

Recibido: 19/06/16; Aceptado: 10/12/16

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

indexada en



http://www.latindex.unam.mx/buscador/ficPais.html?opcion=1&clave_pais=3

3



EVALUACIÓN DE 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.

EVALUATION OF POSSIBLE AGENTS OF TWO BACTERIAL PATHOLOGIES: *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* AND THEIR PRESENCE IN TISSUES OF THE RICE PLANT IN SOME RICE FIELDS OF PANAMA.

Alexis De La Cruz L.¹

¹ MSc. Profesor, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Centro Regional Universitario de Azuero, Universidad de Panamá; alexisdelac@gmail.com

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 (vaina 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. En este sentido, los resultados del diagnóstico molecular de la presencia, arrojaron mayor ocurrencia de una de las patologías ***B. gladioli***, para dos de los 5 posibles diseminadores, como lo

fue el ácaro y las malezas, lo que concuerda con la literatura; en el primero de los casos, la mayor ocurrencia de ambas bacterias se atribuye a ***B. gladioli***; de las etapas fenológicas la de semilla presentó mayor ocurrencia de ***B. gladioli***, las otras etapas resultaron con poca presencia, las muestras de espigas y vainas se detectó ambas patologías bacterianas, en tanto que la zona arrocerá con mayor ocurrencia fue Natá y posteriormente Alanje, resultando el campo 907 y 922 con mayor ocurrencia. Finalmente, se concluye que los posibles diseminadores agua y suelo resultaron negativo a la presencia de estas dos patologías, en tanto que ácaro y semillas reafirman lo reportado en la literatura científica, sin embargo ***B. gladioli*** se reporta en este estudio con la mayor presencia.

Palabras claves: Agentes diseminadores, *Burkholderia glumae*, *B. gladioli*, etapa fenológica, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

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. 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.

KEYWORDS: Disseminating agents, *Burkholderia glumae*, *B. gladioli*, phenological stages, reaction the polymerase chain.

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 (Castellanos et al., 2001).

Es importante señalar, que uno de los más grandes problemas fitosanitarios para la década de los 90', 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 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).

El principal hospedero del ácaro ***Steanothersonemus 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 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 (Coenye & Vandame, 2003).

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 (Correa, 2006).

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 (Saylor *et al.*, 2006). 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).

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.

El objetivo de este trabajo fue 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

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 arrocera 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. Además se evaluaron 3 campos de cultivo en el área de Nata, para muestras de tejidos de algunas etapas fenológicas de arroz.

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: Alanje 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. gladiolis* 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.

La investigación estuvo 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.**

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.

Estandarización de Protocolos de Extracción de ADN de los diferentes posibles agentes diseminadores: para **Agua**, se probaron 2 métodos (Métodos concentración-Buffer lisis y Proteinasa K, Protocolo de extracción de ADN en muestras de aguas de riego (Ausubel *et al.*, 1992), para las muestras de Suelo, se probaron 4 métodos: Método bead beating con Cloruro de calcio según (Balandreau *et al.*, 2001). El método S con Cloruro de Calcio y Carbonato de Calcio. El protocolo de Extracción de ADN Bacteriano a partir de Muestras de Suelo por el Método de Miller *et al.* Modificado. Para la extracción de ADN a partir de muestras de ácaro, se probaron 4 métodos : Método CTAB para la Extracción de ADN a partir de Ácaros, Método FTA para la Extracción de ADN a partir de Ácaros, Digestión Enzimática y Extracción Orgánica de ADN a partir de Ácaros Short Protocols (Desloire *et al.*, 2006), finalmente para malezas y semillas, se probaron 2 métodos (protocolo estandarizado en otros proyectos a partir de tejido de plantas: uno con Buffer de lisis y otro método con Trizol, Protocolo de extracción de ADN a partir de tejidos de la planta para detección de *Burkholderia glumae* y *Xanthomona oryzae* pv. *Oryzae*).

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*., GluF 5'-**ACACGGAACACCTGGGTA**-3' y GluR 5'(**AGACTCGAAGAGAT**)3'; y para el caso específico de *B. gladioli* , 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) (Coenye & Vandame, 2003).

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.

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.1.

Cuadro.1: Preparación del Master Mix para la amplificación de las muestras de ADN obtenidas a partir de los agentes diseminadores, tejidos y etapas fenológicas.

Reactivos	cantidades base (μ l)
	16.05
Agua ultrapura	
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**

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 1.14 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).

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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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 cuadro No.2)

Cuadro No. 2 Registro de muestras totales para posibles agentes diseminadores de las patologías bacterianas por fincas y zonas arroceras.

Zona	Finca	Agua	Suelo	Ácaro	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	Bayano	4	4	4	15	4	31
	Alanje 1	4	4	4	12	4	28
	Alanje 2	4	4	4	10	4	26
SANTA MARÍA	Cabezona	4	4	4	23	4	39
	El Rincón	4	4	4	15	4	31
	Rodeo	4	4	4	11	4	27
NATÁ	Santa Rita	4	4	4	20	4	36
	Sierra	4	4	4	15	4	31
	Margarita	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 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 aislaran 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 Laurin Bertaini (Caldo LB)

Las colonias con características similares a *B. glumae* y *B. gladioli*, se 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.1, abajo).

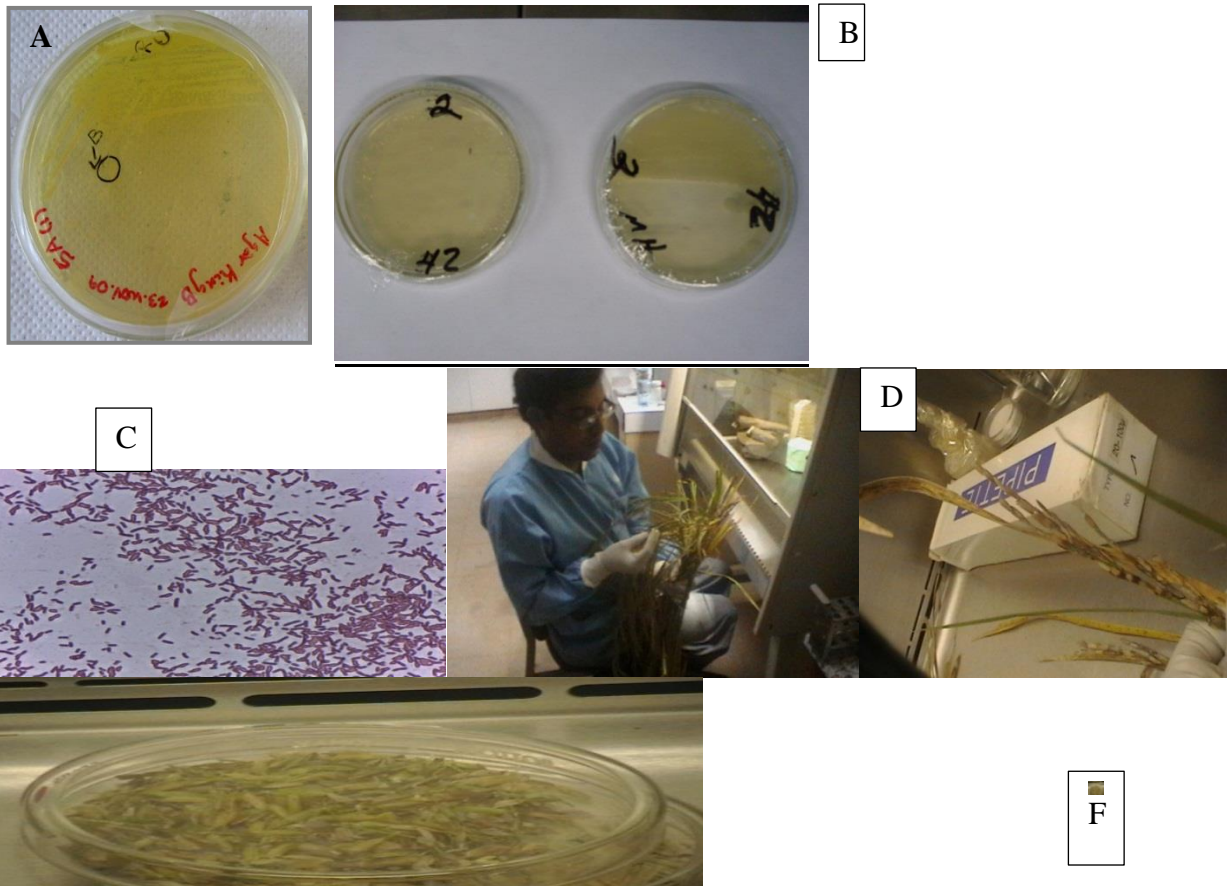


Figura No 1.: En estas imágenes se muestra el proceso de aislamiento de *B. glumae* y *B. gladioli* a partir de muestras de tejidos y semillas, A: Plato con agar King B, con colonias de *B. glumae*; B: Platos con colonias de *B. gladioli*; C: Tinción de Gram típica de *Burkholderia glumae*, la cual muestra 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.

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.1. 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, 4ª y 4C**; mientras que las colonias denominadas **A2 y H1**, no presentaron dicho crecimiento (**ver cuadro No.3 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 (Sayler, *et al.*, 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 Sayler, *et al.*, (1989) y Yuan (2004), clasifican a ***B. glumae*** como negativa para esta prueba.

Cuadro No.3: Diferenciación Bioquímica de las distintas cepas obtenidas a partir de los aislados de semillas, vainas y espigas.

Característica colonial	Cepas con código A2 y H1	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.

Para cada uno de los agentes diseminadores evaluados (agua, suelo, acaro, maleza, semillas) y muestras de tejido, (vaina 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.2 a 5**).

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. 4**), 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***. (**figura No.2**).

En los agentes diseminadores agua y suelo, se han realizado estudios, donde se han detectado bacterias de ***Burkholderia spp.***, (Dobereimer, 1993; Coenye *et al.*, 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 Cho *et al.*, 2007, 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 *et al.*, (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 *Asclepiascurassavica*, *Digitariasanguinalis*, *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.

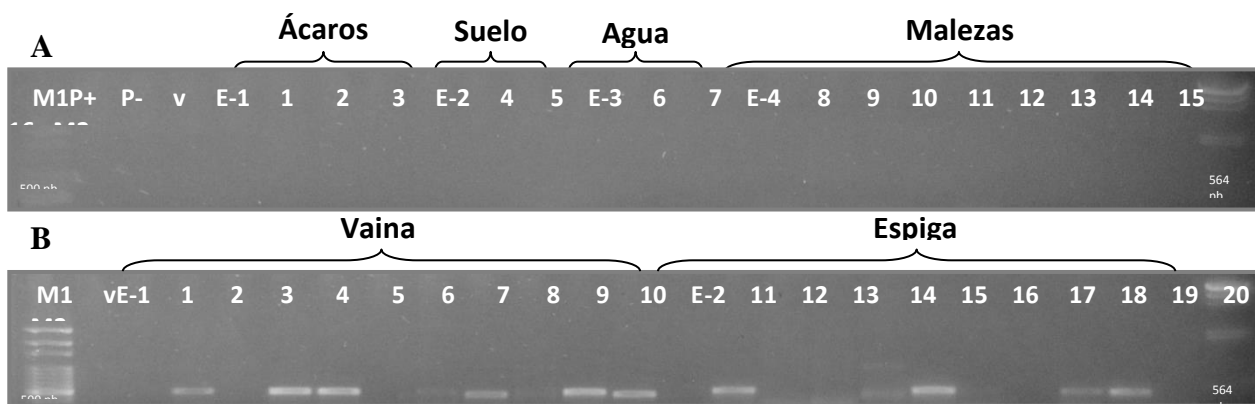


Fig. 2. Diagnóstico de *B. gladioli* (primersGlaFw – GlaRv, 471 nt) a partir de muestras con sintomatología de pudrición bacterial de la panícula del arroz. **Panel A.PCR de ADN extraído de diseminadores** por los métodos seleccionados. Línea 1 – 3: Muestras de ácaros (método BL1). Línea 4 – 5: Muestras 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; v P+, al control positivo de PCR

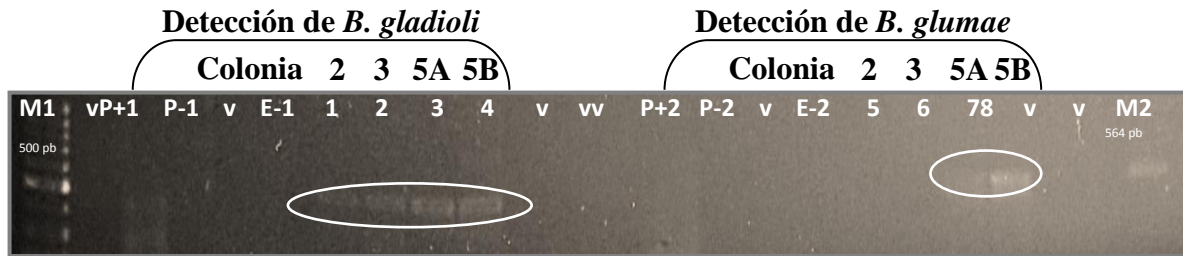
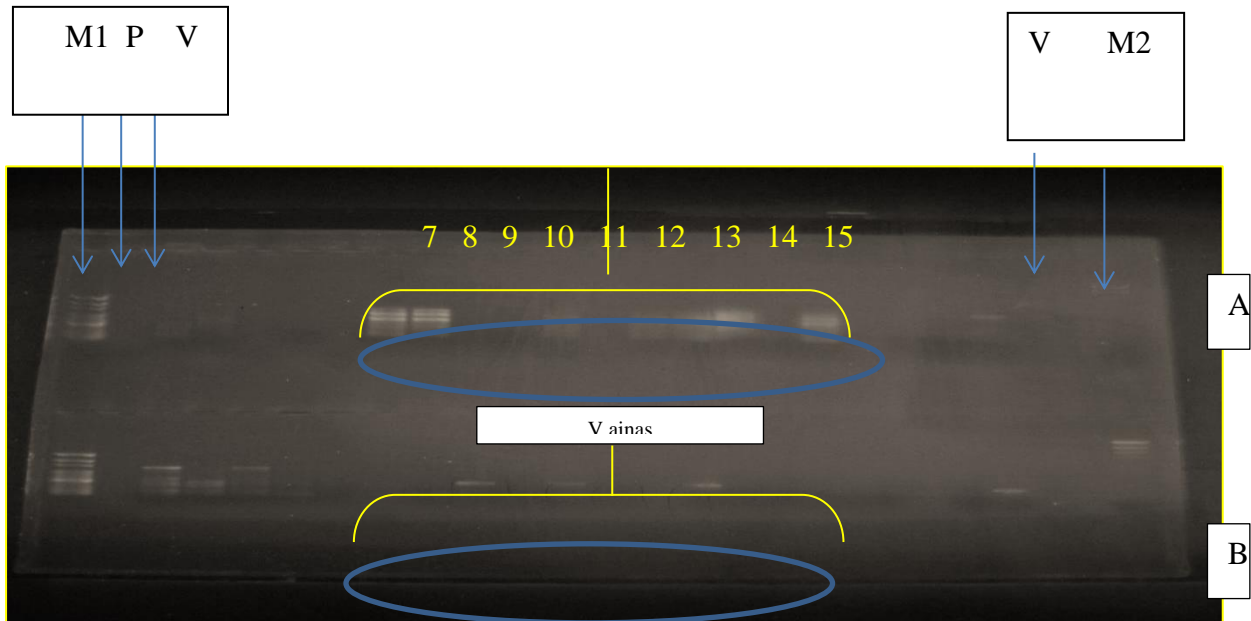


Fig. 3. Identificación de bacterias aisladas a partir de tejido de espiga con sintomatología para *B. glumae* y *B. gladioli* (primers GlaFw – GlaRv, 471 nt; y GluFw – GluRv, 528 nt). Línea 1 – 4: PCR con primers para la detección de *B. gladioli*. Línea 5 – 8: PCR con primers para la detección de *B. 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.



M1 V P+

Figura No. 4: 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.

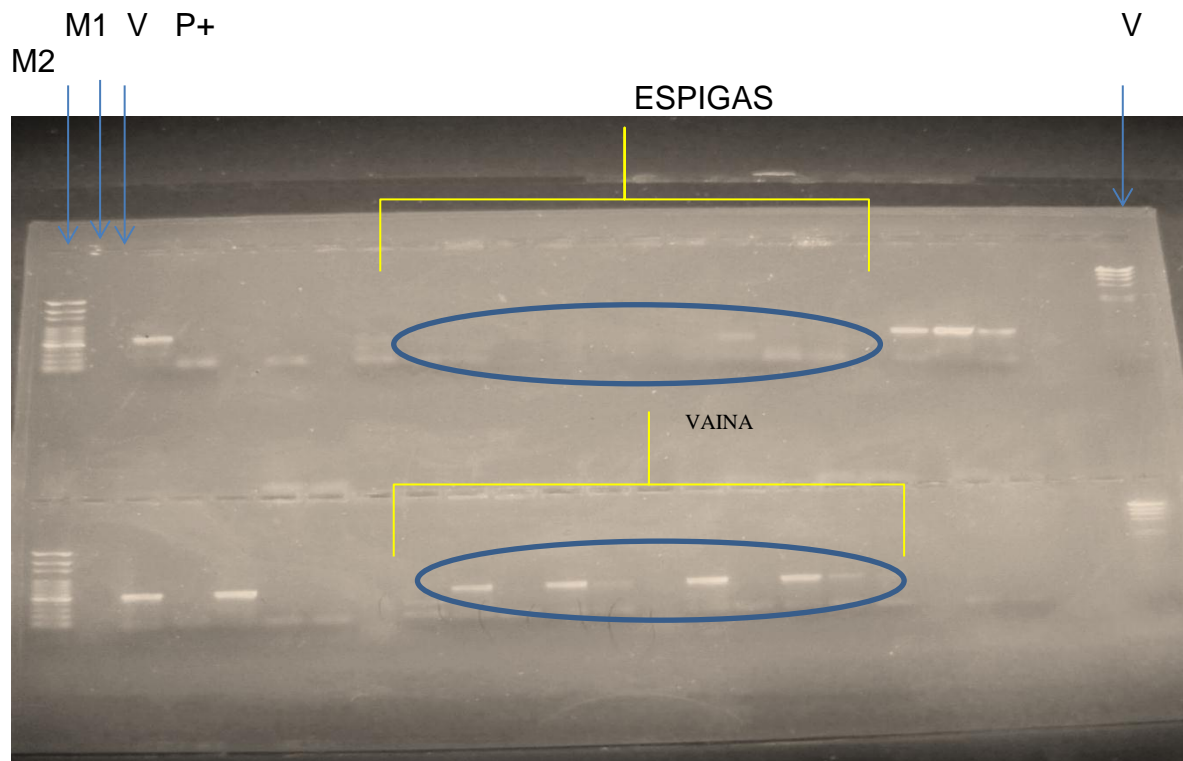
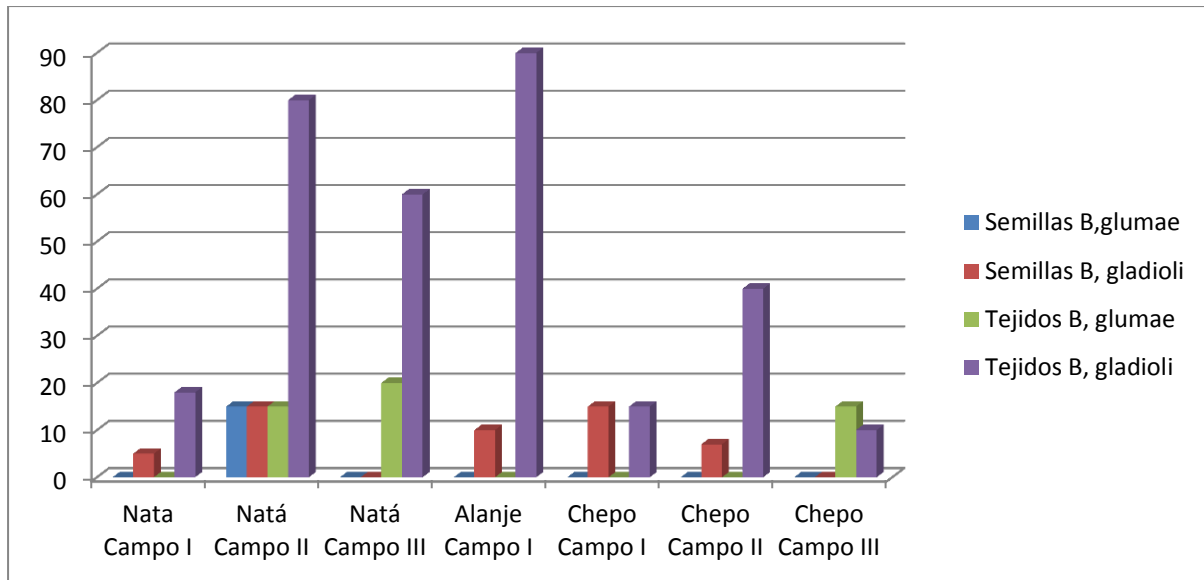


Figura No.5: Identificación de *B. glumae* aisladas a partir de tejidos de espigas y vainas con sintomatología usando (primers GluFw – GluRv, 528 nt). Se observa que del pocillo 7-17, algunas bandas tenues para la patología señalada, en el carril A, en el carril B, se observa PCR positivo más intenso. 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.

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, *et al.*, 2009). 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.6: 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* es la bacteria que se haya mayormente asociada a la patología de vaneamiento de los cultivos de arroz (Rush *et al.*, 2009, Sayler *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 arroceras con mayor ocurrencia de porcentaje de las patologías la de Natá, y es allí como los señores Rush *et al.*, (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

Se determinó una mayor presencia de la bacteria ***B. gladioli*** en comparación ***B. glumae*** en todas los posibles agentes diseminadores y muestras de tejido.

Respecto a los agentes diseminadores, se pudo determinar una mayor presencia de ***B. gladioli*** en ácaro, con la excepción de las muestras de semillas.

Las muestras de los diseminadores, agua y suelo resultaron negativas para la presencia de ambas patologías bacterianas para este estudio.

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

Las muestras de tejidos de vainas y espigas, fueron las que reportaron ambas patologías bacterianas.

De los campos evaluados 907, 922 y 943, resultaron positivas para las dos patologías 907 y 922, pero con mayor ocurrencia de ***B. gladioli***.

De las etapas fenológicas evaluadas, las etapas de semillas resultaron con mayor ocurrencia de ***B. gladiolis***, no así para ***B. glumae***.

La zona arrocera de Natá en sus tres campos evaluados resultaron con mayor porcentaje de presencia de las dos patologías bacterianas de las tres zonas evaluadas.

De las dos patologías evaluadas en todas las muestras, fue más notoria la presencia de *B. gladioli*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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_Ba ck_Page,F2400_P1001_PUB_mail_ID:1000,79327.

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).

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.

Correa, V. F. 2006. **Asociación de la bacteria *Burkholderia glumae* al complejo acaro-hongo-bacteria en Panamá.** Tesis de Maestría.

- 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.
- Chowdhury, P.R., y Heinemann, J.A 2006. **The General Secretary Pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *Agaricicola* BG164R Is Necessary for Cavity Disease in White Button Mushrooms.** Appl Environ Microbiol. 72(5): 3558-3565.
- Coenye, T., & Vandame, P. 2003, **Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches .** Environmental Microbiology, 5 (9), 719-729.
- Da Silva, B. 2001. **Estudio del arroz en campo en Brasil.** Informe técnico. Salud Vegetal do Brasil. 36 págs.
- Desloire, S.; Valiente Moro, C.; Chauve, C. & Zenner, L. (2006). **Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae).** *Veterinary Research* 37: 725–732.
- Dobereiner, J. 1993. **Recent changes in concepts of plants bacteria interactions: endophytic N2 fixing bacteria.** Cienc. Cult. 44:310-313.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- 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.

- 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.
- 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>.
- Hollis, J.P. 1951. **Bacteria in healthy potato tissue**. Phytopathology 41:350-366.
- 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.
- 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.
- Nandakumar, R., Rush, M.C., & Correa, F., Nalinova, M. S 2007. Association of ***Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with panicle blight symptoms on rice in Panama**. Plant Disease, 91(6), 76.
- Rush, M. C., Correa, F., Sayler, R.J., Nandakumar, R. 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.
- 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.

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.

Schaad, N.W., & Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3ra. Ed.). Minnesota: APS Press.