

**UNIVERSIDAD DE PANAMA**  
**VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS AGRICOLAS CON**  
**ESPECIALIZACION EN PROTECCION VEGETAL**

**DETERMINACION DE LA INCIDENCIA DE BACTERIAS PATOGENAS**  
**EN SEMILLAS DE ARROZ, (CATEGORIAS BASICA,**  
**REGISTRADA Y CERTIFICADA) Y EVALUACION**  
**DE ALTERNATIVAS QUIMICAS**  
**PARA SU CONTROL**

**JUAN PABLO SORIANO BARRIA**

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA**  
**OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON**  
**ESPECIALIZACION EN PROTECCION VEGETAL**

**PANAMA, REPUBLICA DE PANAMA**

**2006**

**DETERMINACION DE LA INCIDENCIA DE BACTERIAS PATOGENAS  
EN SEMILLAS DE ARROZ, (CATEGORIAS BASICA,  
REGISTRADA Y CERTIFICADA) Y EVALUACION  
DE ALTERNATIVAS QUIMICAS  
PARA SU CONTROL**

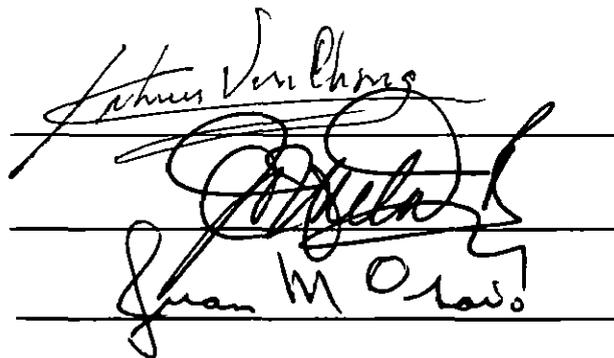
**TESIS**

**Sometida para optar al título de Maestro en Ciencias con  
especialización en Protección Vegetal**

**VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO**

**Permiso para su publicación o reproducción total y parcial debe  
ser obtenida en la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado**

**APROBADO**

  
The image shows three horizontal lines representing signature lines. The top line has a signature that appears to be 'Johannes Van der...' followed by a large, stylized signature. The middle line has a signature that appears to be 'Juan M. Orozco'. The bottom line is empty.

**Asesor**

**Jurado**

**Jurado**

# **Dedicatoria**

# **Agradecimiento**

**Primero que todo a Dios todo poderoso por darme vida y salud para culminar con éxito este trabajo**

**Agradezco a mis padres Juan Pablo Soriano II a mi madre Dionisia Barria por creer en mí a mi esposa Lilena Zarzavilla a mi hijo Juan Pablo Soriano IV a mi hija Mercedes Soriano a mis hermanas Dons y Jessica a mi sobrina Teresita Quijano y a mi cuñado Ricardo Quijano por escucharme y darme su vos de aliento en aquellos momentos difíciles**

**Igualmente agradezco al grupo de excelentes profesionales que me supieron dirigir en la culminación del mismo Al Dr Kilmer Von Chong Director de este trabajo por su gran ayuda y cooperación en todo momento al Dr Juan Miguel Osono miembro del Comité de Asesores por sus acertados comentarios al Magister José Carlos Ureta miembro del Comité de Asesores por su gran cooperación en los aspectos requeridos de este tema Al Dr Francisco Mora y a la Ing Fanny Saavedra por su impetu de fortalecer al sector agropecuario y científico ya que cada modulo de este curso fue la fuente de inspiración para llegar a la meta deseada y más allá**

**A todos ustedes ¡Muchas Gracias!**

***Juan Pablo Soriano III***

# **Indice General**

<b>Dedicatoria</b>	<b>I</b>
<b>Agradecimiento</b>	<b>III</b>
<b>Índice de cuadros</b>	<b>IX</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>XIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>Revisión de literatura</b>	<b>8</b>
<b>A Importancia de la detección de bacterias fitopatógenas en semillas de arroz</b>	<b>9</b>
<b>B Generalidades de las especies bacteriales transmitidas por semillas que causan enfermedades en granos plantulas y vainas</b>	<b>10</b>
<b>1 Género <i>Pseudomonas</i></b>	<b>12</b>
<b>1 1 <i>Pseudomonas fuscovaginae</i></b>	<b>12</b>
<b>1 1 1 Síntomas</b>	<b>13</b>
<b>1 1 2 Agente causal</b>	<b>13</b>
<b>1 1 3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad</b>	<b>14</b>
<b>1 1 4 Control</b>	<b>14</b>
<b>1 2 <i>Pseudomonas glumae</i> (Sin <i>Burkholdena glumae</i>)</b>	<b>15</b>
<b>1 2 1 Sintomas</b>	<b>15</b>
<b>1 2 2 Agente causal</b>	<b>16</b>

1 2 3	Epidemiología y ciclo de la enfermedad	16
1 2 4	Control	16
1 3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>syringae</i>	17
1 3 1	Sintomas	17
1 3 2	Agentes causal	17
1 3 3	Epidemiología y ciclo de la enfermedad	18
1 3 4	Control	18
1 4	<i>Pseudomonas avenae</i>	19
1 4 1	Sintomas	19
1 4 2	Agentes causal	20
1 4 3	Epidemiología y ciclo de enfermedad	20
1 4 4	Control	20
C	Generalidades de las especies bacteriales transmitidas por semilla que causan enfermedades foliares	21
1	Genero <i>Xanthomonas</i>	23
1 1	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzae</i>	23
1 1 1	Sintomas	24
1 1 2	Agente causal	25
1 1 3	Epidemiología y ciclo de enfermedad	25
1 1 4	Control	26
1 2	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzicola</i>	26
1 2 1	Sintomas	26

1 2 2 Agente causal	27
1 2 3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad	27
1 2 4 Control	28
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>30</b>
A Variedades	31
B Toma de muestras	31
C Procesamiento de muestras	33
D Análisis de semilla	33
E Aislamiento de bacterias	33
F Identificación	33
G Prueba inmunoenzimática	37
H Prueba de patogenicidad	38
I Alternativas químicas de control	39
J Análisis estadístico	40
<b>Resultados</b>	<b>41</b>
<b>Discusión</b>	<b>55</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>62</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>64</b>
<b>Revisión bibliográfica</b>	<b>66</b>
<b>Anexos</b>	<b>75</b>

# Indice de Cuadros

CUADRO I	Características fenotípicas empleadas para diferenciar <i>X oryzae</i> pv <i>oryzae</i> de <i>X oryzae</i> pv <i>oryzicola</i>	23
CUADRO II	Total de muestras por categoría	32
CUADRO III	Características de crecimiento de las colonias de <i>Pseudomonas</i> en medio King B	34
CUADRO IV	Características de crecimiento de las colonias de <i>Xanthomonas oryzae</i> en medio factor de crecimiento	35
CUADRO V	Características bioquímicas de <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> <i>Pseudomonas avenae</i> <i>Burkholdena glumae</i> ( <i>P glumae</i> ) y <i>P syringae</i> (Zeigler y Col 1988)	36
CUADRO VI	Características bioquímicas de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzae</i> y <i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzicola</i> (Mew T W 1992) Agarwal y Col (1989)	37
CUADRO VII	Alternativas químicas evaluadas para el control de bacterias en arroz	39
CUADRO VIII	Características morfológicas de las colonias aisladas por especies	44
CUADRO IX	Numero de aislamientos obtenidos por categoría de semilla variedad género y especie bacterial	45
CUADRO X	Características bioquímicas inmunoenzimáticos de los	

	aislamientos de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzae</i> por categoría de semilla	46
CUADRO XI	Características bioquímicas inmunoenzimáticas de los aislamientos de <i>Pseudomonas avenae</i> (no fluorescente) por categoría de semilla	47
CUADRO XII	Características bioquímicas inmunoenzimáticas de los aislamientos de <i>Burkholderia glumae</i> (no fluorescentes) por categoría de semilla	48
CUADRO XIII	Características bioquímicas inmunoenzimáticas de los aislamientos de <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> por categoría de semilla	49
CUADRO XIV	Características bioquímicas inmunoenzimáticas de los aislamientos de <i>Pseudomonas syringae</i> por categoría de semilla	50
CUADRO XV	Análisis de varianza de la eficacia biológica de bactericidas en el control de bacterias en semillas categorías básica registrada y certificada 2004	52
CUADRO XVI	Promedio de granos con crecimiento bacteriales ordenados mediante la prueba de Rangos Múltiples de Duncan por tratamiento evaluados a las 24 48 y 72 horas de sembrados	52
CUADRO XVII	Análisis de varianza de la eficacia del control de la	

	bacteriosis combinando las tres categorías de semilla de arroz	53
<b>CUADRO XVIII</b>	Promedio de incidencia de exudados bacteriales ordenados mediante la prueba de Rangos Múltiples de Duncan por categoría de semilla	53
<b>CUADRO XIX</b>	Promedio de incidencia de granos con crecimiento bacteriano combinando las tres categorías ordenados mediante la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan por tratamiento	54

# **Indice de Figuras**

Figura 1	Imbibición de semillas de arroz	76
Figura 2	Imbibición y germinación de los granos de arroz	76
Figura 3	Crecimiento bacterial de <i>Xanthomonas</i> y <i>Pseudomonas</i> a partir de granos en medio de cultivo	77
Figura 4	Aislamiento bacterial de <i>Pseudomonas</i> spp purificado en agar nutritivo	77
Figura 5	Crecimiento bacterial de <i>Pseudomonas</i> spp en medio de cultivo agar nutritivo	78
Figura 6	Crecimiento bacterial de <i>Pseudomonas sinngae</i> en medio de cultivo Levan	78
Figura 7	Crecimiento bacterial de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzae</i> en medio de cultivo YDC	79
Figura 8	Crecimiento bacterial de <i>Pseudomonas</i> spp en medio de cultivo KB	79
Figura 9	Preparación de medio de cultivo	80
Figura 10	Crecimiento bacterial de <i>Pseudomonas</i> spp en medio de cultivo YNA (Levadura Agar Nutritivo)	80
Figura 11	Crecimiento bacterial de <i>Pseudomonas</i> spp en medio de cultivo Arginina	81
Figura 12	Crecimiento bacterial <i>Pseudomonas sinngae</i> positivo	

	fluorescente en medio de cultivo KB	81
Figura 13	Reacción positiva a la prueba Reducción de Nitrato (NO <sub>3</sub> ) de <i>Pseudomonas glumae</i>	82
Figura 14	Reacción bacterial positiva de <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> en medio de cultivo Arginina	82
Figura 15	Producción de Ácido Sulfúrico (H <sub>2</sub> S) para el aislamiento <i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	83
Figura 16	Hidrolisis de Gelatina (positiva y negativa) <i>Pseudomonas sinngae</i>	83
Figura 17	Reacción positiva de patogenicidad a <i>Pseudomonas</i>	84
Figura 18	Reacción positiva de patogenicidad a <i>Xanthomonas</i>	84

# **Resumen**

En el periodo junio 2004 – julio 2005 se determinó la incidencia de bacterias patogénicas en semilla de arroz (categoría básica registrada y certificada) y se evaluaron algunas alternativas de control bacterial en el laboratorio de Protección Vegetal del IDIAP en Divisa. Se analizó un total de 112 muestras colectadas en 10% de la superficie total sembrada en las Provincias de Chiriquí, Coclé, Veraguas, Herrera y Los Santos. Los aislamientos se identificaron en base a las características morfológicas, reacción bioquímica de hipersensibilidad y prueba inmunoenzimática ELISA. Se confirmó la presencia de bacterias sembrando semillas sumergidas en agua estéril en medio agar nutritivo; se lograron 103 aislamientos en factor de crecimiento y 6 cepas fluorescentes en King B y 106 no fluorescentes. El número de aislamiento por categoría y variedad de semilla, género y especie bacterial indica que los géneros con mayor incidencia fueron *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* seguido de *Pseudomonas avenae*, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas fuscovaginae* y *Pseudomonas syringae*. También encontramos un género bacterial por variedad y categoría. La eficacia de control de los bactericidas indicó que ninguno suprimió el crecimiento de bacterias y que los menores niveles de incidencia de crecimiento bacterial se encontraron entre los bactericidas evaluados. Todas las muestras de la categoría de semillas estudiadas están infectadas con una mezcla de especies bacteriales patogénicas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

**PALABRAS CLAVES** Patología de semillas *Pseudomonas* *Xanthomonas*

The incidence of pathogenic bacteria on rice seed (basic register certified category) and the evaluation of the control efficacy of bactericides was done in the Phytopathology Laboratory of IDIAP – Divisa from June 2004 to July 2005. A total of 112 samples were collected in 10% of the seed cultivated area of Chiriquí, Coclé, Veraguas, Herrera, and Los Santos provinces. The isolations were identified based on morphological and biochemical characteristics and hypersensitive reaction and ELISA serological tests. A total of 103 isolates were obtained in growth factor 6 fluorescent and 106 non fluorescent isolate in King B media. The number of isolate per category and variety of seed, genera and bacterial species indicated that mainly the incidence of bacterial genera were from *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* followed by *Pseudomonas avenae*, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas fluscovaginae*, *Pseudomonas syringae*. Also, it was found more than one bacterial genera per variety and category. The control efficacy of bactericides showed that none of them were able to eliminate seed bacteria and the lowest levels of incidence were detected in the bacterial treatments as compared to the check. Every sample of seed was infected with a mixture of pathogenic bacteria belonging to the *Pseudomonas* and *Xanthomonas* genera.

**KEYWORDS** Bacteria seed pathology *Pseudomonas* *Xanthomonas*

# **Introducción**

En los últimos años los productores de arroz comercial y de semillas han reportado mermas en producción y pérdidas económicas asociadas directamente con el vaneado de espigas decoloración manchado de granos y lesiones en vainas y hojas. Los productores fueron sujetos de descuentos sustanciales en los molinos por la presencia de granos moderado o severamente manchados y parcialmente llenos a pesar de haber asperjado fungicidas en los estadios fenológicos de máximo embuchamiento y floración.

Las evidencias indican que las aplicaciones de fungicidas ofrecieron muy poca protección y que los incrementos en la incidencia del manchado de grano y pudrición de la vaina atribuidos a hongos como *Sarocladium* spp y *Drechslera* spp (Kadote y col 1983) pudieran tener una naturaleza bacterial más que fungosa.

Investigadores como Zeigler y col (1987 1988 1989) Tominaga y col (1981) Miyajima (1983) y Azagami y col (1987) han reportado incrementos en la incidencia de enfermedades de origen bacterial en el arroz afectando tanto a los granos como a plántulas vainas y hojas.

Se han aislado bacterias patogénicas de especies de los géneros *Pseudomonas* spp fluorescentes y no fluorescentes así como especies del género *Xanthomonas* causando síntomas diversos que limita el empleo de la sintomatología como criterio único de diagnóstico. El desarrollo de los síntomas en los granos parece no depender de la aparición previa de lesiones en las vainas. Las hojas y vainas pueden permanecer sanas y las florecillas presentar necrosis, decoloración y estenilidad. Los géneros de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* causantes de estos síntomas han sido reportados como transmitidos por semilla por (Klement 1955, Zeigler y col 1987) y (Janes y col 1989) respectivamente.

La alta incidencia de bacterias en follaje y semillas es un problema de interés nacional que puede poner en peligro la producción del cultivo de mayor importancia económica del país. El arroz.

A pesar de contar con un programa nacional de certificación de semillas, el incremento en el vaneado de espigas, decoloración y manchado de granos está directamente relacionado con la no realización de pruebas de detección de bacterias patogénicas transmitidas por semilla. A la percepción de que las enfermedades bacteriales transmitidas por semilla pueden detectarse con precisión en las inspecciones de campo y que los tratamientos químicos de las semillas son altamente efectivos.

**En Panamá existe muy poca información y experiencias endógenas sobre la incidencia de enfermedades bacteriales transmitidas por semilla y sobre las especies bacteriales presentes en ellos**

**Es necesario realizar trabajos de investigación dirigidos a aislar e identificar las especies bacteriales transmitidas por semillas de arroz**

# **Revisión de Literatura**

## **A Importancia de la detección de bacterias fitopatógenas en semillas de arroz**

La semilla de arroz es uno de los insumos más importantes en la producción de este componente en la canasta básica familiar de los panameños

Las semillas infestadas o contaminadas con fitobacterias constituyen la principal fuente de inóculo primario por lo que producir analizar y cultivar semillas libres de bacterias patogénicas representan los medios más importantes de control y manejo especialmente en países en vías de desarrollo donde los recursos económicos para implementar medidas de control son limitadas (Saettler 1989)

Semillas de arroz infestadas o infectadas representan un medio efectivo de diseminación de bacterias a largas y cortas distancias ya que éstas se transportan frecuentemente de un país a otro con propósitos de mejoramiento o para producción (Schaad N W 1982)

La mayoría de las agencias involucradas en la certificación de semillas libres de patógenos basan sus programas principalmente sino exclusivamente en inspecciones oculares de los campos para detectar enfermedades bacteriales

Se sabe que las bacterias patogénicas son transmitidas en semillas de cultivares tolerantes o susceptibles y en plantas asintomáticas. Los programas de certificación basados en inspecciones visuales no garantizan semillas libres de patógenos de allí que se requiera analizarlas para detectar la presencia de bacterias patogénicas (Saettler 1989)

## **B Generalidades de las especies bacteriales transmitidas por semillas que causan enfermedades en granos, plántulas y vainas**

Se han aislado *Pseudomonas* patogénicas fluorescentes y no fluorescentes de plantas de arroz en América Latina, África y Asia. Los síntomas aparentemente causados por estas *Pseudomonas* spp son similares impidiendo realizar un diagnóstico confiable basado solamente en la sintomatología ya que se asemejan a los causados por hongos patógenos tales como *Sarocladium* sp y *Drechslera* spp (Kadota y col 1983, Zeigler y col 1987)

En plántulas se desarrolla una decoloración sistémica de la vaina que alcanza la vena central y secundarias de las hojas y pueden llevar a la muerte de la plántula (Zeigler y col 1987)

En plantas maduras los síntomas usualmente aparecen cerca de la floración y pueden estar limitadas a necrosis café en el cuello de la vaina de la hoja bandera o necrosis extensiva de la vaina, pobre emergencia de panícula

decoloración y estenidad de grano Alternativamente las flores se descoloran necrosan y no se polinizan mientras que las hojas y vainas permanecen sanas (Zeigler y col 1990)

El desarrollo de los síntomas en granos no dependen de la presencia de síntomas en la vaina (Zeigler y col 1987)

Vanas *Pseudomonas* son causantes de la pudrición de vainas y granos mientras que otras bacterias incluyendo a *Erwinia* spp se han reportado causando decoloración de granos y de manchas lineales en plántulas (De Faria y col 1984 Goto 1985)

En Japón se han aislados de granos tres *Pseudomonas* spp y vainas bacterias diferentes de *Pseudomonas* (Goto y col 1987)

Se ha asociado a la decoloración de granos y pudrición de vainas del arroz cuatro *Pseudomonas* tales como *P fuscovaginae* Miyajima Tani y Akita *P syringae* pv *syringae* Van Hall *P avenae* Manns y *P glumae* Kunita y Fabel (Azegami y col 1987 Duveiller y col 1988 Schaad y col 1975)

En Chile se aisló una *Pseudomonas* spp fluorescente similar a *P syringae* pv *syringae* de vainas de arroz (Zeigler y col 1987)

Varias de los *Pseudomonas* mencionadas se han asociado con el síndrome del manchado de granos problema que se ha incrementado y captado la atención de los investigadores (Ou 1985)

Las *Pseudomonas* que causan estos síntomas son transmitidas por semillas (Klement 1955 Tomimaga y col 1981) y se recuperan tanto de semillas decoloradas como de aparentemente sanas

En las áreas costeras del golfo de Louisiana se reportó en 1955 y 1988 pérdidas en producción de 40% causadas por bacterias transmitidas por semillas de las especies *Burkholdena gladioli* *B plantari* y *B cepocia* (Mew 1992)

## **1 Genero *Pseudomonas***

### **1 1 *Pseudomona fuscovaginae***

Agente causal de la pudrición marrón de la vaina ha sido reportado en Latino América (Brasil Colombia Guatemala México Panamá Peru y Surinam) África Central Madagascar Japón (Mew 1992 Agarwal y col 1989) La bacteria se ha encontrado que infecta otras especies de poaceas y hospederos diferentes a gramíneas (Agarwal y col 1989)

La enfermedad se manifiesta causando pudrición de vainas y granos de plantas maduras así como de plantones (Mew 1992)

### **1 1 1 Síntomas**

En plantones causa una decoloración sistemática de las vainas que alcanza a la vena central de la hoja en plantas maduras los síntomas se observan en la vaina de la hoja bandera desde el ahijamiento hasta floración y en la panícula En la vaina se observan lesiones húmedas oblongas a irregulares de color verde oscura que cambian a gris marrón rodeada de un margen marrón oscuro

La vaina puede presentar lesiones húmedas necróticas Infecciones severas hacen que la vaina entera se necrose y la panícula se marchite Las glumas de las panículas que emergen de vainas con lesiones húmedas tienen color marrón claro los granos de panículas infectadas se observan descolorados deformes y vacías (Mew 1992 Agarwal y col 1989)

### **1 1 2 Agente causal**

La bacteria causante de la pudrición marrón de la vaina se describió originalmente como *P marginales* (*P fluorescens* biovar II) Más tarde se describió como una nueva especie *P fuscovaginae* Tani, Miyajima y Akita Las razas de *P fuscovagin* se reportan como heterogéneas y se ubican en dos

grupos *P fluorescens* no es patogénica en arroz y es claramente diferente de *P fuscovaginae* (Mew 1992)

*Pseudomonas fuscovaginae* es una bacilar gram (negativa) que no forma esporas de 0.5 – 0.8 x 2.0 – 3.5 µm con uno a cuatro flagelos polares (Mew 1992)

Luego de 4 a 5 días a 28 °C las colonias en agar nutritivo son blanco cremoso lisas convexas translúcidas butirosas y de 3 a 5 µm en diámetro. La bacteria produce pigmento fluorescente en medio King B y es positiva a Arginina dihidrolasa y Oxidasa (Mew 1992 Agarwal y col 1989)

### **1.1.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad**

*Pseudomonas fuscovaginae* sobrevive en semillas de arroz en baja población y epifíticamente en gramíneos en campos arroceros. La bacteria puede recuperarse de hojas sanas y vainas de arroz en el campo y el pico de la población epifita de la bacteria se detecta en el estadio de máximo macollamiento (Mew 1992)

### **1.1.4 Control**

El empleo de semilla limpia o tratada con calor a 65 °C por 6 días. También el uso de antibióticos como estreptomicina sola o en combinación con

oxitetraciclina ayuda a controlar efectivamente la enfermedad si se aplica antes de la emergencia de panícula (Mew 1992 Zeigler y col 1986)

## **1 2 *Pseudomonas glumae* (Sin *Burkholderia glumae*)**

Causa la pudrición del grano han sido reportadas en muchos países principalmente en Japon Taiwán y América Latina Esta bacteria causa la muerte de los plántulas las cuales se pudren en las cajas preparadas para el transporte También causa esterilidad y pobre maduración del grano en campo (Zeigler y col 1990)

### **1 2 1 Síntomas**

En plántulas los síntomas consisten de pudrición marrón húmeda de la vaina acompañado de marchitamiento o pudrición suave de la hoja En la panícula infecta granos que se deforman con coloración que pasa de verde pálido a amarillento sucio y seco La porción infectada de la lema y palea tiene color marrón purpura a marrón oscuro En infecciones claras solo se decolora la palea Se desarrolla un margen marrón entre la parte infectada y la sana del grano No se detectan síntomas en el raquis y ramificaciones de la panícula La bacteria puede causar una pudrición suave de la hoja bandera o el collar de la vaina de la hoja bandera (Mew 1992)

## **1 2 2 Agente causal**

*Pseudomonas glumae* Kurita y Tabei es una bacteria bacilar gram negativa con dimensiones 0.5-0.7x1.5-2.5  $\mu\text{m}$  con uno a tres flagelos polares. Forma colonias blancas en agar nutritivo y no produce pigmentos fluorescentes en medio King B. Utiliza L. arginina e inositol y es lecitina positiva (Mew 1992)

En el medio selectivo S-PG *P. glumae* produce colonias circulares convexas con márgenes lisos color marrón rojizo a opalescente con centro púrpura o rojo púrpura (Mew 1992 Agarwal y col 1989)

## **1 2 3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad**

La bacteria es transmitida por semilla e invade los espacios entre las células de la epidermis externa y el parenquima esponjoso de la lema. A partir de la semilla infestada crece epifíticamente en baja población hasta que llega la emergencia de panícula cuando la población se incrementa rápidamente en el grano (Mew 1992)

## **1 2 4 Control**

El empleo de calor a 65 °C por 6 horas para erradicar la bacteria de los lotes de semilla y monitoreo de la semilla para asegurar que están libres del patógeno (Zeigler y col 1988)

### **1 3 *Pseudomonas syringae* pv *syringae***

Agente causal de la pudrición de la vaina similar a los síntomas que causa *Pseudomonas fuscovaginae* ha sido reportada en Australia China Hungría Japón y recientemente en Chile (Sur América) (Agarwal y col 1989 Zeigler y col 1987)

*Pseudomonas syringae* produce pigmento fluorescente en medio King B pero se diferencia rápidamente de *P fuscovaginae* por que es negativa para Oxidosa y Arginina-dehidrolasa (Agarwal y col 1989)

#### **1 3 1 Síntomas**

La bacteria ataca hojas vainas y tallos del arroz se caracteriza por causar lesiones marrón o negros en vainas nudos y tallos Las lesiones en las vainas son elongadas color marrón a rojizo y la necrosis causa secamiento de toda la planta En casos extremos causa decoloración de grano infección de la semilla y estenilidad (Agarwal y col 1989)

#### **1 3 2 Agentes Causal**

*Pseudomonas syringae* pv *syringae* Van Hall tiene como sinónimo *Pseudomonas oryzoicola* Klement La bacteria es un bacilo gram negativo móvil

con uno a cinco flagelos polares sólo o en pares no forma esporas aeróbica obligada con dimensiones entre 2 0-3 5x0 8 1µm Las colonias son circulares enteras blanquecinas con margen translucidos en Agar nutritivo cuando viejos los margenes se tornan serrados u ondulados (Agarwal y col 1989 AB 1965)

*Pseudomonas syringae* produce colonias tipo leván en agar nutritivo conteniendo 5% sucrosa utiliza inositol y produce reaccion hipersensible en tabaco (Zeigler y col 1990)

### **1 3 3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad**

*Pseudomonas syringae* sobrevive en semillas de arroz y epifitamente en malezas gramíneas en las zonas arroceras Puede recobrase de hojas y vainas de las plantas de arroz en el campo (Mew 1992 Agarwal y col 1989)

### **1 3 4 Control**

Empleo de semilla sana libre de la bacteria o tratada con calor seco a 65 °C por 6 dias (Mew 1992 Agarwal y col 1989)

#### **1 4 *Pseudomonas avenae***

Causa el rayado bacterial en arroz reportado en Japón Taiwán Las Filipinas Corea Irán (Ou 1985) en Portugal Latino América (Agarwal y col 1989)

La identidad de la bacteria se confirmó serológicamente y se encontró en muestras de semillas de 8 años de edad almacenadas a 5 °C La bacteria infecta otras gramíneas hospederas (Agarwal y col 1989)

#### **1 4 1 Sintomas**

La enfermedad aparece en las plántulas en los viveros los primeros síntomas aparecen en las vainas inferiores como bandas longitudinales húmedas de color verde oscuro que luego se torna marrón oscuro Las infecciones severas pueden causar enanismo y muerte de plántulas las hojas jóvenes no expandidas al ser atacadas les causa la muerte del brote Las semillas presentan decoloración moderada a severa en las glumas y endosperma En casos extremos el grano se pudre completamente y no se llena (Agarwal y Col 1989)

#### **1 4 2 Agentes causal**

La bacteria es bacilar gram negativo con dimensiones 0.4-8.8x1.8-4.4  $\mu\text{m}$  sólo o en pares en cadenas cortas con un flagelo polar sin cápsulas ni endosporas en agar nutritivo las colonias son circulares enteras lisas brillantes y elevadas (CAB 1970 G) la bacteria se localiza entre las glumas y el pericarpo o profundo en la semilla (Shakya y col 1986)

#### **1 4 3 Epidemiología y ciclo de enfermedad**

En Filipinas se observó el rayado bacteral en plántulas a partir de semilla inoculada y en plantas inoculadas al estadio de primordio floral y floración y en plántulas sembradas en suelo inoculado artificialmente demostraron que la bacteria puede ser transmitida internamente de planta a semilla en plantas asintomáticas La incidencia de la enfermedad esta en un rango de 1.28 % (Shakya y col 1986)

#### **1 4 4 Control**

El tratamiento con calor a 65° C por 6 días erradica *Pseudomonas avenae* de la semilla de arroz El tratamiento con Kasugamicina en el vivero controla los daños en las plántulas (Zeigler y Álvarez 1988)

Desde que la bacteria tiene una amplia distribución en el mundo no debe considerarse objeto de cuarentena a menos que se identifiquen razas virulentas y diferentes (Shakya y col 1985)

### **C Generalidades de las especies bacteriales transmitidas por semilla que causan enfermedades foliares**

El fuego bacterial del follaje del arroz es una de las enfermedades más severas del cultivo encontrado en regiones tropicales y templadas (Mew 1987 Ou 1985) La variación en la patogenicidad de razas diferentes de este organismo en diferentes cultivares ha promovido el establecimiento de subdivisiones del taxon en 16 18 razas (Benedict y col 1989)

El fuego bacterial del follaje del arroz es causado por *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* Se ha detectado su presencia en las glumas de semilla de arroz (Mizukami 1961) y en el endospermo del grano (Srivastava y col 1964)

Kauffman y col (1974) aisló *Xanthomonas oryzae* de glumas de semillas y encontró que la frecuencia de ocurrencia de semillas infectadas es variable

En campos donde la enfermedad era baja y su desarrollo tardío la bacteria se encontraba en bajo porcentaje el flujo bacteriano de glumas de semillas frescas está altamente correlacionado con la presencia de *Xanthomonas oryzae* La

bacteria puede sobrevivir solamente 2 meses en semillas almacenadas bajo condiciones naturales (Kauffman y col 1974)

Kauffman y col (1974) aislaron *X oryzae* del 70 % de las semillas 1 mes después de cosechada y del 40 % al final de los 2 meses También encontró en forma rutinaria varias colonias amarillas de bacterias saprófitas entre las 24 y 48 hrs y una especie similar a *X oryzae* entre los 60 72 hrs De allí que el diagnóstico definitivo requiere la conducción de la prueba de patogenicidad

El rayado bacteriano de la hoja del arroz es causado por *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola* Esta ampliamente distribuido en Asia Tropical y África Occidental tanto en tierras altas como bajas Las pérdidas en rendimiento estimado causados por la enfermedad varían de 1 a 17 % dependiendo del cultivar y condiciones climáticas (Mew 1992)

La enfermedad puede presentarse en cualquier estadio fenológico inicialmente aparece como bandas intervenales húmedas verde oscura y al final translúcidas Estas bandas se agrandan se unen y toman un color café claro Se observa exudado bacterial como gotas pequeñas amarillas en la superficie de las lesiones Finalmente toda la hoja se torna color café luego blanco grisáceos y finalmente muere semejante a los síntomas del fuego bacterial (Mew 1992)

Las características fenotípicas empleadas que permiten diferenciar a *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* de *Xanthomonas oryzae* pv *Oryzicola* se presentan en el Cuadro I

**CUADRO I CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS EMPLEADAS PARA DIFERENCIAR *X oryzae* pv *oryzae* DE *X oryzae* pv *oryzicola***

<b>Características Fenotípicas</b>	<b><i>X oryzae</i> pv <i>oryzae</i></b>	<b><i>X oryzae</i> pv <i>oryzicola</i></b>
1 Producción de Acetoina		+
2 Peptonización de la leche		+
3 Fenilalanina de aminosas		+
4 Utilización de Lalonina		+
5 Sensibilidad a 0 001 % de nitrato cuprico ( w/v )		+

a Respuesta positiva en 50 % de la Raza (Mew 1992)

## **1 Genero *Xanthomonas***

### **1 1 *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae***

Agente causal del fuego bacterial que es una de las enfermedades más serias y de distribución mundial Se ha reportado en Asia Australia África América Latina Canbe y USA (Mew 1992)

Esta enfermedad ha tenido un gran impacto económico en las ultimas dos decadas en Asia y África Occidental particularmente en Nigeria donde causó

grandes daños en arroz de negro en 1982 Las pérdidas estimadas en rendimiento están entre 10 50 % causados por la enfermedad (Mew 1992 Reckhaus 1983)

### **1 1 1 Síntomas**

El fuego bacterial causa dos síndromes principales fuego del follaje y marchites o Kresek El síndrome más común es el del fuego del follaje que se presenta desde máximo macollamiento hacia delante Se inicia como bandas húmedas en la lámina foliar que se agrandan en longitud y anchura con color amarillo a blanco y coalescen cubriendo toda la lámina Gotas de exudado bacterial pueden observarse en lesiones jóvenes Las hojas más viejas pueden aparecer gnises por el crecimiento de hongos saprófitos En las glumas se pueden formar lesiones circulares con márgenes húmedos Las plantas infectadas producen pocos granos de pobre calidad (Mew 1992)

El síndrome de marchitez es la forma mas destructiva de la enfermedad y ocurre en los trópicos desde el vivero al inicio de macollamiento un tercer síndrome asociado con el fuego bacterial es el de hoja amarilla o palidez amarilla Las hojas más jóvenes de la planta se tornan amarillas completamente o tienen bandas amarillas Con la hoja amarilla la bacteria no se detecta en la hoja pero puede encontrarse en los internudos y corona de los tallos afectados (Agarwal y col 1989 Mew 1992)

### **1 1 2 Agente causal**

El fuego bacterial es causado por *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (ex Ishiyama) Swings y col (1990) (Syn *X campestris* pv *oryzae* (Ishiyama Dye) La bacteria es un bacilo gram negativo no forma endosporas con dimensiones 0.55-0.75x1.35-2.17µm en Agar nutritivo las colonias son amarillo claro circulares convexas y lisas y producen pigmento amarillo soluble en agua *X oryzae* pv *oryzae* varía en patogenicidad y se han descrito varias razas en Japón y Filipinas. En este momento no hay una colección de aislamiento adecuada para diferenciar e identificar razas en todos los países (Mew 1992)

### **1 1 3 Epidemiología y ciclo de enfermedad**

*Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* sobrevive en desechos de arroz y en malezas hospederas alternas (*Leersia oryzoides* (L) sw *Zizania latifolia* (Gnesb) turez Ex stapf *Leptochloa chinensis* (L) ness *L. panicea* (retz) Ohwi y *Cyperus rotundus* L. En Australia la bacteria sobrevive en especies no domesticadas de *Oryza*. También puede sobrevivir por periodos cortos en semilla infectada y en suelo pero no se ha demostrado que esta ultima sea una fuente importante de inóculo. En el trópico puede sobrevivir en el agua de negro (Mew 1992)

La bacteria infecta el hospedero a través de los hidátodos o heridas en las hojas o raíces y se multiplica en el xilema. El fuego bacterial es favorecido por

temperaturas cálidas (25 30 °C) alta humedad y lluvia pero es más prevalente en áreas húmedas La enfermedad es favorecida por exceso en la fertilización nitrogenada y por vientos fuertes que causan heridas (Mew 1992)

#### **1 1 4 Control**

La enfermedad puede ser efectivamente controlada con cultivares resistentes Las recomendaciones para el uso del control cultural incluyen evitar excesiva fertilización nitrogenada empleo de niveles bajos de agua en viveros proveer buen drenaje durante la inundación (Mew 1992)

#### **1 2 *Xanthomonas oryzae pv oryzicola***

Es el agente causal del rayado bacterial de la hoja esta ampliamente distribuida en Asia Tropical y África Occidental Las estimaciones de pérdidas en rendimiento varían desde 1 17 % dependiendo del cultivar y las condiciones climáticas (Mew 1992)

#### **1 2 1 Síntomas**

La enfermedad se presenta en cualquier estadio de crecimiento inicialmente aparece como pequeñas rayas húmedas intervenales las rayas son inicialmente

verde oscuros y luego traslúcidos, las rayas se alargan y coalescen y toman color marrón claro.

La producción de exudado como gotitas amarillas es común en la superficie de las lesiones, los estados avanzados de la enfermedad son similares al fuego bacterial (Agarwal 1989; Mew 1992).

### **1.2.2. Agente causal**

El rayado bacterial es causado por *Xantomonas oryzae* pv *oryzicola* (Fang y col 1956); Swing y col 1990) (Syn. *X. campestris* pv *oryzicola* (Fang y col) Dye. La bacteria es un bacilo encapsulado gram-negativo, que no forma endosporas, con un flagelo polar con dimensiones 1.2 x 0.3-0.5  $\mu\text{m}$ . Las colonias en agar nutritivo son amarillo pálido circulares, lisas y convexas (Mew 1992).

En la planta de arroz la bacteria esta presente en el tejido parenquimatoso se han identificado aislamientos que difieren en virulencia (Mew 1992, Agarwal 1989, CAB 1970).

### **1.2.3. Epidemiología y ciclo de la enfermedad**

La bacteria sobrevive bajo las glumas en semilla infectada y en el rastrojo. Las semillas procedentes de campos infectados llevan la bacteria de un ciclo a

otro y son fuente potencial de disseminación a largas distancias (Mew 1992 Singh 1978)

Todas las especies silvestres del genero *Oryzae* pueden ser infectadas por *X oryzae* pv *oryzicola* y funcionan como reservono de inoculo No se conoce otros hospederos de la bacteria La bacteria también es disseminada por el agua de nego Durante la germinación de la semilla la bacteria localizada bajo las glumas infecta la plumula y pueden infectar posteriormente la planta entrando por hendas y estomas (Singh 1978)

La bacteria infecta pncipalmente las células del parénquima de las hojas pero no es sistémica El tejido parenquimatoso puede ser reemplazado por la masa bacteral (Ou 1985) El exudado bacteral en las lesiones foliares es disseminado pncipalmente por salpique de lluvia y arrastre por viento y también por contacto de las hojas con el agua de nego

El desarrollo de la enfermedad es favorecido por la lluvia alta humedad y altas temperaturas (28 30 °C) (Mew 1992)

#### **1 2 4 Control**

La enfermedad puede controlarse mediante uso de variedades resistentes y tratamiento de semillas (Streptociclina a 0 025 %/30 min) (Agarwal y col 1989)

**Aplicaciones de Streptociclina y Agrimicin (Terramicina) a una dosis de 100 ppm controlan la enfermedad (Agarwal y col 1989 Mew 1992)**

# **Materiales y Métodos**

**Esta investigación se ejecutó en el Laboratorio de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuario de Panamá (IDIAP) Región Central Divisa en el período Junio 2004 – julio 2006**

**Las muestras fueron colectadas en parcelas de productores de semillas de las provincias de Chirquí Coclé Veraguas Herrera y Los Santos**

## **A Variedades**

**En este trabajo se analizaron semillas de variedades con mayor demanda nacional tales como Panamá 3621 Panamá 1048 IDIAP 2503 IDIAP 38 IDIAP 22 e IDIAP L7**

## **B Toma de muestras**

**Se tomaron muestras de semillas de las categorías básica registrada y certificada bajo las normas del Comité Nacional de Semillas (CNS) – MIDA**

**Las categorías básica y registrada se colectaron en los Sub-Centros Experimentales del IDIAP en Río Hato – Antón – Coclé y en Arena – Mariato – Veraguas y la categoría certificada en las parcelas de multiplicación de semilla**

de productores inscritos en el Programa de Certificación del CNS – MIDA en las principales zonas arroceras del país

Para establecer la incidencia de bacterias patogénicas en semillas se muestreo al 10% del área total sembrada con las categorías de semillas objeto de estudio (Cuadro II)

#### **CUADRO II TOTAL DE MUESTRAS POR CATEGORIA**

<b>Categoria</b>	<b>Muestras</b>
Basica	24
Registrada	20
Certificada	68
<b>TOTAL</b>	<b>112</b>

En cada parcela y categoria se tomaron al azar cuatro muestras de 100 espigas empleando un patron de muestreo preestablecido semejante a la figura "W" que permitió cruzar los campos varias veces En cada parcela se registró el nombre del productor fecha de siembra localidad variedad y tamaño de la parcela Las muestras colectadas se colocaron en bolsas plásticas se etiquetaron sellaron y transportaron al laboratorio

### **C Procesamiento de muestras**

Las espigas colectadas por categoría se desgranaron y secaron en un horno hasta lograr 14% de humedad inmediatamente se almacenaron en bolsas de papel manila para su análisis posterior

### **D Analisis de semilla**

Para recuperar y confirmar la presencia de bacterias en las semilla se empleo la tecnica de imbibición de los granos en agua destilada – esterilizada por 24 horas Lundsgaard (1976) Trujillo y Col (1979) descascarado y siembra en medio agar nutritivo (AN) e incubado por 24 horas a 30<sup>0</sup>C

### **E Aislamiento de bacterias**

El crecimiento bacterial obtenido alrededor de cada grano se estrió en medio agar nutritivo (AN) fresco hasta obtener colonias aisladas Las colonias aisladas se transfineron a medio fresco en viales con tapa de rosca

### **F Identificación**

Se determinaron las características de crecimiento de los aislamientos *Pseudomonas* en medio King B (Ziegler y Álvarez 1988) (Cuadro III) y de *Xanthomona* en medio factor de crecimiento (Mew T W 1992) (Cuadro IV)

**CUADRO III CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS DE *Pseudomonas* EN MEDIO KING B**

<b>Especie</b>	<b>Color</b>	<b>Forma de la colonia</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Fluorescencia</b>	<b>Reacción de Gram</b>
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	Blanco a café claro	Circular	Lisa	+	
<i>Pseudomonas syringae</i>	Blanquecino con margen traslucido	Circular	Enteros	+	
<i>Pseudomonas avenae</i>	Crema	Circular	Enteros elevados		
<i>Pseudomonas glumae</i>	Blanca a gnsácea	Circular	Lisos elevados		

**CUADRO IV CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS DE *Xanthomonas oryzae* EN MEDIO  
FACTOR DE CRECIMIENTO**

<b>Especie</b>	<b>Color</b>	<b>Forma de la Colonia</b>	<b>Apariencia</b>	<b>Fluorescencia</b>	<b>Reacción de Gram</b>
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzae</i>	Amarilla	Pequeños y circular	Mucoides		
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzicola</i>	Bianquecina al principio mas tarde amarilla	Circular	Mucoides		

Las características bioquímicas de las diferentes especies se determinaron en base a la reacción de los aislamientos en los diferentes medios diferenciales reportados por Agarwal y Col (1989) Zeigler y Col (1988) Mew (1992)

**CUADRO V CARACTERISTICAS BIOQUÍMICAS DE *Pseudomonas fuscovaginae* *Pseudomonas avenae* *Burkholderia glumae* (*P glumae*) Y *P syringae* (Zeigler y Col 1988)**

Prueba	Fluorescente		No Fluorescentes	
	P <i>fuscovaginae</i>	P <i>syringae</i>	P <i>avenae</i>	<i>Burkholderia glumae</i>
Lipasa	+			
Licuefacción de gelatina	+	+		d
Arginina dehidrolasa	+			
Oxidasa	+		+	
Utilización de Sucrasa		+		
Inositol	+	+		+
Arginina	+			+
Producción de H <sub>2</sub> S	+			
Reducción NO <sub>3</sub>			+	+
Producción de levan a partir de sucrosa		+		
Crecimiento 37 °c	+		+	+
Crecimiento 41 °c			+	+

#### Símbolos

- + Reacción positiva
- Reacción negativa
- d Variable

**CUADRO VI CARACTERISTICAS BIOQUÍMICAS DE *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* y *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola* (Mew T W (1992) Agarwal y Col (1989)**

Prueba	<i>X o pv oryzae</i>	<i>X o pv oryzicola</i>
Producción de Acetoina		+
Peptonización fuerte de leche Litmus		+
Fenil alanina deamidasa		+
Utilización de L Alanita		+ <sup>a</sup>
Sensibilidad al nitrato cuprico (0 001%)	+	
Hidrólisis de almidón		+
Hidrólisis de gelatina		+

**Símbolos**

- + Reacción positiva
- Reacción negativa
- +a Respuesta positiva en el 50% de las cepas

**G Prueba Inmunoenzimática**

Elisa (Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas)

La caracterización de los aislamientos de *Pseudomonas avenae*, *Burkholderia glumae* y *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* se realizó mediante la prueba inmunoenzimática (ELISA)

Se empleó cultivos puros de 24 horas de crecimiento en caldo nutritivo y el Kit ELISA Indirecto (Agdia Products) Para la identificación de las especies se analizó un total de 30 aislamientos 6 de la categoría básica 5 de la registrada y 19 de categoría certificada

## **H Prueba de Patogenicidad**

Se realizó la inoculación de una suspensión de cepas puras de 24 horas de crecimiento en caldo nutritivo inoculado por infiltración en hojas de plántones de tomate con 21 días de germinado

La inoculación se consideró completa al observarse movimiento de la solución infiltrada en la parte interior del mesófilo de la hoja Las plantas inoculadas se colocaron en cámara húmeda (HR 90%) a una temperatura de 28 – 30 ° C la lectura de los resultados de la prueba se realizó a los 15 días después de la inoculación Se consideró como positiva las plantas que mostraron necrosis del tejido foliar

## I Alternativas químicas de control

Para evaluar algunas alternativas químicas de control se trató superficialmente 0.45 Kg de semilla de cada categoría con bactericidas disponibles en el mercado

### CUADRO VII ALTERNATIVAS QUÍMICAS EVALUADAS PARA EL CONTROL DE BACTERIAS EN ARROZ

Tratamientos	Dosis de P C/tonelada de semilla
1 Estreptomina + oxitetraciclina (Agrimicin 16.5 WP)	300 gr
2 Extracto de semilla de toronja (Kilol 11SL)	1000 cc
3 AC Ascórbico + AC Cítrico + AC Láctico (Lon Life 20 SL)	1000 cc
4 Extracto de semilla de cítrico (Biocto 6 84.68 SL)	500 cc
5 Sulfato de cobre penta hidratado (Phyton al 24 SC)	750 cc

Las muestras de semilla de cada categoría se asperjaron con cada uno de los tratamientos (5 bactericidas) se dejaron secar al ambiente y se almacenaron en bolsas de papel manila para su uso posterior

Las semillas tratadas se sumergieron en un volumen pequeño de agua estéril por 24 horas y luego se sembraron en agar nutritivo y se incubaron a 31 ° C

La eficacia del control se evaluó contando el número de semillas con y sin crecimientos bacteriales a las 24, 48 y 72 horas de sembrados

## **J Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos de la caracterización bioquímica y de crecimiento de las colonias de los aislamientos bacteriales se organizaron en cuadros resumen. Los datos de control de la incidencia bacteriana en semillas se procesaron mediante análisis de varianza y los promedios ordenados mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. Empleando el paquete estadístico para computadoras (SAS – Statistical Analysis System)

# Resultados

Las 112 muestras de semillas de categorías básica registrada y certificada se sembraron en medio factor de crecimiento y King B. De este gran total se detectó crecimiento de 103 muestras en medio diferencial factor de crecimiento y en King B. 6 muestras con cepas fluorescentes y 106 muestras sin producción de pigmentos fluorescente.

Las características de color, forma, apariencia de las colonias, producción de pigmentos fluorescentes, prueba de gram y forma de la bacteria permitió identificar cepas bacteriales del género *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, *Burkholderia glumae* (antigua *Pseudomonas glumae*), *Pseudomonas avenae*, *Pseudomonas fuscovaginae* y *Pseudomonas syringae* (Cuadro VIII).

La prueba de patogenicidad realizada a los aislamientos pertenecientes a los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas* inoculados en hojas de tomate indican que son patogénicas al mostrar el desarrollo de síntomas en la prueba.

El número de aislamientos obtenidos por categoría de semilla, variedad, género y especie bacteriana indica que la mayor incidencia detectada perteneció al género *X. oryzae* pv *oryzae* seguido de *P. avenae*, *B. glumae*, *P. fuscovaginae* y *P. syringae*. También se detectó más de un género bacteriano en las semillas de una misma variedad (Cuadro IX).

La especie *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* *P. avenae* y *B. glumae* se detectaron en las tres (3) categorías de semilla estudiada mediante la prueba bioquímica e inmunoenzimática (ELISA) (Cuadros No X XI y XII)

La especie *P. fuscovaginae* y *P. syringae* se detectaron en la categoría certificada (Cuadro XIII y XIV)

**CUADRO VIII CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS AISLADAS POR ESPECIES**

<b>Color de la Colonia</b>	<b>Forma de la Colonia</b>	<b>Apariencia de la Colonia</b>	<b>Fluorescencia</b>	<b>Gram</b>	<b>Forma de La Bacteria</b>	<b>Especie</b>
Blanco a Café claro	Circular	Lisa	+		Bacilar	<i>Pseudomona fuscovaginae</i>
Blanca	Circular	Entera elevada			Bacilar	<i>Pseudomona glumae</i>
Crema	Circular	Entera elevada			Bacilar	<i>Pseudomona avenae</i>
Blanquecinas márgenes traslucidos	Circular	Entera	+		Bacilar	<i>Pseudomona syringae</i>
Amarillas	Circular	Mucoide			Bacilar	X <i>oryzae</i> pv <i>oryzae</i>

**CUADRO IX NUMERO DE AISLAMIENTOS OBTENIDOS POR CATEGORÍA DE SEMILLA VARIEDAD GÉNERO  
Y ESPECIE BACTERIAL**

<b>Categoría de Semilla</b>	<b>Variedad</b>	<b><i>X oryzae</i> pv <i>oryzae</i></b>	<b><i>P</i> <i>avenae</i></b>	<b><i>B</i> <i>glumae</i></b>	<b><i>P</i> <i>fuscovaginae</i></b>	<b><i>P</i> <i>syringae</i></b>	<b>TOTAL</b>
<b>Registrada</b>	P 3621	1		2			3
	P 1048	1	1				2
	I 22		1				1
	I 38	1					1
	I 2503	1	1				2
<b>Básica</b>	P 3621		1	2			3
	I 2503	1					1
	I 22	4					4
	I 38	1	1				2
	L 7		1				1
<b>Certificada</b>	P 1048			1	3		4
	I ~ 22	6	3	1	2		12
	I 38	2		1	1		4
	I 2503	1		1		2	4
	L 7	2					2
	<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>46</b>

**CUADRO X CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS INMUNOENZIMÁTICOS DE LOS AISLAMIENTOS DE  
Xanthomonas oryzae pv oryzae POR CATEGORÍA DE SEMILLA**

<b>Categoría de Semillas Básica Registrada y Certificada</b>	<b>Factor Crec</b>	<b>Elisa</b>	<b>L Gelatina</b>	<b>KB</b>	<b>Almidón</b>	<b>Prod Acetoina</b>	<b>Sensibilidad nitrato cuprico</b>
R P 3621	+	+		nofluorescente			+
R P 1048	+	+		nofluorescente			+
R I 38	+	+		nofluorescente			+
RI 2503	+	+		nofluorescente			+
CI L 7	+	+		nofluorescente			+
CI L 7	+	+		nofluorescente			+
BI 2503	+	+		nofluorescente			+
BI 22		+		nofluorescente			+
BI 22	+	+		nofluorescente			+
BI 22	+	+		nofluorescente			+
BI 22	+	+		nofluorescente			+
BI 38	+	+		nofluorescente			+
CI 22	+	+		nofluorescente			+
CI 22	+	+		nofluorescente			+
CI 2503	+	+		nofluorescente			+
CI 22	+	+		nofluorescente			+
CI 22	+	+	+	nofluorescente			+
CI 22	+	+		nofluorescente			+
CI 38	+	+		nofluorescente			+
CI 38	+	+		nofluorescente			+
CI 22	+	+	+	nofluorescente			+

**CUADRO XI CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS INMUNOENZIMÁTICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE *Pseudomonas avenae* (NO FLUORESCENTE) POR CATEGORÍA DE SEMILLA**

<b>Categoría de Semilla Básica Registrada y Certificada</b>	<b>L Gelatina</b>	<b>Oxidosa</b>	<b>Sucrosa</b>	<b>Arginine</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>Levan</b>	<b>37°C</b>	<b>41°C</b>	<b>Elisa</b>
R P 1048		+				+		+	+	+
R I 2503		+				+		+	+	+
R I 22		+				+		+	+	+
B I L 7		+				+		+	+	+
B I 38		+				+		+	+	+
B P 3621		+				+		+	+	+
C I 22		+				+		+	+	+
C I 22		+				+		+	+	+
C I 22		+			+	+		+	+	+

**CUADRO XII CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS INMUNOENZIMATICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE  
*Burkholderia glumae* (NO FLUORESCENTES) POR CATEGORÍA DE SEMILLA**

<b>Categoría de Semilla Básica Registrada y Certificada</b>	<b>L Gelatina</b>	<b>Oxidasa</b>	<b>Sucrosa</b>	<b>Arginine</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>Levan</b>	<b>37°C</b>	<b>41°C</b>	<b>Ellsa</b>
R P 3621				+		+		+	+	+
R P 3621				+		+		+	+	+
B P 3621				+		+		+	+	+
B P 3621				+		+		+	+	+
C I 38				+		+		+	+	+
C P 1048				+		+		+	+	+
C I 2503				+		+		+	+	+
C I 22				+		+		+	+	+

**CUADRO XIII CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS INMUNOENZIMATICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE  
*Pseudomonas fuscovaginae* POR CATEGORÍA DE SEMILLA**

<b>Categoría de Semilla Certificada</b>	<b>Levan</b>	<b>Arginine</b>	<b>Red NO<sub>3</sub></b>	<b>Oxidosa</b>	<b>37°C</b>	<b>41°C</b>	<b>Sucrosa</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>Gelatina</b>
C P 1048		+		+	+			+	+
C P 1048		+		+	+			+	+
C I 22		+		+	+			+	+
C I 22		+		+	+			+	+
C I 38		+		+	+			+	+
C P 1048		+		+	+			+	+

**CUADRO XIV CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS INMUNOEZIMATICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE  
*Pseudomonas syringae* POR CATEGORÍA DE SEMILLA**

<b>Categoría de Semilla Certificada</b>	<b>Levan</b>	<b>Arginine</b>	<b>Red NO<sub>3</sub></b>	<b>Oxidosa</b>	<b>37°C</b>	<b>41°C</b>	<b>Suclosa</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>Gelatina</b>
C I 2503	+	+					+		+
C I 2503	+	+					+		+

El análisis de varianza de la eficacia biológica de control de los bactericidas estudiados aplicados superficialmente a las glumas de las semillas indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos para las categorías básica y certificada ( $P \geq 0.0087$  y  $0.0001$ ) respectivamente (Cuadro XV)

Los promedios de granos con crecimiento bacterial ordenados mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan indican que la mayor incidencia de crecimiento bacterial se detectó en el testigo sin tratamiento y menores niveles de incidencia entre los bactericidas evaluados (Cuadro XVI)

El análisis de varianza combinado de las tres categorías de semilla sobre la eficacia biológica de control de los bactericidas indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \geq 0.0492$ ) (Cuadro XVII)

Los promedios de crecimiento bacterial ordenados mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan entre las categorías de semilla indican que la mayor incidencia de crecimiento se encontró en la categoría de semilla básica (Cuadro XVIII)

Los promedios de incidencia de granos con crecimiento bacterial combinando las categorías indica que la mayor incidencia de granos infestados se detectó en el testigo sin tratamiento (Cuadro XIX)

**CUADRO XV ANALISIS DE VARIANZA DE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE BACTERICIDAS EN EL CONTROL DE BACTERIAS EN SEMILLAS CATEGORÍAS BÁSICA REGISTRADA Y CERTIFICADA 2004**

<b>Categoría de Semilla</b>	<b>Fuente de Variación</b>	<b>G L</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Valor de F</b>	<b>P&gt;F</b>
Básica	Tratamiento	5	23 833	4 71	0 0087**
Registrada	Tratamiento	5	14 333	1 87	0 1597ns
Certificada	Tratamiento	5	27 375	16 02	0 0001**

\* Diferencias Estadísticas Significativas al 5%

\*\* Diferencias Estadísticas Significativas al 1%

ns No existen diferencias estadísticas

**CUADRO XVI PROMEDIO DE GRANOS CON CRECIMIENTO BACTERIALES ORDENADOS MEDIANTE LA PRUEBA DE RANGOS MULTIPLES DE DUNCAN POR TRATAMIENTO EVALUADOS A LAS 24 48 Y 72 HORAS DE SEMBRADOS**

<b>Tratamientos</b>	<b>Categorías de Semilla</b>		
	<b>Básica</b>	<b>Registrada</b>	<b>Certificada</b>
Testigo	4 000 a	4 250 a	4 500 a
Phyton	3 750 ab	2 000 b	1 750 c
Agnmicin	2 500 abc	4 000 ab	1 750 c
Lon Life	2 250 bc	3 250 ab	1 500 c
Kilol	1 750 c	4 000 ab	3 000 b
Biocto	1 250 c	3 250 ab	1 750 c

Los promedios con la misma letra no son estadísticamente diferentes

**CUADRO XVII ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA EFICACIA DEL CONTROL  
DE LA BACTERIOSIS COMBINANDO LAS TRES  
CATEGORÍAS DE SEMILLA DE ARROZ**

<b>Parámetro</b>	<b>Fuente de Variación</b>	<b>G L</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Valor de F</b>	<b>P &gt; F</b>
Incidencia de exudado	Tratamiento	5	18 458	2 38	0 0492

Diferencias Estadísticas Significativas al 5%

\*\* Diferencias Estadísticas Significativas al 1%

ns No existen diferencias estadísticas

**CUADRO XVIII PROMEDIO DE INCIDENCIA DE EXUDADOS BACTERIALES  
ORDENADOS MEDIANTE LA PRUEBA DE RANGOS  
MULTIPLES DE DUNCAN POR CATEGORÍA DE SEMILLA**

<b>Categoría de Semilla</b>	<b>Incidencia de Exudados</b>
Basica	3 417 a
Registrada	2 583 b
Certificada	2 375 b

Los promedios con la misma letra no son estadísticamente diferentes

**CUADRO XIX PROMEDIO DE INCIDENCIA DE GRANOS CON  
CRECIMIENTO BACTERIAL COMBINANDO LAS TRES  
CATEGORÍAS ORDENADOS MEDIANTE LA PRUEBA DE  
RANGOS MULTIPLES DE DUNCAN POR TRATAMIENTO**

<b>Tratamiento</b>	<b>Crecimiento Bacterial</b>
Testigo	3 833 a
Kilol	2 917 ab
Agrimicin	2 750 b
Phyton	2 500 b
Biocto	2 417 b
Lon Life	2 333 b

Los promedios con la misma letra no son estadísticamente diferentes

# **Discusión**

Sin lugar a dudas esta investigación permite establecer que las Semillas de las categorías estudiadas (básica registrada y certificada) se encuentran infectadas con una mezcla de bacterias que crecen en los medios de cultivos diferenciales Factor de Crecimiento y King B. En el medio King B unos pocos aislamientos produjeron pigmentos fluorescentes y la gran mayoría no las produjo.

Estos resultados son corroborados por Zeigler y col (1989) quienes reportaron que la decoloración de los granos de arroz en América Latina es causada por las bacterias *Pseudomonas* spp fluorescentes (*P. fuscovaginae*) y no fluorescente (*P. avenae*).

Paralelamente en Japón Goto y col (1987) encontraron asociados a los granos de arroz tres *Pseudomonas* spp y varios géneros no identificados diferentes a *Pseudomonas*.

En este trabajo se detectó la presencia de especies de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* en semillas de una misma variedad (Ver Cuadro N° IX). Este hecho sugiere que estas bacterias se encuentran formando complejos tal como lo establecieron Castaño (1985), Nematsu y col (1976), Zeigler y col (1987) quienes encontraron varias *Pseudomonas* asociadas al síndrome del grano.

machado De acuerdo con Klement (1955) Tominaga y Col (1981) Zeigler y col (1987) estas *Pseudomonas* son transmitidas por semilla y se han recuperado tanto de granos manchados como de granos aparentemente sanos

La especie *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* detectada en las tres categorías de semillas objeto de estudio ha sido identificada como el agente causal del fuego bacterial del arroz en Texas y Louisiana (Jones y col 1989)

*Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* se encontró en la mayoría de las áreas productoras del mundo incluyendo Asia (Ou 1985) Australia (Aldnck y col 1973) África Occidental (Reckhaus 1983) Centro y Sur América (Ou 1977 Lozano y col 1981) Fang y col (1956) encontraron la bacteria *Xanthomona oryzae* pv *oryzae* dentro de las glumas del grano de arroz Srivastava y Rao (1964) encontraron entre 50-100% de las semillas infectadas en La India 50% y 100% Además reportan que se encontraba en las glumas sino también en el endosperma También en la India Durgapal Singh y Pandey (1980) reportaron la presencia de la bacteria en el 90% de las semillas inmediatamente después de la cosecha

La presencia en semillas de las especies de *Pseudomonas* reportadas en este trabajo es corroborado por Azegami y col (1987) al reportar cuatro especies de *Pseudomonas* asociadas a la decoloración de granos y pudrición de la vaina

a saber *P fuscovaginae* Miyagima Tanı and Akita *P synngae* pv *synngae* Van Hall *P avenae* Manns y *P glumae* Kurita and Tabei

De acuerdo con Zeigler y col (1987) el incremento en el manchado de granos y pudrición de la vaina en la década anterior a su reporte consistente con la presencia de bacterias patogénicas transmitidas por semilla dado el tremendo incremento e intercambio internacional de germoplasma de arroz

La alta incidencia de bacteria en las semillas sujetas a estudio quizás se deba a la poca importancia que se le presta en Panama a las pruebas de detección de bacterias patogénicas como medio para controlar bacterias transmitidas por semillas

Otra razón puede ser el asumir que el tratamiento químico de semillas ó las aspersiones de campo controlan efectivamente las bacterias transmitidas por semilla Sin embargo sabemos que los químicos controlan algunas enfermedades fungosas pero tienen un éxito limitado con las enfermedades bacteriales

La percepción de que las enfermedades transmitidas por semilla pueden ser detectadas con precisión en las inspecciones de campo ha influido significativamente en el reconocimiento de la necesidad de desarrollar métodos confiables de detección de bacterias patogénicas en semillas

Sin lugar a duda las inspecciones de campo han ayudado en los programas de certificación de semillas a eliminar campos altamente infectados pero no campos con niveles de infección bajo

La presencia de plantas enfermas asintomáticas ó enmascaradas por otras enfermedades es un factor que reduce significativamente la utilidad de las inspecciones de campo Ya que no es posible determinar mediante inspecciones de campo si una parcela esta libre de semillas infectadas o infestadas pero es posible certificar que la parcela presenta niveles de incidencia por debajo del nivel de tolerancia establecido

El control de bacterias transmitidas por semilla con quílmicos ó agua caliente puede ser ineficiente sino se hacen análisis a la semilla tratada para determinar su efectividad

Al respecto Zeigler y col (1987) encontraron que a pesar de haber erradicado exitosamente *Pseudomonas* patogénicas en semilla no observaron reducción en los niveles de enfermedad en el campo bajo condiciones favorables para su expresión

Los pobres resultados se debieron a que estos géneros bacteriales tienen un amplio rango de hospederos y pueden residir en las malezas en altos niveles poblacionales

En esta investigación la evaluación de bactericidas para el control de las bacterias en semilla nos indicaron que unos son más efectivos que otros para suprimir la presencia de las bacterias pero no la erradicaron. Quizás sea necesario evaluar otros métodos de tratamiento de semilla que permitan la penetración de los bactericidas al endosperma.

En resumen es totalmente preocupante detectar bacterias patogénicas en semillas asociadas directamente con las pérdidas económicas de los productores de arroz comercial y de semilla.

Es necesario que los bancos de germoplasma tanto de semillas del mejorador como la de los programas de certificación de semilla analicen a través de pruebas de laboratorio las semillas y eliminen todas las que estén infectadas.

Los programas de producción de semilla sólo deben emplear semillas libres de bacteria o de patógenos transmitidos por semilla y los laboratorios de análisis de semillas deben realizar el proceso en tres pasos principales:

- 1 Extracción de las bacterias de la semilla
- 2 Identificación de la bacteria extraída
- 3- Determinación de la sensibilidad de las pruebas y de los niveles de tolerancia a los tratamientos. Esto busca relacionar los niveles de incidencia de bacterias en la semilla y las pérdidas de rendimiento que causan en campo.

**De esta forma se podrían establecer niveles de tolerancia en las semillas que no causen mermas económicas en la producción y calidad de los granos**

# **Conclusiones**

- 1 Todas las muestras de las categorías de semillas estudiadas están infectadas con una mezcla de especies bacteriales patogénicas**
  
- 2 Las bacterias encontradas pertenecen a especies del género *Pseudomonas* y *Xanthomonas***
  
- 3 Los bactericidas evaluados difieren en sus niveles de eficacia biológica de control pero ninguno logró erradicar las bacterias**

# Recomendaciones

- 1 Emplear cepas de referencia (American type culture collection) de las especies de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* encontradas**
- 2 Emplear biotécnicas como PCR para mejorar la precisión del diagnóstico**
- 3 Comparar los niveles de sensibilidad entre las técnicas de diagnóstico**
- 4 Desarrollar antisueros monoclonales para pruebas de inmunofluorescencia**
- 5 Realizar estudios epidemiológicos para establecer la relación entre los análisis de laboratorio y niveles de tolerancia en campo**
- 6 Emplear tratamiento térmico a 65 C por 6 horas para erradicar la bacteria de los lotes de semillas en categoría Básicas Registradas y Certificadas**

# **Revisión Bibliográfica**

**AGARWAL P C MONTESEU C N Y MATHUR S B 1989** Seed borne diseases and seed health testing of rice Phytopathological CAB International Mycological Institute N° 30 (58-88) pp

**ALDRICK S J BUDDENHAGEN I W AND REDDY A P K 1973** The occurrence of bacterial leaf blight in wild and cultivated rice in Northern Australia Aust J Agric Res 24 219 – 227

**AZEGAMI K NISHIYAMA K WATANABE Y KADOTA I OHUCHI A AND FUKAZAME C 1987** *Pseudomonas plantani* sp nov the causal agent of rice seedling blight Inst J Syst Bacteriol 17 144-152

**BENEDICT A A A M ALVAREZ J BERESTECKY W IMANACA C Y MIZUMOTO L W POLLARD T W MEW AND C F GONZALEZ 1989** Pathovar – specific monoclonal antibodies for *Xanthomonas campestris* pv *Oryzae* and *Xanthomonas campestris* pv *oryzicola* phytopathology 79 322 – 328 p

**CAB INTERNATIONAL MYCOLOGICAL INSTITUTE 1970** b Descriptions of Pathogenic Fungi and bacteria N° 46

\_\_\_\_\_ 1970 b Descriptions of Pathogenic Fungi and bacteria N° 237

\_\_\_\_\_ 1970 Description of pathogenic Fungi and Bacterial N° 240

**CASTAÑO Z J 1985** Efecto del manchado de grano de arroz sobre algunos estados de desarrollo de la planta de arroz Arroz 34 22 – 26

**DE FAIRA J C Y PRABHU A S 1984** Brown Stripe (Bst) a new bacterial disease on rice Int Rice Res Inst Newsl 9 12

**DURGAPAL J C SINGH BALESHUWAR AND PANDEY K R 1980** Mode of infection of rice seeds by *Xanthomonas oryzae* Indian Journal of Agricultural Science 50 624 – 626

**DUVEILLER E MIYAJIMA K. SNACKEN F AUTRIQUE A AND MARAITE H 1988** Characterization of *Pseudomonas fuscovaginae* and differentiation from other fluorescent *Pseudomonas* occurring on rice in Burundi J Phytopathol 122 97 107

**FANG C T LIN C F AND CHU C L 1956** A preliminary study on the disease cycle of the bacterial leaf blight of rice Acta Phytotaxonomica Sinica 2 173 – 185

- GOTO M 1965** A comparative study of the sheathrot bacteria of rice Ann  
Phytopathol Soc Jpn 30 42-45
- GOTO T NISHIYAMA K AND OHATA K 1987** Bacteria causing grain rot of  
rice Ann Phytopathol Soc Jpn 53 141-49
- JONES R K BARNES L W GONZALEZ C F LEACH J E ALVAREZ  
A M AND BENEDICT A A 1989** Identification of low virulence strains  
of *Xanthomonas campestris* pv *oryzae* from rice in the United States  
Phytopathology 79 984 – 990
- KADOTA I AND OUCHI A 1983** Symptoms of bacterial brown stripe of rice  
seedling in nursery boxes Ann Phytopathol Soc Jpn 49 561 – 564
- KAUFFMAN H E AND A P REDDY 1974** Seed transmission studies of  
*Xanthomonas oryzae* in rice Phytopathology 65 663 – 666
- KLEMENT A 1955** A new bacterial disease of rice caused by *Pseudomonas  
oryzicola* n Sp Acta Microbiol Acad Sci Hung 2 265 – 274
- LOZANO J C VICTORIA J VELASCO A C AND AHN S W 1981**  
Bacterial Brown blotch a disease of rice in tropical America Pages 65 – 73  
in Proc Int Conf plant Pathog Bat 5<sup>th</sup>

**LUNDSGAARD T 1976** A method for detection of *Xanthomonas campestris*  
(PAMMEL) Dowson in brassica seeds Statens Plantetilsyn 21 34-38

**MEW T W 1987** Current Status and future prospects of Research on bacterial  
blight of Rice Annu Bbv Phytopathol 25 359 382

\_\_\_\_\_ 1992 Bacterial leaf streak in Compendium of rice diseases Eds  
Webster R K y Gunnel P S American Phytopathological Society Press  
3340 Pilot Knob Road St Paul Minnesota USA

**MIZUKAMI T 1961** Studies on the ecological properties of *Xanthomonas*  
*oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson the causal organism of bacterial leaf  
blight of Rice Agnc Bull Saga Univ 13 1 85

**MIYAJIMA K 1983** Studies on the sheath brown rot of rice caused by  
*Pseudomonas fuscavaginae* Taniı Miyajima and Akita Rep Hokkaido  
Prefect Agnc Exp Stn Rep 43 74 pp

**OU S H 1977** Possible presence of bacterial blight in Latin America Int Rice  
Res Newsl 2 5 – 6

\_\_\_\_\_ 1985 Rice Diseases Commonwealth Micological Institute Kew  
Surrey England 380p

**RECKHAUS P M 1983** Occurrence of bacterial blight of rice in Niger West  
Africa Plant Dis 67 1039

**ROTT P NOTTEGHEM J L AND FROSSARD P 1989** Identification and  
characterization of *Pseudomonas fuscovaginae* the causal agent of  
bacterial sheath brown rot of rice from Madagascar and other countries  
Plant Dis 73 133 137

**SAETTLER A W 1989** The need for detection assays in Detection of bacteria  
in seed and other plant material Eds Saettler A W Schaad N W y Roth  
D A APS Press 122 p

**SAS USERS GUIDE 1985** Statistics version 5 edition SAS Institute Inc Cary  
NC 956 p

**SCHAAD N W 1982** Detection of seedborne bacterial Plant Pathogens Plant  
Discoise Vol 66 No 10 885 – 890

\_\_\_\_\_, **KADO C I Y SUMMER D R 1975** Synonymy of *Pseudomonas*  
*avenae* Manns 1905 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Rosen 1922  
Int J Syst Bacteriol 25-133-137

**SHAKYA D D VINTHER E Y MATHUR S B 1985** World wide distribution of  
bactenal stripe pathogen of rice identified as *Pseudomonas avenae*  
Phytopathologische Zeitschrift 114 256-259

\_\_\_\_\_ **CHUNG H S Y VINTHER F 1986** Transmission of *Pseudomonas*  
*avenae* the cause of bactenal stripe of rice Journal of Phytopathology 116  
92-96

**SHEKHAWAT G S Y SRIVASTAVA D N Y RAO V P 1969** Seed infection  
and transmission of bacterial leaf streak of rice Plant Disease Reporter  
53 115-116

**SINGH R S 1978** Plant Diseases 4<sup>th</sup> Edition IBH y Oxford Publishing co New  
Delhi

**SRIVASTAVA D N AND RAO Y P 1964** Seed transmission and  
epidemiology of the bactenal blight disease of rice in North India Indian  
Phytopathology 17 77 – 78

**SWINGS J VAN DER MOOTER M VAN TER HOF L HOSTE B GILLIS M  
MEW T W AND KERSTERS K 1990** Reclasification of causal agents of  
bactenal blight (*Xanthomonas campestris* pv *oryzae*) and bactenal leaf  
streak (*Xanthomonas campestris* pv *orycola*) of rice as pathovars of

*Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp Nov Nov rev Int J Syst  
Bactenal 40 309-311

**TOMINAGA T KIMURA K AND GOH N 1981** Bactenal brown stripe of rice  
in nursery box caused by *Pseudomonas avenae* Ann Phytopathol Soc  
Jpn 49 92

**TRUJILLO G E Y SAETTLER A W 1979** A combined semi – selective  
medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria  
in bean seed J Seed Technol 4 35-41

**VEMATSU T YOSHIMURA D NISHIYAMA K IBARAKI T AND FUJII H**  
**1976** Pathogenic bacterium causing seedling rot of rice Ann Phytopathol  
Soc Jpn 42 464 -471

**ZEIGLER, R S AND ALVAREZ E 1986** Bactenal Sheath brown rot (BSBR) in  
Latin America International Rice Research Newsletter 11 15-16

\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_ **1987** Bacterial sheath brown rot of rice caused by  
*Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America Plant Dis 71 592 – 597

\_\_\_\_\_ 1988 *Pseudomonas* spp causing sheath rot of rice in Latin America In Proceeding of the 5<sup>th</sup> Int Congress of Plant Pathology  
Kioto Japan

\_\_\_\_\_ 1989 Grain discoloration of rice caused by *Pseudomonas glumae* in Latin America Plant Disease 73 368

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ 1990 Characteristics of *Pseudomonas* spp Causing grain discoloration and sheath rot of rice and associated to *Pseudomonas* epiphytes Plant Disease 79 917-922 pp

\_\_\_\_\_ ARICAPA G Y HOYOS E 1987 Distribution of fluorescent *Pseudomonas* spp causing grain and sheath discoloration of rice in Latin America Plant Dis 71 896-900

# **Anexos**



Fig. 1: Imbibición de semillas de arroz.



Fig. 2: Imbibición y germinación de los granos de arroz.



Fig. 3: Crecimiento bacterial de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* a partir de granos en medio de cultivo.



Fig. 4: Aislamiento bacterial de *Pseudomonas* spp. purificado en agar nutritivo.



Fig. 5: Crecimiento bacterial de *Pseudomonas* spp. en medio de cultivo agar nutritivo.



Fig. 6: Crecimiento bacterial de *Pseudomonas siringae* en medio de cultivo Levan.



Fig. 7: Crecimiento bacterial de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* en medio de cultivo YDC.



Fig. 8: Crecimiento bacterial de *Pseudomonas* spp. en medio de cultivo KB.



Fig. 9: Preparación de medio de cultivo.



Fig. 10: Crecimiento bacterial de *Pseudomonas* spp. en medio de cultivo YNA (Levadura Agar Nutritivo).



Fig. 11: Crecimiento bacterial de *Pseudomonas* spp. en medio de cultivo Arginina.



Fig. 12: Crecimiento bacterial *Pseudomonas syringae* positivo fluorescente en medio de cultivo KB.



Fig. 13: Reacción positiva a la prueba Reducción de Nitrato ( $\text{NO}_3$ ) de *Pseudomonas glumae*.



Fig. 14: Reacción bacterial positiva de *Pseudomonas fuscovaginae* en medio de cultivo Arginina.



Fig. 15: Producción de  $H_2S$  para el aislamiento *Pseudomonas fuscovaginae*.



Fig. 16: Hidrólisis de Gelatina (positiva y negativa) *Pseudomonas syringae*.



Fig. 17: Reacción positiva de patogenicidad a *Pseudomonas*.



Fig. 18: Reacción positiva de patogenicidad a *Xanthomonas*.