

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLA**

TITULO:

**“IDENTIFICACIÓN *in vitro* DE LAS BACTERIAS
FITOPATÓGENAS QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DEL
CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*)”**

**POR:
ROGER GUERRA**

DAVID, CHIRIQUÍ, REPUBLICA PANAMÁ

2008

**“IDENTIFICACIÓN *in vitro* DE LAS BACTERIAS
FITOPATÓGENAS QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DEL
CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*)”**

**TESIS:
SOMETIDA PARA OPTAR POR EL TITULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO CON ORIENTACIÓN EN FITOTECNIA**

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL
DEBE SER OBTENIDO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS.**

MIEMBROS DEL COMITÉ		FIRMA
DIRECTOR	M. Sc. Zyddi Vissuetti	_____
MIEMBRO	M. Sc. Simón Vásquez	_____
MIEMBRO	M.Sc. Ricardo Blas	_____

DAVID, CHIRIQUÍ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2008

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios Todo Poderoso por haberme dado la vida y la salud para poder finalizar con éxito mi estudio universitario ya la vez este trabajo de graduación.

Agradezco a mis abuelos porque sin ellos yo no estuviera en este mundo.

Agradezco a mis padres por haberme permitido venir a este mundo.

También le agradezco; a mis hermanos por darme sus voz de aliento y motivación.

Igualmente les agradezco a los Asesores que me brindaron su ayuda, cooperación, y su comprensión para poder realizar un buen trabajo de graduación como lo fueron M.Sc. Zyddi S. Vissuetti S, M.Sc. Simón Vásquez, M.Sc. Ricardo Blas. A la Ing. Mayvis de Mata y al Ing. Iván Alvarado por su apoyo para poder realizar este trabajo de grado.

Roger Guerra

DEDICATORIA

Primero es a Dios por darme la vida,

A mis padres por sus enseñanzas, amor y comprensión por su herencia: mi educación, y por ayudarme a que este momento llegara gracias.

A mis hermanas por su apoyo. Y amor incondicional para lograr nuestro objetivo

A todos mis familiares los cuales me supieron brindar su apoyo en los momentos difíciles de mi estudios; lo cuales fueron de gran inspiración para poder culminar exitosamente mis estudios universitarios.

Roger Guerra

Roger Guerra. 2008 “IDENTIFICACIÓN *in vitro* DE LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*)”

RESUMEN

El propósito de la presente investigación fue la identificación de las bacterias fitopatógenas asociadas al follaje y seudotallo del cultivo de arroz (*Oryza sativa*). Se tomaron 24 muestras entre agosto de 2006 a enero de 2007, en las regiones de Chiriquí y Bocas del Toro de un total de 14 variedades de las más sembradas. Se seleccionaron 4 aislamientos de fitobacterias identificadas en el Laboratorio de fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, los cuales fueron clasificados a nivel de especie

De las bacterias identificadas y asociadas al arroz con potencial fitopatogénico pertenecen a los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Xanthomonas*. Al realizar las pruebas de patogenicidad demostraron que los cuatros géneros de bacterias fitopatógenas aislados produjeron síntomas en las plantas de arroz en el invernadero del Departamento de Protección Vegetal y son: *Pseudomonas syringe*, *fuscovagine*, *Xanthomonas oryzae*, *Erwinia carotovora* y *Burkholderia glumae*

Las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación fueron: Agar nutritivo (AN), Papa Dextrosa Agar (PDA), Agar, YDC, King, MS y MTC, a demás, Ryu (KOH 2%), Gram Rápida, Campos Oscuros de Benias,

A demás se identificaron los hongos fitopatogenos: *Rhizoctonia sp*, *Gaumannomyces sp*, *Aspergillus sp*, *Mucor sp*, *Helminstoporium sp*, *Fusarium sp*, *Piricularia sp* y *Sarocladium sp*.

Palabras claves: Fitobacterias, Fitopatógenos, *Burkholderia glumae*, *Pseudomona syringae pv syringae*, *Psuedomonas fuscovaginae*, *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas oryzae var. oryzae*, Pruebas bioquímicas, Medios de Cultivo.

ÍNDICE CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
RESUMEN	v
INDICE DE CONTENIDO.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE ANEXOS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Importancia de las Bacterias en el Cultivo de Arroz.....	3
2.2. Las Bacterias Fitopatógenas.....	4
2.3. Biología de las Bacterias Fitopatógenas	5
2.4. Supervivencia.....	6
2.5. Diseminación.....	6
2.6. Sintomatología.....	7
2.7. Diagnóstico.....	8
2.8. Interacciones Hospedero-Patógeno.....	10

2.9. Clasificación Taxonómica.....	11
2.10. Característica de las Bacterias que se Encuentran en el en el	
Cultivo de Arroz.....	13
2.10.1. Genero <i>Pseudomonas</i>	13
2.10.1.1. Clasificación Taxonómica de Especies.....	13
2.10.1.2. Características Generales.....	14
2.10.1.3. Condiciones de Crecimiento Microbiano.....	15
2.10.1.4. <i>Pseudomona fuscovaginae</i>	16
2.10.1.5. <i>Burkholderia glumae</i>	17
2.10.1.6. <i>Pseudomona avenae</i>	18
2.10.1.7. <i>Pseudomona syringae</i> pv. <i>Syringae</i>	19
2.10.2. Genero <i>Xanthomona</i>	21
2.10.2.1. Clasificación taxonómica de especie.....	21
2.10.2.2. Características Generales.....	22
2.10..2.3. <i>Xanthomona oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	22
2.10.3 Genero <i>Erwinia</i>	24
2.10.3.1. Clasificación Taxonómica de Especie.....	24
2.10.3.2. Características Generales.....	24
2.7.3.3. <i>Erwinia carotovora</i>	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. Ubicación del Área y Metodología General.....	27
3.2. Recolección de Muestra en Campo	29

3.2.1. Diagnostico de Campo.....	30
3.3. Variedades de Semillas de Arroz Recolectadas para la Identificación de Bacterias Fitopatógenas.....	31
3.4. Preparación de las Muestras y Aislamiento de Bacterias.....	31
3.5. Pruebas de Diagnostico Utilizadas para la Identificación Fitobacterias Patógenas.....	32
3.6. Desinfección de Semillas.....	33
3.7. Preparación de Medios de Cultivos Agar Nutritivo (AN) y Papa Dextrosa Agar (PDA).....	34
3.7.1. Protocolo para la Preparación de un Medio de Cultivo.....	34
3.8. Identificación de las Bacterias	35
3.8.1. Prueba Ryup (KOH).....	36
3.8.2. Pruebas de Gram.....	36
3.8.2.1. Tinción de “Gram Rápida”	37
3.8.2.2. Tinción Negativa “Coloración de Contraste o de Campo Oscuro de Benias”	39
3.8.3. Pruebas de Identificación de Géneros por Medio Cultivos Diferenciales.....	40
3.8.3.1. Extracto de Levadura Dextrosa Carbonato de Calcio Agar (EDCA o YDC).....	40
3.8.3.2. B de King Agar (KB).....	41
3.8.3.3. Miller Schoroth Agar (MS).....	41

3.8.3.4. NCTC (BCSA).....	42
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
V. CONCLUSIONES.....	45
VI. RECOMENDACIONES.....	46
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	47
VIII. ANEXOS.....	51

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Clasificación Taxonómica Tentativa de los Prokaryotas que Causan Enfermedad a las Plantas	12

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Pág.
1	Codificación de Semillas Colectadas para Identificación de Fitobacterias Patógenas que Afectan el Cultivo de Arroz (<i>Oryza sativa</i>).	52
2	Protocolo para la Desinfección de Partes Vegetativas Modificado por Vissueti, Z. (FCA 2007)	53
3	Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Barú	54
4	Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Alanje	55
5	Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Oriente	55
6	Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Oriente	56

7	Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arrocera de Bocas del Toro	56
8	Preparación de los Reactivos para las Pruebas de Campos Oscuro de Bennis para Determinar las Formas de las Bacterias	57
9	Preparación de los Reactivos para las Pruebas de Gram Rápida y Determinar si son Gram (-) o (+).	57
10	Medios Selectivos y Básicos para la Identificación de Bacterias Fitopatógenas	58
11	Crecimiento de Hongos Fitopatógenos en Seudotallo en Platos Petri con Agar Nutritivo (AN).	58
12	Crecimiento de Hongos y Bacterias Fitopatógenos en Hojas en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	59
13	Crecimiento de Hongos y Bacterias Fitopatógenas con Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	59
14	Crecimiento Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	60
15	Crecimiento de Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	60
16	Reislamiento de Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	61

17	Reaislamiento de Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	61
18	Purificación Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	62
19	Purificación Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	62
20	Crecimiento de Hongos y Bacterias Fitopatógenas con Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).	63
21	Prueba Ruy (KOH) para Determinar la Presencia de Bacterias Fitopatógenas	63

I. INTRODUCCIÓN

En el cultivo de arroz en las regiones de Chiriquí y Bocas del toro se ha observado un complejo fitosanitario, favorecido por las condiciones ambientales de temperatura y humedad, siembras extemporáneas, la alta densidad de siembra, el uso de semilla no certificada, el manejo inadecuado de arvenses, la nutrición desbalanceada y la aplicación indiscriminada de plaguicidas.

Desde el 2002 se observó en estas regiones, la presencia de una sintomatología al inicio de la floración, de espiguillas vanas, decoloración de las mismas y manchado del grano. Los monitoreos realizados por el MIDA, IDIAP y FCA, demostraron la presencia de un complejo de bacterias que afectaban al cultivo de arroz.

Estas bacterias identificadas causan grandes pérdidas a los productores que se dedican a la explotación de este rubro en forma comercial que sustenta a un número apreciables de familias que de ello dependen para su subsistencia.

En Panamá, Von Chong *et al.* (2001) indican haber encontrado bacterias fitopatógenas en el follaje de plantas de arroz que presentaban los siguientes síntomas: puntos cloróticos húmedos, amarillamiento, necrosis, manchas cafés y necrosis del follaje.

Entre las bacterias fitopatógenas más importantes están *Erwinia carotovora* que afecta el tallo y provoca la pudrición blanda, *Burkholderia glumae*, agente causal de la enfermedad conocida el añublo del arroz, *Xanthomonas oryzae pv oryzicola*, que produce el tizón bacteriano foliar y *Pseudomonas syringae pv syringae* y *Pseudomonas fuscovagine*, bacteria que produce el estriado y pudrición del pseudotallo y espiga.

Observaciones y estudios realizados a partir de muestras de granos, pseudotallo y follaje severamente por la presencia del complejo acaro-hongo-bacteria en la región occidental del país arroceras de Panamá en los años 2006 y 2007, permitieron aislar en condiciones de laboratorio a las bacterias

Los objetivos principales de la presente investigación fueron: 1) identificar bacterias fitopatógenos asociados al cultivo de arroz y 2) aislar e identificar bacterias fitopatógenas asociadas al follaje, tallo y granos de las plantas de arroz en la región No. 1 de Panamá

II- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de las Bacterias en el Cultivo de Arroz.

El cultivo del arroz (*Oryza sativa*) es afectado por numerosos y diferentes enemigos naturales, encontrándose entre éstos un extenso grupo de agentes infecciosos que causan distintas enfermedades, las cuales en determinadas condiciones ambientales constituyen uno de los factores limitantes de mayor importancia en la explotación de este cereal. La actividad desarrollada por fitobacterias, en los órganos que invaden (hojas, tallos, inflorescencias, semillas) origina disminuciones, tanto en la calidad como en la cantidad de la cosecha.

La magnitud de las pérdidas económicas se encuentra determinada por los niveles de susceptibilidad de las variedades sembradas y por el tipo de manejo agronómico que ellas reciben.

Las bacterias son organismos que le originan al cultivo de arroz grandes daños. Los cuales le provocan pequeñas manchas húmedas que luego se vuelven amarillentas o blanquecinas, que a medida que se desarrollan crecen y se alargan; estas manchas

pueden estar perladas por gotitas que al secarse dejan como pequeños gránulos ;lo que demuestran la presencia de una enfermedad vascular típica.

La presencia de bacterias fitopatógenas en semillas de arroz se conoce desde hace poco tiempo y ha sido preocupación de distintos investigadores por constituir un problema grave, debido a que las bacterias constituyen el inóculo primario, que en condiciones apropiadas puede originar una epidemia.

2.2. Las Bacterias Fitopatógenas

Según Agrios (2004) las Bacterias y Mollicutes son organismos ubicados taxonómicamente dentro del Reino Prokaryotae y sus principales características son:

- No poseen material genético envuelto por ninguna membrana biológica.
- Presencia de Ribosomas pequeños (70S) exclusivamente.

Generalmente, son organismos unicelulares y aunque sus células son de tamaño muy variable, suelen ser más pequeñas que las de los organismos Eukariotas.

De las especies descritas dentro del Reino Prokaryotae actualmente, la gran mayoría son organismos Saprofitos. No obstante, se sabe desde 1882 que existen bacterias fitopatógenas y de éstas, hay actualmente unas 100 especies descritas y confirmadas como patógenos de plantas (Agrios, 2004) y sin lugar a dudas otras más serán descubiertas en el futuro (Ramos, 2000).

2.3. Biología de las Bacterias Fitopatógenas

La identificación de las bacterias de una especie presenta ciertos inconvenientes con respecto a los organismos Superiores, entre los que se destacan los siguientes:

- Las células bacterianas no tienen características morfológicas distintivas claramente visibles.
- Predominio de la reproducción asexual por fisión binaria.

Según Ramos (2000) y Agrios (2004) se reconoce como una especie bacteriana a un grupo de cepas que tienen en común características: morfológicas, culturales, fisiológicas, bioquímicas y patológicas (sólo en bacterias capaces de producir enfermedades infecciosas).

Como regla general se acepta que existe una cepa que funciona como espécimen tipo de la especie (que es a partir de la cual se obtiene la descripción de la especie), mientras que las otras cepas pueden presentar algunas variaciones con respecto a la cepa tipo de la especie (Agrios, 2004).

Cuando ocurre la existencia de cepas bacterianas dentro de la misma especie (es decir, con iguales propiedades culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas a las indicadas para el espécimen tipo) pero con diferente capacidad de infectar hospederos, se dice que estas cepas son patovares (abreviatura pv.) dentro de dicha especie (Agrios, 2004).

En general, el ciclo de las bacterias fitopatógenas es muy corto, se reproducen asexualmente por un proceso denominado fisión binaria o simplemente fisión, en el cual, a partir de una célula bacteriana, se obtienen dos nuevas células con igual genoma (nucleoide + plásmidos) y cantidades aproximadamente iguales de citoplasma (Agrios, 2004).

Según los autores antes mencionados, el ciclo de vida de una bacteria (entre fisiones consecutivas) puede tardar en condiciones ideales entre 20 y 50 minutos.

2.4. Supervivencia

Por lo general, en condiciones naturales las bacterias fitopatógenas sobreviven en residuos vegetales sobre la superficie del suelo, en o sobre semillas, en el suelo, y asociadas con hospedantes perennes. Pero algunas bacterias también pueden sobrevivir en el agua, y algunas hasta en objetos inanimados, o sobre o dentro de insectos. Conocer la forma de supervivencia suele ser esencial para prevenir la diseminación y para el manejo de la enfermedad.

2.5. Diseminación

La diseminación de las bacterias fitopatógenas es fácil, pero afortunadamente no siempre resulta en enfermedad. Generalmente ocurre por partículas de suelo y arena llevadas por el viento, las que causan heridas, especialmente durante o después de lluvias o tormentas. Las heridas son esenciales para el ingreso de muchos fitopatógenos. Los

aerosoles generados por fluctuaciones diurnas de temperatura permiten la diseminación, siempre que la temperatura y humedad están en concordancia (Hirano and Upper 1989). Algunas enfermedades vegetales requieren ciertas condiciones de temperatura; por ej. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* causa enfermedad por debajo de 22°C (72 °F) y *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, por encima de 22°C en poroto (*Phaseolus vulgaris*). Ambas enfermedades pueden ocurrir simultáneamente en plantas susceptibles si las temperaturas diurnas y nocturnas permiten el progreso de la enfermedad. Semilla infestada (contaminada superficialmente) o infectada o cualquier parte de la planta pueden ser fuentes de inóculo. La maquinaria, ropa, material de empaque y el agua también pueden diseminar patógenos, así como también los insectos y los pájaros. El monocultivo continuo en una zona generalmente permite el aumento de inóculo, haciendo más fácil la diseminación de los patógenos.

2.6. Sintomatología

La sintomatología de las enfermedades bacterianas es extremadamente variada, pero generalmente característica para un patógeno en particular. Los síntomas pueden variar desde mosaicos, pareciendo infecciones virales, a grandes anomalías tales como las agallas o partes de plantas distorsionadas. La alteración hormonal puede producir crecimientos anormales característicos en raíces, tallos y estructuras florales (filodia) y a veces color anormal de las flores (virescencia). Los síntomas más comunes son las manchas en hojas o frutos como tizones o muerte de tejidos en hojas, tallos o troncos de árboles, y podredumbres de raíces o tubérculos o cualquier otra parte de la

planta. También pueden ocurrir marchitamientos debido al taponamiento del tejido vascular. Los síntomas pueden variar con el fotoperíodo, variedad vegetal, temperatura y humedad, y la dosis de infección. En algunos casos, los síntomas pueden desaparecer o volverse poco importantes al continuar el crecimiento de la planta. Por ejemplo, el desarrollo de la mancha Holcus o mancha bacteriana del maíz causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* se frena al comenzar el tiempo cálido y seco.

2.7. Diagnóstico

El diagnóstico de las enfermedades causadas por bacterias no fastidiosas se basa en la presencia de síntomas característicos, el aislamiento del presunto agente infeccioso, y de pruebas fisiológicas y/o moleculares. En plantas muy infectadas, las poblaciones bacterianas en hojas o lesiones pueden alcanzar las 10^8 ó 10^9 UFC/gramo de tejido vegetal, y hasta pueden verse salir (en zoogreas) de hojas y tallos. Una forma simple de determinar si una enfermedad es causada por una bacteria es cortar una lesión típica o zona decolorada cerca de tejidos sanos y suspenderlo en una gota de agua en un portaobjetos. Si con un aumento de 400-1000x se ve una masa de pequeños bastones o “puntos” moverse y salir del tejido cortado, lo que se ve fluir es una corriente bacteriana. Sin embargo, esto no puede verse en todas las infecciones bacterianas, o puede ser que no se vean sin accesorios especiales del microscopio. Para unas pocas bacterias comunes y económicamente importantes hay disponibles comercialmente pruebas fisiológicas y serológicas, generalmente ligadas a enzimas. Se están volviendo más comunes las pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basados en

secuencias genómicas específicas. Aún están evolucionando las pruebas de diagnóstico (Schaad et al. 2001), de modo que unas pocas están estandarizadas y validadas por múltiples usuarios, incluyendo gobiernos.

La mayoría de los patógenos vegetales puede inducir una reacción de hipersensibilidad (HR) en especies vegetales no hospedantes o en plantas indicadoras (Klement et al. 1964). La HR es un mecanismo de defensa de plantas no hospedantes en respuesta a la presencia de un patógeno. El tejido se sensibiliza al patógeno, resultando en una muerte rápida de las células vegetales locales, atrapando al patógeno. Esto limita efectivamente la dispersión de la infección. Se puede usar la prueba de hipersensibilidad para determinar si una colonia aislada de un tejido vegetal infectado es un patógeno. Para ello se lo introduce, en una suspensión acuosa del cultivo puro con 10^8 UFC/ml, en una hoja de una planta no hospedante. El tabaco (*Nicotiana tabacum*) se usa con frecuencia en pruebas de hipersensibilidad porque tiene hojas con espacios internervales grandes que se infiltran fácilmente, pero para algunas bacterias Gram positivas se puede usar *Mirabilis jalapa* (maravilla ó Don Diego de noche). El colapso dentro de las 48 horas del tejido vegetal en la zona infiltrada indica que la bacteria posiblemente sea un patógeno de otro hospedante.

La confirmación de que el patógeno causa síntomas de enfermedad requiere de un hospedante y la realización de una prueba de patogenicidad. Un cultivo puro de la bacteria obtenida de los tejidos enfermos se inocular artificialmente en el mismo cultivar o

uno relacionado, o en otra especie susceptible, con el fin de reproducir los mismos síntomas de la enfermedad. La bacteria debe reaislarse y compararse con el cultivo puro inoculado. Esta estrategia puede llevar mucho tiempo (días, semanas o meses). Con alguna práctica, la mayoría de las enfermedades bacterianas puede ser diagnosticada fácilmente. Sin embargo, las variaciones entre diferentes cepas pueden hacer necesarias pruebas más sofisticadas

2.8. Interacciones Hospedero-Patógeno

Las bacterias pueden infectar a las plantas de varias maneras. En general se considera que la infección es pasiva, es decir accidental, aunque se ha informado de unos pocos casos de quimioattractivos. Las bacterias pueden entrar a la planta a través de aberturas naturales tales como estomas, hidatodos o lenticelas y también por heridas en hojas, tallos o raíces, o ser introducidas por ciertos insectos fitófagos. Las condiciones de nutrición de las plantas pueden favorecer la multiplicación en diferentes partes de la planta, por ej. Flores o raíces. El inóculo llevado por la lluvia que es arrastrada por el viento puede ser muy efectivo. En inoculaciones artificiales, las bacterias suelen introducirse en las plantas por heridas, aerosoles aplicados con presión para imitar las lluvias llevadas por el viento, infiltración por vacío, o por inmersión de las semillas en el inóculo.

2.9. Clasificación Taxonómica

No existe consenso aún entre los académicos sobre la sistemática completa del Reino Prokaryotae, ni tampoco para los Prokariotas fitopatógenos.

La taxonomía de algunos grupos de Prokariotas que se comportan como parásitos obligados, como por ejemplo las bacterias fastidiosas (limitadas a tejidos vasculares) no está definida y la de Phytoplasmas y Spiroplasma aún es tentativa (Agrios, 2004).

Sin embargo, se ha estudiado bastante aquellas bacterias que crecen bien sobre medios nutritivos artificiales (que son organismos saprofitos o saprofitos facultativos) y hasta ahora, se propone el siguiente esquema de clasificación para las bacterias Fitopatógenas.

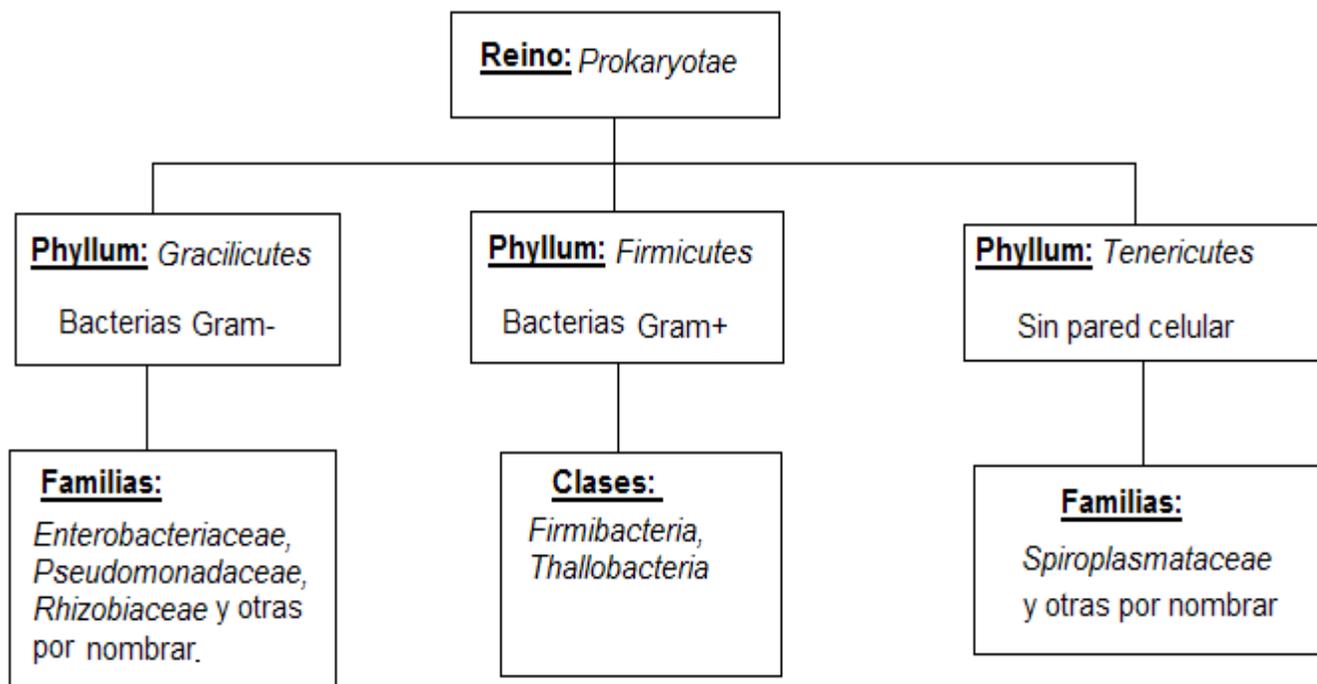


Figura No.1. Clasificación Taxonómica Tentativa de los Prokaryotas que Causan Enfermedad a las Plantas.

Dentro de los Taxa de bacterias antes mencionados, son de particular importancia para la Orizocultura los *Gracilicutes* de las Familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*.

2.10. Característica de las Bacterias que se Encuentran en el Cultivo de Arroz.

2.10.1. Genero *Pseudomonas*

2.10.1.1. Clasificación Taxonómica de Especies

Reino: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Pseudomonadales
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas*
Especie: *P. fuscovaginae*

Nombre binomial: *Pseudomonas fuscovaginae*

(ex Tanii, et al. 1976)

Miyajima, et al. 1983

Reino: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gamma Proteobacteria
Orden: Pseudomonadales
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas*

Especie: *P. syringae*

Nombre binomial: Pseudomonas syringae

Van Hall, 1904

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Beta Proteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Burkholderiaceae

Género: *Burkholderia*

Especie: *B. glumae*

Nombre binomial: Burkholderia glumae

(Kurita and Tabei 1967)

Urakami *et al.* 1994

2.10.1.2. Características Generales

El género *Pseudomonas* presenta un amplio espectro nutricional y no requiere de factores de crecimiento para su desarrollo. Así se ha encontrado como un género dominante en la rizosfera del maíz en diferentes localidades edafoclimáticas. También aparecen poblaciones altas en la rizosfera de las plantas de trigo y plantas ornamentales (Hernández, 2000).

Pseudomonas (Burkholderia) tiene una alta frecuencia de aparición, en la mayoría de los casos estudiados (Hernández, 1998). En los últimos años, esta especie adquiere vital importancia en estudios relacionados con la agricultura, debido fundamentalmente a la producción de una amplia gama de metabolitos activos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Se caracteriza por ser bacilos cortos Gram negativo, móviles y no formadoras de esporas, produce pigmentos no fluorescentes difusibles en el agar (piocinina) y acumula gránulos de poli -b hidroxibutirato (PHB). Es lecitinasa, ureasa, lisina descarboxilasa y amilasa negativa. Puede ser gelatinasa positiva o negativa (Pallerony, 1984). No degradan almidón, son resistentes a los antibióticos.

Dentro de este grupo existen dos grupos:

- Fluorescentes.
- No fluorescentes

Existen cepas patogénicas (*P. fuscovaginae*, *P. Syringae*, *P. avenae*) y saprofitas, dado fundamentalmente por su gran diversidad genética.(Meyer et al., 1989).

2.10.1.3. Condiciones de Crecimiento Microbiano

La composición de los medios de cultivos para la multiplicación de *Pseudomonas*, se informa en general en la literatura especializada, los de mayor frecuencia reportados

son King A, King B (King y Rang, 1954) en medios líquidos y sólidos, sin embargo se reportan otros para su empleo en mayores volúmenes dependiendo de la utilidad final que se requiera (Ortiz *et,al* 2000; Sánchez *et al.*, 2003). Su temperatura óptima de crecimiento es $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$, se desarrollan a un pH 7.2 a.2. Tienen un crecimiento rápido tanto en medio agitado como estático (Miranda, 1998).

2.10.1.4. *Pseudomona fuscovaginae*

Presenta síntomas asociados con el grano descolorado y han sido observados sobre el arroz (*Oryza sativa*) vainas, hojas, y el grano en México, Guatemala, Panamá, Suriname, Colombia, Perú, y Brasil.

Sintomatología

Lesiones necróticas de color marrón en hojas y vainas con manchas castañas o pequeñas motas marrón. Los síntomas se observados son rayas marrón sobre la vaina que podría extenderse a lo largo de la lamina de la hoja entera. La panícula no surge correctamente cuando la vaina de la hoja bandera es afectada con severidad, produciendo grano descolorado y mal lleno. Cuando se aísla el grano presenta síntomas de *Pseudomona* fluorescente similares a los aislamientos de tejido afectado y síntomas reproducidos en laboratorio por inoculación. Esto es característico de *Pseudomonas fuscovaginae*, agente causal de putrefacción bacterial marrón de la vaina de arroz.

Ciclo de Vida y Epidemiología

La bacteria es transmitida por semilla, los plantones muestra síntomas sobre vainas y hojas después de 10-20 días. El tratamiento térmico en 65 C durante 6 días erradica el patógeno de la semilla infectada. Este patógeno es el agente principal causal de la enfermedad de panícula sucia (manchado de grano) Descrita por primera vez en el norte de Japón en el año 1960 (Pfizer, 2006).

2.10.1.5. *Burkholderia glumae*

Los análisis de patogenicidad desarrollados por el CIAT; coinciden con los descritos para la enfermedad conocida como añublo bacterial de la panícula (Shajahan et al., 2000), producida por la bacteria *Burkholderia glumae* (Kurita & Tabei), bacteria reportada en Colombia por Zeigler y Álvarez (1989, 1990). Confirmada por análisis de laboratorios fitopatológicos y biotecnológicos de la Facultad de Ciencias agropecuarias de la Universidad de Panamá (Vissueti 2007 y Vásquez 2008). De las 5 especies de bacterias que afectan plantas de arroz, *B. glumae* produce la enfermedad conocida como “pudrición bacterial de la panícula del arroz”.

Sintomatología

La enfermedad se manifiesta con la pudrición del grano en las plantas maduras en el campo y también como pudrición de plántulas. Son pudriciones de color café, suaves o acuosa en los tallos también presentan marchites y pudriciones suaves de la hoja. En la

panícula, los granos infectados están arrugados y se tornan de color verde pálido para luego secarse.

Ciclo de Vida y Epidemiología

La bacteria puede causar apreciables pudriciones en las vainas con la emergencia de la hoja banderas. Estas bacterias están latentes en semillas infectadas alcanzando bajos niveles hasta desarrollarse la plántula lo que le permite invadir los espacios de las células entre la superficie de la epidermis y el parénquima esponjoso de la lema (cáscara o granza), momento en cual se multiplican la población rápidamente dañando el grano.

Las bacterias penetran a través de las estomas en la superficie interna de la cáscara del arroz. La enfermedad se ve favorecida por una temperatura y humedad relativa alta. (Pfizer, 2006).

2.10.1.6. *Pseudomona avenae*

Esta enfermedad es la causante del rayado bacterial en arroz, el cual fue reportado en Japón, Taiwán las Filipinas, Corea, Iran (Ou 1985). en Portugal , Latino América (Argwal y col 1989).

Sintomatología

Según Argwal y Col 1989 citado por Soriano 2006 Los primeros síntomas que se observan son en las vainas inferiores como bandas longitudinales húmedas las cuales

tienen un color verde oscuro, que luego se van cambiando a un color marrón oscuro. Cuando hay una infección severa causa enanismo y la muerte de las plántulas, las hojas jóvenes no expandidas al ser atacada le causa la muerte a los brotes. También las semillas presentan decoloración moderada a severa en las glumas y el endospermo. Los granos en caso extremo se pudren completamente y no tienden a llenarse la vaina.

Ciclo de Vida y Epidemiología

Según Argwal y col 1989 citado por Soriano 2006 la bacteria está presente a partir de las semillas que fueron inoculadas y en las plantas inoculadas al estadio del primordio floral, la floración y en plántulas sembradas en el suelo que fueron inoculadas artificialmente, demostrando que las bacterias se pueden transmitir internamente de las plantas a semilla o en plantas asintomáticas.

2.10.1.7. *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*

Pseudomonas syringae es una bacteria en forma de barra, Gram-negativa, con flagelos polares. Es miembro del género microbiológico de *Pseudomonas*.

Pseudomonas syringae es una bacteria patógena de plantas, las cepas se destacan por su diversidad y de acogida específicas de la interacción con diferentes especies de plantas. Concretamente, las cepas son asignadas a más de 50 patovares conocidos en base a su capacidad de infectar a diferentes especies de plantas.

Los test en *P. syringae* dan negativo para actividades *arginina dihidrolasa* y *oxidasa*, y forma el polímero leván en nutriente agar sucrosa. Se la conoce por secretar la toxina vegetal lipodepsinonapéptido siringomicina y porta su apariencia amarillo fluorescente al cultivarlo *in vitro* en medio King B.

Sintomatología

P. syringae pv. *syringae* presenta síntomas de decoloración o manchas necróticas de las hojas, vainas y tallos. Causando lesiones marrón o negros en vainas, nudos y tallos. Las lesiones que se presentan en la vaina son enlogadas, de color marrón a rojizo. Produce una necrosis la que causa el secamiento de toda la planta. Causa decoloración del grano, infección de semillas y esterilización. (Argwal y col 1989).

Epidemiología y Ciclo de la Enfermedad

Pseudomonas syringae sobrevive en semillas de arroz y específicamente en malezas gramíneas en las zonas arroceras. Puede recobrase de hojas y vainas de las plantas de arroz en el campo (Mew, 1992; Argwal y col 1989). La enfermedad por *P. syringae* tiende a favorecerse con condiciones de humedad frescas y temperaturas optimas a mantenerse en 12–25 °C, aunque esto puede variar de acuerdo al patovar involucrado.

Las bacterias tienden a estar en las semillas, y se dispersan entre plantas vía lluvia. Aunque es un patógeno vegetal, puede vivir como saprófito en la filósfera cuando

las condiciones no son favorables para la enfermedad. Algunas razas saprófitas de *P. syringae* se han usado como agentes de biocontrol contra la putrefacción postcosecha

P. syringae pv. *syringae* es un patógeno que se encuentra en el suelo y agua. Se transmite y disemina a través de las plantas vivas y por el material de propagación. Puede ser aislado de plantas aparentemente sanas sin síntomas de la enfermedad.

La bacteria se mueve intracelularmente, se multiplica rápidamente en el xilema, moviéndose hacia arriba o hacia abajo. Puede escurrir a través de las estomas y reinfectar tallos o follaje. (Fahy, P. C. y G. L. Persley. 1983)

2.10.2. Genero *Xanthomona*

2.10.2.1. Clasificación Taxonómica de Especie

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Genero: *Xanthomonas*

Especie: *oryzae*

Nombre binomial: *Xanthomonas oryzae*

(Ishiyama 1922) Swings et al. 1990,

2.10.2.2. Características Generales

Este género comprende bacilos rectos y cortos, Gram-negativos, con flagelación monótricas. En medio agar nutriente presentan un pigmento amarillo no difusible en el medio, no reducen nitratos (NO₃-), ni producen (H₂S), su crecimiento se inhibe con cloro. *Xanthomonas* siempre se encuentran en asociación con las plantas. (Mew, 1992) citado por Soriano 2006 menciona que esta bacteria esta distribuida en Asia tropical y África Occidental. Las perdidas en rendimientos por esta fitobacteria pueden variar según los cultivares y de las condiciones climáticas sean sembrados.

2.10.2.3. *Xanthomonas oryzae pv.oryzicola*

Xanthomonas oryzae son bacterias Gram-negativas con formas de barras, capsuladas y móviles con un flagelo polar y es el agente causal del tizón bacteriano del arroz (*Oryza sativa L.*). La plaga bacteriana de la enfermedad es una de las principales enfermedades del arroz en los países asiáticos y tropicales de arroz de alto rendimiento a menudo son cultivares altamente susceptibles a la enfermedad En campos severamente infestados, la enfermedad puede causar pérdidas de rendimiento tan alto como el 50%

Sintomatología

Se trata de una enfermedad vascular resultando en lesiones de gris a blanco a lo largo de las venas de las hojas tienen presencia de manchas en forma de rayas angostas y acuosas traslúcidas, las cuales son alargan y oscuras se observa un exudado bacteriano el cual esta compuesto por pequeñas gotitas amarillas. (Kranz 1982, Smith 1997, Bradbury

1986). Cuando el síntoma esta avanzado, las hojas se marchitan y se tornan color marrón, siendo difícil distinguir esta enfermedad de la mancha bacterial causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. (Kranz 1982, Smith 1997).

Ciclo de Vida y Epidemiología

La bacteria penetra a través de aperturas naturales (estomas e hidátodos) y heridas. La diseminación dentro del cultivo ocurre por contacto mecánico y por agua de lluvia. La bacteria puede persistir de estación a estación donde se presentan hojas infectadas y rastros pero esta no se encuentran en el suelo. Cuando se siembran granos infectados, estos germinan, las bacterias invaden los cotiledones y las vainas foliares a través de las estomas causando pequeñas manchas marrones en las primeras y segundas hojas. Las bacterias multiplicadas en los tejidos del huésped exudan al exterior y causan mas infecciones, así se extiende la enfermedad hacia las hojas de arriba, según va creciendo la planta. Las hojas jóvenes son más susceptibles que las maduras. (Kranz 1982, Smith 1997). Si se lleva a cabo en la fase prelechosa, solamente son infectadas las glumas. Se precisa de dos a tres días seguidos de humedad relativa alta o rocío durante las primeras horas de la mañana para una infección. Las temperaturas moderadas favorecen la extensión de las manchas (25 a 30 °C). (Kranz 1982).

2.10.3 Genero *Erwinia*

2.10.3.1. Clasificación Taxonómica de Especie

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Erwinia*

Especie: carotovora

Nombre binomial. *Erwinia carotovora*

Winslow *et al.* 1920

2.10.3.2. Características Generales

El género *Erwinia*, dividido ahora en *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea* y *Brenneria*, e inicialmente denominado así en honor de Erwin Smith, fue el primero propuesto para bacterias patógenas de plantas con forma de bastón, móviles por flagelos peritricos y anaeróbicos facultativos (Young *et al.*, 1992).

Esta bacteria es un patógeno de plantas con una amplia gama de huéspedes (zanahoria, arroz, papa, tomate, hojas verdes, calabaza y otras cucurbitáceas, cebolla, pimientos verdes, etc), capaces de causar enfermedad en casi todos los tejidos vegetales que invade. Se trata de un patógeno muy importante económicamente en términos de las

pérdidas posteriores, y una causa común de enfermedad en almacenamiento de frutas y verduras. *Erwinia* se conoce como pudrición blanda bacteriana (BSR).

2.10.3.3. *Erwinia carotovora*

La mayoría de las plantas o partes de las plantas pueden resistir la invasión de las bacterias, si no tiene algún tipo de herida presente. Humedad relativa alta y temperaturas alrededor de 30 °C favorecer el desarrollo de la enfermedad. No produce pigmentos fluorescentes en medio de King. Las partes afectadas se vuelven suaves, viscosas y oscuras; con exudados rojo-amarillentos; la pudrición esta limitada al tejido parenquimatoso, la cutícula y los filamentos vasculares permanecen intactos, los parte afectada producen un olor desagradable.

Sintomatología

Las bacterias del género *Erwinia* causan por lo general, la podredumbre blanda conocida como la marchites bacteriana. En el campo, las plantas afectadas presentan síntomas de amarilleo y marchites en las hojas inferiores, con avance hacia la parte superior del tallo y follaje, dándole a la parte apical de la planta un aspecto de punta de cigarro, ocasionando la muerte rápida de la misma. Las zonas afectadas toman una coloración oscura y de los tejidos circundantes sale un líquido de olor fétido

La enfermedad se caracteriza por manchas angulares acuosas en las hojas, necrosis en las nervaduras y manchas aceitosas de diversos tamaños.

Ciclo de Vida y Epidemiología

Penetra por heridas provocadas o naturales con una humedad relativa de 85% y temperatura entre 26 a 28 °C Su actividad virulenta actúa degradando paredes celulares vegetales (pectinasas, celulasas), y también proteasas, lipasas, xilanasas y nucleasas .

Los síntomas iniciales de la enfermedad consisten en manchas de color amarillento, de aspecto acuoso, translúcidas, localizadas en cualquier parte del pseudotallo de la planta; posteriormente estas manchas toman una coloración castaño rojizo y se extienden en todo sentido, hasta cubrir la vaina de las hojas parcialmente o en su totalidad. Al final, al presionar la parte afectada con los dedos. La pudrición avanza progresivamente hacia la base del pseudotallo y al mismo tiempo penetra en los tejidos sanos internos por contacto con las externas afectadas

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del Área y Metodología General

Esta investigación fue realizada en los laboratorios de Fitopatología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, la cual esta ubicada en el Corregimiento de Chiriquí, Distrito de David, Provincia de Chiriquí.

Inicialmente en medios de cultivos se sembraron las muestras colectadas previamente desinfectadas. Los medios de cultivos utilizados fueron: Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Agar nutritivo (AN) y Agar-Agar (AA) para identificación de hongos y bacterias patógenas del cultivo de arroz.

Posteriormente se realizaron otras pruebas mas especificas como las bioquímicas en medios de cultivo diferenciales específicos para determinar bacterias gran negativo (-) y géneros como las pruebas KOH 2%, Gram Rápida, Campos Oscuros de Benias,

Pruebas bioquímicas diferenciales para reconocimiento de géneros YDC, King, MS, a base de nitritos, crecimientos en soluciones líquidas.

A través de estas pruebas se pudo determinar las existencias de fitobacterias patógenas identificándose las siguientes: *Burkholderia glumae*, *Pseudomonas syringae pv syringae* (*), *Pseudomonas fuscovaginae* (*), *Erwinia carotovora* (*), *Disheya sp* y *Xanthomonas oryzae var. oryzae*; encontrándose en mayor poblaciones las enmarcadas con (*) cabe mencionar que las que afectan al cultivo de arroz son Gram negativas (-) y además se identificaron también los siguientes hongos fitopatógenos: los cuales estaban presente en los diferentes medios que se prepararon: *Rizoctonia sp*, *Gaeumannomyces sp* (**), *Aspergillus sp*, *Mucor sp*, *Helminthosporium sp*, *Fusarium sp*, *Piricularia sp* y *Sarocladium sp*, aquí es importante resaltar la presencia del hongo del mal del pie que afecta gramíneas y esta enmarcado con (**) por lo cual hay que monitorear los campos para detectar su presencia y proceder a tiempo con su control.

En este trabajo se le dio énfasis a la presencia de las bacterias en la parte interna de la semilla, ya que de esta forma representa el inóculo primario que va al campo, debido a que no puede ser eliminada por ningún tratamiento.

Con los resultados obtenidos no puede establecerse una relación directa entre la presencia de la bacteria (interna o externamente) y la germinación de la semilla; sin

embargo, se observó que la mayoría del material genético probados estaba contaminado con bacterias fitopatógenas (90% de los lotes muestreados).

3.2. Recolección de Muestra en Campo

Se colectaron mediante muestreo al azar de plantas que presentaban estrías o rayas blanquecinas, rectas, de grosor variable, con bordes bien definidos que se extendían en el mismo sentido de la nervadura central prolongándose hasta las vainas de las hojas, igualmente se colectaron tallos afectados los cuales al realizar cortes longitudinales se observaron los haces fibrovasculares de una coloración rojiza, especialmente en la región nodal. Los materiales fueron colectados en el campo dedicados a la producción comercial del grano de arroz en las provincias de Chiriquí y Bocas del Toro Las 24 muestras fueron colocadas en bolsas plásticas transparentes y llevadas al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad de Panamá para su procesamiento.

3.2.1. Diagnostico de Campo

La germinación y la infección que pueda realizar la bacteria en campo, está más bien relacionado con la edad de la vaina al infectarse y los niveles de bacteria (población) que se alcanza en la semilla. Si las vainas son infectadas jóvenes (inmaduras), la semilla será malformada y la bacteria llegará a niveles muy altos y consecuentemente la semilla no germinará.

Si las vainas están formadas y son afectadas por las bacterias, éstas invaden la semilla pero ya no afecta la germinación y muchas veces no causa síntomas aparentes en la semilla. Los síntomas observados en las vainas de arroz colectadas, y en la semilla de arroz provenientes de esas vainas, son iguales a los descritos por otros autores en distintas literaturas quienes señalan que como efecto de estos microorganismos en la semilla se origina una reducción en la germinación, emergencia y vigor así como disminución del rendimiento de las plantas adultas.

Numerosas metodologías han sido desarrolladas para detectar la presencia de bacterias en semillas.

En este caso, las pruebas de laboratorio y las suspensiones obtenidas como sospechosa de contener las bacterias, fueron en alto porcentaje de positivas. La metodología utilizada ha sido empleada por otros investigadores para detectar bacterias en otros cultivos.

Los síntomas desarrollados en los tejidos de las plantas de arroz que presenta la bacteriosis fueron similares a los señalados en la literatura consultada con lo que queda demostrada la efectividad de la pruebas de diagnóstico utilizadas (Morales, 2008).

La misma podría servir en el futuro como una prueba fitopatológica para certificar semilla de arroz libre de bacterias, de llegarse a establecer un programa de certificación para este cultivo en nuestro país.

3.3.-Variedades de Semillas de Arroz Recolectadas para la Identificación de Fitobacterias Patógenas

FCA 9738, I 145 05, I 2503, Fedearroz 473, Fedearroz 50, Clearfield, Picaporte, Vioal,

3.4. Preparación de las Muestras y Aislamiento de Bacterias

Técnicas utilizadas para la reproducción de fitobacterias:

Cultivo, aislamiento, purificación y multiplicación de follaje afectado utilizando medios de cultivo de agar nutritivo (AN) y papa dextrosa agar (PDA) lo cual se incubo a 36 °C por 24 horas.

De muestras foliares y tallos afectados colectados en cultivos comerciales de arroz de la Región No 1 previamente lavados suavemente con agua corriente, se realizaron cortes de tejido foliar, granos y pseudotallo. Para ello, se tomaron secciones pequeñas del área foliar (1cm) y se desinfectaron en hipoclorito de sodio (NaCl) al 2%. Estos aislamientos se guardaron en bolsas plásticas y se incubaron en condiciones de laboratorio a una temperatura promedio de 27 C y HR máxima de 70% y minina de 55%. Las colonias desarrolladas después de 24 horas, fueron replicadas individualmente en

cápsulas de petri conteniendo medio de cultivo AN, para obtener cultivos puros y realizar las pruebas de patogenicidad

3.5. Pruebas de Diagnostico Utilizadas para la Identificación Fitobacterias Patógenas.

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes.

Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

Para realizar las pruebas bioquímicas se dispone de múltiples medios, los cuales se deben aplicar de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio.

Además estudiaremos los resultados que estos test arrojan, comparando resultados experimentales entre los distintos grupos de trabajo de nuestro laboratorio. Las pruebas más utilizadas para la identificación de las bacterias son: AN; YDC; Ryu (KOH); Prueba de Campo Oscuro de Benias, y la Tinción de Gram Rápida.

3.6. Desinfección de Semillas

Esta se realizo seleccionando 20 semillas que se sumergen en las diferentes soluciones utilizando pinzas, guantes y mascararas en un lugar aislado dentro del laboratorio con todas las reglas de asepsia y esterilización a continuación mencionamos el proceso a seguir:

I. Alcohol 50 % por 10 segundos para eliminar la tensión superficial

II. Hipoclorito de Calcio por 15 segundos

III.-Agua destilada esterilizada para limpiar las semillas de la solución anterior por 10 segundos

IV. Agua destilada esterilizada para limpiar las semillas de la solución anterior por 10 segundos

V. Solución de cloros al 10 % por 15segundos para eliminar cualquier bacteria posible

VI. Agua destilada esterilizada para limpiar las semillas de la solución anterior por 10 segundos

VII. Agua destilada esterilizada para limpiar las semillas de la solución anterior por 10 segundos

Este proceso demora aproximadamente 3 minutos.

3.7. Preparación de Medios de Cultivos Agar Nutritivo (AN) y Papa Dextrosa Agar (PDA).

De acuerdo a las indicaciones de cada etiqueta de los medio de cultivos se preparan en erlermeyer de 1000 ml previamente esterilizados en un horno a 180⁰C durante 2 horas 750 cc de cultivo, utilizando agua destilada y autoclavando a razón de 15 lbs de presión por pulgada cuadrada, 125⁰C y 15 minutos.

Una vez preparados los medios de cultivos estos se vertiron 20 cc en cada plato petri (vidrio o desechable) previamente esterilizados al horno al igual que todo el material y cristalería a utilizar.

3.7.1. Protocolo para la Preparación de un Medio de Cultivo:

- I. Se pesara lo que indique la etiqueta del medio de AN o PDA para un litro.
- II. Se coloquen a calentar 1000 cc de agua destilada en un Erlenmeyer de 1800 cc
- III. Cuando el agua esté caliente se procede a verter poco a poco el medio de cultivo con la finalidad que se disuelva homogéneamente sin formar grumulos.
- IV. Con la varilla policia se agita constantemente para ayudar a la rápida y efectiva disolución del medio de cultivo para que éste no se deposite en el fondo.
- V. Cuando se haya disuelto completamente el AN o PDA (verifique que no se hayan formado grumos), se procede a dividir la solución en 4 alícuotas de 250 cc cada una.
Tape la parte superior con papel aluminio.

- VI. A continuación éstas se montan o se colocan dentro de la autoclave para su correspondiente esterilización depende del volumen en el cual estén envasados los medios de cultivo. El tiempo de esterilización se va a iniciar cuando el termómetro marque los 121 C, por espacio de 15 minutos a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada.
- VII. Transcurrido el período de esterilización, permita que la presión de la autoclave baje a cero, saque el medio y colóquelo dentro de la cámara de aislamiento. Cuando la temperatura baje a unos 45°, vierta el medio en cajas Petri o tubos de ensayo. Si no se va a utilizar el medio pronto, guárdelo en un refrigerador a una temperatura de aproximadamente 4C.

3.8. Identificación de las Bacterias

A partir de una colonia de los medios de AN y PDA, se realizaron pruebas para ver las características morfológicas mediante la tinción con rojo congo, y la tinción de Gram Rápida. Las propiedades fisiológicas y bioquímicas estudiadas fueron las siguientes: Prueba de Ryu (KOH al 3%) y medios de cultivo diferenciales específicos para identificación de géneros como son el EDCA (YDC), KING y MS. Los cuales presentan crecimientos positivos a géneros de bacterias mas comunes de plantas con que estamos tratando, para posteriormente proceder a la identificación de especies por pruebas de Biotecnología Vegetal con PCR y otras pruebas serológicas de confirmación.

3.8.1. Prueba Ryu (KOH).

Prueba de Ryu (KOH 3%) lo cual permite determinar la presencia de fitobacterias.

Se realizara un aprueba de KOH al 3% para determinar si nos encontramos ante una bacteria fitopatogena. Del crecimiento de colonias bacterianas se toma una muestra que se combina con una gota de KOH al 5% si de esta se forma un hilo mucoso al levantarlo con un palillo o asa de vidrio se esta ante la presencia de una fitobacteria.

3.8.2. Pruebas de Gram

Una vez comprobada que las bacterias son fitopatógenas se le realizaran pruebas de Gram. y Campo Oscuro de Benias para determinar si son Gram. Negativas o positivas.

En los casos de hojas, tallos se colocan en el medio de cultivo, un trozo cortado en poca agua, o el extremo de un corte en una gota sobre el portaobjeto hasta que el agua se vea ligeramente lechosa (si esto ocurre, aplástese el material, triturándolo y quítese lo más grueso) o según una muestra pura del medio de cultivo. La gota sobre un portaobjeto bien limpio e identificado en un extremo con lápiz de cera, debe ser distribuida sobre una superficie amplia, que abarque la mitad o mas del portaobjeto, aguja de disección, aguja de transferencia, etc., para formar un frotis lo mas homogéneo posible. Este se seca con la ayuda de la llama de un mechero sobre la cara inferior,

haciendo pases ligeros que no lo calienten más de lo que tolera la piel. Se fija la preparación seca con pases adicionales sobre la llama.

Con un frotis fijado se procede a teñir. Usando la tinción Gram. “rápido” que se detallará a continuación, la cual es superior a las otras versiones de la tinción de Gram., por la economía de tiempo y la estabilidad de los preparados.

3.8.2.1. Tinción de “Gram Rápida”

Pruebas Rápida de Tinción de Gram para determinar si las fitobacterias son gram negativas grupo donde están las bacterias que afectan el cultivo de arroz. Posteriormente se observaron al microscopio con objetivo de inmersión, obteniéndose bacilos finos gram negativos.

Soluciones

A Cristal violeta (o violeta genciana)	2.5 g.
Agua	1000 cc
B Bicarbonato de sodio	12.5
Agua	1000 cc
C Yodo	20.0
Hidróxido de sodio (Sol. Molar, 40.01 g/100cc)	100 cc
Agua	900 cc

Disolver el yodo en la solución de hidróxido de

Sodio y diluirlo con agua	
D Alcohol etílico al 95%	750 cc
Acetona	250 cc
E. Fucsina básica, solución saturada en 95% de alcohol	100 cc
Agua 900 cc	

Pasos a seguir:

- A. Irrigar (cubrir) el frotis con cantidades iguales de (A) y (B) por 10 segundos y luego escurrir el exceso.
- B. Irrigar con (C) por unos 10 segundos, luego lavar con agua.
- C. Irrigar con (D) hasta que no se pueda desteñir más unos 5 a 10 segundos, y luego lavar con agua.
- D. Irrigar con (E) por no más de dos a tres segundos, lavar con agua y secar.

Observación:

Para la observación inmediata se seca el frotis tocando con papel filtro, sin frotar la superficie.

I.-Luego se procede a una gota de aceite de inmersión sobre el frotis y se observa con el objetivo de inmersión de un microscopio (de no tomar éste, cubrir la gota con cubreobjeto y ver con el objetivo de mayor aumento).

II.-Las bacterias que permanecen teñidas de color azul se denominan Gram (+); y las que se desteñen con la solución de alcohol etílico – acetona (D) y luego se tornan rojas con la fucsina (E) se denominan Gram (-).

La “tinción negativa” o coloración de contraste o de campo oscuro de Benias. Esta es aún más rápida, pero tienen las desventajas de que el tinte es inestable, y solo permite hacer observaciones sobre la forma de las bacterias. La tinción Gram indica además si la bacteria es de reacción Gram positiva (+) o negativa (-), característica muy importante en la identificación de bacterias.

3.8.2.2. Tinción Negativa “Coloración de Contraste o de Campo Oscuro de Benias”.

Prueba de Campos de Bennias con lo cual se determina la forma de las bacterias de bastones características de la mayoría de las bacterias que afectan plantas.

Soluciones:

- a. Rojo Congo (Congo red) al 2% en agua.
- b. Alcohol acidulado (3 gotas de ácido clorhídrico (HCl) en 30 ml. de alcohol etílico 95%.

Procedimiento.

- I. Sobre un portaobjeto limpio y seco, ponga una gota de tinte rojo congo (A) y exudado bacteriano, o aplaste en él un trozo pequeño de tejido que se presume contiene bacterias (retirando el material grueso después de dos minutos).
- II. Haga un frotis de la preparación. Agregue 2-3 gotas de alcohol acidulado (B). El frotis se torna azul.

III.-Dejar evaporar el alcohol acidulado.

VI. Se observa en el microscopio para poder identificar que tipo de bacterias es con la tinción de Gram. Las bacterias aparecen blancas, sin teñir, sobre el fondo azul. Es importante no usar demasiado tinte o será demasiado grueso el fondo, ni demasiado material enfermo que pueda precipitar el tinte.

3.8.3. Pruebas de Identificación de Géneros por Medio Cultivos Diferenciales.

3.8.3.1. Extracto de Levadura Dextrosa Carbonato de Calcio Agar (EDCA o YDC)

Medio Extracto de levadura carbonato agar (Yeas-Dextrose-Carbonate agar): medio diferencial para bacterias del género *Xanthomonas*. Las bacterias de este género que crecen sobre este medio deben presentar un vistoso crecimiento amarillo contrastante con el fondo blanco del medio, debido a la producción abundante de un pigmento amarillo llamado Xanthomonadina.

Reactivos:

Agua	250 ml
Extracto de levadura	2.5 g.
Dextrosa (glusoca)	5.0 g.
CaCO ₃	5.0 g.
Agar	3.75 g.

Identificación de *Xanthomonas*

3.8.3.2. B de King Agar (KB)

1. Medio B de King (King's B medium): medio diferencial para bacterias del género *Pseudomonas*. Las bacterias de este género que crecen sobre este medio deben presentar fluorescencia bajo luz ultravioleta.

Reactivos:

Proteosa Peptona No. 3	5.0 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.40 g.
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.40 g.
Glicerol	3.75 ml
Agar	3.75 g
Agua	2.50 ml.

Identificación de *Pseudomonas*

3.8.3.3. Miller Schoroth Agar (MS)

Medio Miller & Schoroth: medio selectivo para Enterobacterias, particularmente recomendado para bacterias del género *Erwinia* no necesariamente con capacidad pectinolítica. En éste medio, sólo deben crecer Enterobacterias (anaeróbicas facultativas) y si se trata de bacterias del género *Erwinia*, el crecimiento debe mostrar una coloración naranja rojiza. El crecimiento en este medio es más lento que en los anteriores.

Reactivos:**Parte sólida**

Agua	250 ml.
Agar	4.70 g.
Manitol o Sorbitol	3.15 g.
Ácido Nicotínico	0.16 g.
Aspergina L.	0.94 g.
K ₂ HPO ₄	0.63 g.
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.06 g.
Taurocloruro de sodio	0.80.g

Parte líquida

Ácido Nítrito	3.13 ml.
Bromoimol Azul	2.81 ml.
Rojo Neutro	0.78 ml.
NaOH (IN)	1.56 ml.
Citrato Talio	0.55 ml.
Cloruro Cobalto	15.6 ml.
Ciclohexamida	1.56 ml.

Identificación de *Erwinia*

3.8.3.4. NCTC (BCSA)

Medio NCTC: medio diferencial para aislamiento de bacterias del género *Burkholderia* con un crecimiento mucoso de colonias amarillas claras y la presencia de

una pigmentación amarilla que se difunde en el agar a una temperatura 36°C de por espacio de 2 a 4 días, mostrando una colación brillante. Cristal violeta, gentamicina, vancomicina y polimixina B son los inhibidores; rojo fenol es el indicador de pH.

Reactivos:

En gramos por litro de agua filtrada purificada

Caseína Peptone 10,0 g.

Extracto de levadura 1,5 g.

Cloruro de Sodio 5,0 g.

Lactosa 10,0 g.

Sacarosa 10,0 g.

Cristal Violeta 0.002 g.

Fenol Rojo 0,08 g.

Agar 14,0 g.

Antibióticos

Gentamicina 0,01

Polimixina B 600000 u

Vancomicina 0,0025

pH 7,0 ^{+/-0,2 a 25 C}

Identificación de *Burkholderia*

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del Patógeno

A partir de muestras de tallos, hojas y granos enfermos de arroz se aisló consistentemente colonias bacterianas de color amarillo, no mucoides, circulares, de bordes uniformes, consistencia gelatinosa y aspecto brillante, las cuales, crecieron a los 3 días después de la siembra en el medio AN y vistas al microscopio óptico presentaron forma de bastón. Lo que confirmo la presencia de bacterias fitopatógenas.

Reaislamiento del Organismo Causal

El método de inoculación que resultó positivo en las pruebas se utilizo para reaislar las bacterias fitopatogenasmente que dieron positivas en platos petri sellados con parafilm. Los crecimientos iniciaron a apreciarse a las 8 horas de sembradas las unidades formadoras de colonia (ufc), lo que se hizo evidente a las 48 horas de realizar pruebas para determinar que estábamos antes fitobacterias patógenas

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a la sintomatología observada en plantas enfermas en campos comerciales de las provincias de Chiriquí y Bocas del Toro y a los resultados positivos obtenidos en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá de las pruebas de patogenicidad, características morfológicas y bioquímicas y al crecimiento de la bacteria en los medios selectivos de YDC, MS, KING y MCCT se comprobó que los diversos síntomas en campos observados son causados por los géneros de bacterias *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Burkholderia* confirmándose así, la presencia de un complejo de bacterias afectando hoja, pseudotallo y grano del cultivo de arroz (*Oryza sativa*).

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de patogenicidad en diferentes periodos fenológicos del cultivo.
2. Utilizar métodos más específicos para caracterizar bacterias, como son el análisis de ácidos grasos y secuencias del ADN tales como la ITS del rDNA o las porciones codificantes del mismo.
3. Utilizar semillas registrada y certificada para asegurar una buena producción y resistencia a la incidencia de fitobacterias.
4. Considerar las condiciones agro-climáticas y de suelo dentro de un programa de sanidad vegetal
5. Utilizar un bactericida de acción sistémica y acción residual prolongada que le permita un control por lo menos durante 15 días.

VI. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- ANDREW, KATIUSKA** 2004. *Steneortarsonemus spinki* Smiley: Acaro de las vainas del arroz. Jornada de capacitación IDIAP 20004. Revista Arroz en Chiriqui No.91. Julio de 2004. asociación de productores de arroz de Chiriqui (APACH). David, Chiriqui.1p.
- ANGLADETTE, ANDRE.** 1969. Técnica Agrícolas y Producciones Tropicales “El Arroz”. Editorial Blume, Primera Edición, Barcelona, España..
- BRYAN A, BRYAN CH. A, BRYAN. CH.G,** 1979. “Bacteriología” Principio y Practicas. Editorial Continental S.A., 6 edición México-España, argentina, Chile, Venezuela, 1979. 572 Pág.
- CAMARGO I, BRUNO ZACHRISSON, KILMER, VON CHONG** et. al. 2005. Guía técnica para el Manejo Integrado del complejo acaro hongo, bacteria en el cultivo del arroz. Panamá, Rep. De Panamá.
- CAMARGO ISMAEL MARTÍNEZ R. LUISA.**2005. Folleto de la Variedad IDIAP 145-05. Departamento de publicaciones del IDIAP.
- GAONA, JAIME.** 2006. FCA 9738 Nueva variedad de arroz para los ecosistemas de secano favorecido y riego de Panamá. Editado en la Dirección de Extensión de la Facultad De Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Panamá.
- FAHY, P. C. y G. L. PERSLEY.** 1983. Plant Bacterial diseases a diagnostic guide. Academic Press. Sydney. Australia. pp. 141-188.
- FERNÁNDEZ, YAKELIN** (1998): Evaluación de diferentes medios para la producción de metabolitos secundarios a partir de las cepas de *Pseudomonas sp.* Trabajo e diploma Universidad de la Habana

- HIRANO, S. S. AND C. D. UPPER.** 1989. Diel variation in population size and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on snap bean leaflets. www.plantpath.wisc.edu/fac/cdu.htm
- HERNÁNDEZ, ANA; FERNÁNDEZ, ANA, I; PÉREZ, J; MIRANDA, SANDRA; FONS CARIDAD; HERNÁNDEZ, ANA, N. Y SANTANDER J. L.** (1999): Producción, purificación y diagnóstico de sideróforos a partir de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-1443. *Cultivos Tropicales*. Vol. 20(1):21-25.
- HERNÁNDEZ, ANNIA.** (2000): Características de géneros asociados a los cultivos de gerbera y clavel. *Cultivos Tropicales*. Vol.21(3): 15-18.
- INSTITUTO DE INVESTIGACION EN SANIDAD VEGETAL (INISAV)** 1998. Informe sobre el vaneado de la panícula y la pudrición de la vaina de arroz por el complejo del acaro *Steneortarsonemus spinki* y el hongo *Sarocladium oryzae*. La Habana, 26p.
- KING, E. O; WARD, M. K.; AND RANEY, D.E.** (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* Vol.44: 301-307.
- KLEMENT, Z., FARKAS, G. L. AND LOVREKOVICH, L.** 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54:474-477.
- KRANZ, J.** 1982. Enfermedades de los cultivos tropicales. Verlag P.P. ALEMANIA. P.73
- LATORRE G. BERNARDO,** Enfermedades de las plantas cultivadas, Editorial Alfaomega, Chile, 1999. 646 pag.
- MARTÍNEZ R. LUISA, CAMARGO ISMAEL.**2003. Folleto de la Variedad 25-03 Centenario. Departamento de publicaciones del IDIAP.
- MEYER, I. N.; HOHNADEL, D. AND HALLÉ, F.** (1989): Cepabactín from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *I. Gen. Microbiol.* Vol.135:479-1487.
- MIRANDA, SANDRA.** (1998): Identificación y caracterización en cuanto a producción de sideróforos de cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. Trabajo de Diploma. Universidad de la Habana. La Habana. 56.
- ORTÍZ, SUCEL; SÁNCHEZ, LILIAN Y HERNÁNDEZ, ANNIA.** (2000): Evaluación de dos componentes del medio de cultivo para la producción de sideróforos a partir de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* 0057 mediante

fermentación. En: Programa y Resúmenes XII Seminario Científico . Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. (11: 2000: La Habana).

PALLERONY, N. J. (1984): Family 1. *Pseudomonadacea* En Bergey's manual of systematic bacteriology. N. R. Kried (ed). The William and Wilkins. Co, Baltimore. p. 140-205.

PFIZER SALUD ANIMAL. 2006. Pudrición bacterial de la vaina y manchado del grano del arroz.

PÛNTENER, W. 1981. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. CIBA GEIGY. Suiza.205p.

RAMOS MARIANO, ROSA DA LIMA. 2000. Manual de praticas em fitobacteriologia. Universidad Federal rural de Pernambuco. Recife, PE. Brasil. 171p.

SÁNCHEZ LILIAN; ORTIZ SUCEL; HERNÁNDEZ ANNIA (2003): Obtención de sideróforos a partir de *Burkholderia cepacia* y optimización del medio de cultivo para su producción. *Rev.Salud Anim.*25(1): 27-23

SARASOLA, ABEL A. Y ROCCAS DE SARASOLA MARIA A. 1975, Fitopatología Curso Moderno. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires. Argentina. Tomo III

SCHAAD, N. W., JONES, J. B. AND CHUN, W. (ed.). 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN.

SORIANO, JUAN PABLO.1998 Determinación de la incidencia de bacterias patógenas en semillas de arroz, (Categorías básica, registrada y certificada) y Evaluación de alternativas químicas para su control. Panamá, Rep. De Panamá.

SCHAAD, N. W. 1983. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Bacteriology committee. America Phytopathological society. St. Paul, MN. Estados Unidos. 71p.

VISSUETTTI, Z. Y VASQUEZ, S. 2006. Identificación de las fitobacterias, determinación de los bactericidas más eficiente y la variedad de arroz más tolerante que actualmente se cultivan en el área de la Provincias de Chiriquí en el control del complejo acaro bacterias hongo, con énfasis en la bacteriosis del arroz. Facultad de Ciencias Agropecuaria. Chiriquí. Chiriquí.10 pág.

VON CHONG, KILMER Y OTROS. 2001. Identificación del agente etiológico de la bacteriosis del follaje del arroz en Panamá. Revista: Actualidad Agropecuaria. No. 29. Julio de 2001. 4p.

BACTERIAL SHEATH BROWN ROT OF RICE CAUSED BY *PSEUDOMONAS FUSCOVAGINAE* IN LATIN AMERICA. R. S. ZEIGLER, PLANT PATHOLOGIST, RICE PROGRAM, CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT), Apartado Aereo 6713, Cali, Colombia. E. Alvarez, Research Assistant, Rice Program, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aereo 6713, Cali, Colombia. Plant Dis. 71:592-597. Accepted for publication 20 November 1986. Copyright 1987 The American Phytopathological Society.

YUAN, XIANGLONG. 2001. Identification of bacterial pathogens causing panicle blight of rice in Louisiana. Master of Science Thesis for the Degree of Master of Science in Plant Pathology. Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University. Baton Rouge, Louisiana. 102p. Disponible en: http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-01282004-111538/unrestricted/Yuan_thesis.pdf

VIII. ANEXOS

Anexo No.1. Codificación de Semillas Colectadas para Identificación de Fitobacterias Patógenas que Afectan el Cultivo de Arroz (*Oryza sativa*).

Variedad	Categoría	Localidad
V.1. IDIAP 145-05	SB. Semilla Básica	A.(La Esperanza, Kilómetro 32, Progreso y Baco-Barú) Progreso y Pto. Armuelles
V.2. Siglo XXI	SC. Semilla Certificada	B.(Los Limones, Canta Gallo, Las Moras y Barro Blanco) Alanje y Divala.
V.3. VIOAL	SR. Semilla Registrada	C.(David, Chiriquí, San Lorenzo y Remedios) David y Oriente Chiricano
V.4. Fedearroz 50		D.(Punta Róbalo, Chiriquí Grande y Changuinola) Bocas del Toro
V.5. Gallote		
V.6. I-2503		
V.7. I-3003		
V.8. Fe-473		
V.9. Guanacaste		
V.10. Picaporte		
V.11.-FCA 9738		
V.12 -FCA 3621		
V.13.-Oryzica 1		
V.14.-Clearfield		

Fuente: Vissueti, (2007).

**Anexo No.2. Protocolo para la Desinfección de Partes Vegetativas
Modificado por Vissuetti, Z. (FCA 2007)**

PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN DE SEMILLAS		
PASO	LABOR	Duración
1	Enjuague con agua potable	Hasta remover la mayor cantidad de granos vanos e impurezas livianas.
2	Inmersión en Etanol 70%	10 seg.
3	Doble enjuague con agua destilada estéril.	10 seg. (cada enjuague)
4	Hipoclorito de Calcio 10%	10 seg.
5	Doble enjuague con agua destilada estéril.	10 seg. (cada enjuague)
6	Hipoclorito de Sodio 10%	10 seg.
7	Doble enjuague con agua destilada estéril.	10 seg. (cada enjuague)

Fuente: Vissuetti, (2007).

Anexo No.3. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Barú
*Muestras de Semillas.

CÓDIGO	AN (crec.)	KOH 3%	YDC	King`s B	M.S.	Gram rápida	Campo de Benias	Caract. de colonia	**Bacteria
V1SCA (d)	positivo	positivo	Negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	Colonia blanca mucosa, fluorescente	R
V1SCA (d)	positivo	positivo	Negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	Colonia rosada	P
V1SCA (sd)	positivo	positivo	Negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	Colonia blanca fluorescente	R Y B
V1SCA (sd)	positivo	positivo	Negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	Colonia blanca fluorescente	X
V2SCA (d)	positivo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	
V2SCA (sd)	positivo	positivo	Negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	Colonia blanca fluorescente mucosa	B
V5SCA (d)	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	*Crecimiento de hongos	<i>Rizoctonia</i>
V5SCrA (sd)	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo		<i>Gaeumannomyces</i>
V5SCrA (sd)	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo		<i>Aspergillus</i>
V5SCrA (d)	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo		<i>Mucor</i>
V9SCA (d)	positivo	positivo	Positivo	positivo	positivo	negativo	negativo		<i>Helminthosporium</i>
V9SCA (sd)	positivo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo		<i>Fusarium</i>
V9SCA (d)	positivo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo		<i>Piricularia</i>
V9SCA (sd)	positivo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo		<i>Sarocladium</i>
V10SCA (d)	positivo	positivo	Negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	Colonia blanca viscosa fluorescente	R Y B
V10SCA (sd)	positivo	positivo	Positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Colonia crema mucosa	X
V10SCA (d)	positivo	positivo	Negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	Colonia blanca viscosa	R
V10SCA (sd)	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	
V10SCA (d)	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	

Fuente: Autor y Vissueti, (2007).

Anexo No. 4. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Alanje.

*Muestras de Tejido (tallo y hojas).

CÓDIGO	AN (crec.)	KOH 3%	YDC	King`s B	M.S.	Gram rápida	Campo de Benias	Caract. de colonia	Bacteria
V6SCB	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Colonias cremas mucosas	X
V7SCB	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	Colonias amarillo intenso	P

Fuente: Autor y Vissuetti, (2007).

Anexo No. 5. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Oriente.

*Muestras de Semillas

CÓDIGO	AN (crec.)	KOH 3%	YDC	King`s B	M.S.	Gram rápida	Campo de Benias	Caract. de colonia	Bacteria
V2SSCC (d)	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	N
V2SSCC (sd)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	N
V2SCC (d)	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	Crecimiento crema poco mucoso	P

Fuente: Autor y Vissuetti, (2007).

Anexo No.6. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Oriente.

*Muestras de Tejido (tallo y hojas).

CÓDIGO	AN (crec.)	KOH 3%	YDC	King`s B	M.S.	Gram rápida	Campo de Benias	Caract. de colonia	Bacteria
V1SCC	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	C. Crema Viscosa	P
V1SCC	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	C. Blanca seca	B
V2SCC	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	C. Blanca seca	B

Fuente: Autor y Vissueti, (2007).

Anexo 7. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Muestras Colectadas en la Zona Arroceras de Bocas del Toro

*Muestras de semillas

CÓDIGO	AN (crec.)	KOH 3%	YDC	King`s B	M.S.	Gram rápida	Campo de Benias	Caract. de colonia	Bacteria
V1SRD (d)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	N
V1SCD (d)	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	Colonia blanca, mucosa y fluorescente	R Y B
V2SCD (sd)	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Crecimiento crema mucoso	X
V2SCD (sd)	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Colonia blanca mucosa	X
V2SCD (d)	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	Colonia mucosa amarilla	P
V2SCD (d)	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Colonia viscosa anaranjada.	X
V2SCD (d)	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Colonia crema viscosa.	X
V7SCD (d)	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Colonia crema mucosa.	X
V7SCD (d)	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	Colonia amarilla	X
V7SCD (sd)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	N
V7SCD (d)	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	N

Fuente: Autor y Vissueti, (2007).



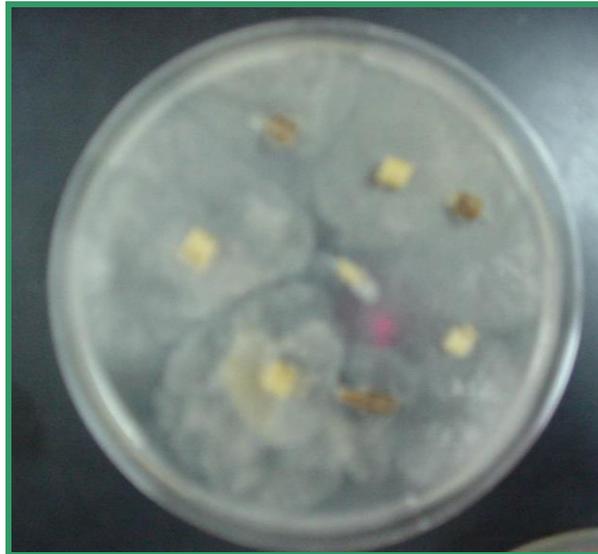
Anexo No. 8. Preparación de los Reactivos para las Pruebas de Campos Oscuro de Bennis para Determinar las Formas de las Bacterias.



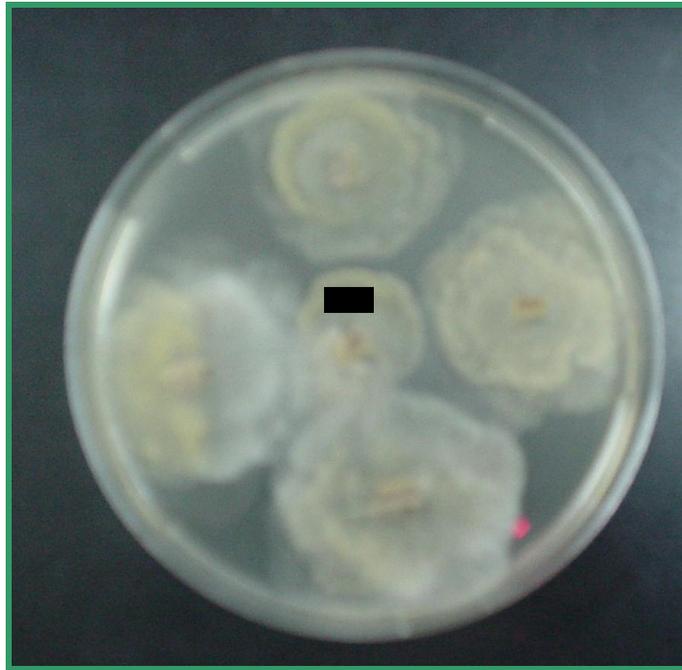
Anexo No.9. Preparación de los Reactivos para las Pruebas de Gram Rápida y Determinar si son Gram (-) o (+).



Anexo No.10. Medios Selectivos y Básicos para la Identificación de Bacterias Fitopatogenas.



Anexo No.11. Crecimiento de Hongos Fitopatógenos en Seudotallo en Platos Petri con Agar Nutritivo (AN).



Anexo No.12. Crecimiento de Hongos y Bacterias Fitopatógenos en Hojas en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



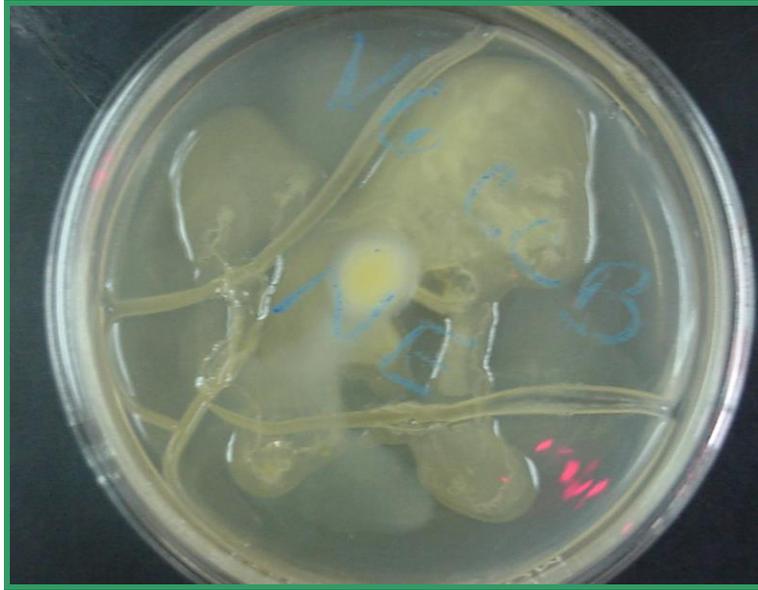
Anexo No.13.. Crecimiento de Hongos y Bacterias Fitopatógenas con Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



Anexo No. 14. Crecimiento Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



Anexo No.15. Crecimiento de Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



Anexo No.16. Reaislamiento de Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



Anexo No.17. Reaislamiento de Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



Anexo No.18. Purificación Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



Anexo No.19. Purificación Bacterias Fitopatógenas de Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



Anexo No.20. Crecimiento de Hongos y Bacterias Fitopatógenas con Semillas de Arroz en Platos Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA).



Anexo No.21. Prueba Ruy (KOH) para Determinar la Presencia de Bacterias Fitopatógenas.