (Sagova-Mareckova *et al*; Yeates *et al*, 1998), El método para la extracción y amplificación de ADN de suelo, sucrosa con cloruro de calcio, usando 1 y 0.05 gramos de suelo respectivamente (SC1 y SC2), el método de extracción de ADN bacteriano (K1) a partir de muestras de suelo por modificado de Yates *et al*, (1998). El protocolo que arrojó mejores resultados fue el de Bead beating (B), en la cual se mezcló 0.5 g (peso húmedo de la muestra de suelo, con 800 µl de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM [pH 8.0], EDTA sódico 100 mM [pH 8.0], NaCl 1.5 M y 0.4 g de perlas de vidrio en el vortex por 2 min. Se agregó 80 µl de SDS al 20% y se continuó mezclando por 5 seg, La muestra se incubó a 65°C por 1 hora y se centrifugó. El sobrenadante se recolectó en un tubo aparte. Se extrajo el precipitado del suelo con 800 µl de buffer de extracción. Se incubó nuevamente a 65°C por 10 min. Y se centrifugó a 6000 x g por 10 min. Este sobrenadante se mezcló con el sobrenadante

colectado anteriormente, Se agregó 0.5 volumen de polietilenglicol 30 %, NaCl 1.6 M y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Las muestras se centrifugaron a 10000 x g por 20 min. El precipitado con ácido nucleico parcialmente purificado se resuspendió con 160 µl de TE. Se agregó acetato de potasio a una concentración final de 0.5 M y las muestras fueron transferidas al hielo por 5 min. Luego se centrifugó a 16000 x g por 30 min a 4°C, para precipitar proteínas y polisacáridos. La fase acuosa fue extraída con PCI. Se precipitó con 0.6 volumen de isopropanol. Después de incubar por 2 h a temperatura ambiente se centrifugó el ADN a 16000 x g por 30 min, para obtener el precipitado. Se resuspendió el precipitado de ADN en 50 µl de TE.

3.5.2.3 Protocolo para Ácaros: Se probaron 3 métodos para la extracción de ADN a partir de ácaros como sigue: el método de buffer de lisis con CTAB (**BL1**), el método proteínas K, con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (**K3**); el método de digestión enzimática y extracción orgánica de ADN, proteinasa K (**K2**), Short Protocols (Desloire *et al.*, 2006). El método con mayor optimización fue el de CTAB (**BL1**) con mercaptoetanol, el cual se describe a continuación.

Para este protocolo se maceraron de 8 a 10 ácaros en microtubos con 200 µl de buffer de extracción (CTAB al 2%, NaCl 1.4 M, EDTA sódico 20 mM, Tris-HCl 100 mM [pH 8.0], 2 mercaptoetanol al 0.2%), previamente calentado, se incubó la muestra en baño maría a 65°C por 1 hora, luego se agregó isovolumen de cloroformo-alcohol isoamílico, se centrifugó a 6000 x g por 5 min. El sobrenadante recuperado fue precipitado mezclando con isovolumen de isopropanol, la muestra se incubó a -20 °C toda la noche. Se le agregó 300 µl de etanol al 70% y el ADN fue resuspendió con 20 µl de buffer TE.

3.5.2.4 **Protocolo para Maleza, semilla y tejido (vainas y espigas)** para muestra de tejido, se probaron 2 métodos: el de buffer de lisis con CTAB (BL2), y el método con trizol (T) (tiocianato con guanidinio) (Protocolo de extracción de ADN a partir de tejidos de planta para detección de *Burkholderia glumae* y *Xanthomona oryzae* pv *Oryzae*). El protocolo con mayor optimización fue el Buffer de Lisis, que a continuación se detalla.

Este método de buffer de lisis con CTAB según Doyle & Doyle (1987), consistió en macerar con nitrógeno líquido 0.5 g de tejido. A este se le agregó 500 µl de buffer de lisis y se incubó a 65°C por 20 min. Después se le añadió 500 µl de CI y se centrifugó a velocidad máxima por 8 min. Al sobrenadante recuperado se le agregó isovolumen de isopropanol, se homogenizó y se almacenó a -20°C de 30 min. a 1 h. Después se centrifugó a velocidad máxima por 8 min, y se eliminó el isopropanol. Finalmente se lavó el ADN precipitado con 1000 µl de etanol al 70% y se resuspendió en TE.

3.5.3 **Etapas de diagnóstico molecular de *B. glumae* y *B. gladioli* por PCR de los 5 posibles agentes diseminadores, tejidos y algunas de las etapas fenológicas**

Una vez que se realizó la validación de protocolos de extracción de ADN de los agentes diseminadores (agua, suelo, acaro, maleza, semillas) y de tejidos (vainas y espigas), algunas etapas fenológicas (plántula, inicio de primordio, primordio floral, macollamiento, máximo macollamiento, embuchamiento, máximo embuchamiento, grano pastoso, grano lechoso y grano maduro), se realizaron las extracciones de ácido nucleico, para comprobar la presencia de las patologías bacterianas: *B. glumae* y *B. gladioli*, en estas muestras, a través de la técnica de PCR. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para el diagnóstico de estas patologías bacterianas los cuales fueron: para *B.*

glumae se usó GluFw-GluRv , GluF 5'-ACACGGAACACCTGGGTA-3' y GluR 5'(AGACTCGAAGAGAT)3', y para el caso específico de *B. gladioli* , Gla Fw-GlaRv ,serían, GlaF 5'-CGAGCTAATACCGCGAAA-3' , y el primer reverso GlaR 5'-AGACTCGAGTCAACTGA-3' , ambos oligonucleótidos fueron obtenidos a partir de secuencias de la subunidad β -girasa (gyrB) (Christopher y Aponte, 2008).

El diagnóstico molecular consistió en aplicar los protocolos validados y optimizados en el apartado de arriba para la extracción de ADN bacteriano de cada tipo de agente diseminador, tejido y etapa fenológica. Para cada diseminador se realizaron muestras controles, que fueron diagnosticados por PCR para ambas patologías bacterianas.

La aplicación del PCR en cada diagnóstico para ambas patologías bacterianas, consistió en realizar una muestra positiva (agua, suelo, acaro, maleza, semillas y tejidos), inoculadas con cepas purificadas y conservadas a -20°C, de *B. glumae* y *B. gladioli* obtenidas del cepario de referencia, así como bacterias aisladas de campos y muestras sospechosas con la sintomatología de esta enfermedad al arroz, como también controles negativos de PCR y de extracción, que consistió en aplicar todos los componentes de la PCR, sin el ADN (amplicón), de las bacterias y los químicos de la extracción sin la muestra respectivamente.

Para el desarrollo del PCR para el diagnóstico de estas bacterias en las muestras de agentes diseminadores, tejidos y etapas fenológicas, se prepararon soluciones madres (Master Mix), de PCR, tal como se muestra en la siguiente cuadro No.5

Cuadro 5: Preparación del Master Mix para la amplificación de las muestras de ADN obtenidas a partir de los agentes diseminadores, tejidos y etapas fenológicas

Reactivos	Cantidad (µl)
Agua ultrapura	16.05
Solución Buffer	2.5
Solución de MgCl ₂	0.75
dNTP	0.5
Oligonucleotido (primer Forward)	0.5
Oligonucleotido (primer Reverse)	0.5
Enzima Taq polimerasa	0.2
Muestra de ADN (amplicón)	4.0

Fuente De La Cruz L., 2009

Una vez preparado el master mix, se procedió a adicionar en tubos espendorff, que fueron usado para llevarlo al equipo para la PCR, el termociclador, el cual se programó con ciclos de amplificación de ADN entre 30 a 35 ciclos, estos ciclos comprendieron etapas de desnaturalización, hibridación y finalmente extensión de las cadenas moldes de ADN bacteriano.

Finalmente una vez obtenido la amplificación de ADN de las bacterias, procedentes de cada una de las muestras arriba citadas, para comprobar el proceso de amplificación de las muestras de ADN bacteriano con las secuencias específicas de los primers para ambas patologías bacterianas, se procedió a correr un gel de agarosa con concentración de 1%,

en 240 mililitros de buffer TE 1X, con 14 µl de bromuro de etidio a un voltaje de 120 volts. Los resultados de amplificación fueron comparados con un marcador de peso molecular Hind III, en donde para *B. glumae* las bandas positivas marcaron a 571 pares de bases (pb), y para *B. gladioli* a 471 (pb). El registro de las bandas positivas y amplificación fueron anotados usando un formato desarrollado (ver Anexo pág. No.111).

3.5.4 Pruebas Adicionales para identificación de Cepas de *B. glumae* y *B. gladioli*

3.5.4.1 Aislamiento y Prueba Bioquímicas para identificación de cepas bacterianas Adicionalmente, se aplicaron pruebas bioquímicas de identificación a las cepas de *B. glumae* y *B. gladiolis*, aisladas, a partir de los tejidos infectados de vainas y espigas, con sintomatología sospechosas de estas dos patologías bacterianas, en este caso, las muestras fueron procesadas, lavando y desinfectando las muestras de tejidos, con agua destilada estéril y una solución de hipoclorito de sodio (3.25%) respectivamente. Posteriormente, con la ayuda de un bisturí, se obtuvieron, tamaños proporcionales de 3 mm, de los tejidos y se maceraron. Del líquido macerado, se tomaron alícuotas que fueron colocadas y esparcidas en sendos platos petris con agar King B. Los platos se incubaron a 30° C, de 24 a 48 horas, para obtener colonias típicas con coloración blanca y pigmentación amarilla difundida en el medio de crecimiento, Las colonias obtenidas fueron purificadas e identificadas a través de las siguientes pruebas:

- Triple azúcar e hierro (TSD)
- Citrato de Simmons
- Sulfuro, indol y Motilidad (SIM)
- Desnitrificación

- Descarboxilación y deaminación de lisina y arginina respectivamente
- Hidrolisis de almidón
- Urea
- Oxidación y Fermentación
- Crecimiento a pH ácidos y alcalinos.
- Crecimiento a a temperaturas de 25° C, 37° C y 42° C
- Catalasa y oxidasa

Finalmente, los resultados fueron tabulados mediante cuadros, gráficas y figuras para ambas patologías bacterianas, y confirmados a través de la presencia o ausencia de bandas correspondientes a los pesos moleculares de los fragmentos amplificados para cada par específicos de primers en los geles de agarosa, en correspondencia con el marcador de peso molecular. Todo en relación al tipo de diseminador, etapa fenológica y zona arroceras.

Capitulo No. 4
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Muestras Obtenidas por Agente Diseminador

Los resultados de esta investigación detallan las cantidades de muestras que fueron obtenidas de los posibles agentes diseminadores para las dos patologías bacterianas que afectan los cultivos de arroz (*B. glumae* y *B. gladiolis*), los cuales fueron: semilla, suelo, agua, acaro y malezas. En realidad la cantidad total de muestras como se señala en el diseño experimental debió ser 240 para ambas patologías, sin embargo la cantidad obtenida es la que se refleja en la tabla de abajo (Ver abajo cuadro No.6 y figura No. 21 en anexo).

Cuadro No. 6. Registro de muestras totales para posibles agentes diseminadores de las patologías bacterianas por fincas y zonas arroceras.

Zona	Finca	Agua	Suelo	Acaro	Maleza	Semilla	Total por Finca
CHEPO	CONAGRO	4	4	4	25	4	41
	Francia	4	4	4	23	4	39
	Ferrabone	4	4	4	10	4	26
ALANJE	Alanje 1	4	4	4	15	4	31
	Alanje 2	4	4	4	12	4	28
	Cabezona	4	4	4	10	4	26
SANTA MARÍA	El Rincón	4	4	4	23	4	39
	Rodeo	4	4	4	15	4	31
	Santa Rita	4	4	4	11	4	27
NATÁ	Sierra	4	4	4	20	4	36
	Margaría	4	4	4	15	4	31
	Ganaco	4	4	4	10	4	26
Total por Agente		48	48	48	189	48	381

Fuente: De La Cruz, 2009.

Nota: En total debieran ser 48 muestras de cada posible diseminador, pero en el caso de maleza existen 189 muestras, debido a la alta población y diversidad de especies en los campos muestreados.

Para el caso del proyecto de investigación, se contempló que de cada agente diseminador se tomaran 48 muestras, esto totalizaría la cantidad por cada 3 fincas a nivel de cada zona arroceras, donde de cada finca se tomaron los 5 diseminadores, con sus réplicas, sin

embargo para el caso de las malezas, se encontró mucha diversidad de maleza asociada a los cultivos de arroz en las fincas de cada zona arrocera, de allí que se tomaron mayor cantidad de muestras.

4.2 Muestra obtenida por Tejidos de cultivo de arroz

También se tomaron muestras de tejido de arroz, principalmente de semillas, vainas y espigas, que presentaban sintomatología de la enfermedad y que fueron colectadas a nivel de cada zona arrocera, para la determinación molecular de la presencia de las dos patologías bacterianas de este estudio (Ver cuadro No.7 abajo, figuras No.21 en anexo).

Cuadro No 7: Registro de las cantidades totales de muestras de tejido obtenidos a nivel de cada zona arrocera para la determinación de las dos patologías bacterianas.

Zona Arrocera Zona	Tipo de Tejido				Total por Zona
	semilla	vaina	espigas	hoja	
Natá-Coclé	180	30	30	NC	240
Alanje-Chiriquí	30	NC	NC	10	40
Chepo-Panamá Este	90	30	30	NC	150
Total por tejido	300	60	60	10	430

Fuente: De La Cruz, 2009

Observación: NC: muestra no colectada

4.3. Resultados de validación de protocolos para la extracción y amplificación de ADN por PCR de los agentes diseminadores:

Para cada uno de los 4 protocolos de extracción de ADN, a través de tejido de espigas y vainas, con sintomatología propia de la pudrición bacteria de la panícula del arroz y su posterior amplificación por PCR, se seleccionaron los métodos que aparecen en el

cuadro No. 8, donde se tomaron aspectos como porcentaje de extracción y la intensidad de bandas de ADN amplificado por PCR utilizando primers universales para bacteria.

Cuadro No.8: Comparación de los diferentes métodos para la extracción de ADN, a partir de cada posible agente diseminador de *B. glumae* y *B. gladioli*.

AgenteDiseminador	Metodo Evaluado	Porcentaje de Extracción (%)	Intensidad bandas de ADN (baja, media, alta)
Agua	AP	50	Alta
	AM	50	Baja
Suelo	BC	43	Medi:z
	B	50	Media
	SC1	0	Baja
	SC2	0	Baja
	K1	50	Alta
Acaro	K2	0	Baja
	K3	40	Media
	BL1	80	Alta
	BL2	50	Media
Maleza	T	10	Baja
	BL2	62	Alta
	T	0	Baja

Fuente: De La Cruz, 2009.

Observaciones: El porcentaje de extracción se evaluó a través del total de muestras positivas entre el total de muestras multiplicado por un factor de 100. La intensidad de las bandas, se tomaron como baja (poca resolución), media (apenas resolución) y alta (buena resolución).

Como se observa en el cuadro No.7 de arriba, los métodos de extracción de ácidos nucleicos seleccionados para cada posible agente diseminador fueron aquellos que presentaron mejor resolución, y fueron los métodos que se usaron para la determinación de la presencia confirmativa de las dos patologías bacterianas en esta investigación (ver cuadro No.9 y figuras No. 3-6).

Cuadro No.9: Métodos seleccionados para la extracción de ADN de *B. glumae* y *B. gladioli*, de los posibles agentes diseminadores y de tejidos de cultivos de arroz.

Possible Diseminador	Metodo seleccionado	Descripcion	Referencia
Agua	AP	Buffer de lisis y TE-sucrosa con proteinasa K	Poutou et al., 2001
Suelo	BC	Beadbeating con CaCl ₂	Sagova-Mareckova et al., 2008
Acaro	BL1	Buffer de lisis con CTAB	Modificación de Desloire et al., 2006
Semilla y Maleza	BL2	Buffer de lisis con CTAB para tejidos	Doyle and Doyle, 1987

Fuente: De La Cruz, 2009.

Como se observa en el cuadro No.8, el método seleccionado para la extracción de ADN de las dos patología para agua, lo fue el AP, ya que la electroforesis con gel de agarosa mostró mejor resolución de las bandas de ADN (ver cuadro No.7 y **figura No. 4**).

Para el caso del suelo, el método BC, se logró una mayor extracción y amplificación del material genético (ver **Figura No.4**), por ser sencillo y rápido. La extracción de ADN a partir de suelo resulta dificultosa por la presencia de material húmico y ácido fúlvico, que se pueden encontrar en ambientes acuáticos, suelo y sedimentos, pueden interferir con el proceso de extracción y amplificación por la *Taq* polimerasa, y causar resultados falsos negativos(Tsai & Olson, 1992; Yeates *et al.*, 1998 y; Mareckova *et al.*, 2008).

En tanto que el mejor método para la extracción de ADN bacteriano a partir del agente diseminador ácaro los fue el método **BL1**, en el que se usó buffer de lisis con CTAB. Se observó que la extracción de ADN de ácaros extraídos de plantas sintomáticas es 50 % más eficaz cuando se toma más de un ácaro para el análisis(ver **cuadro No.7 figura No.4 y 5**). Esto se comprobó usando dos pares de primer (par 519F-907R), y se amplificaron bandas muchos mas fuerte en resolución, que las que se obtuvieron con los

primer internos (ITS1 y ITS4), la longitud de los amplicones transcribibles internos están en el orden de 600 pares de bases (pb), mientras que para ácaros y material vegetal están en 700 pb (Ver figura No.3).

Para el caso de las muestras de tejido, semillas, vainas y espigas, al igual que para el diseminador maleza, resultado satisfactorio el método **BL2**, a pesar de que ambos tanto el método T y BL2 se obtuvo una buena extracción en la que se usaron los primers de ubiquitina y actina, los cuales son universales, el BL2 resultó ser menos complicado (ver figura No 6)

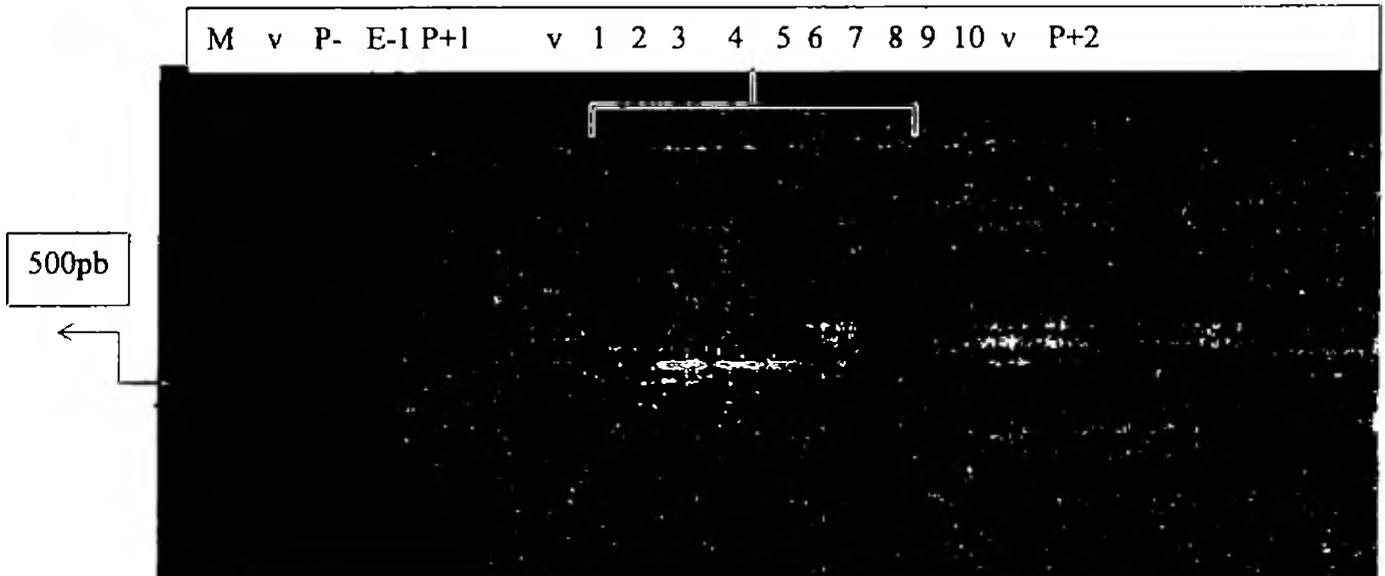


Figura No3 Electroforesis de amplicones de regiones universales para procariontas y eucariotas (par de primer 519F-907R amplicón de 500 pb), a partir de muestras de agua. M marcador de peso molecular (500 pb), v: espacio, P- control negativo PCR, E-1 control negativo de extracción, P+1 y P+2. controles positivos de PCR (ADN bacteriano), carriles 1 al 10 muestras ADN

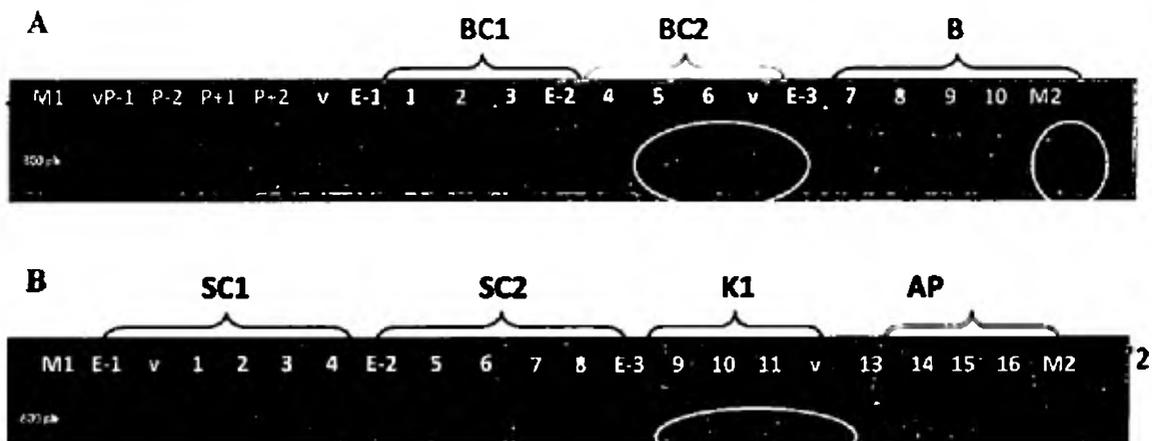


Figura No4 : Electroforesis de amplicones de regiones universales para procarionotas de la región IGS del ARNr (primers SPRRNAF-SPRRNAR), a partir de ADN extraídos de suelo y agua (panel A y B respectivamente) Método de extracción de suelo BC1 (BeadBeating), BC2 (etanol y acetato de sodio), SC1 y SC2 (sucrosa y cloruro de sodio) y K1 (método de proteinasa K en suelo), mientras que en agua AP (Poutou et al., 2001). P-1,P-2, (controles negativos de extracción), P+1, P+2 (controles positivos de PCR-ADN bacteriano), M1 y M2 (marcador de peso molecular de 100 pb de promega y ADN λ /Hind III, respectivamente), v; son pocillos vacíos

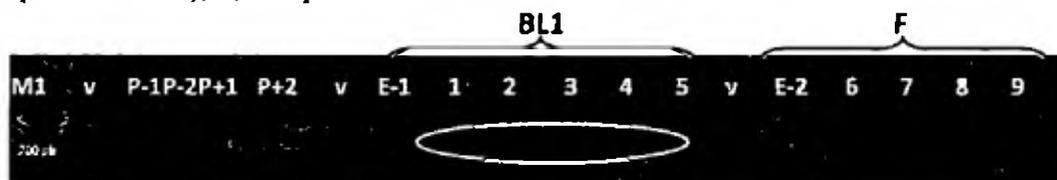


Figura No.5 : Resultados de PCR, de la región IGS del ARNr en procarionotas (primers SPRRNAF-SPRRNAR), a partir de muestras de ácaro, el método seleccionado BL1, buffer de lisis con CTAB. P-1, P-2 (controles negativos de extracción), P+1, P+2 (controles positivos de PCR);v: pocillo vacío, del carril 1 al 4 se observan bandas de 700 pb; M: marcador de peso molecular a 100 pb

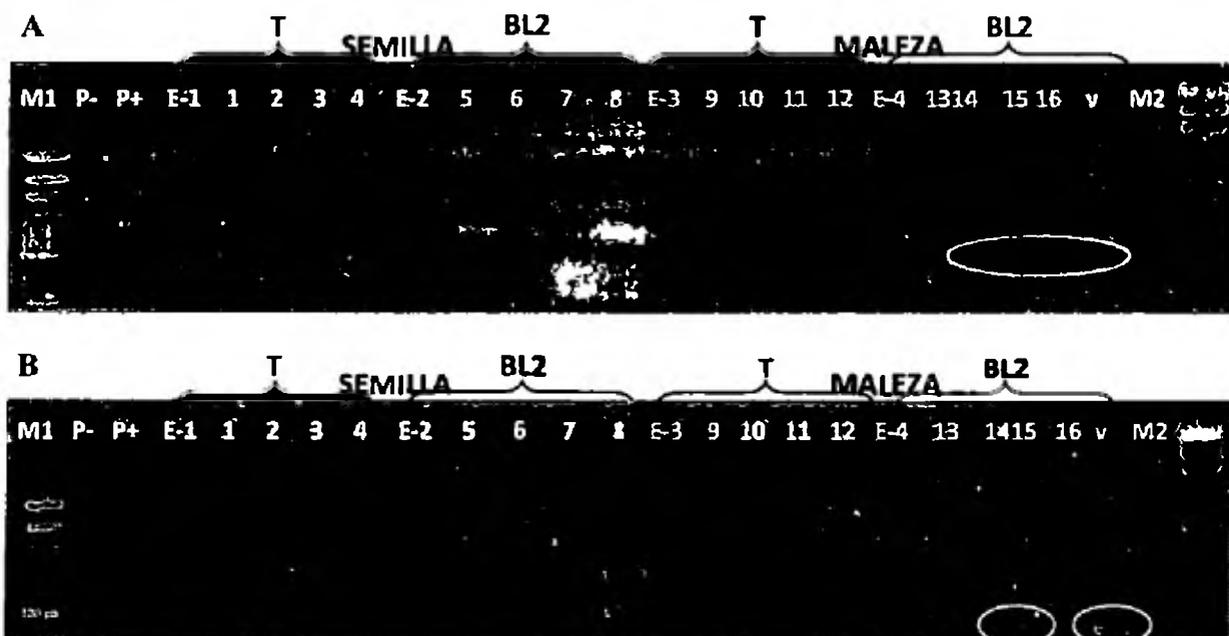


Figura No.6: Resultados de extracción de ADN a partir de semillas y malezas utilizando los primers de Actina (Bloque de electroforesis A), y de ubiquitina (bloque de electroforesis B), sometidos a diferentes métodos: con Trizol (T), buffer de lisis y CTAB (BL2) P- (control negativo de PCR), P+ (control positivo de PCR ADN arroz), E-1 y E-2 (controles negativos de extracción), M1 y M2 (marcadores de peso molecular), ambos métodos con buena extracción

4.4. Aislados de las dos patologías bacterianas a partir de muestras de tejidos (vainas y espigas) obtenidas de los cultivo de arroz:

Para el aislamiento de *B. glumae* y *B. gladioli*, se obtuvieron muestras de tejidos de vaina y espigas que presentan la sintomatología en campo propia para la enfermedad de pudrición bacteriana de la panícula y vaneamiento del grano de arroz. De esta manera se aislaron algunas cepas nativas que afectan los campos de arroz en Panamá, el proceso se realizó de acuerdo a Schaad & Chun (2001).

Como resultado del proceso de aislamiento de *B. glumae* y *B. gladiolis*, a partir de muestras de semillas, vainas y espigas, con sintomatología de la pudrición y vaneamiento, se hicieron aislados en medios de agar King B, luego que fueran obtenida por dilución en caldo LaurinBertaini (Caldo LB)

Las colonias con características similares a *B. glumae* y *B. gladioli*, se re-aislaron en medio de agar King B, para realizarles las pruebas bioquímicas de identificación y la

prueba por diagnóstico molecular mediante PCR, para su confirmación (ver figura No.7, abajo).

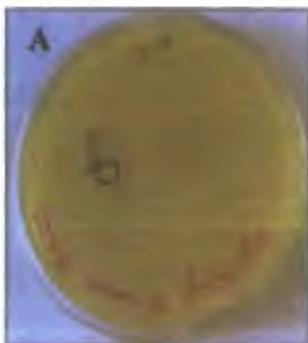




Figura No 7.: En estas imágenes se muestra el proceso de aislamiento de *B. glumae* y *B. gladioli* a partir de muestras de tejidos y semillas, A: Plato con agar King B, con colonias de *B. glumae*; B: Platos con colonias de *B. gladioli*; C: Tinción de Gram típica de *Burkholderia glumae*, la cual muestra bacilo pequeños en empalizada, gran negativos ; D: Proceso de aislamiento por dilución de las bacterias a partir de vainas y espigas; E: Síntomas positivos de *B. glumae* en muestras de espigas y vainas. F: Muestras de semillas de arroz.

Las características de las colonias típicas de las dos patologías bacterianas obtenida a partir de los aislados de tejidos de arroz (vainas y espigas) y semillas, se muestran en el cuadro No.10, las mismas fueron crió conservadas para controles positivos en agar inclinado King B con glicerol en nitrógeno líquido (temperatura de -196°C).

Cuadro No.10: Características de las colonias sospechosas de las dos patologías bacterianas obtenidas de los diferentes aislamientos de tejidos de arroz con sintomatología.

Característica colonial	Cepas con código A2 y H1	Cepas con código B2, A, 2 y 4C
Forma	Redonda	Puntiforme
Borde	Entero	Entero
Elevación	Convexa	Plana
Color	Amarillo	Blanco
Pigmentación en el medio	No presenta	Verde amarillo

Fuente: De La Cruz, 2009.

Observación: las colonias fueron crecidas a temperatura de 30° C.

Es importante señalar que las colonias aisladas, se obtuvieron a partir de tejidos de vainas y espigas con las sintomatologías, y fueron conservadas, para su caracterización bioquímica y molecular por PCR

4.5 Pruebas Bioquímicas convencionales para la identificación de las cepas bacterianas obtenidas a partir de aislados de vainas, espigas y semillas.

Las pruebas bioquímicas aplicadas, revelan que las cepas aisladas, reaccionaron negativamente a la tinción de Gram, como se observa en la figura No 7. También se realizaron prueba fenotípicas de crecimiento a distintas temperaturas principalmente a 30 °C y a 42 °C, resultando esta última con crecimiento por parte de las cepas denominadas **R2A, 4^a y 4C**; mientras que las colonias denominadas **A2 y H1**, no presentaron dicho crecimiento (**ver cuadro No.10 en la parte de abajo**)

Como lo señala Nandakumar *et al.*, (2009), la bacteria *B. glumae* es capaz de crecer a 40°C, mientras que algunos subtipos de *B. gladioli* no presentan crecimiento. De igual forma para las pruebas de pH, donde se hicieron crecer las 5 cepas aisladas a pH de 4, 7.2 y 9, se muestra que las bacterias pueden crecer hasta pH 9

En el caso de la prueba bioquímica, oxidasa aplicada a las colonias aisladas, los resultados fueron negativos, para las 5 cepas, la literatura científica muestra que *B. glumae* es negativa para la oxidasa (Zeigler & Alvarez, 1989, Yuan, 2004), en tanto que *B. gladioli*, la reacción a la oxidasa es variable (Schaad *et al.*, 2001).

Para la prueba de arginina dihidrolasa, las colonias resultaron positivas, esto es demostrado por Schaad *et al.*, (2001), cuando señala que *B. glumae* es positiva a la prueba de arginina dihidrolasa, en tanto que *B. gladioli*, se comporta como negativa a la

prueba, sin embargo Zeigler & Alvarez en (1989) y Yuan (2004), clasifican a *B. glumae* como negativa para esta prueba (Ver cuadro No.11)

Cuadro No.11: Diferenciación Bioquímica de las distintas cepas obtenidas a partir de los aislados de semillas, vainas y espigas.

Característica colonial	Cepas con código A2 y A1	Cepas con código R2A, 4A y 4C
Forma	Redonda	Puntiforme
Borde	Entero	Entero
Elevación	Convexa	Plana
Color	Amarillo	Blanco
Pigmentación en el medio	No presenta	Verde amarillo
Prueba Bioquímica	Cepas H2 y A1	Cepas R2A, 4A y 4C
Crecimiento a pH 4	-	-
Crecimiento a pH 9	+	-
Crecimiento a 40oC	-	+
Oxidasa	-	-
Arginina dihidrolasa	+	+
Hidrólisis del almidón	-	-
Reducción de nitrato	+	+
SIM Producción H2S	-	-
Indol	-	-
Motilidad	+	+
Uso de Urea	-	-
TSI pH del pico	Acido	Alcalino
pH del fondo	Acido	Acido
Producción de gas	-	-
Producción H2S	-	-
Oxidación Glucosa	+	+
Oxidación Lactosa	+	+
Oxidación Sacarosa	+	+

Fuente De La Cruz, 2009.

Los resultados de las pruebas bioquímicas, no fueron suficientes para identificar a las bacterias aisladas, solo se demostró que se aislaron dos distintas cepas bacterianas, en la cual 4 de ellas muestran comportamiento similar a *B. glumae* y las otras dos cepas con *B. gladioli*, por lo que se realizó prueba de PCR, con los primer específicos.

Cuadro No.12: Diferenciación Bioquímica de las bacterias aisladas de vainas y espigas, de muestras procedentes de Chiriquí

PRUEBA	MUESTRAS DE VAINAS					MUESTRAS DE ESPIGAS				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TSI (gas)	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
TSI (a/a)										
TSI (k/a)			X	X	X	X	X	X	X	X
TSI (k/k)	X	X								
TSI (sulfuro de hidrogeno)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SIM (motilidad)	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
SIM (Indol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caldo de nitrto (NO2)	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Glucosa (Ox/Ferm)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Sucrosa (Ox/Ferm)	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente. De La Cruz, 2009.

Observaciones a/a. reacción inclinado ácido/fondo ácido, k/a. alcalino sobre ácido, k/k alcalino sobre alcalino (no fermentación), TSI triple azúcar e hierro, SIM sulfuro, indol y motilidad, Prueba de azúcares Ox oxidación, Ferm fermentación

En el cuadro No.12, se muestra las pruebas bioquímicas de diferenciación fenotípica que se aplicó a otras diez cepas bacterianas aisladas de muestras de vainas y espigas, que procedían de campos del área de Chiriquí.

4.6 Diagnóstico Molecular por PCR de los diferentes posibles agentes diseminadores y muestras de tejidos de cultivos de arroz (semillas, vaina y espigas, etapas fenológicas) para las dos patologías bacterianas

Para cada uno de los agentes diseminadores evaluados (agua, suelo, acaro, maleza, semillas) y muestras de tejido, (vainas y espigas), así como las etapas fenológicas, se aplicaron pruebas de PCR, a partir del material genético extraído de las mismas, por

medio de los métodos seleccionados, para cada tipo de muestra para la confirmación de la presencia de estas dos patologías bacterianas, en cada una de las muestras respectivamente (ver **figuras No.8 a 20**).

El diagnóstico resultó ser positivo para *B. glumae* y *B. gladioli* solo en las muestras obtenidas de tejido, los otros posibles diseminadores fueron negativos para ambas bacterias. Además las muestras fueron en su mayoría positiva para *B. gladioli* (ver **figura No. 10**), Sin embargo, esto no necesariamente indica que los métodos de validación para los posibles diseminadores sean inadecuados, ya que es muy posible que las muestras no estuvieran infectadas con la bacteria, aunque se haya observado sintomatología de la enfermedad en los tejidos, no quiere decir que las muestra de suelo, agua y maleza contengan las bacterias, principalmente porque todavía no se sabe si estos agentes son capaces de albergar las bacterias el tiempo suficiente y con la cantidad necesaria para infectar los tejidos de las plantas y ser detectados por la técnica

Se determinó una mayor presencia de *B. gladioli* en ácaro y se reportó como la de mayor ocurrencia, lo contrario de las muestras ambientales principalmente agua y suelo, en donde los diagnóstico fueron negativos, en maleza se observó presencia de *B. gladioli* (**Ver cuadro No.12 y figura No.8**).

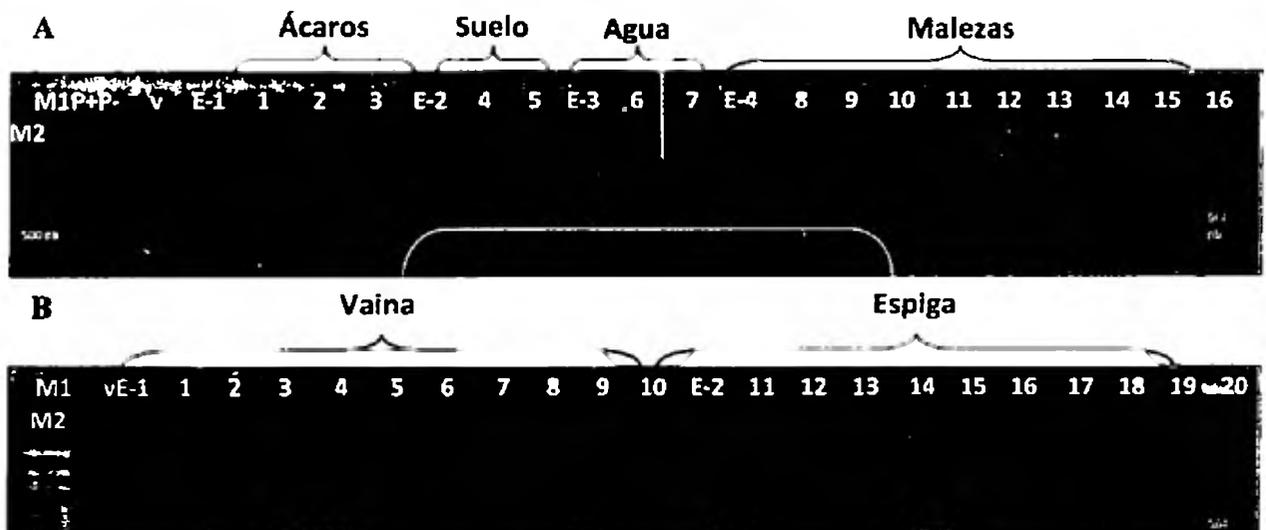
En los agentes diseminadores agua y suelo, se han realizado estudios, donde se han detectado bacterias de *Burkholderia spp.*, (Dobereimer, 1993, Miyagawa & Inoue, 2002; Coenye & Vandamme, 2003) Pero para este estudio, los resultados arrojaron que las dos especies no se encuentran, es decir fueron reportadas en concentraciones muy bajas, no detectables por el método molecular, implementado. De acuerdo a estudios a Tsushima *et al.*, (1986); Kawarandani *et al.*, (2000), se deben realizar estudios de la determinación de

estas bacterias usando medios específicos, evaluando cada muestra ambiental por separado

Un gran porcentaje de muestras del diseminador ácaro, fueron positivas para *B. gladioli*, estos mismo resultados fueron encontrados por Rush (2009), donde reportó que el acaro *S. spinki* conlleva en su interior las bacterias de la panícula o están adheridas en el tegumento, por lo que es posible que los ácaros al pasar de una planta a la otra, diseminen las bacterias

Por otro lado aunque se pudo amplificar ADN bacteriano en malezas, no fue en un alto porcentaje. Los resultados en malezas dan indicios de algunas especies como *Asclepias curassavica*, *Digitaria sanguinalis*, *Mimosa spp.* y *Echinochloa spp.*, las cuales reportaron presencia de ambas patologías bacterianas, lo que probablemente, estos tejidos permiten que las bacterias sobrevivan y de esta manera infectan los cultivos de arroz los cuales rodean

Para el caso de colonias aisladas a partir de muestras de tejidos (vainas y espigas), tanto para *B. gladiolis* (figura No.10), como para *B. glumae* (figura No.11), se reportó la presencia de las misma, sin embargo hubo mayor detección de *B. gladiolis* en las muestras de tejidos



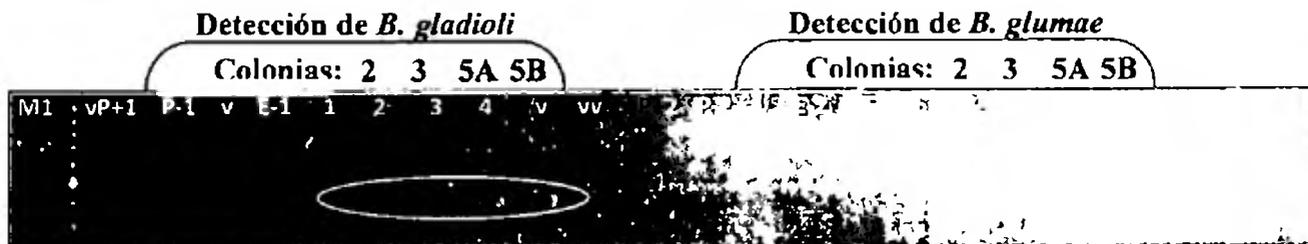


Fig. 9. Identificación de bacterias aisladas a partir de tejido de espiga con sintomatología para *B. glumae* y *B. gladioli* (primers GlaFw – GlaRv, 471 nt, y GluFw – GluRv, 528 nt) Línea 1 – 4: PCR con primers para la detección de *B. gladioli* Línea 5 – 8: PCR con primers para la detección de *B. glumae*. Línea 1, 2, 5 y 6: Colonias de referencia (códigos 2 y 3) para *B. gladioli*. Línea 3 y 7: Supuesta colonia (código 5A) aislada de *B. glumae* o *B. gladioli* Línea 4 y 8: Supuesta colonia (código 5B) aislada de *B. glumae* o *B. gladioli* La letra P+1 corresponde al control positivo de PCR para *B. gladioli* y P+2, control positivo de PCR para *B. glumae*. La letra E-1 corresponde al control negativo de extracción con primers para *B. gladioli* y E-2, con primers para *B. glumae*. La letra P-1 indica el control negativo de PCR con primers para *B. gladioli* y P-2, con primers para *B. glumae* La letra v señala los pocillos vacíos La letra M1 corresponde al marcador de peso molecular 100 pb de Promega; y M2, al *DNA λ / Hind III* 0.1 µg/µl.

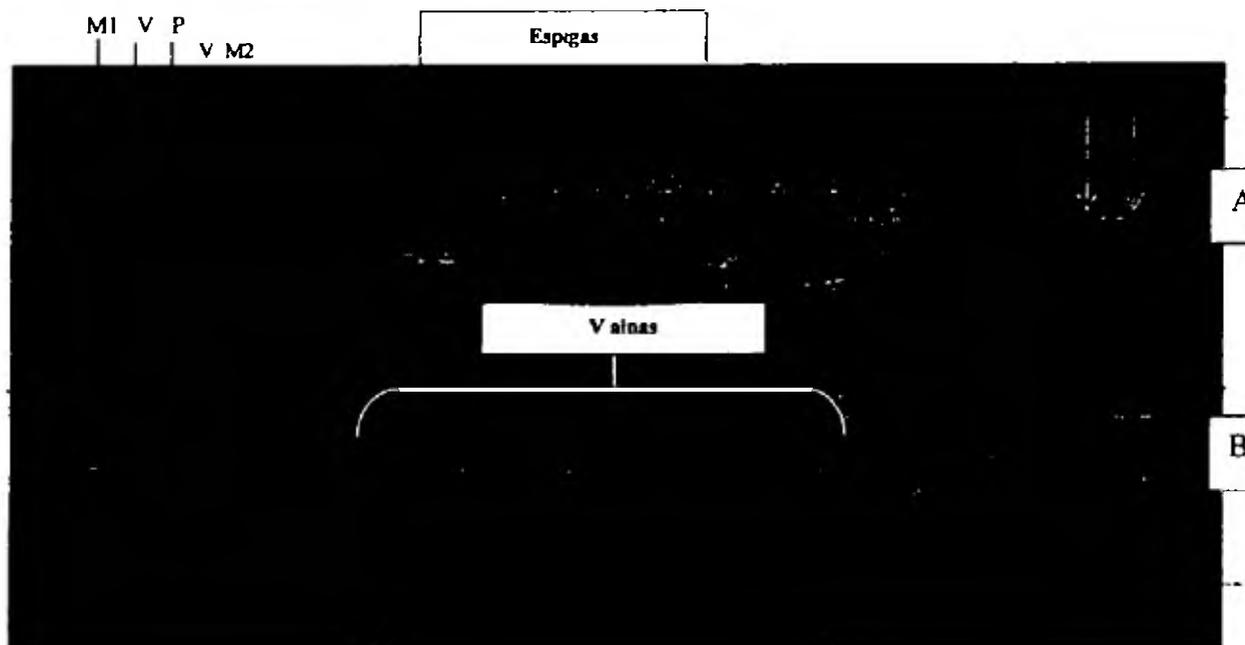


Figura No. 10: Identificación de *B. gladiolis* aisladas a partir de tejido de espiga y vainas con sintomatología usando (primers GlaFw – GlaRv, 471 nt). Del 7-17, PCR positivo para las muestras de Espigas en el panel A y PCR positivo para las muestras de vainas en el panel B. La Letra V son pocillos vacíos, la letra P+ corresponde al control positivo de PCR. La letra M1 corresponde al marcador de peso molecular 100 pb de Promega; y M2, al *DNA λ / Hind III* 0.1 µg/µl.

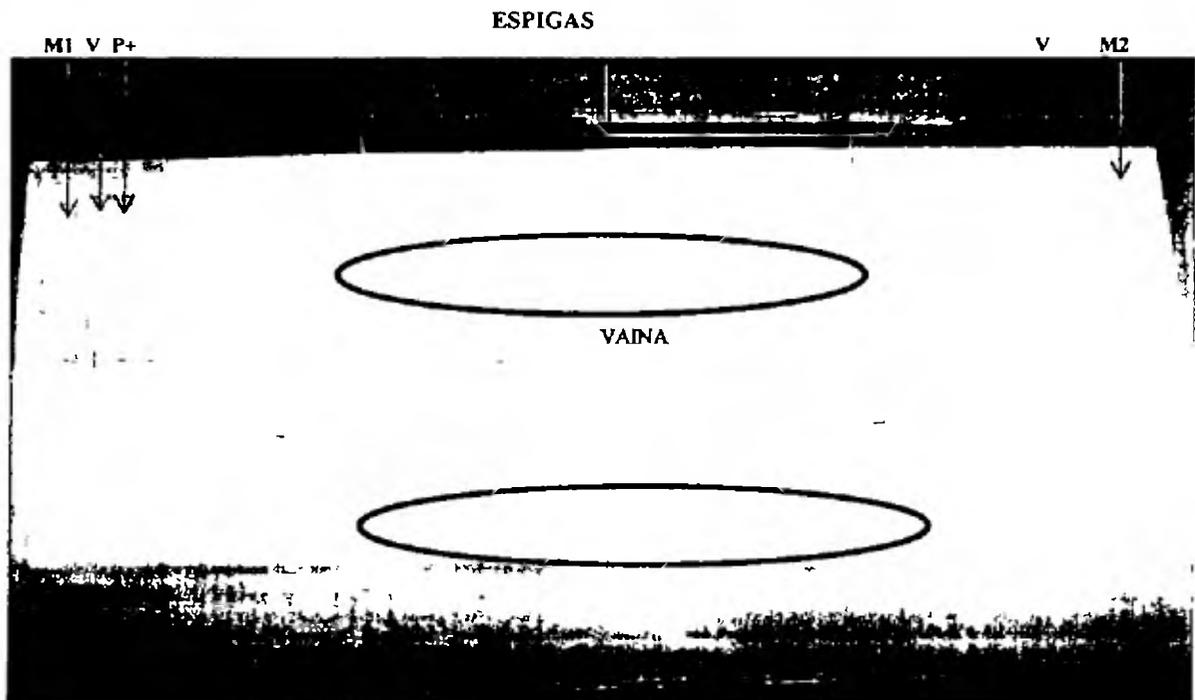


Figura No.11 Identificación de *B. glumae* aisladas a partir de tejidos de espigas y vainas con sintomatología usando (primers GluFw – GluRv, 528 nt) Se observa que del pocillo 7-17, algunas bandas tenues para la patología señalada, en el carril A, en el carril B, se observa PCR positivo más intenso. La letra V pocillos vacíos, la letra P+ control positivo de PCR La Letra M1 corresponde al marcador de peso molecular 100 pb de promega, y M2, al DNA λ Hind III 0.1 μ g/ μ l

Respecto a la determinación de la presencia de las dos patologías bacterianas (*B. gladiolis* y *B. glumae*), en las diferentes etapas fenológicas de las muestras tomadas en los campos de CEGRACO (campo 907, 922 y 943), podemos ver las etapas de semilla, germinación, plántula e inicio de macollamiento, para el campo 907, al observar las figuras 12, 13, 14,15, 16,17. Para el campo 907, en el caso de las semillas, podemos ver que se obtuvieron resultados positivos para *B. gladiolis*, en tanto que para *B. glumae* se observaron pocas bandas. Esto no coincide con lo reportado en otros estudios, donde *B. glumae* es el patógeno mayormente encontrado en los cultivos de arroz, y no *B. gladiolis* (Yuan, 2004, Correa, 2006; Nandakumar *et al.*, 2009; Rush, 2009) Probablemente esto

se debe al enmascaramiento de *B. gladioli* sobre *B. glumae*, por su proliferación, e igualmente las condiciones climáticas en Panamá son totalmente diferente a los países donde se han evaluados estas patologías bacterianas (Miyagawa, 2000)

En la etapa de Germinación los resultados para las dos patologías resultaron negativos, para el caso de las etapas de plántula e inicio de macollamiento también los resultados fueron similares (ver figura No.14).

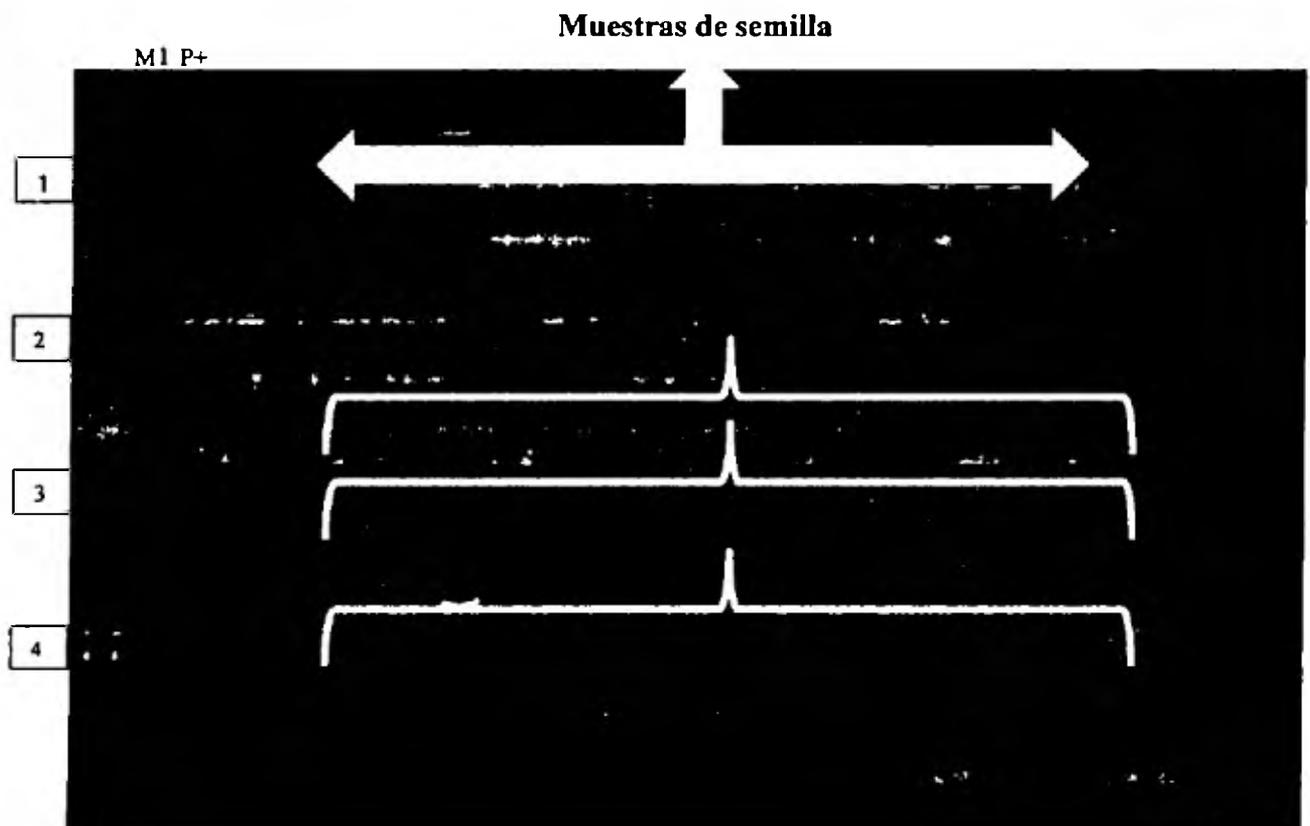


Figura No.12 Determinación de *B. gladioli* usando los primers específicos (GlaFw – GlaRv, 471 nt), en la etapa fenológica de semillas, determinándose la presencia mediante la visualización de las bandas en los cuatros carriles de las muestras evaluadas. P+ es el control positivo de PCR, M1 es el marcador de peso molecular, DNA λ Hind III 0.1 μ g/ μ l.

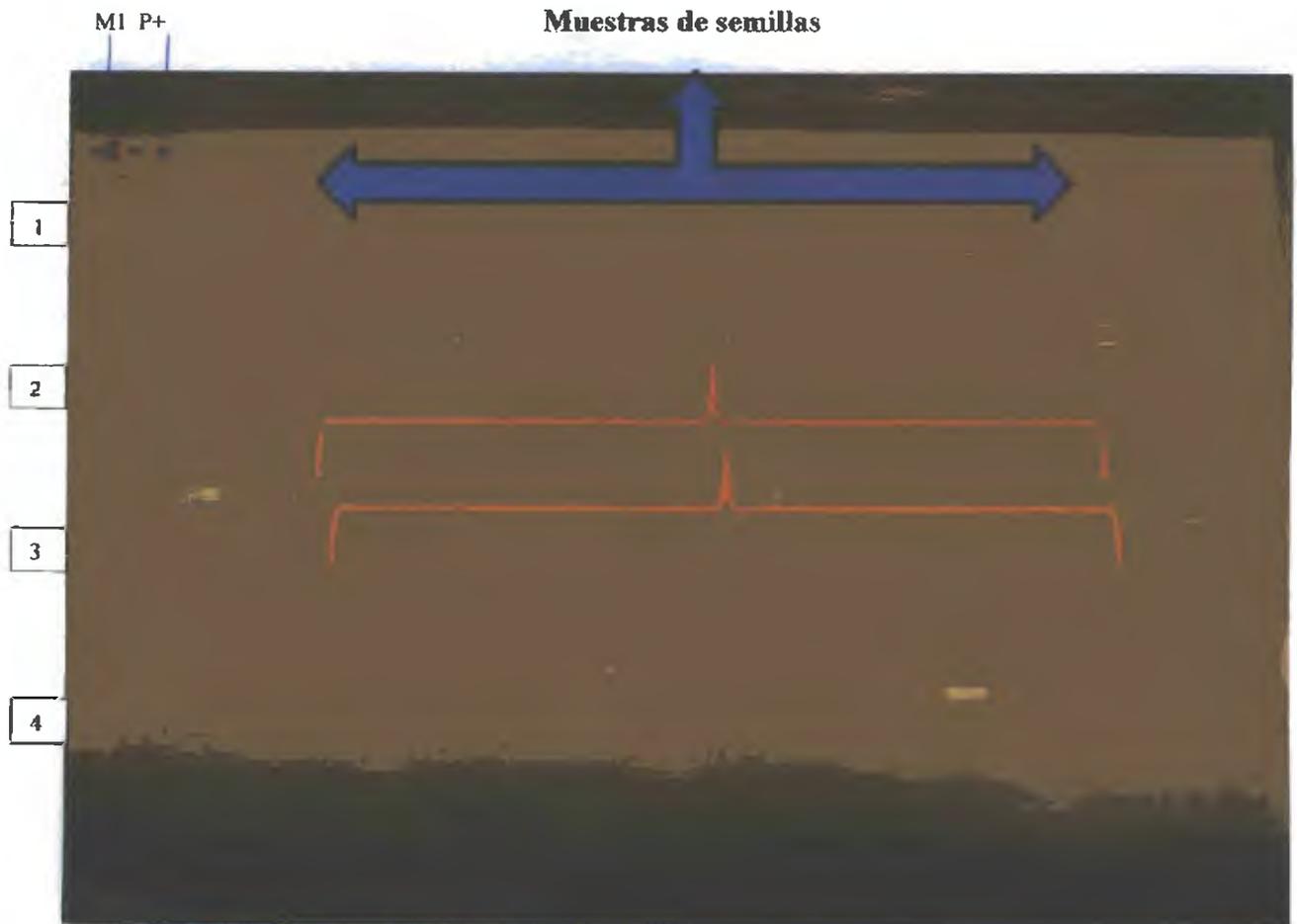


Figura No.13: Determinación de *B. glumae* usando los primers específicos (GluFw – GluRv, 528 nt), en la etapa fenológica de semillas, determinándose la presencia mediante la visualización de las bandas en los carriles uno, dos y tres de las muestras evaluadas, las muestras en el carril cuatro salieron negativas por PCR. P+ es el control positivo de PCR, MI es el marcador de peso molecular, DNA λ /Hind III 0.1 μ g/ μ l.

Se detectó mayormente la presencia de *B. gladioli* en muestras de semillas que *B. glumae* (ver figura No. 12 y 13). De Acuerdo con Rush (2009), quien reportó la presencia de *B. glumae* en semillas, en el Estado de Luisiana, EEUU, bajo condiciones de elevada humedades y temperaturas.

En semillas y tejidos también se pudo observar que para la mayoría de las muestras positivas fueron de *B. gladioli*, sin embargo en este caso el porcentaje de incidencia de la

bacteria fue mayor en los tejidos con respecto al resto de los diseminadores (ácaros, maleza, semillas, agua y suelo). Es importante señalar que esto no se encontró en todos los campos evaluados.

Las muestras de semillas fueron entre los diseminadores, las que mostraron resultados relativamente altos en comparación con el resto de los diseminadores, incluyendo las maleza, obteniéndose un valor de 20% para *B. gladioli*, mientras que para *B. glumae*, se detectó en una única muestra solamente en un 22% (Ver figura No.13). Esto fue demostrado en un estudio muy similar, en donde concluyeron que las semillas pueden actuar como diseminadoras de estas patologías bacterianas (Ura, 2005).



Figura No.14: Determinación de *B. gladioli*(panel A) y *B. glumae* (panel B) mediante electroforesis usando primers específicos (GlaFw – GlaRv, 471 nt), (GluFw-Glu RV, 520nt) respectivamente, en la etapa fenológica de **Germinación**, determinándose ausencia de bandas en ambos panel. P+ es el control positivo de PCR, M1 es el marcador de peso molecular, DNA λ Hind III 0.1 μ g/ μ l.

Por otro lado, para el caso de las muestras de las etapas fenológicas evaluadas del campo 922, sus resultados fueron negativos, para la etapa de plántula y macollamiento (ver **figura No.15 y 19**), mientras que resultados positivos se observaron con las semillas y la etapa de germinación ver **figura No.16 y 18**).

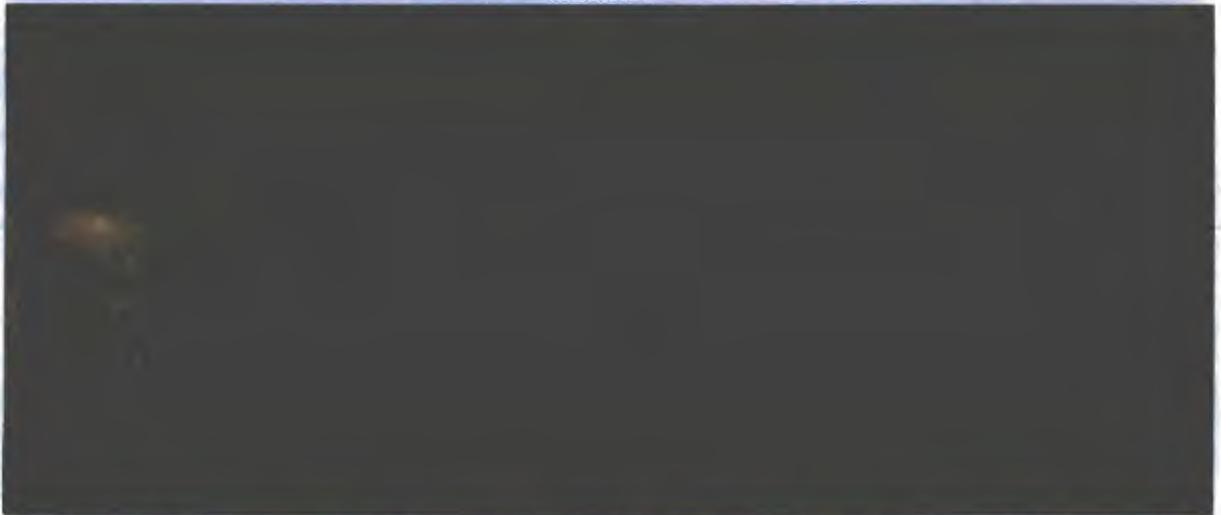


Figura No.15: Electroforesis de muestras de Plántulas, para el diagnóstico de *B. gladioli*, el cual resulto negativo. M1 es el marcador de peso molecular, DNA λ /Hind III 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
M1

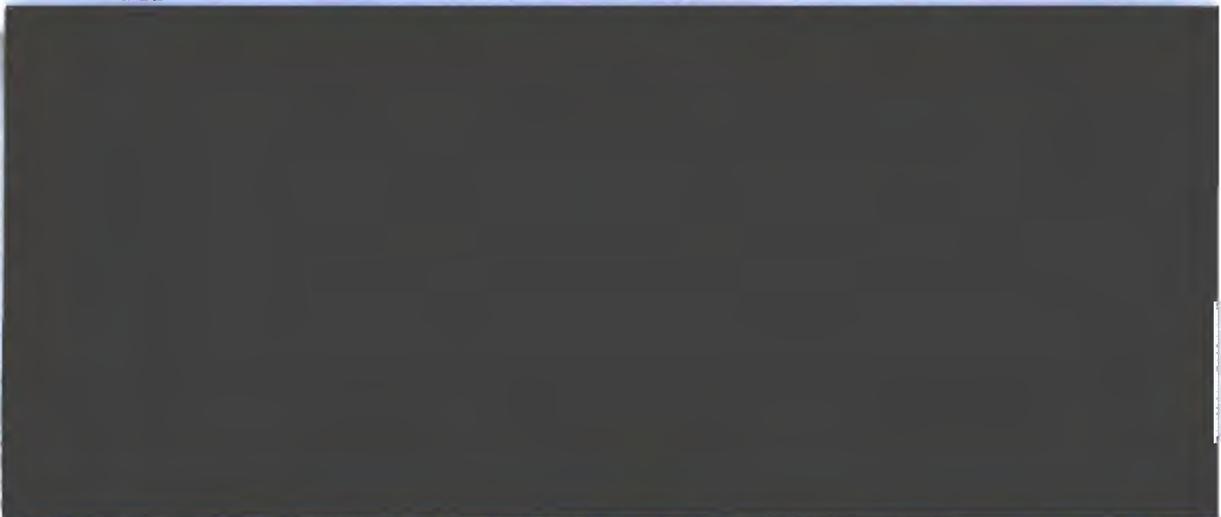


Figura No.16: Electroforesis de muestras de Semilla del campo 922 (CEGRACO), para la determinación de *B. gladioli* usando primers específicos, el porcentaje de detección es bajo.

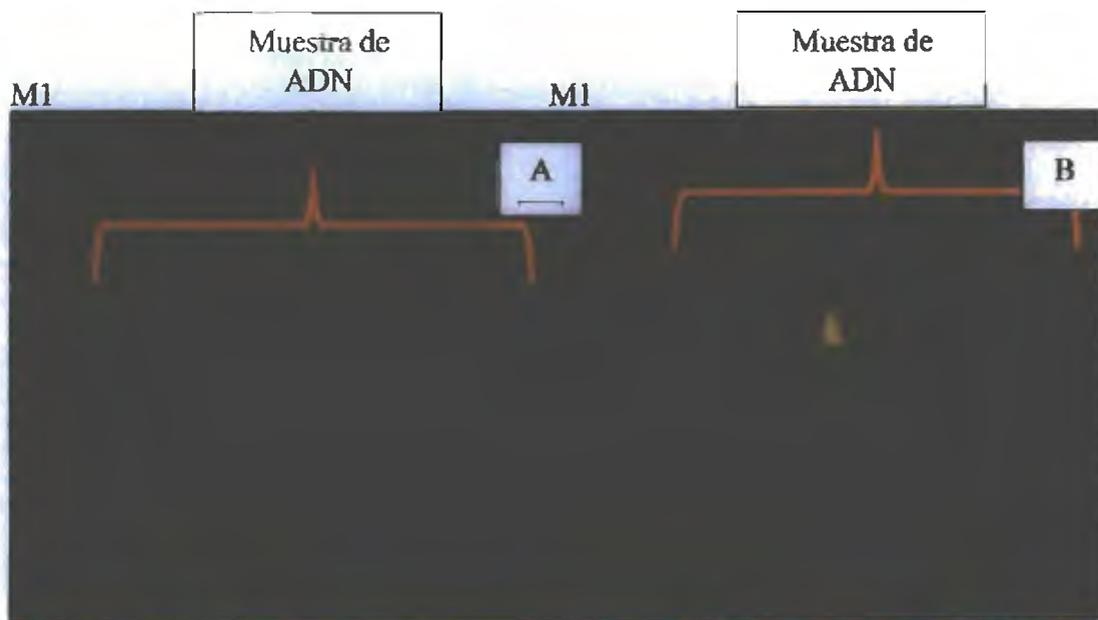


Figura No. 17: Resultados de electroforesis de muestras de la etapa de germinación del campo 922, podemos ver los resultados positivos para ambas patología, obtenidos en el panel A (*B. gladioli*), panel B (*B. glumae*).



Figura No.18: Electroforesis de la etapa de la etapa de plántula, para el campo 922, con resultados positivos para *B. gladioli* (panel A), y negativo para *B. glumae* (panel B). M1, es el marcador de peso molecular, DNA λ /Hind III 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

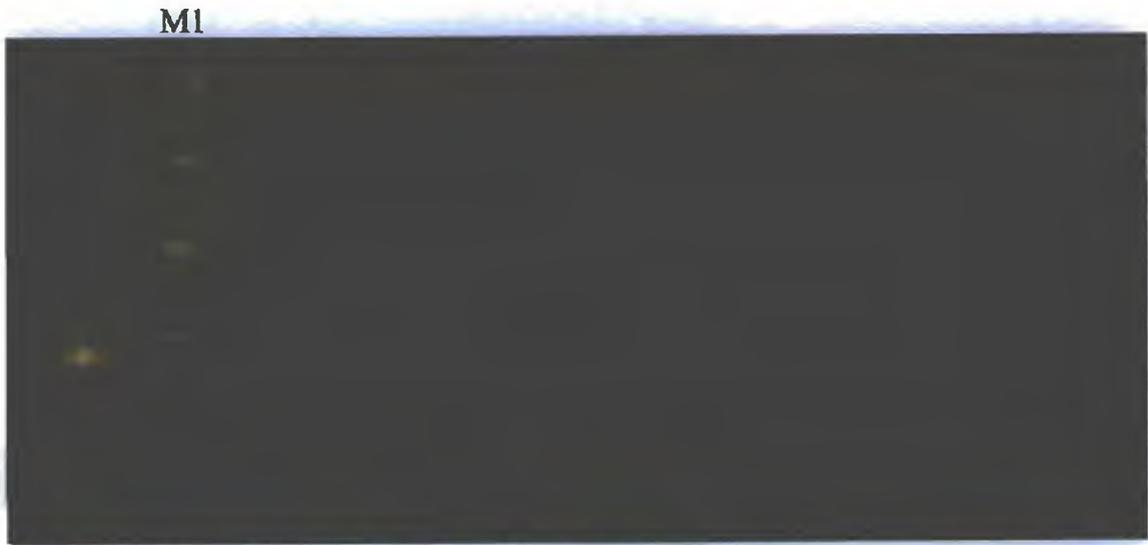


Figura No.19: Resultados negativos de electroforesis de la etapa de Macollamiento, para el campo 922, para el caso de *B. glumae*. M1, es el marcador de peso molecular, DNA λ /Hind III 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Para el Caso del campo 943, podemos ver la **figura No.20**, en la parte de abajo, para las etapas que resultaron positivas con las patologías determinadas.



Figura No.20: Resultados negativo de electroforesis para las patología de *B. gladioli* y *B. glumae*, de muestras procedentes del campo 943.M1, es el marcador de peso molecular, DNA λ /Hind III 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

La mayoría de los tejidos evaluados ya habían pasado la etapa de floración, no obstante, para el caso de la zona arrocera de Alanje Chiriquí, se observaron en las hojas evaluadas, obteniéndose un gran porcentaje positivo para la presencia de *B. gladioli*, las hojas fueron obtenidas en cultivos con 55 días de sembrado donde las plántulas deben estar iniciando el embuchamiento para que aproximadamente a los 85 días emerja la panícula. La presencia de la bacteria antes de la floración es un indicio de que la bacteria estaba alojada dentro de la planta posiblemente desde la semilla, aunque en esta zona (Alanje), no se encontró presencia de *B. gladioli* en un lote de 30 semillas evaluadas. De acuerdo a Saylor *et al.*, (2006), menciona la capacidad de estas bacterias para infectar las semillas y causar la enfermedad en las etapas más avanzadas de la planta (Rush, 2009).

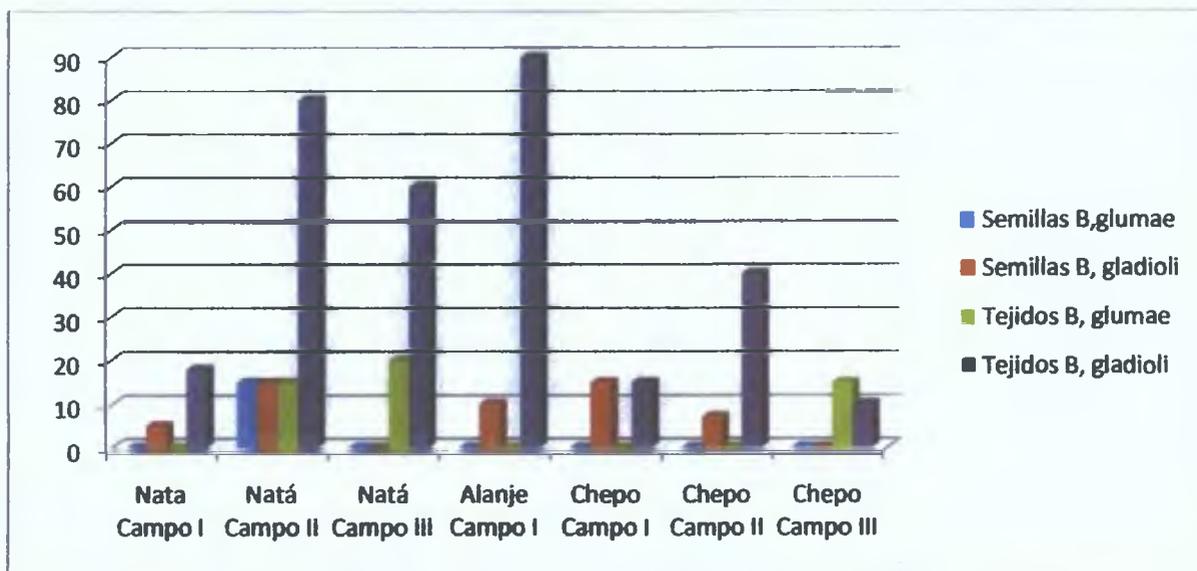
Cuadro No.13: Ocurrencia de muestras positivas de los agentes diseminadores, para las zonas arrocera en sus respectivas fincas evaluadas para las dos patologías bacterianas (*B. gladiolis* y *B. glumae*).

Zona Arrocera	Fincas Evaluadas	Diseminadores							
		Agua		Suelo		Acaros		Maleza	
		% Gls	% Gls	% Gls	% Gls	% Gls	% Gls	% Gls	% Gls
Nudo-Cordo	Sierra	0	0	0	0	0	25	0	0
	Margaría	0	0	0	0	0	68	0	4.8
	GANACO	0	0	0	0	0	0	0	16.7
Santa María Herrera	El Rincón	0	0	0	0	0	68	0	8
	Rodeo	0	0	0	0	0	80	0	5.6
	Santa Rita	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

Observación: porcentaje de muestras positivas se calculó tomando en cuenta el número de muestras positivas entre el total de muestras evaluadas. NE: no evaluada.

Finalmente, en esta investigación los resultados obtenidos indican que, entre las muestras evaluadas, los posibles diseminadores podrían ser las semillas y los ácaros, ambos mencionados en la literatura (Baekeland, 2009, Cho *et al.*, 2007; Correa, 2006; Rush,

2009; Ura, 2005). En las malezas todavía no se puede saber si estas pueden ser un agente diseminador de las bacterias. Para suelo y agua los resultados indican que estos no son agentes diseminadores por no encontrarse presente ninguna de las dos patologías.



Fuente: De La Cruz, 2009.

Figura No.21: Porcentaje de presencia de las dos patologías bacterianas, para muestras de semillas y muestras de tejidos (vaina y espigas), en 3 zonas arroceras.

En la figura de arriba, se observa, que las zonas arroceras que resultaron con presencia de las patologías bacterianas, fueron principalmente Natá a nivel del campo II. Sin embargo hay una mayor ocurrencia de *B. gladioli* en muestras de semilla y tejido, siendo la patología más notoria presente en estas muestras, lo que no coincide con la literatura, donde señala que *B. glumae* la bacteria que se haya mayormente asociada a la patología de vaneamiento de los cultivos de arroz (Rush, 2009, Saylor *et al.*, 2006).

De manera general, podemos señalar para esta investigación que la presencia de las dos patologías bacterianas, es más notoria la de *B. gladioli* y el diseminador reportado con mayor ocurrencia son principalmente semillas y el ácaro, en tanto que para los tejidos,

vaina y espigas, las otras etapas fenológicas fueron negativas, y la zona arrocera con mayor ocurrencia de porcentaje de las patologías la de Natá, y es allí como los señores Rush (2009) y Correa (2006), reportaron que unos de los factores que incide en su presencia es las temperatura, siendo la zona de Natá, ubicada en la área de zona seca

Conclusiones

- 1 Se validaron múltiples protocolo para la extracción de ADN a partir de los posibles agentes diseminadores y muestras de tejidos, para el caso del agua el AP, para el caso de suelo, el método BC, en tanto que para ácaro y semillas con maleza lo fue BL1 y BL2 respectivamente.
2. Las pruebas bioquímicas aplicada para la diferenciación bacterianas, no fueron suficientes para identificar fenotípicamente estas dos patologías, sin embargo permitió diferenciar la existencia de dos tipos distintos de bacterias dentro del estudio, de las cuales 3 cepas se correspondieron con el fenotipo de *B. gladioli*, mientras que dos cepas, correspondieron a *B. glumae*
- 3 Las muestras identificadas fenotípicamente como *B. glumae* y *B. gladiolis* procedieron de vainas y espigas con sintomatología sospechosa de la pudrición bacteriana.
4. Se determinó una mayor presencia de la bacteria *B. gladiolien* comparación *B. glumae* en todas los posibles agentes diseminadores y muestras de tejido.
- 5 Respecto a los agentes diseminadores, se pudo determinar una mayor presencia de *B. gladioli* en ácaro, con la excepción de las muestras de semillas
- 6 Las muestras de los diseminadores, agua y suelo resultaron negativas para la presencia de ambas patologías bacterianas para este estudio.
7. El porcentaje de ADN de las patologías bacterianas obtenidas a partir de maleza no fue tan alto, las especies con muestras de ADN positivo para ambas patología,

se dieron en las siguientes especies *Asclepias curassavica*, *Digitaria sanguinalis*, *Mimosa spp* y *Echinochloa spp*.

8. Las muestras de tejidos de vainas y espigas, fueron las que reportaron ambas patologías bacterianas
- 9 De los campos evaluados 907, 922 y 943, resultaron positivas para las dos patologías 907 y 922, pero con mayor ocurrencia de *B. gladioli*
- 10 De las etapas fenológicas evaluadas, las etapas de semillas resultaron con mayor ocurrencia de *B. gladiolis*, no así para *B. glumae*
- 11 Las etapas fenológicas de germinación, plántula y macollamiento, resultaron con pocos positivos para ambas patologías.
- 12 La zona arrocera de Nata en sus tres campos evaluados resultaron con mayor porcentaje de presencia de las dos patologías bacterianas de las tres zonas evaluadas.
13. De las dos patologías evaluadas en todas las muestras, fue más notoria la presencia de *B. gladioli*

Recomendaciones

- 1 Desarrollar evaluaciones de ambas patologías bacterianas entre las especies de maleza y por zona o finca de estudio
- 2 Realizar estudios a futuro que evalúen como más detalle cada muestra ambiental por separado para tratar de aislar las bacterias con medios específicos
- 3 Las zonas arroceras que resultaron positivas para las muestras de semillas y tejidos, sean tomadas en cuenta para evaluar otras etapas fenológicas para el diagnóstico de estas dos bacterias
- 4 Hacer estudio de ensayos experimentales con las patologías bacterianas sobre muestras de semillas para verificar con más precisión la etapa de mayor proliferación
- 5 Realizar estudio de control biológico sobre campo de cultivos con sintomatología positiva.
- 6 Realizar estudios de inoculación con cepas de ambas patologías sobre agua y suelo, en campos experimentales, para determinar la real forma de transmisión de estas bacterias.
- 7 Desarrollar estudios experimentales con ambas bacterias sobre semillas tratadas y no tratadas con diferentes agentes de control bacteriano
- 8 Es necesario realizar estudios más específico que identifiquen por lo menos a nivel de género las malezas capaces de actuar como agentes diseminadores
9. Hacer estudios de secuenciación de ambas patologías a partir de muestras de tejidos y semillas positivas.

- 10 Determinar el grado de infección aplicando la técnica de PCR en tiempo real, para la viabilidad y grado de infección en muestras de semillas y otros tejidos del arroz.
- 11 Relacionar la presencia de las bacterias con estudio de Quorum sensing, y activación de los síntomas de la pudrición de las espigas.

Bibliografía Consultada

- 1 ALMAGUEL, L , Y BOTTA, E 2005. **Manejo integrado de Steneotarsonemus spinki**, Smuley Curso de Postgrado de Acarologia Introducción a la Acarologia Agrícola, febrero, La Habana
- 2 AUSUBEL, F M., SMITH, J A , MOORE, D.D , BRENT, R.,&SEIDMAN, J G. 1992 **Short Protocols in Molecular Biology** (2a Ed). Massachusetts John Wiley and Sons, Inc
- 3 BALANDREAU, J, VILLARD, V., COURNOYER, B., COENYE, T., LAEVENS. S AND VANDAMME P. 2001 **Burkholderia genomovar III is a common plant-associated bacterium**. Appl Environ. Microbiol 67:982-985
- 4 BAEKELAND, S. 2009 **Panicle Blight Rice** Colombia: Tolima, Huila). Consultado el 22 de abril de 2010, disponible en: http://www.promedmail.org/pls/otn/f?p=2400:1001_57555:NO-F2400_P1001_Back_Page,F2400_P1001_PUB_mail_ID:1000,79327.
5. BURLKHOLDER, W H 1950 **Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs** Phytopathology. 40:115-120
- 6 CASTELLANOS, V.C , CÁRDENAS-NAVARRO, R., FARIAS-RODRÍGUEZ, R, Y SÁNCHEZ-YÁÑEZ, JM 2001. **Diversidad de Burkholderia de teocintle**. VIII Simposium, Ciencia y Tecnología del estado de Michoacán. UMSNH, CONACYT, CIDIR, INIFAP, CIDEM. (Memorias).
7. COENYE,T., MAHENTHIRALINGAM,E-. HENRY, D., LIPUMA, J.L., LAEVENS, S., GILLIS M ,SPEERT,D V AND VANDAMME, P. 2001

- Burkholderia ambifaria** sp nov. a novel member of *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates *Int J Syst and Evol Microbiol.*51.1481-1490.
8. CORREA, V F 2006. **Asociación de la bacteria *Burkholderia glumae* al complejo acaro-hongo-bacteria en Panamá** Tesis de Maestría
 9. COTTYN, B., 2003 **Bacteria Associated with Rice Seed from Philippine Farmers' Fields.** Tesis Posdoctoral. University of Ghent. USA, International Rice Research Institute .235 pp -
 10. CHO, H S., PARK, S Y., RYU, C M. KIM, J. F., KIM, J. G., & PARK, S. H. 2007 **Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium.** *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 14-23.
 11. CHOMCZYNSKI, P., & SACCHI, N 1987. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Analytical Biochemistry*, 162 (1), 156-159.
 12. CHOWDHURY, P.R., Y HEINEMANN, J A 2006. **The General Secretory Pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *Agaricicola* BG164R Is Necessary for Cavity Disease in White Button Mushrooms.** *Appl Environ Microbiol.* 72(5)· 3558-3565.
 13. COENYE, T., & VANDAME, P. 2003, **Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches.** *Environmental Microbiology*, 5 (9), 719-729.

14. DA SILVA, B 2001. **Estudio del arroz en campo en Brasil** Informe técnico. Salud Vegetal do Brasil 36 págs
15. DESLOIRE, S , VALIENTEMORO, C., CHAUVE, C & ZENNER, L. (2006) **Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae).** *Veterinary Research* 37 725–732
16. DOBEREINER, J. 1993. **Recent changes in concepts of plants bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria.** *Cienc. Cult* 44:310-313
- 17 DOYLE, J.J., & DOYLE, J.L 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15
18. FEDEARROZ. 2005. Vaneamiento y manchado de grano en cultivos de arroz en Panamá. 2005. *Revista Arroz*, 53(455) Consultado el 22 de abril de 2010, disponible en <http://www.fedearroz.com.co/arroz/455/resumen.shtml>.
- 19 GIULIA, D. , BIGIRIMANA, J , DEGRASSI, G., CABRIO, L., LIPUMA, J , KIM, J., HWANG, I, VENTURI, V. 2007. **A Clinical isolate of *Burkholderia glumae* causes Severe Disease symptoms in Rice: involvement of a Quorum Sensing regulated secreted Lipase.** *Appl. Environ Microbiol.* 10 1-36.
20. GOTO, K., & OHATA, K 1996. **New bacterial diseases of rice (bacterial brown stripe and bacterial grain rot)** *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 21, 46.
21. GOVAN J.R.W AND DERETIC V. 1996. **Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*.** *Microbial rev.* 60:539-574.

- 22 HAM, J H 2008 **Molecular biology of bacterial panicle blight of rice defense systems for this disease.** Consultado el 24 de abril de 2010, disponible en <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/214676.html>.
- 23 HOLLIS, J P 1951. **Bacteria in healthy potato tissue.** *Phytopathology* 41 350-366
24. HUMMEL, N. A., CASTRO, B.A., MCDONALD, E M., PELLERANO, & M.A., OCHOA, R. 2009 **The panicle rice mite, *Steneotarsonemus spinki* Smiley, a re-discovered pest of rice in the United States.** *Crop Protection*, 1-14
- 25 JEONG, Y., KIM, J., KIM, S., KANG, Y., NAGAMATSU, T , & HWANG, I. 2003. **Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops.** *Plant Disease*, 87 (8), 890-895.
- 26 KAWARADANI, M , OKADA, K., KUSAKARI, S 2000. **New Selective Medium for Isolation of *Burkholderia glumae* from Rice Seeds.** *Plant Pathol.* 66. 234-237.
- 27 KIM, J , KIM, J G., KANG, Y , JANG, J. Y , JOG, G J. Y , KIM, S., SUGA, H., NAGAMATSU, T , & HWANG, I 2004. **Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*.** *Molecular Microbiology*, 54(4), 921-934.
- 28 Kurita, T., Tabei, H. 1997. **On the causal agent of bacterial grain rot of rice.** *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33, 111.

- 29 LA PRENSA Febrero 2010 Artículo Trny Mary Panamá, el mayor consumidor de arroz en América: FAO
30. LALLANA, V. H. 2005. Lista de malezas del cultivo de arroz en Entre Rios, Argentina. *Ecosistema*, 14(2), 162-167 Consultado el 24 de abril de 2010, disponible en <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=97>
31. MAEDA, Y., SHINOHARA, H., KIBA, A., OHNISHI, K., FURUYA, N., KAWAMURA, Y., EZAKI, T., VANDAMME, P., TSUSHIMA, S., & HIKICHI, Y. 2006. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1031-1038.
- 32 MARIN M., SMITS, THM, VAN BEILEN J.B. AND ROJO F. 2001 **The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia* RR10 is under catabolic repression control.** *J. Bacteriol.* 183:4202-4209.
33. MENDOZA, R S. 2004. ***Stenotartarsonemus pinki* Smiley . Una amenaza para a cultura do arroz no Brasil** EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnología. Brasil . 54p.
- 34 MIYAGAWA, H, & INOUE, H. 2002. **Alternative route of infection for bacterial seedling blight of rice caused by *Burkholderia plantarii*.** *Journal of General Plant Pathology*, 68(4)356-362.
35. MORE, M.I., HERRICK, J.B., SILVA, M.C., GHIORSE, W.C. AND MADSEN, E.L. 1994. **Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms**

- and rapid extraction of microbial DNA from sediment** Applied and Environmental Microbiology. 60, 1572-1580
- 36 NALINOVA, M S Y GARCÍA, A 2007.**El Servicio de Diagnóstico de las Bacterias Fitopatógenas en Cuba: Desarrollo y Alcances.** Instituto de investigaciones en Sanidad Vegetal. Fitosanidad. Vol, 11.pgs
37. NANDAKUMAR, R , RUSH, M.C , & CORREA, F 2007. Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with panicle blight symptoms on rice in Panama. Plant Disease, 91(6), 767
- 38 NANDAKUMAR R., A.K M. SHAHJAHAN, XL , YUAN, ER DICKSTEIN, CA CLARK, RD CARTWRIGTH. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States American Phytopathological Society Plant Disease 93 No.9: 896-904
- 39 PEPPER, I. L., & PILLAI, S.D 1994 **Detection of specific DNA in environmental samples via Polymerase Chain Reaction.** In Soil Science Society of America, Methods of soil analytical, part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Pp. 707-726
- 40 POUTOU, R. BURBANO, M., TORRES, K, CARRASCAL, A.K, Y MERCADO, M. 2001. Revista Universitas Scientiarum, 10 (2). 261-278
41. RODRÍGUEZ, H., Y QUIRÓS, E. I. 2009. **Steneotarsonemus spinki, el ácaro del vaneo del arroz, um enemigo silencioso.** La Habana, Cuba: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. 18 pgs

- 42 ROLIM D B , Y QUEIROZ SOUSA A 2006 **Melioidosis in the Americas**. Am J Trop Med Hyg 7 5(5).947--54)
- 43 RUSH, M C. 2009 **Resultados de la investigación de arroz en Estados Unidos**. Trabajo presentado en la instalaciones de la Asociación Coclesana de Productores de Arroz (ACOPRA), Noviembre, Coclé
- 44 SÁNCHEZ, E , GARCÍA, A., EXTRAMIANA, A., ESCOBAR, M 2002 **Descripción de un Brote Clínico de Mamitis por el Complejo Burkholderia cepacia en un Rebaño de Ovino Lechero SEOC**. España. 400 pags
- 45 SAYLER, R.J., R.D. CARTWRIGHT, AND Y YANG, 2005. **Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the USA**. Plant. Dis. 90: 603-610.
- 46 SCHAAD, N.W., JONES, J.B. & CHUN, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3ra Ed) Minnessota: APS Press.
47. SHAHJAHAN, A K M , RUSH, M.C., GROTH, D., & CLARK, C. 2000. **Panicle blight. Recent research points to a bacterial cause** Rice Journal, 103, 26-28
- 48 STRAGIER, D., ABLORDEY, R., PORTAELS, L 2009 **Extraction of Bacterial DNA from soil and water**. Microbiol Methods Department of Biology. University of Antwerp, Belgium. J Microbiol Methods 76 (2). 152-158
- 49 SUBUDHI, P K., SASAKI, T., & KHUSH, G S. 2006. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 1 Cereals and Millets**. Heidelberg Berlin: spinger-Verlag.

- 50 TSAI, Y L & OLSON, B H. 1992 **Rapid Method for Separation of Bacterial DNA from Humic Substances in Sediments for Polymerase Chain Reaction** Applied and Environmental Microbiology, 58(7), 2292-2295
- 51 TSUSHIMA, S , WAKIMOTO, T AND MOGI, S. 1986. **Selective medium for detecting Pseudomonas glumae Kurita et Tabei the causal bacterium of grain rot rice** Annals of Phytopathological Society of Japan, 52,253-259
- 52 URA, H. FURUYA, N., IYAMA,K. HIDAKA, M TSUCHIYA, K., & MATSUYAMA, N 2006. **Burkholderia gladioli associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants** Journal of General Plant Pathology, 72(2), 98-103
53. URAKAMI, T , C ITO-YOSHIDA, H. ARAKI, T. KIJIMA, K. SUZUKI, AND K. MOMAGATA. 1994. **Transfer of Pseudomonas plantari and Pseudomonas glumae to Burkholderia as Burkholderia spp. And description of Burkholderia vandii sp. Nov** Int J Syst. Bacteriol 44 235-245
- 54 VARÓ, O 2009. **Ataque Bacterial en Cultivos de Arroz del Norte de Tolima, México.** Reporte Económico. El nuevo Día 1-3.
55. VIALARD, V , I POIRIER, B. COURNOYER, J. HAURAT, S. WIEBKIN, K OPHEL-KELLER, AND J. BALANDREAU. 1998. **Burkholderia graminis sp. Nov, a novel species of rhizospheric Burkholderia and reassessment of Pseudomona phenazinium, Pseudomonas pyrrocinia and Pseudomonas glathei into Burkholderia.** Int. J. Syst. Bacteriol 48:549-563.
- 56 WOODS,D.E. & SOKOL, P.A. (2006). The genus Burkholderia. Prokaryotes, 5,848-860

- 57 YABUCHI, D., SUN, X , ZHOU, L , BENYON, L , GOTTFWARD, T 2009
**Bacterial Brown Leaf Spot of Citrus, A New Disease Caused By
*Burkholderia andropogonis*** Plant Dis. 93 607-614
- 58 YEATES, C., GILLINGS, M.R., DAVISON, A., ALTAVILLA, N AND
VEAL, D.A 1997 **PCR amplification of crude microbial DNA extracted
from soil.** Letters in Applied Microbiology 25, 303-307.
59. YUAN, X. 2004. **Identification of Bacterial Pathogens Causing Panicle
Blight of Rice in Louisiana.** Thesis.University of Liaoning. 97 pgs.
- 60 ZEA, M.T. 2009. **Panamá, el mayor consumidor de arroz en América**
FAO, Diario La Prensa Extraído el 14 de abril de 2011 desde
[http://www mensual
mesa.com/mensual/contenido/2009/03/18/hoy/panorama/1728379](http://www.mensual
mesa.com/mensual/contenido/2009/03/18/hoy/panorama/1728379) a sp.
- 61 ZEIGLER, R., AND ALVAREZ, E. 1989. **Grain discoloration of rice
caused by *Pseudomonas glumae* in Latin America** Plant Disease, 73, 368

ANEXOS

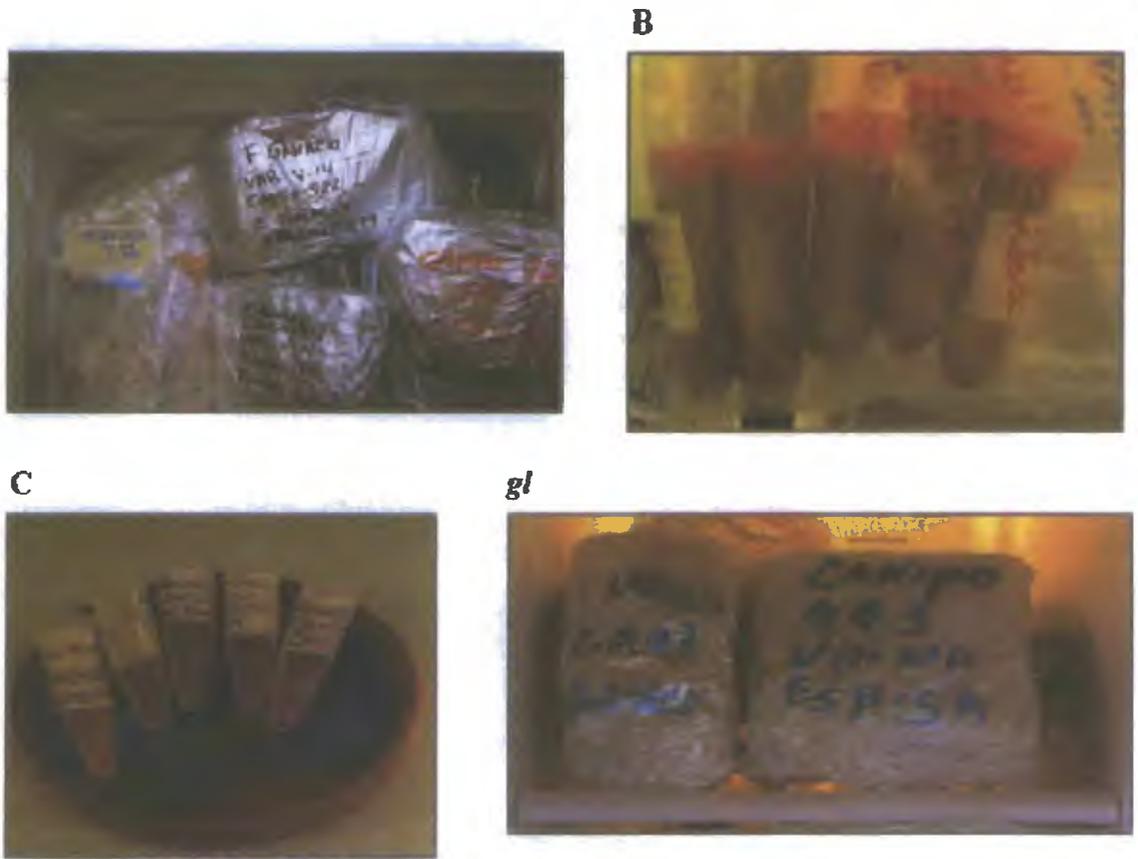
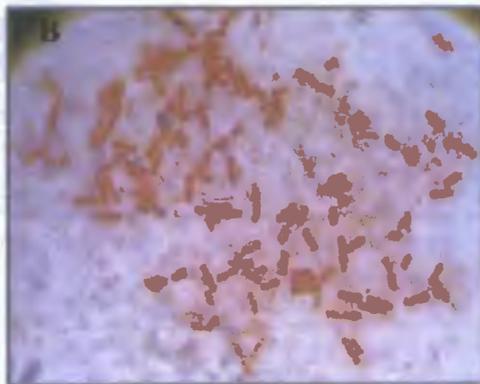
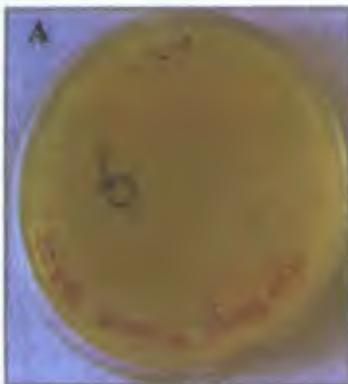


Fig. No.22. Toma y almacenamiento de muestras de agentes diseminadores. **Panel A.** Muestra de tejidos de arroz (etapas fenológicas). **Panel B.** Muestras de suelo. **Panel C.** Muestras de ácaro conservados en etanol al 70%. **Panel D.** Muestras de tejidos de malezas.





Fig. No. 23 Etapas de aislamiento de las patologías bacterianas (*B. glumae* y *B. gladioli*), a partir de muestras de hojas, espigas y semillas., muestras de tejido de espigas y vainas, con síntomas sospechosos de la pudrición del arroz, como se observa en la figura



g. No. 24 Bacterias aisladas a partir de tejido de espiga con sintomatología para *B. glumae* y *B. gladioli*. **Panel A y C** Aislamiento inicial de bacterias en agar King B. **Panel B.** Tinción de Gram de bacterias aisladas. Se observa la morfología de bacilos Gram negativos, lo cual sugiere pudieran ser de *B. gladioli* y *B. glumae*.

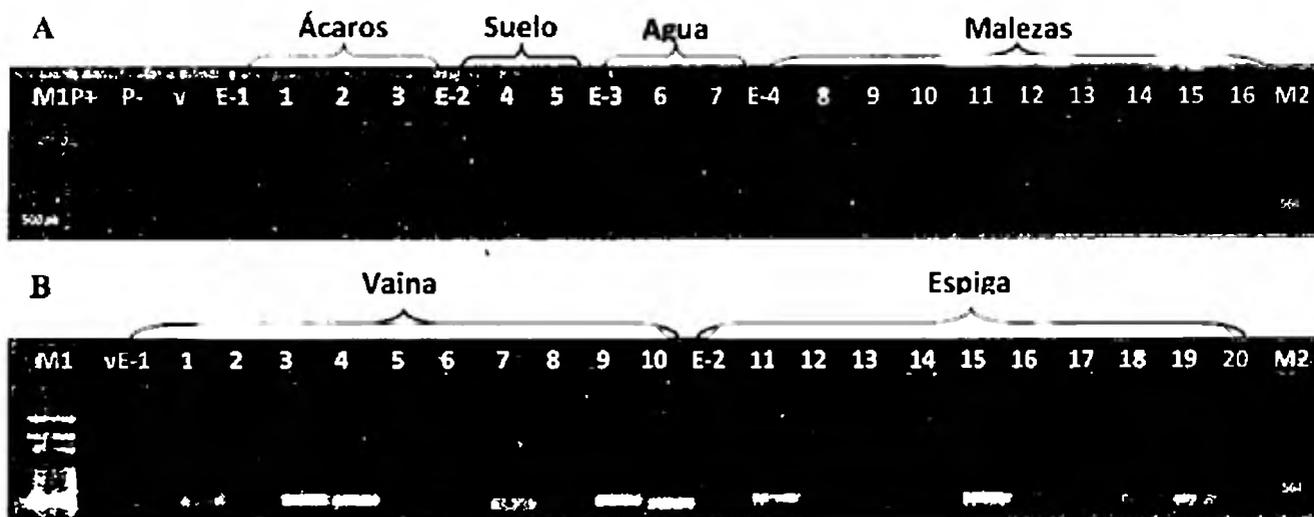


Fig. No.25 Diagnóstico de *B. gladioli* (primers Gla Fw – Gla Rv, 471 nt) a partir de muestras con sintomatología de pudrición bacterial de la panícula del arroz **Panel A.** PCR de ADN extraído de diseminadores por los métodos seleccionados Línea 1 – 3 Muestras de ácaros (método BL1) Línea 4 – 5 Muestras de suelo (método BC1). Línea 6 – 7 Muestras de agua (método AP). Línea 8 – 16: Muestras de malezas (método BL2). Las letras E-1, E-2, E-3 y E-4 indican los controles negativos de extracción para cada uno de los respectivos diseminadores **Panel B.** PCR de ADN extraído de tejidos Línea 1 – 10 Muestras de vaina (método BL2) Línea 11 – 20 Muestras de espiga (método BL2) Las letras E-1 y E-2 indican los controles negativos de extracción para cada uno de las respectivas muestras La letra P- corresponde a los controles negativos de PCR, y P+, al control positivo de PCR (ADN de bacteria). La letra v señala los pocillos vacíos La letra M1 corresponde al marcador de peso molecular 100 pb de Promega; y M2, al *DNA λ / Hind III* 0.1 µg/µl

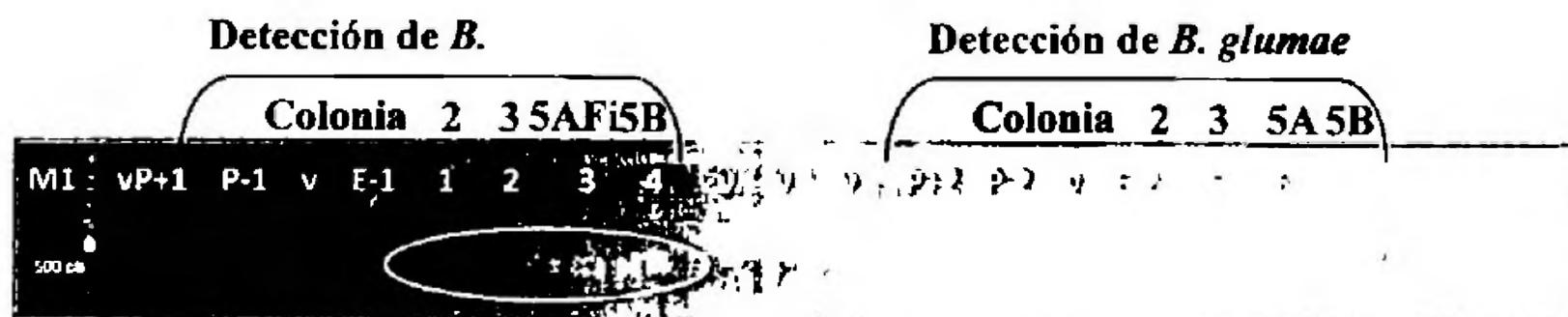


Fig. No. 26 Identificación de bacterias aisladas a partir de tejido de espiga con sintomatología para *B. glumae* y *B. gladioli* (primers Gla Fw – Gla Rv, 471 nt; y Glu Fw – Glu Rv, 528 nt) Línea 1 – 4: PCR con primers para la detección de *B. gladioli*; Línea 5 – 8: PCR con primers para la detección de *B. glumae*. Línea 1, 2, 5 y 6 Colonias de referencia (códigos 2 y 3) para *B. gladioli*. Línea 3 y 7: Supuesta colonia (código 5A) aislada de *B. glumae* o *B. gladioli*. Línea 4 y 8: Supuesta colonia (código 5B) aislada de *B. glumae* o *B. gladioli*. La letra P+1 corresponde al control positivo de PCR para *B. gladioli* y P+2, control positivo de PCR para *B. glumae*. La letra E-1 corresponde al control negativo de extracción con primers para *B. gladioli* y E-2, con primers para *B. glumae*. La letra P-1 indica el control negativo de PCR con primers para *B. gladioli* y P-2, con primers para *B. glumae*. La letra v señala los pocillos vacíos. La letra M1 corresponde al marcador de peso molecular 100 pb de Promega; y M2, al *DNA λ / Hind III* 0.1 µg/µl