



"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE DESARROLLO RURAL

Trabajo de Graduación

Evaluación *in vitro* de la eficacia de bactericidas sobre la
inhibición del crecimiento de *Burkholderia glumae*

AUTOR

Br. Roger Iván Moreira Centeno

TUTORES

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

MSc. Lic. Cristina Fuentes Castillo

Managua, Nicaragua

Julio 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE DESARROLLO RURAL

Trabajo de Graduación

**Evaluación *in vitro* de la eficacia de bactericidas sobre la
inhibición del crecimiento de *Burkholderia glumae***

AUTOR

Br. Roger Iván Moreira Centeno

TUTORES

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Lic.MSc. Cristina Fuentes Castillo

Tesis sometida a la consideración del Honorable Tribunal Examinador como
requisito parcial para optar al título de Licenciatura en Extensión Agraria

Managua, Nicaragua

Julio 2017

Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el Honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Desarrollo Rural como requisito parcial para optar al título profesional de:

Licenciado en Extensión Agraria

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Fidel Guzmán Guillén

Presidente

Lic.MSc. Isaías Sánchez Gómez

Secretario

Ing.MSc. Rosario Chavarría Sánchez

Vocal

Managua, Nicaragua, 25 de Julio 2017

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE CUADROS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE ANEXOS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo General.....	7
2.2. Objetivos Específicos.....	7
III. MATERIALES Y METODOS	8
3.1. Ubicación del ensayo.....	8
3.2. Metodología.....	8
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	17
4.1. Purificación de la bacteria	17
4.2. Efecto de los bactericidas sobre el crecimiento de <i>Burkholderia glumae</i>	17
V. CONCLUSIONES	26
VI. RECOMENDACIONES.....	27
VII. LITERATURA CITADA	28
VIII. ANEXOS	33

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de graduación primeramente a Dios Nuestro Señor, que nos da la vida, es la fuente de toda sabiduría y que es fuerza vital para todo ser humano que nos impulsa a ser mejores cada día, a mi esposa Claudia Melania por estar conmigo en aquellos momentos en el que el estudio y trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo; por darme evidencia de su gran amor al ser paciente y comprensiva en este largo camino al éxito. Gracias por llenar mi vida de cariño y por ser mi principal apoyo moral, por ser compañera y amiga; a mis hijos Wendy Scarleth y Gelder Iván que son mis dos grandes motivaciones para seguir superándome día a día.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento en primer lugar a Dios Nuestro Señor por haberme dado la vida, y con ella la oportunidad de emprender esta meta, por estar conmigo en cada paso que doy, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo mi periodo de estudio: a mis asesores Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz y Lic.MSc. Cristina Fuentes Castillo, hago extensiva mi gratitud a la Lic. Lorena Jarquín por su valioso apoyo, al Ing. Denis Hernández por su valiosa colaboración, al Dr. Arnulfo Monzón por su apoyo, a la Prof. Isabel Herrera por su apoyo, a la Lic. Ruth Velia Gómez por su valiosa colaboración y su incondicional amistad y a todas aquellas personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo para la conclusión de este estudio.

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1 Descripción de los bactericidas utilizados en el ensayo de eficacia biológica	11

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1 Semillas de arroz con síntomas causados por la bacteria <i>Burkholderia glumae</i> .	9
2 Procedimiento utilizado para llevar a cabo las diluciones en serie (Lehmann, 1987; Schröder, 1980)	10
3 Diferentes dosis de los bactericidas preparadas con agua destilada (A) y aplicadas a discos de papel filtro (B)	12
4 Discos de papel filtro impregnados con 10 ml de cada una de las diferentes dosis de los bactericidas (A) y puestos a secar en una cámara de flujo laminar (B)	13
5 Discos de papel filtro impregnados con las diferentes dosis de los bactericidas en medio de cultivo que contenía a la bacteria <i>B. glumae</i> con 48 horas de crecimiento	13
6 Procedimiento de medición de las áreas de inhibición.	15
7 Área de inhibición del crecimiento (mm) de <i>Burkholderia glumae</i> de tres concentraciones del bactericida Starner 20 WP y la concentración del bactericida Agrimycin 16.5 WP	19
8 Área de inhibición del crecimiento de <i>Burkholderia glumae</i> ejercido por el bactericida Starner 20 WP y el bactericida Agrimycin 16.5 WP a las 24 horas de exposición	20
9 Área de inhibición del crecimiento de <i>Burkholderia glumae</i> ejercido por el bactericida Starner 20 WP y el bactericida Agrimycin 16.5 WP a las 48 horas de exposición	21
10 Área de inhibición del crecimiento de <i>Burkholderia glumae</i> ejercido por el bactericida Starner 20 WP y el bactericida Agrimycin 16.5 WP a las 72 horas de exposición	22
11 Discos sumergidos en agua destilada estéril fueron colocados como testigo que no tuvieron ningún efecto inhibitorio en ninguno de los tiempos de exposición	23

12 Porcentaje de eficacia de cada una de las dosis de los dos bactericidas probados en el bioensayo

24

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1 Análisis de varianza del área de inhibición	33

RESUMEN

El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) ocupa el segundo lugar a nivel mundial, después del trigo (*Triticum aestivum*), en importancia económica y nutricional en la alimentación de los seres humanos. En Nicaragua, el cultivo de arroz representa una fuente importante de ingresos para los productores. Sin embargo este rubro se encuentra afectado por plagas y enfermedades que inciden fuertemente en los rendimientos. Una de las enfermedades más relevantes en el cultivo de arroz en Nicaragua es el añublo bacterial de la panícula causado por *Burkholderia glumae*. Por lo tanto, el objetivo principal de esta investigación fue el de generar información sobre el uso de bactericidas para el manejo de *B. glumae*. Para la realización de este trabajo de investigación se utilizó semilla de arroz de la variedad Palo 2, infectada por *B. glumae*. En las pruebas de eficacia biológica se utilizaron los bactericidas Starner 20 WP (ácido oxolínico) y Agrimycin 16.5 WP (sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina) aplicados en diferentes dosis y a diferentes tiempos de exposición. Los resultados de las pruebas *in vitro* indicaron que el bactericida Starner 20 WP en una dosis alta (1500 ppm) inhibió eficazmente el crecimiento radial de *B. glumae*, en los tres tiempos estudiados. En general, los tratamientos basados en dosis baja (500 ppm) y dosis comercial (1000 ppm) del bactericida Starner 20 WP tuvieron un comportamiento similar a la dosis comercial del bactericida de referencia (Agrimycin 16.5 WP). La dosis baja de Starner 20 WP presentó una inhibición radial de 5.61 mm a las 24 horas de exposición, 6.57 mm a las 48 horas y de 5.35 mm a las 72 horas. La dosis comercial presentó una inhibición radial de 5.49 mm a las 24 horas, de 7.37 mm a las 48 horas y de 5.12 mm a las 72 horas. Para la dosis alta se obtuvo una inhibición radial de 7.51 mm a las 24 horas, de 8.36 mm a las 48 horas y de 7.07 mm a las 72 horas. La mayor eficacia del bactericida Starner 20 WP se muestra en los valores obtenidos a las 48 horas de exposición en los tres tiempos estudiados.

Palabras claves: Control químico, antibióticos, *Burkholderia glumae*, bactericidas

ABSTRACT

The rice crop (*Oryza sativa* L.) ranks second worldwide after wheat (*Triticuma estivum*), due to its economic and nutritional importance in the human diet. In Nicaragua, rice cultivation represents an important source of income for producers. However this crop is affected by pests and diseases that strongly affect yields. One of the most important diseases in rice crop in Nicaragua is the bacterial panicle blight caused by *Burkholderia glumae*. Therefore, the main objective of this research was to generate information on the use of bactericides for *B. glumae* management. To carry out this research rice seed variety Palo 2 infected by *B. glumae* was used. In tests of biological effectiveness bactericides Starner 20 WP (oxolinic acid) Agrimycin and 16.5 WP (streptomycin sulfate oxytetracycline +) applied at different dosages and at different exposure times were used. The results of the in vitro tests indicated that the bactericidal Starner 20 WP at a high dose (1500 ppm) effectively inhibited the radial growth of *B. glumae* in the three times studied. Overall, treatments based on low doses of bactericidal and commercial Starner 20 WP had a similar radial efficacy according to low dose concentrations (500 ppm) and commercial dose (1000 ppm). The low dose of Starner 20 WP presented a 5.61 mm radial inhibition at 24 hours of exposure, 6.57 mm at 48 hours and 5.35 mm after 72 hours. It presented a commercial dose of 5.49 mm radial inhibition at 24 hours, 7.37 mm of 48 hours and 5.12 mm after 72 hours. For high dose inhibition radial 7.51 mm to 24 hours, at 48 8.36 mm 7.07 mm hours and at 72 hours it was obtained. The increased efficiency of bactericidal Starner 20 WP shown in the values obtained after 48 hours exposure in the three times studied.

Keywords: Chemical control, antibiotics, *Burkholderia glumae*, bactericides

I. INTRODUCCION

El arroz (*Oryza sativa* L.) es parte de la dieta alimenticia de la población lo cual representa un rubro de importancia estratégica. La producción está en manos de grandes productores quienes siembran bajo un sistema de riego por inundación y también pequeños y medianos productores que lo realizan bajo un sistema de riego por aspersión (Saavedra, 2012).

De acuerdo al censo agropecuario, el cultivo del arroz de riego por inundación se cultiva en un área total de 59,151 manzanas. Los departamentos donde se concentra la mayor producción bajo este sistema son: Matagalpa, Rivas, Granada y Río San Juan. El cultivo de arroz de secano, se cultiva en 23,518 fincas para un total de 40,719 manzanas en los departamentos de RACCN, Rivas, Chinandega, RACCS; entre otros. En total se puede considerar que más de 23,000 familias se dedican al cultivo del arroz en Nicaragua, lo que refleja un rubro de importancia para la economía familiar (Saavedra, 2012).

El cultivo del arroz en nuestro país representa una fuente importante de ingresos para los productores. Sin embargo este rubro se encuentra afectado por plagas y enfermedades que inciden fuertemente en los rendimientos (Saavedra, 2012). Su cultivo intensivo es afectado por numerosos factores bióticos, destacándose particularmente los agentes infecciosos, incluyendo virus, bacterias y hongos, así como plagas por diversas especies de artrópodos (Quesada, 2014).

Burkholderia glumae es un importante patógeno en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L), siendo el principal agente causal de la enfermedad denominada añublo bacterial de la panícula (Shahjahan *et al.*, 2000), enfermedad que produce graves mermas en la producción de este cereal. La enfermedad fue reportada por primera vez en el distrito de Kyushu en Japón (Goto & Ohata, 1956) y desde entonces, se ha reportado en importantes áreas productoras de arroz en Taiwán (Chien *et al.*, 1984), Colombia (Zeigler & Alvarez, 1989), Vietnam (Trung *et al.*, 1993), Sri Lanka, Malasia, Las Filipinas (Cottyn *et al.*, 1996), Nepal (Nieves, 1999), Korea (Jeong *et al.*, 2003), Estados Unidos en los estados de Louisiana, Arkansas y Texas, (Nandakumar *et al.*, 2005), Panamá (Nandakumar *et al.*, 2007), Indonesia, Tailandia, Tanzania (Zhu *et al.*, 2008), Cambodia (Cothier *et al.*, 2010),

Venezuela (González *et al.*, 2011). También ha sido registrada en Nicaragua, Costa Rica, Cuba y República Dominicana, provocando grandes pérdidas económicas anualmente en los países productores del grano, por lo que este problema infeccioso amerita un abordaje integral para evitar un impacto en la productividad nacional (Quesada, 2014).

El género *Burkholderia* es un importante componente de la comunidad microbiana, se reportan 30 especies que ocupan diferentes nichos ecológicos que se pueden presentar en el suelo, en el agua, en los animales y en los humanos. Este género es de amplia distribución y se registran especies patogénicas, las plantas, de uso en control biológico de hongos, en bioremediación y promotoras del desarrollo de plantas (Coenye & Vandamme, 2003).

A nivel agronómico son importantes las especies *B. cepacia* asociada a cebolla, *B. andropogonis* que infecta entre otros el sorgo y el maíz, *B. caryophylli* que se encuentra en clavel y *B. gladioli* que se encuentra asociado a gladiola y arroz, causando pudrición suave y necrosis severa en tejidos (Viallard *et al.*, 1998). El género *Burkholderia* fue establecido en 1992 (Yabuuchi *et al.*, 1992) y está conformado por especies previamente incluidas en el género *Pseudomonas*. Para el año 2009 habían sido reportadas 59 especies (Coenye, 2009).

La bacteria *Burkholderia glumae* (*Pseudomonas glumae* Kurita & Tabei 1967, *Burkholderia glumae* Urakami *et al.*, 1994.) se asocia al suelo, a la rizosfera y a la superficie de diversas plantas donde se considera epífita, sin provocar daño al hospedero, pero constituyendo un importante reservorio que puede dar origen a patologías bajo ciertas condiciones en numerosos cultivos (Goto y Ohata, 1956; Kurita y Tabei, 1967; Urakami *et al.*, 1994; Compant *et al.*, 2008). Además, esta especie es causante del marchitamiento en muchos cultivos de campo como tomate, chile, berenjena, papa, girasol (Uematsy *et al.*, 1976).

La semilla aparentemente sana puede llevar la bacteria sin mostrar síntomas de pudrición del grano. La razón por la que *Burkholderia* podría existir en semillas aparentemente sanas, es atribuida al número insuficiente de células bacterianas para causar los síntomas o a

condiciones ambientales desfavorables para que se desarrolle la enfermedad (Kurita & Tabei, 1967).

Actualmente en campos arroceros de nuestro país a nivel nacional se han reportado bacterias fitopatógenas tales como: *Xanthomonas axonopodis* pv. *oryzae*, *Burkholderia glumae* (Kurita & Tabei, 1967) Urakami et.al, 1994., *Erwinia chrysanthemi*. (Burkh.) Young et.al, 1978., *Pseudomonas* sp. (Migula, 1894), y hongos fitopatógenos como: *Helminthosporium oryzae*, *Rhizoctonia oryzae*, *Alternaria padwickii*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium moniliforme*, entre otros (Prado, 2010).

Aunque se sugirió que *B. glumae* era un componente más del complejo ácaro *Steneotarsonemus spinki* - hongo *Sarocladium oryzae* – bacteria (Prado, 2010) en Luisiana EE.UU en el año 2005 después de un monitoreo en todas las zonas productoras de arroz no se encontró el ácaro, pero el cultivo sí presentaba la enfermedad añublo bacterial de la panícula (Correa-Victoria, 2006).

Esta enfermedad se caracteriza en el arroz por la presencia de panículas café o decoloradas debido a un proceso de clorosis. Las ramas y panículas se mantienen verdes al inicio, sin lesiones ni presencia de decoloración, y las flores afectadas detienen el crecimiento o son abortadas por la planta. Las panículas afectadas pueden tener pocas o todas las flores enfermas (Yang, 2004). Los granos pueden mostrar diferentes grados de decoloración dependiendo de la intensidad de la infección (Zhou et al., 2011).

La sintomatología se ve solo al inicio de la floración produciéndose espiguillas vanas. Las características de esta enfermedad son la decoloración en la parte basal de la vaina, la cual rápidamente avanza, hasta afectar la totalidad de la misma (Nieves, 1999), presentando lesiones largas y verticales color grisáceo, rodeadas por un margen de color marrón rojizo oscuro (Nandakumar *et al.*, 2009).

Cuando la enfermedad es severa, las plantas permanecen erguidas y la panícula se mantiene vertical, debido a la ausencia de ganancia de peso en los granos (Yang, 2004; Sayler y

Yang, 2006). Así, el estado más crítico de la enfermedad se presenta en el momento que emerge la panícula y el efecto más claro es la esterilidad de los granos y su decoloración (Correa y Victoria, 2006).

Normalmente, los granos infectados se pueden observar de manera dispersa en la panícula, pero en casos severos, todos los granos pueden ser afectados (Ou, 1985). Hasta el momento no existe variedades resistentes a la enfermedad, pero existen variedades más susceptibles que otras (Correa, et al. 2007)

Burkholderia glumae es una bacteria que se transmite principalmente mediante semilla infectada, y es por medio de esta que se disemina a diferentes regiones, debido a la exportación e importación de semilla (Sayler et al., 2006). En Colombia la enfermedad fue observada por primera vez en 1989 en muestras de granos decolorados (Zeigler y Álvarez, 1989).

Los granos infectados muestran una banda café que atraviesa sobre el endospermo (Mogi, 1988). *Burkholderia glumae* invade las semillas germinadas, inhabilita las raíces y las vainas inferiores y de esta manera empieza a crecer sobre la planta como un organismo epífito. La sintomatología se presenta durante la floración, cuando la bacteria se multiplica activamente al invadir las espigas de la planta a través de los estomas o de pequeñas heridas en la epidermis de las glumas (Sayler et al., 2006; Zhou et al., 2011). Posteriormente, coloniza las espigas y se multiplica rápidamente utilizando los azúcares que son necesarios para el desarrollo del grano (Hikichi et al., 1994).

De hecho, la bacteria es más virulenta en panícula que en plántulas, debido probablemente a la mayor densidad bacteriana (Nandakumar et al., 2009). La bacteria se localiza en la parte basal del lodículo y al interior de la lema del grano de arroz (Tsushima, 2011), pudiendo sobrevivir dentro de la semilla hasta por tres años (Tsushima et al., 1989). Se ha reportado que la fitotoxina toxoflavina, la biogénesis flagelar, un sistema de secreción tipo III y la catalasa, son factores implicados en la virulencia de *Burkholderia glumae* en la pudrición de granos y plántulas de arroz (Ham et al., 2011; Jeong et al., 2003; Chen, 2011)

Se reportan varios factores de virulencia en *B. glumae*, entre ellos, la catalasa, la biogénesis flagelar, un sistema de secreción tipo III y una fitotoxina llamada toxoflavina (Ham et al., 2011); sin embargo, el principal mediador de daño es la toxoflavina, una toxina con propiedades físicas y químicas similares a la riboflavina y que se evidencia en las cepas productoras de la toxina por la pigmentación amarilla que produce en los medios de cultivo (Nandakumar et al., 2009).

Tsushima *et al.*, (1995), encontró una relación directa entre el índice de severidad en las panículas y la disminución del rendimiento del cultivo, sugiriendo que la aparición de panículas severamente afectadas una semana después del tiempo de espigamiento es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad.

Otro factor que favorece el desarrollo de la enfermedad es la fertilización con nitrógeno en niveles superiores a los recomendados para el cultivo (Tsushima, 2011; Groth & Hollier, 2011). Este patógeno a nivel mundial ha causado pérdidas desde un 18% hasta un 80%, siendo reportada en Japón, Estados Unidos, Panamá, Costa Rica y Colombia (Correa, 2005). Algunos autores han estimado que las disminuciones en la producción de arroz pueden oscilar entre el 15% y el 80% de la producción (Ham et al., 2011; Iwai et al., 2002; Rush et al., 2003; Shahjahan et al., 2000).

A partir de las siembras de arroz de verano del 2003 en Nicaragua se observaron afectaciones de vaneos las cuales fueron atribuidas a *Sarocladium*; sin embargo, en las siembras de invierno del mismo año se presentaron afectaciones más severas, las cuales provocaron una reducción en los rendimientos hasta de un 62.5% del rendimiento esperado (FONTAGRO, 2011).

En ese año se inició una campaña en la cual se realizaron rastreos y tomas de muestras efectuadas por el Centro Nacional de Diagnóstico Fitosanitario (CNDF) del MAGFOR, estos determinaron la presencia de un ácaro del género *Steneotarsonemus*, sin precisar la especie del mismo. El MAGFOR-INTA, en coordinación con organizaciones arroceras y un

especialista cubano, lograron identificar el estatus fitosanitario del ácaro, ratificándose así la presencia del ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley en las cuatro zonas arroceras del centro de Nicaragua (FONTAGRO, 2011).

El ácido oxolínico (Starner) ha demostrado ser hasta el momento el producto más efectivo para inhibir el crecimiento y reducir la población de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz (Rush et al., 2000). El ácido oxolínico aplicado en la etapa de máximo embuchamiento disminuye la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) de la bacteria *Burkholderia glumae* por la inhibición de la enzima ADN-girasa bacteriana Topoisomerasa II, la cual evita el enrollamiento excesivo de las dos bandas cuando se separan antes de sus replicaciones una condición importante para que el tratamiento sea efectivo es la homogeneidad de las plantas de arroz presentes en el lote. Actualmente el mejor control reportado, es el uso de bactericidas con base en quinolonas de primera generación aplicados en el tratamiento de semillas y en máximo embuchamiento (Hikichi, et al, 1994).

Según la literatura consultada, referente a este patógeno y en base a la experiencia que han tenido los países que actualmente están manejando esta enfermedad, *B. glumae* es un patógeno completamente atípico y variable en su comportamiento condicionado por los factores climáticos, lo que dificulta poder diagnosticar y determinar con exactitud el manejo y control de la enfermedad (Prado, 2010).

El presente estudio se plantea como objetivo fundamental generar información sobre la eficacia de dos bactericidas (Agrimycin 16.5 WP y Starner 20 WP) sobre las poblaciones bacterianas de *B. glumae* bajo condiciones de laboratorio. Los resultados de este estudio podrían dar una pauta sobre el uso correcto y oportuno de estos bactericidas bajo condiciones de campo para el manejo de esta enfermedad bacteriana importante en el cultivo de arroz.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Generar información sobre la eficacia biológica de bactericidas para el manejo de *Burkholderia glumae*, agente causal de la enfermedad conocida como añublo bacteriano de la panícula del arroz bajo condiciones “*in vitro*”.

2.2. Objetivos Específicos

- i) Determinar el efecto de tres dosis del bactericida Starner 20 WP y una dosis del bactericida Agrimycin 16.5 WP sobre el crecimiento de *Burkholderia glumae* mediante pruebas “*in vitro*”.
- ii) Comparar la eficacia biológica de tres dosis de Starner 20 WP con la del bactericida de referencia Agrimycin 16.5 WP aplicado en dosis comercial.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación del ensayo

El ensayo de eficacia biológica del bactericida Starner 20 WP se realizó de Septiembre a Octubre del año 2015 en la Sección de Bacteriología, del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Calidad de Semillas (LNDFCS) ubicado en el Km 12.½ c. Sur, 2 Km al Noroeste, comarca San José de la Cañada, Managua, perteneciente al Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA), cuyas coordenadas son 12°04'49.4" Latitud Norte y 86°20'04.8" Longitud Oeste.

Esta investigación es de tipo experimental cuantitativa y descriptiva en la cual se sometieron a prueba dos bactericidas para examinar su efectividad en la reducción del crecimiento de la bacteria fitopatógena *B. glumae* bajo condiciones controladas.

3.2. Metodología

El material utilizado para este ensayo correspondió a semillas de arroz granza, infectadas por *B. glumae*, de la variedad Palo 2, procedente de la finca Altamira, ubicada en la comunidad de Tecolostote, departamento de Boaco, donde se observaron plantaciones de arroz con la sintomatología típica de la enfermedad como es: decoloración, vaneo de las semillas, base de la semilla color chocolate, granos pico de pájaro y raquis verde (Figura 1).

La identificación de la bacteria a nivel de género y especie fue llevada a cabo a través de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana (UCA). Esta semilla fue usada para la obtención de cultivos puros y multiplicación de la bacteria en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Calidad de Semilla (LNDFCS) del Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA).



Figura 1. Semillas de arroz con síntomas causados por la bacteria *Burkholderia glumae* y con las cuales se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.2.1. Aislamiento y multiplicación de la bacteria

Se seleccionaron veinticinco semillas (granza) que presentaron la sintomatología típica de la enfermedad. Se procedió a realizar la desinfección de las semillas seleccionadas aplicando una solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 1% con un tiempo de exposición de 2 minutos, posteriormente se aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril con un tiempo de exposición de 3 minutos para cada enjuague. Las semillas una vez desinfectadas se colocaron sobre un papel toalla, para someterlas a un proceso de secado a temperatura ambiente por un periodo de 2 horas. Todo este proceso se realizó en condiciones de un flujo laminar aséptico (Lehmann, 1987).

Concluido el proceso de secado de las semillas, se suspendieron cinco semillas en 5 ml de agua destilada estéril contenida en tubos de ensayo, para un total de cinco suspensiones (suspensiones madre), posteriormente se procedió a homogenizar cada suspensión con ayuda de un agitador tipo Vortex (Lehmann, 1987).

Cada tubo de ensayo con su respectiva suspensión madre se dejó en reposo por un período de 24 horas en condiciones de flujo laminar (Prado, 2010). Finalizado el tiempo de reposo de las suspensiones madres, se realizaron las diluciones en serie, de las que se consideraron cuatro concentraciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) para cada suspensión.

Se prepararon cuatro tubos conteniendo 4.5 ml de agua destilada estéril y se rotularon con la concentración de la dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), para cada suspensión madre (Lehmann, 1987).

Se tomaron de la suspensión madre 0.5 ml con una pipeta estéril y se transfirieron al tubo (1) rotulado con la concentración 10^{-1} , se aplicó vortex por 5 segundos, luego con otra pipeta estéril, se tomaron 0.5 ml de la solución del tubo 1 y se transfirieron al tubo 2 rotulado con la concentración 10^{-2} , se aplicó este procedimiento para los otros dos tubos restantes de la serie. Este procedimiento se aplicó a cada suspensión madre (Lehmann, 1987) (Figura 2).

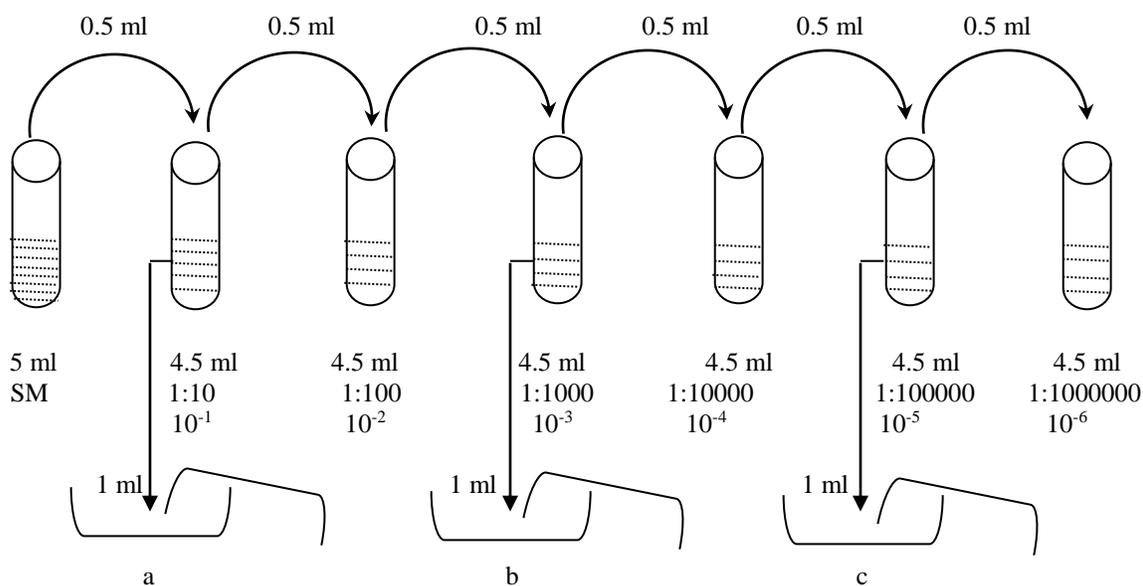


Figura 2. Procedimiento utilizado para llevar a cabo las diluciones en serie (Lehmann, 1987; Schröder, 1980).

Obtenidas todas las concentraciones de las diluciones en serie, se realizaron rayados continuos con ayuda de un asa bacteriológica de cada una de las concentraciones, en el medio de cultivo de crecimiento general, Agar Nutriente (agua destilada: 1000 ml; Extracto de carne 1 g; extracto de levadura: 2 g; Bacto Peptona: 5 g; NaCl: 5 g; Agar Agar: 15 g) y en el medio de cultivo King B (agua destilada: 1000 ml; Proteosa Peptona: 20 g; Glicerina: 10 ml; K_2HPO_4 : 1.5 g y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1.5 g), medio específico para el crecimiento y aislamiento de la bacteria *Burkholderia glumae* (Schaad, 1988).

Los rayados de las diferentes diluciones (inoculaciones) se incubaron por un período de 48 horas a 28⁰C., condiciones de tiempo y temperatura óptimas para el crecimiento de la bacteria (Schaad, 1988).

Concluido el período de incubación se procedió a la observación de los crecimientos bacterianos con ayuda del estereoscopio, se seleccionaron las colonias que presentaron las siguientes características: colonias de color blanco cremosa, redondas y de crecimientos irregulares, propios de la bacteria en estudio (Lehmann, 1987).

Posteriormente se realizaron un total de 10 reaslamientos de la bacteria en medio King B, de las colonias seleccionadas hasta que se obtuvieron colonias puras, una vez purificada se incubó por un período de 48 horas a 28⁰ C, para su multiplicación. Una vez cumplido este período, los platos Petri con la bacteria fueron conservados a 4⁰C (en refrigeración) hasta su utilización (Lehmann, 1987).

3.2.2. Evaluación de eficacia biológica de los bactericidas

En el estudio de eficacia biológica se incluyeron los bactericidas Starner 20 WP (ácido oxolínico) y Agrimycin 16.5 WP (sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina). Se utilizó un diseño completo al azar (DCA), con cinco tratamientos y cuatro repeticiones, para un total de 20 unidades experimentales conformadas por platos Petri con medio de cultivo King B (Correa,2006). Los tratamientos se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de los bactericidas utilizados en el ensayo de eficacia biológica.

Tratamientos	Productos	Concentración (ppm)
1) Dosis Baja (DB)	Starner 20 WP	500
2) Dosis Comercial (DC)	Starner 20 WP	1000
3) Dosis Alta (DA)	Starner 20 WP	1500
4) Dosis Comercial (DC)	Agrimycin 16.5 WP	1500
5) Agua	Testigo absoluto	Agua destilada estéril

a) Preparación de los tratamientos

Las dosis ensayadas en este estudio se determinaron a partir de los resultados de eficacia biológica obtenidos por Correa (2006). A cada tratamiento se le tomó peso de acuerdo a la concentración indicada en el Cuadro 1 y luego fue depositado en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 1000 ml de agua destilada estéril (Figura 3A). Preparados los tratamientos, estos fueron homogenizados con ayuda de un agitador tipo Vortex. Para verificar la eficacia de los bactericidas se utilizó la técnica de difusión, la cual consistió en impregnar discos de papel filtro estéril de un centímetro de diámetro, los cuales se depositaron en cajas Petri estériles y se rotularon con el nombre y dosis de cada uno de los tratamientos (en total se prepararon 16 discos por tratamiento) (Figura 3B).

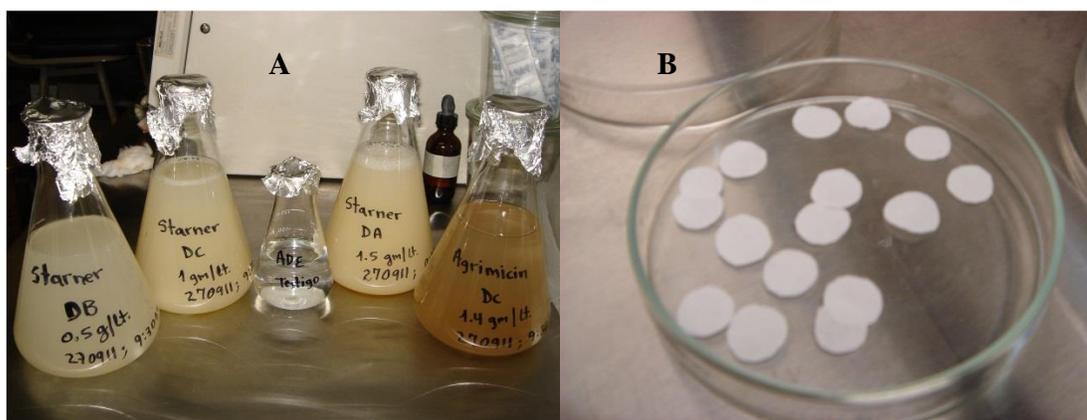


Figura 3. Las diferentes dosis de los bactericidas fueron preparadas en matraces de Enlenmeyer con agua destilada (A) y luego aplicadas a discos de papel filtro (B).

Se preparó un volumen de 500 mL de cada concentración del tratamiento, en cada caja Petri estéril conteniendo los discos de papel filtro estéril se depositaron 10 ml de las dosis de los bactericidas (Figura 4A). Luego se garantizó la cobertura total del producto en los discos, el que fue distribuido homogéneamente con ayuda de una pinza esterilizada. Los discos fueron expuestos a las diferentes dosis de los bactericidas por un período de 15 minutos. Una vez concluido el tiempo de exposición de los discos, se decantó el exceso de líquido que contenía las dosis de los bactericidas y se dejaron secar a temperatura ambiente dentro de una cámara de flujo laminar durante 5 minutos (Lehmann, 1987) (Figura 4B).

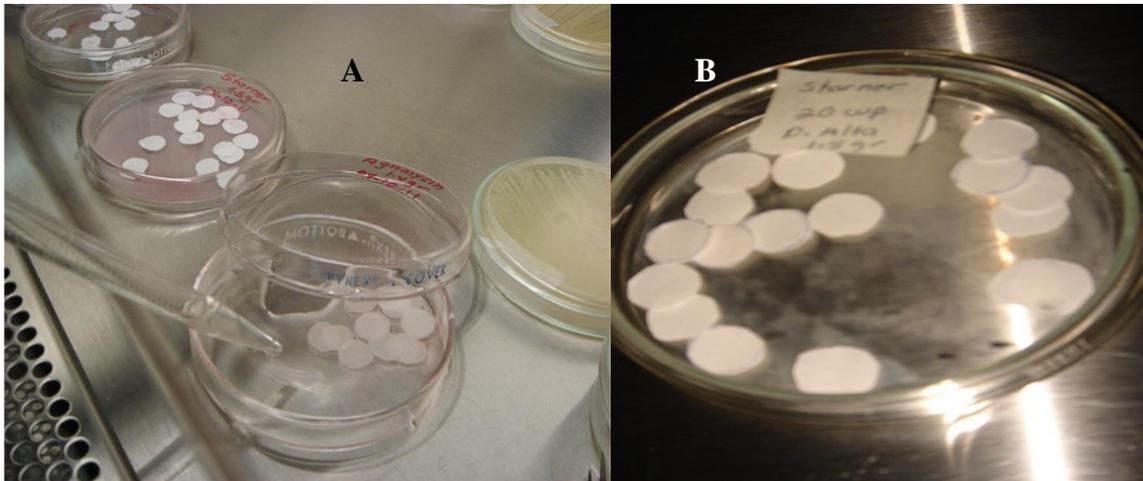


Figura 4. En cada plato Petri que contenía los discos de papel filtro se depositaron 10 ml de cada una de las diferentes dosis de los bactericidas para que se impregnaran (A) y después de 15 minutos de exposición se pusieron a secar en una cámara de flujo laminar (B).

b) Aplicación de los Tratamientos

Una vez finalizado el tiempo de secado de los discos se procedió a la aplicación de los tratamientos, en el crecimiento bacteriano preparado con diferentes tiempos de exposición. Inicialmente los tratamientos fueron aplicados en el crecimiento bacteriano con 48 horas de incubación a 28⁰C. La aplicación consistió en colocar cuatro discos de papel impregnado con el producto en cada plato Petri con crecimiento bacteriano (Correa, 2006) (Figura 5).

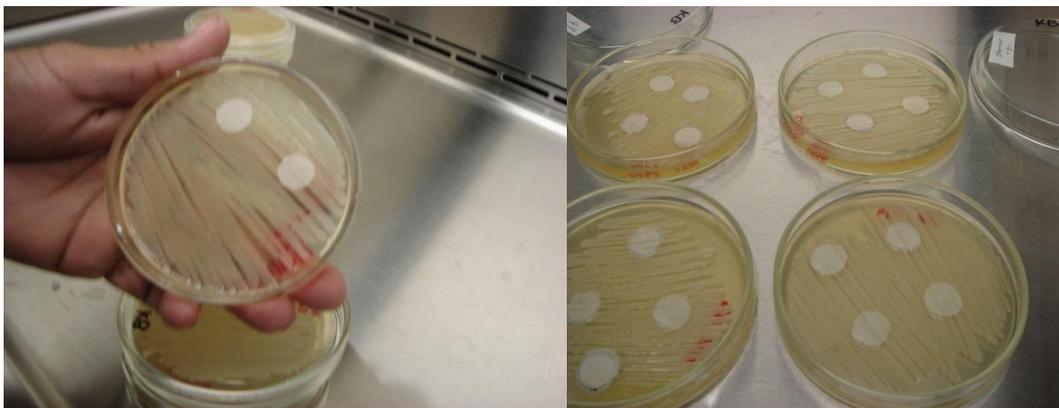


Figura 5. Se colocaron cuatro discos de papel filtro impregnados con las diferentes dosis de los bactericidas en medio de cultivo que contenía a la bacteria *B. glumae* con 48 horas de crecimiento.

Posteriormente se realizaron dos aplicaciones adicionales de los diferentes tratamientos. Uno con crecimiento bacteriano de 48 horas y otro con crecimiento bacteriano de 72 horas a 28°C (Correa, 2006).

Después de haberse llevado a cabo la aplicación de todos los tratamientos en los diferentes períodos de crecimiento bacteriano (24 horas, 48 horas y 72 horas), no se observó ningún efecto de control en los mismos, lo que ameritó la implementación de cambios en los procedimientos, para lo cual se utilizó la prueba de difusión en disco sugerida por Jorgensen y Ferraro (2009).

Se procedió a la aplicación de los tratamientos al momento de la inoculación de la bacteria (con la ayuda de un ansa bacteriológica, aplicando rayado continuo y por saturación de la superficie del medio), en medio de cultivo King B, se aplicaron cuatro discos por plato y se utilizaron cuatro platos por tratamiento, lo que significa que por tratamiento se aplicaron dieciséis discos. A cada disco se le asignó un número de identificación (del 1 al 4) y a cada plato se le asignó un número de identificación (del 1 al 4). Por tanto para llevar la secuencia de las mediciones se identificaron los datos de la siguiente manera: Plato 1: D1, D2, D3, D4; de igual manera para los otros platos.

3.3. Variables evaluadas

- a) Área de inhibición (mm/h), del crecimiento bacteriano a las 24, 48 y 72 horas.
- b) Eficacia expresada en porcentajes, de los bactericidas.

Las observaciones se realizaron con la ayuda de un estereoscopio. Para la toma de datos se diseñó en Excel, una tabla que reflejó el comportamiento de los tratamientos en la población bacteriana con respecto al tiempo de exposición, expresadas en milímetros (mm). Con la ayuda una regla milimetrada se realizó las mediciones del área de inhibición alrededor de los discos impregnados con el producto evaluado.

Para la realización de las mediciones se consideraron como criterio de medición cuatro puntos en forma de cruz, del disco hacia las líneas de inhibición (dos puntos partiendo del disco hacia la colonia más cercana al mismo y dos puntos partiendo del disco hacia las colonias más alejadas del mismo). Este procedimiento se realizó en las tres lecturas con cada tiempo de exposición (24 horas, 48 horas y 72 horas), (Figura 6).

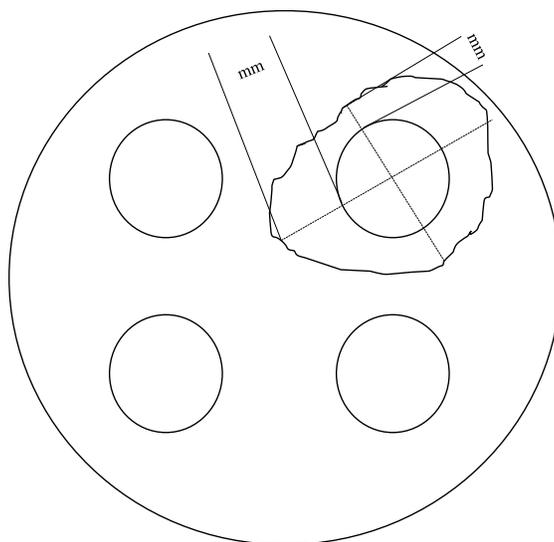


Figura 6. Procedimiento de medición de las áreas de inhibición, en el cual los círculos representan los discos impregnados con los bactericidas probados y el área irregular alrededor del círculo representa el área de inhibición.

La eficacia de los productos bactericidas se evaluó con la siguiente fórmula propuesta por López-Cardona y Castaño-Zapata (2011):

$$E = \frac{RDI_{Tto}}{RDI_{Máx}} \times 100\%$$

Donde:

E = Porcentaje (%) de eficacia del producto

RDI_{Tto} = Rango de inhibición obtenido del tratamiento

$RDI_{Máx}$ = Máximo rango de inhibición obtenido del mejor tratamiento.

3.4. Análisis de datos

Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza para las variables en estudio: concentraciones de los bactericidas y áreas de inhibición del crecimiento bacteriano. Se realizaron pruebas de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Infostat (2008).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Purificación de la bacteria

La obtención de cultivos bacterianos puros se logró mediante la utilización de diluciones seriadas e inoculación en medios de cultivo, incubados a 28°C. Los resultados obtenidos en la multiplicación de *B. glumae* en el medio de cultivo King B mostró que la mayor multiplicación se logró al incubar la bacteria por 48 horas a 28°C.

En campo, la temperatura óptima de crecimiento de *Burkholderia glumae* es relativamente alta (30-35°C), lo cual explica los reportes que indican que la temperatura alta, especialmente la temperatura nocturna, durante el estado crítico, favorece el desarrollo de la epidemia de añublo bacteriano de la panícula (Tsushima, *et al.*, 1985; Tsushima *et al.*, 1996; Shahjahan *et al.*, 2000; Nandakumar *et al.*, 2009). No obstante, Tsushima, *et al.*, (1996) obtuvieron alto porcentaje de espiguillas enfermas (>50%), en inoculaciones realizadas bajo condiciones de invernadero a 28°C.

Burkholderia glumae pertenece al phylum β -Proteobacteria, posee un metabolismo oxidativo, tiene forma de bastón, es móvil, Gram negativa, aeróbica, no fluorescente, con un tamaño de 0.5 a 0.7 μm x 1.5 – 2.5 μm . tiene de uno a tres flagelos polares, se desarrolla a temperatura ambiente (mesófilo) (Ou, 1985), comúnmente viven en el suelo (Schaad *et al.*, 2001). Sus colonias son de color blanco en medio Nutritivo de Agar, no fluorescente en el medio King B. En medios nutritivos como el medio Selectivo PG (S-PG) produce colonias circulares convexas con márgenes uniformes las cuales son de color rojo-café o son opalescentes con un centro purpura-rojo. Las colonias se pueden obtener en medio Agar ácido de Casamino Peptona Glucosa (CPG) a temperatura de 28°C, al igual que en Agar de Triphenyl Tetrazolium Chloride (TZC) (Correa, 2009).

4.2. Efecto de los bactericidas sobre el crecimiento de *Burkholderia glumae*

El efecto de los bactericidas se estimó a través del área de inhibición del crecimiento bacteriano que ejercieron las diferentes dosis probadas. Los resultados obtenidos se describen de acuerdo a los tiempos de exposición y a las concentraciones ensayadas de cada uno de los bactericidas.

El análisis de varianza demostró que había diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$; $\alpha = 0.05$) en dependencia de las dosis aplicadas. El bactericida que alcanzó la mayor área de inhibición de crecimiento bacteriano fue Starner en dosis alta (DA) y su valor promedio fue de 7.65 mm y el tratamiento que tuvo el menor valor promedio de inhibición (3.67 mm) fue el bactericida Agrimycin aplicado a la dosis comercial (DC). Las dosis de Starner a dosis comercial (DC) y dosis baja (DB) tuvieron valores promedios de inhibición de 5.99 mm y 5.84 mm respectivamente. Entre estos dos últimos tratamientos no hubo diferencias significativas (Figura 7).

En Nicaragua, este es el primer reporte del uso de los bactericidas Starner 20 WP (ácido oxolínico) y Agrimycin 16.5 WP (sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina) en pruebas “*in vitro*” para probar su utilidad como posibles inhibidores del crecimiento de la bacteria *B. glumae* bajo condiciones controladas. El ácido oxolínico es un antimicrobiano perteneciente al grupo de las Quinolonas, cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de ADN en bacterias Gram Negativas (Stockwell y Duffy, 2012). El ácido oxolínico ha sido probado en la agricultura para el control de bacterias tales como *Erwinia amylovora*, *Burkholderia glumae* y *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* con muy buenos resultados a nivel de campo (Maeda et al., 2007).

Con respecto a los tiempos de exposición el ANDEVA también detectó diferencias significativas ($p = < 0.0001$; $\alpha = 0.05$). El tiempo de exposición donde se obtuvo el mayor halo de inhibición del crecimiento bacteriano fue en el de 48 horas (6.51 mm) y se diferenció significativamente de los otros dos tiempos de exposición en los cuales se obtuvieron halos de inhibición de 5.31 para el tiempo de exposición de 72 horas y 5.54 mm para el tiempo de exposición de 24 horas. Entre estos dos últimos tiempos de exposición no hubo diferencias significativas (Anexo 1).

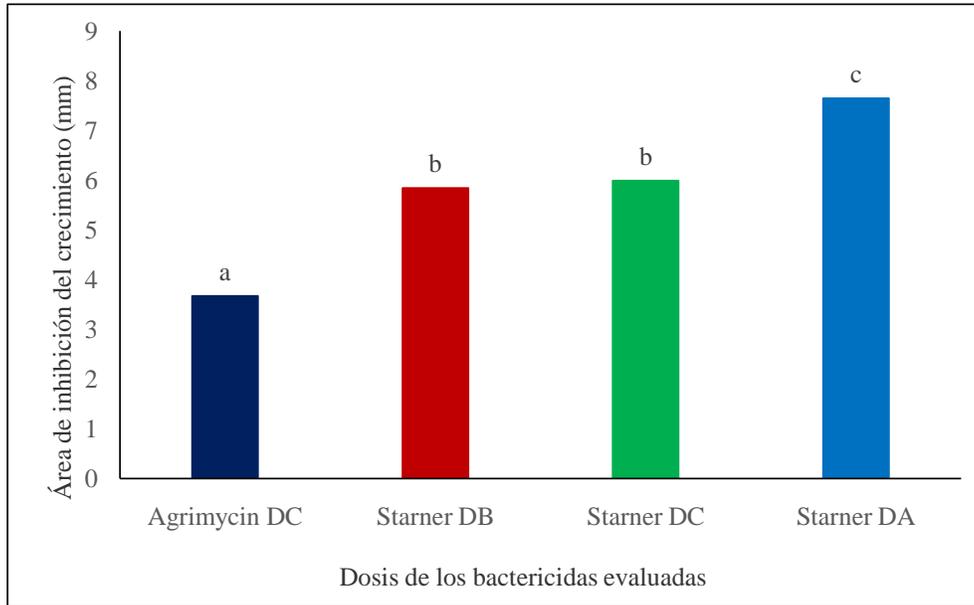


Figura 7. Área de inhibición del crecimiento (mm) de *Burkholderia glumae* observada bajo tres concentraciones del bactericida Starner 20 WP: dosis baja (DB) – 500 ppm, dosis comercial (DC) – 1000 ppm y dosis alta (DA) – 1500 ppm; y el bactericida Agrimycin 16.5 WP aplicado a la dosis comercial – 1500 ppm.

El análisis de varianza y la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) detectó diferencias significativas en la interacción entre los tratamientos y el tiempo de exposición ($p = 0.0037$; Anexo 1). A las 24 horas de exposición, el área de inhibición más bajo se obtuvo con el bactericida Agrimycin en dosis comercial (DC, 3.56 mm), seguido de Starner en dosis comercial (DC, 5.49 mm) y Starner en dosis baja (DB, 5.61 mm). La mayor área de inhibición se obtuvo con Starner en dosis alta (DA), con la cual se observó que el crecimiento de la bacteria fue inhibido en un radio de 7.51 mm (Figura 8).

De acuerdo a los resultados obtenidos se analizó el comportamiento de las distintas concentraciones utilizadas en este ensayo tomando como datos de referencia los valores obtenidos del Agrimycin 16,5 WP y contraponiéndolos con los valores de cada concentración del Starner 20 WP. El área de inhibición del crecimiento de *B. glumae* obtenida con el bactericida Agrimycin 16.5 WP (DC) fue superada por todas las concentraciones del bactericida Starner 20 WP en un rango que osciló entre 1.93 mm (Starner DC) y 3.95 mm (Starner DA) en el tiempo de exposición de 24 horas (Figura 8).

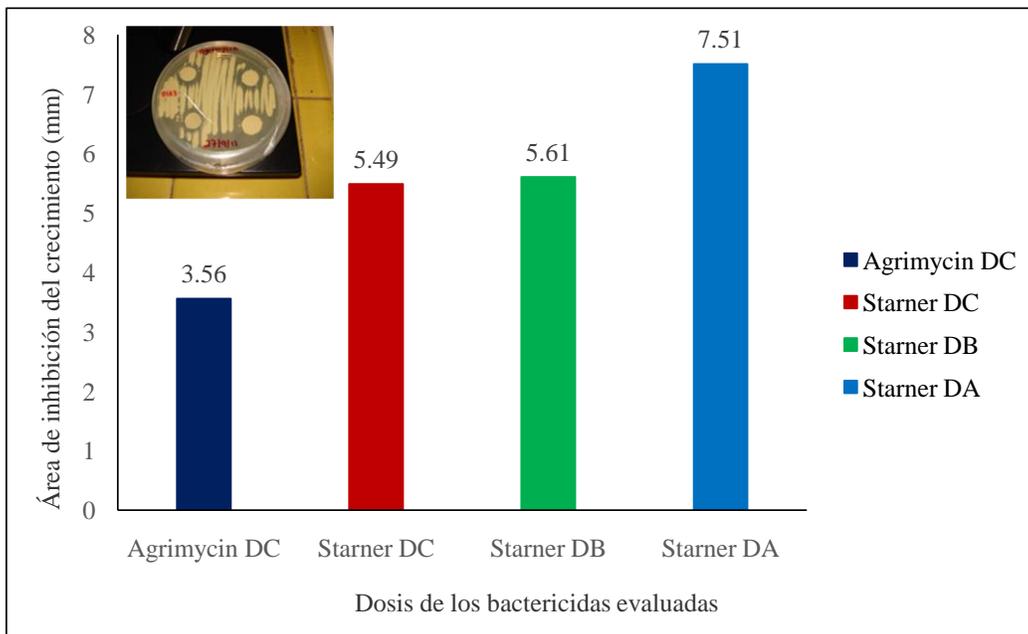


Figura 8. Área de inhibición del crecimiento de *Burkholderia glumae* ejercido por el bactericida Starner 20 WP en concentraciones de 500 ppm (DB), 1000 ppm (DC) y 1500 ppm (DA) y del bactericida Agrimycin en dosis comercial (DC) a las 24 horas de exposición.

A las 48 horas de exposición, el área de inhibición más bajo se obtuvo con el bactericida Agrimycin en dosis comercial (DC, 3.74 mm), seguido de Starner en dosis baja (DB, 6.57 mm) y Starner en dosis comercial (DC, 7.37 mm). La mayor área de inhibición se obtuvo con Starner en dosis alta (DA), con la cual se observó que el crecimiento de la bacteria fue inhibido en un radio de 8.36 mm (Figura 9).

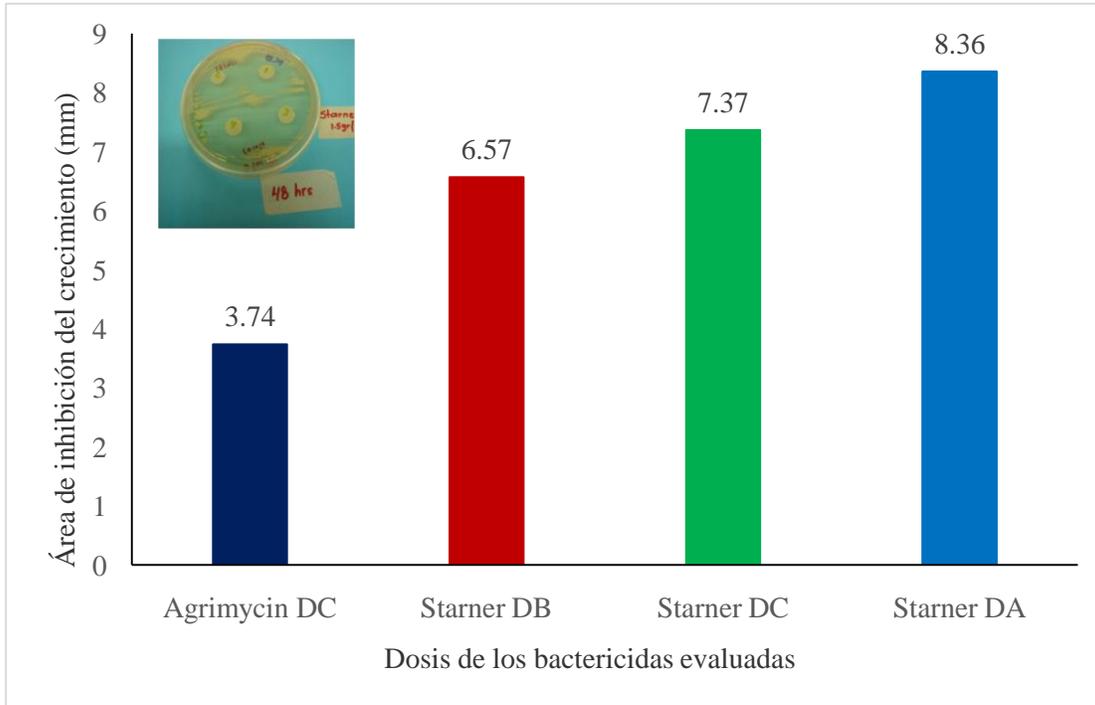


Figura 9. Área de inhibición del crecimiento de *Burkholderia glumae* ejercido por el bactericida Starner 20 WP en concentraciones de 500 ppm (DB), 1000 ppm (DC) y 1500 ppm (DA) y del bactericida Agrimycin en dosis comercial (DC) a las 48 horas de exposición.

A las 48 horas de exposición, todas las concentraciones del bactericida Starner 20 WP superaron el área de inhibición obtenido con el bactericida de referencia Agrimycin 16.5 WP en rango que osciló entre 6.57 mm (Starner DB) y 8.36 mm (Starner DA), lo que confirma que el bactericida Starner 20 WP es más efectivo que el Agrimycin para inhibir el crecimiento “*in vitro*” de la bacteria *B. glumae* (Figura 9).

A las 72 horas de exposición, el área de inhibición más bajo se obtuvo con el bactericida Agrimycin en dosis comercial (DC, 3.72 mm), seguido de Starner en dosis comercial (DC, 5.12mm) y Starner en dosis baja (DB, 5.35 mm). La mayor área de inhibición se obtuvo con Starner en dosis alta (DA), con la cual se observó que el crecimiento de la bacteria fue inhibido en un radio de 7.07 mm (Figura 10).

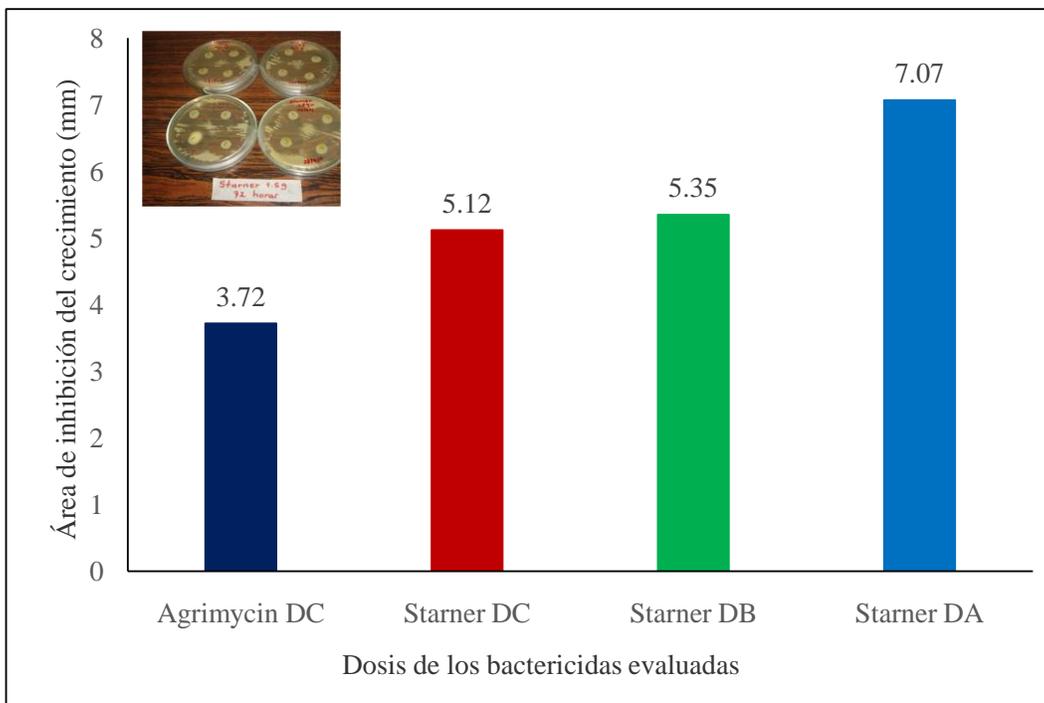


Figura 10. Área de inhibición del crecimiento de *Burkholderia glumae* ejercido por el bactericida Starner 20 WP en concentraciones de 500 ppm (DB), 1000 ppm (DC) y 1500 ppm (DA) y del bactericida Agrimycin en dosis comercial (DC) a las 72 horas de exposición.

De manera general, el bactericida de referencia, Agrimycin 16.5 WP tuvo un comportamiento casi similar durante los tres tiempos de exposición en lo que se refiere al área de inhibición del crecimiento de la bacteria *B. glumae* y tuvo un rango que osciló entre 3.56 mm y 3.74 mm. Sin embargo, en el caso del bactericida Starner 20 WP, los rangos del área de inhibición fueron mayores a las 48 horas de exposición (6.57 mm – 8.36 mm) y tuvieron una tendencia a la disminución a las 72 horas (5.12 mm – 7.07 mm) e incluso fueron menores que los rangos de inhibición observados a las 24 horas de exposición (5.49 mm – 7.51 mm). Esto confirma que Starner 20 WP (ácido oxolínico) es un bactericida de contacto, cuya efectividad tiende a disminuir a medida que transcurre el tiempo de exposición.

En el caso del testigo utilizado en este estudio, no se observó ningún diámetro radial de inhibición durante todos los tiempos evaluados, conservando el mismo comportamiento al final del mismo, como se observó a las 72 horas (Figura 11).



Figura 11. Los discos sumergidos en agua destilada estéril, los cuales fueron colocados en los platos Petri que sirvieron como testigo no tuvieron ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento de la bacteria en ninguno de los tiempos de exposición.

4.3. Eficacia biológica del bactericida Starner 20 WP

La eficacia del bactericida Starner 20 WP se evaluó de acuerdo a las distintas concentraciones ensayadas (500 ppm, 1000 ppm y 1500 ppm), se obtuvieron los siguientes porcentajes: para la concentración de 500 ppm, la eficacia fue del 70%, para la concentración de 1000 ppm, la eficacia fue del 72% y para la concentración de 1500 ppm, la eficacia fue del 92%. Para el bactericida de referencia Agrimycin 16.5 WP con una concentración de 1500 ppm, la eficacia fue del 44% (Figura 12).

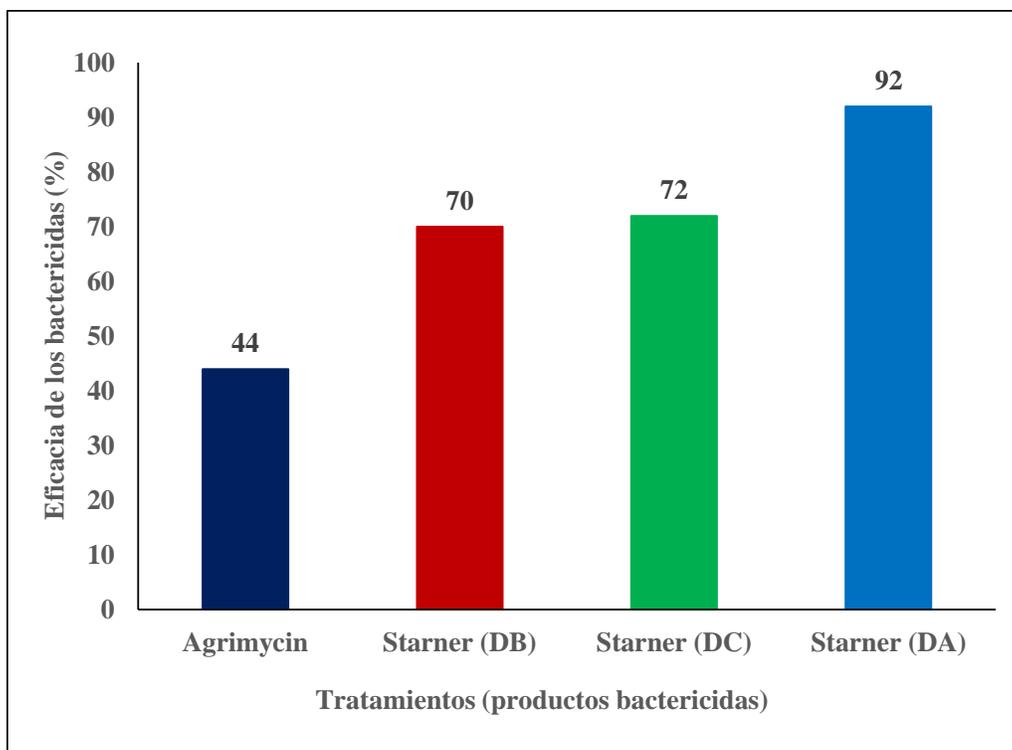


Figura 12. Porcentaje de eficacia de cada una de las dosis de los dos bactericidas probados en el bioensayo.

En estudios de eficacia biológica desarrolladas “*in vitro*” usando diferentes productos comerciales (Starner, Cumber WP, Kasumin 2%, Validacin, Biolto, Phytol 27, Agrimycin, Kilol J DF-100 y Busan) para el control de la bacteria *Burkholderia glumae* realizados en el Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia, de los productos evaluados a nivel de laboratorio el Starner resultó más efectivo para el control de *B. glumae* (Correa, 2006).

En Panamá, en dos años de estudio se observó que al tratar la semilla de arroz con los productos mencionados anteriormente se obtuvieron mayores rendimientos y menos manchado de grano con los productos Starner, Busan 30 y Phytol 24. En este mismo estudio, en cuanto a la oportunidad de aplicación, se observó que la mejor respuesta se obtuvo cuando los productos se aplicaron en la fase de desarrollo del cultivo conocida como “máximo embuchamiento”. Las mezclas de los productos estudiados, podrían presentar ventajas significativas ante la utilización de los productos por separado (Fontagro, 2011).

En pruebas *in vitro* y bajo condiciones controladas de invernadero, el ácido oxolínico y la mezcla de oxiclورو de cobre + mancozeb, fueron los productos que mejor funcionaron para el control de esta bacteria. La mezcla de estos dos productos debe evaluarse en condiciones de campo para determinar su efectividad (Prado, 2010).

Por otro lado y para disminuir el riesgo de resistencia de la bacteria a estos productos, se recomienda hacer tratamientos a la semilla para disminuir la cantidad de inóculo en semillas infectadas naturalmente, pues se ha observado en evaluaciones de laboratorio que la semilla inoculada con diferentes concentraciones de la bacteria pierden completamente su viabilidad (Prado, 2010). El tratamiento químico de la semilla no representa una técnica útil para el control de la enfermedad en el cultivo, representa una opción para disminuir la presión de inóculo, evitando de esta manera una mayor contaminación de los lotes de producción y diseminación de la enfermedad mediante el intercambio de semilla contaminada (Prado, 2010).

La enfermedad ocasionada por *B. glumae*, es un problema recurrente en áreas productoras de arroz, y es particularmente importante en otros países como Japón, Tailandia, Vietnam, Korea del Sur, Malasia, Filipinas, Sri Lanka y otras naciones del sureste asiático. También ha sido registrada en América en Estados Unidos, Panamá, Nicaragua, Costa Rica y Colombia, lo cual sumado a que la enfermedad se ha vuelto más prevalente en los años recientes, las pérdidas económicas ocasionadas, y la carencia de métodos efectivos de control y variedades de arroz resistentes, ha generado gran interés en este patógeno a nivel mundial (Zhu et al., 2008; Devescovi et al., 2007; Lim et al., 2009; Nandakumar et al., 2007; Ham et al., 2011).

En Nicaragua, en los últimos quince años las enfermedades bacterianas han aumentado en el cultivo del arroz, ocasionando bajos rendimientos, debido al vaneo y manchado de la panícula. Según estudios realizados por FEDEARROZ estos han logrado determinar la presencia de un complejo de bacterias entre ellas la presencia de *Burkholderia glumae* que es uno de los principales patógenos que actualmente se encuentra asociado a los síntomas observados en el cultivo (Saavedra, 2012).

V. CONCLUSIONES

- El bactericida Starner 20 WP (ácido oxolínico) indujo mayores área de inhibición del crecimiento de *B. glumae* en los tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas) y en las tres dosis probadas (dosis comercial, dosis baja y dosis alta) en comparación con el bactericida de referencia, Agrimycin (sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina) que fue usado de acuerdo a la dosis comercial recomendada por el fabricante.
- El ensayo de eficacia biológica demostró que el bactericida Starner 20 WP (ácido oxolínico) alcanzó porcentajes de eficacia que oscilaron entre 70% y 92% en las tres dosis ensayadas y que fue más efectivo en este sentido que el bactericida de referencia, Agrimycin 16.5 WP (sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina).

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos a nivel de invernadero para analizar el comportamiento de los bactericidas y de las dosis ensayadas, y comparar los resultados obtenidos in vitro con los que se obtengan a nivel de invernaderos.
- Realizar ensayos en condiciones de campo para estudiar el comportamiento de los bactericidas y de las dosis ensayadas, tomando en cuenta todos los factores que intervienen en este escenario.
- Realizar pruebas para establecer una línea base de sensibilidad de la bacteria *B. glumae* al bactericida Starner 20 WP utilizando técnicas convencionales y técnicas moleculares.
- Utilizar el bactericida Starner 20 WP (ácido oxolínico) en su dosis comercial y en el momento oportuno tal y como lo recomienda la etiqueta del producto, teniendo en cuenta de no abusar de este producto ya que se puede correr el riesgo de que la bacteria *Burkholderia glumae* adquiera resistencia al bactericida como ya ha ocurrido en otras partes del mundo.

VII. LITERATURA CITADA

- Chen, R. 2011. A molecular study on the *tofI/tofR* quorum-sensing system of *Burkholderia glumae*, the major pathogen that causes bacterial panicle blight of rice. Thesis (M.Sc.) Louisiana State University.p.57.
- Chien, C. C., Chang, Y.C., Liao, Y.M. &Ou, S.H. 1984. Bacterial grain rot of rice a new disease in Taiwan. Review of Plant Pathology. 63(8):317.
- Coenye, T.; Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches.Laboratory of Microbiology, Ghent University.Environmental Microbiology. p. 5(9), 719-729.
- Coenye, T. 2009. Modern bacterial systematics in practice: Polyphasic taxonomy of the *Burkholderia cepacia* complex. Laboratory for Pharmaceutical Microbiology Ghent University Belgium.
- Compant, S., J. Nowak, T. Coyene, C. Clement, E.A. Barka. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. FEMS Microbiology. Rev. 32: 607-626.
- Correa, F. 2005. Complejo ácaro-hongo-bacteria del arroz (en línea) (s.f). Palmira. Disponible desde internet en www.ciat.cgiar.org/riceweb/esp/pdf/complejoácarocostarica.pdf
- Correa-Victoria, F. 2006. Asociación de la bacteria *Burkholderia glumae* al complejo ácaro-hongo-bacteria en Panamá. Observaciones sobre muestras afectadas por el complejo en campos de arroz de Panamá. Aislamiento y pruebas de patogenicidad. CIAT.
- Correa, F., Pérez, C.; Saavedra, E. 2007. Añublo bacterial de la panícula del arroz. Revista Arroz. 57(468): 26-32.
- Correa, F.; Fory, P.; Mejía, E.; Aricarpa, G.; Prado, G. 2009. Pruebas de diagnóstico convencionales de *Burkholderia glumae*.
- Cother, E.J., Noble D.H., van de Ven R.J., Lanoiselet V., Ash G., Vuthy N., Visarto P. & Stodart B. 2010. Bacterial pathogens of rice in the Kingdom of Cambodia and description of a new pathogen causing a serious sheath rot disease. Plant Pathology 59:944-953.
- Cottyn, B., Van Outryve, M.F., Cerez, M.T., De Cleene, M., Swings, J., and Mew, T.W. 1996.Bacterial disease of rice. II. Characterization of pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. Plant Dis. 80:438-445.

- Cottyn, B., Cerez, M.T., Van Outryve, M.F., Barroga, J., Swings, J., and Mew, T.W. 1996. Bacterial disease of rice. I. Pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. *Plant Disease* 80:429-437.
- Devescovi, G., J. Bigirimana, G. Degrassi, L. Cabrio, J.J. Li Puma, J. Kim, I. Hwang and V. Venturi. 2007. Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and Environmental Microbiology* 73(15): 4950-4958.
- FONTAGRO. 2011. Informe Técnico Final. Complejo Acaro Hongo Bacteria Nuevo reto para arroceros Centroamericanos. Proyecto FONTAGRO FTG 311-05.
- González, A., Graterol, E., Arnao, E., Acevedo, M. & Mosquera, G. 2011. Primer reporte de *Burkholderia glumae* causante de la pudrición bacteriana de la panícula del arroz en Venezuela. *Fitopatología Colombiana* 35(1):81.
- Goto, K. & Ohata K. 1956. New bacterial diseases of rice (Brown stripe and grain rot). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 21:46-47.
- Groth, D. & Hollier, C. 2011. Bacterial panicle blight of rice. Louisiana Plant Pathology. Pub. 3106. www.lsuagcenter.com.
- Ham, J.H., Melanson, R.A. & Rush, M.C. 2011. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Mol. Plant Pathol.* 12:329-339.
- Hikichi, Y, Okuno, T., & Furusawa, I. 1994. Susceptibility of rice spikelets to infection with *Pseudomonas glumae* and its population dynamics. *J. Pesticide Sci.* 19:11-17.
- Iwai, T., K. Kaku, R. Honkura, S. Nakamura, H. Ochiai, T. Sasaki, e Y. Ohashi. 2002. Enhanced resistance to seed transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell wall bound thionin. *Molecular Plant Microbe Interact* 15:515-521.
- Jeong, Y.; Kim, J.; Kim, S.; Kang, Y.; Nagamatsu, T.; Hwang. I. 2003. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis.* 87:890-895
- Jorgensen, J.H., and Ferraro, M.J. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of general principles and contemporary practices. *Medical Microbiology* 49:1749-1755.
- Kurita, T.; Tabei, H. 1967. On the causal agent of bacterial grain rot of rice. (Abstract in Japanese). *Annals of the Phytopathological Society of Japan.* p. 33:111.
- Lim, J.Y., T.H. Lee, B.H. Nahm, Y.D. Choi, M. Kim and I. Hwang. 2009. Complete genome sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. *Journal of Bacteriology* 191(11): 3758-3759.

- López-Cardona, N., y Castaño-Zapata, J. 2011. Evaluación in vitro de la eficacia de bactericidas sobre *Pseudomonas* sp. Migula, causante de la muerte descendente del tomate de árbol [*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.]. *Agronomía* 19:31-41.
- Lehmann-Danzinger, H. 1987. *Microbiología Fitopatológica*. Curso práctico. 4ta. Edición. Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz. Georg-August-Universität Göttingen. República Federal de Alemania. p. 71.
- Maeda, Y., Kiba, A., Ohnishi, K., and Hikichi, Y. 2007. Amino acid substitutions in GyrA of *Burkholderia glumae* are implicated in not only oxolinic acid resistance but also fitness on rice plants. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1114–1119.
- Mogi, S. 1988. Detection and diagnosis of pathogen for bacterial grain rot (*Pseudomonas glumae*) on rice. 5th Int. Congress of Plant Pathology. Section XIII, 3-3. p. 403.
- Nandakumar, R., Rush, M., Shahjahan, A., O'Reilly, K. & Groth, D. 2005. Bacterial panicle blight of rice in the southern United States caused by *Burkholderia glumae* and *B. gladioli*. *Phytopathology* 95 (suppl.): S73.
- Nandakumar, R., Rush, M.C. & Correa, F. 2007. Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with panicle blight symptoms on rice in Panama. *Plant Dis.* 91:767.
- Nandakumar, R., Shahjahan, A.K.M., Yuan, X.L.; Dickstein, E.R.; Groth, D.E.; Clark, C.A.; Cartwright, R.D. & Rush, M.C. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Dis.* 93:896-905
- Nieves, C. 1999. Bacterial grain rot. In: *Seed-Borne Bacterial Diseases*. 8th Revised Edition. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. p. 108-113.
- Ou, S.H. 1985. *Rice diseases*. CAB Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, England. p.380.
- Prado, G. 2010. Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz (*B. glumae*). *Agricultura Eco-Eficiente para Reducir la Pobreza*. p. 30
- Quesada, A., Gracia F. 2014. *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Costa Rica. *Análisis y Comentarios*. *Agronomía Mesoamericana*. Universidad de Costa Rica.
- Rush, M.C., A.K.: Shahjahan, and J. P. Jones. 2000. Outbreak of false smut of rice in Louisiana. *PlantDis.* 84:100.
- Rush, M., Q. Shao, S. Zhang, K. Shahjahan, K. O'reilly, D. Shih, D. Groth, y D. Linscombe. 2003. *Biotechnology and control of rice diseases*. *La. Agric.* 46:20-23.

- Saavedra Montano, D.2012. Las tendencias de las nuevas innovaciones tecnológicas en arroz. FUNICA. (Artículo) p. 1-3
- Sayler, R.J.; Cartwright, R.D.; Yang, Y. 2006.Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United State. En: Plant Dis. p. 90:603-610.
- Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria.2da Edition. Bacteriology Committee of American, Phytopathogenic Society. p 36-44.
- Schaad, N., J. Jones., W, Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria. 3da Edition. APS Press, Minnesota, USA.
- Shahjahan, A.K.M., M.C. Rush, D. Groth, and C. Clark. 2000. Panicle blight. Recent research points to a bacterial cause. Rice Journal. www.ricejournal.com/april2000. p. 103:26-28.
- Stockwell, V.O., and Duffy, B. 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. Revue Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris) 31: 199-210.
- Trung, H.M., N.V., Vien,N.V., Lam, D.T. & Lien, M. 1993.Occurrence of rice grain rots disease in Vietnam. Int. Rice Res. Notes 18:30.
- Tsushima, S., Mogi, S. & Saito, H. 1985.Effects of inoculums density, incubation temperature and incubation period on the development of rice bacterial grain rot. Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu.p.31:11-12.
- Tsushima, S., Mogi, S., Naito, H. & Saito, H. 1989.Existence of *Pseudomonas glumae* on the rice sedes and development of the simple method for detecting *P. glumae* from the rice seeds. Bull. Kyushu Natl. Agric. Exp. Stn.p. 25:261-270.
- Tsushima, S., Naito, H. & Koittabashi, M. 1995. Change in panicle susceptibility associated with flowering rate of spikelets in bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. Ann. Phytopathol. Soc. Japan. p. 61:109-113.
- Tsushima, S., Naito, H., and Koittabashi, M. 1996. Population dynamics of *Pseudomonas glumae*, the causal agent of bacterial grain rot of rice, on leaf sheaths of rice plants in relation to disease development in the field. Ann. Phytopathol. Soc. Japan. p. 62:108-113.
- Tsushima, S. 2011. Study on control and epidemiology of bacterial grain rot of rice. J. Gen. Plant Pathology. p. 77:358-360.
- Uematsy, T., D. Yoshimura, K. Nishiyama, T. Ibaragi, y H. Fujii. 1976. Pathogenic bacterium causing seedling rotof rice. Annals of the Phytopathological Society of Japan 42:464-471.

- Urakami, T., C. Ito-Yoshida, H. Araki, T. Kijima, K.I. Suzuki, K. Komagata. 1994. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. Institute Japanese Systemic Bacteriology. 44: 235-3245.
- Viallard, V., I. Poirier, B. Cournoyer, J. Haurat, S. Wiebkin, K. Phhel-Keller, y J. Balandreau. 1998. *Burkholderia graminis* a novel species of rhizospheric *Burkholderia* and reassessment of *Pseudomonas phenazinium* pyrrocinia and *Pseudomonas glathei* into *Burkholderia*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:549-563.
- Yang, X. 2004. Identification of bacterial pathogens causing panicle blight of rice in Louisiana. Thesis M.Sc. The Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, USA.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, y M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni y Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol 36:1251-1275.
- Zeigler, R.S. & Alvarez, E. 1989. Grain discoloration of rice caused by *Pseudomonas glumae* in Latin America. Plant Dis. p. 73:368.
- Zhou, X.G., A.M. McClung, M.O. Way, Y. Jo, R.E. Tabien, y L.T. Wilson. 2011. Severe outbreak of bacterial panicle blight across Texas Rice Belt in 2010 [abstract]. Phytopathology 101:S205.
- Zhu B., Lou M., Huai Y., Xie G., Luo J. & Xu L. 2008. Isolation and identification of *Burkholderia glumae* from symptomless rice seeds. Rice Science, p. 15(2):145-149.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza del área de inhibición

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Inhibición	48	0.97	0.93	7.93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	145.86	23	6.34	30.11	<0.0001
Tiempo	12.93	2	6.47	30.70	<0.0001
Tratamiento	95.81	3	31.94	151.65	<0.0001
Repetición	12.31	3	4.10	19.49	<0.0001
Tiempo*Tratamiento	5.61	6	0.94	4.44	0.0037
Tratamiento*Repetición	19.19	9	2.13	10.12	<0.0001
Error	5.05	24	0.21		
Total	150.91	47			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.40518

Error: 0.2106 gl: 24

Tiempo Medias n E.E.

72 horas	5.31	16	0.11	A
24 horas	5.54	16	0.11	A
48 horas	6.51	16	0.11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.51683

Error: 0.2106 gl: 24

Tratamiento Medias n E.E.

Agrimycin DC	3.67	12	0.13	A
Starner DB	5.84	12	0.13	B
Starner DC	5.99	12	0.13	B
Starner DA	7.65	12	0.13	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.51683

Error: 0.2106 gl: 24

Repetición Medias n E.E.

P2	5.10	12	0.13	A
P3	5.56	12	0.13	A B
P4	6.05	12	0.13	B C
P1	6.44	12	0.13	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.17003

Error: 0.2106 gl: 24

Tiempo	Tratamiento	Medias	n	E.E.			
24 horas	Agrimycin DC	3.56	4	0.23	A		
72 horas	Agrimycin DC	3.72	4	0.23	A		
48 horas	Agrimycin DC	3.74	4	0.23	A		
72 horas	Starner DC	5.12	4	0.23		B	
72 horas	Starner DB	5.35	4	0.23		B	
24 horas	Starner DC	5.49	4	0.23	B	C	
24 horas	Starner DB	5.61	4	0.23	B	C	
48 horas	Starner DB	6.57	4	0.23		C	D
72 horas	Starner DA	7.07	4	0.23			D
48 horas	Starner DC	7.37	4	0.23		D	E
24 horas	Starner DA	7.51	4	0.23		D	E
48 horas	Starner DA	8.36	4	0.23			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.42572

Error: 0.2106 gl: 24

Tratamiento	Repetición	Medias	n	E.E.				
Agrimycin DC	P4	3.54	3	0.26	A			
Agrimycin DC	P2	3.65	3	0.26	A			
Agrimycin DC	P3	3.70	3	0.26	A			
Agrimycin DC	P1	3.80	3	0.26	A			
Starner DB	P2	4.39	3	0.26	A			
Starner DB	P3	4.57	3	0.26	A	B		
Starner DC	P3	5.88	3	0.26		B	C	
Starner DC	P4	5.97	3	0.26		B	C	
Starner DC	P1	6.03	3	0.26			C	
Starner DC	P2	6.08	3	0.26			C	
Starner DA	P2	6.29	3	0.26		C	D	
Starner DB	P4	6.71	3	0.26		C	D	E
Starner DB	P1	7.70	3	0.26			D	E
Starner DA	P4	7.98	3	0.26			E	F
Starner DA	P3	8.07	3	0.26			E	F
Starner DA	P1	8.25	3	0.26				F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)