



“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMIA

Trabajo de Graduación

Diagnóstico de enfermedades bacterianas y sensibilidad
“*in vitro*” a bactericidas, en el cultivo de café (*Coffea
arabica* L)

Autor

Br. Edwin Eliezar Cuadra Arauz

Asesores

Ing. MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán
Lic. MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez
Ing. Patricia Contreras Estrada

Managua, Nicaragua
Febrero, 2019



“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMIA

Trabajo de Graduación

Diagnóstico de enfermedades bacterianas y sensibilidad
“*in vitro*” a bactericidas, en el cultivo de café (*Coffea
arabica* L)

Autor

Br. Edwin Eliezar Cuadra Arauz

Asesores

Ing. MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán
Lic. MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez
Ing. Patricia Contreras Estrada

Managua, Nicaragua
Febrero, 2019

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el decanato de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria como requisito parcial para optar al título de:

Ingeniero en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal

Miembros del Tribunal Examinador

Presidente

Secretario

Vocal

Lugar y fecha (día/mes/año) _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. Ubicación del estudio	4
3.2. Colecta de muestras	4
3.3. Descripción de síntomas de tejido vegetal enfermo	5
3.4. Identificación de bacterias fitopatógenas en tejido vegetal de café	5
3.4.1. Técnica de inducción al crecimiento bacteriano	5
3.4.2. Identificación de géneros y especies de bacterias fitopatógenas mediante características morfológicas y pruebas bioquímicas	5
3.4.3. Prueba de hipersensibilidad en planta no huésped	6
3.5. Prueba de sensibilidad “ <i>in vitro</i> ” a bactericidas	6
3.6. Análisis de datos	8
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4.1. Características de fincas cafetaleras en estudio	9
4.2. Síntomas en tejido vegetal causados por el género <i>Pseudomonas</i> , en el cultivo de café ..	9
4.3. Identificación de bacterias fitopatógenas en tejido vegetal de café	11
4.3.1. Prueba de reacción de hipersensibilidad en planta no huésped	13
4.4. Sensibilidad de bacterias fitopatógenas a bactericidas de uso agrícola	14
4.4.1. Análisis de sensibilidad a bactericidas	17

V. CONCLUSIONES.....	19
VI. RECOMENDACIONES.....	20
VII. LITERATURA CITADA	21
VIII. ANEXOS.....	23

DEDICATORIA

A **DIOS** por concederme la vida, primeramente, por regalarme la fuerza necesaria para enfrentar cada circunstancia y la sabiduría para seguir adelante venciendo cada obstáculo que se presentase en mi vida diaria.

A mis padres: Luis Amado Cuadra Zeledón y Virginia Victoria Arauz Herrera, les dedico este trabajo como agradecimiento a todo su esfuerzo, dedicación, apoyo incondicional y la confianza que me dieron para cumplir una meta más en esta vida.

A mis hermanos: Jarvin Cuadra Arauz y Marveli Cuadra Arauz, por los consejos, motivación y el apoyo que siempre me brindaron para seguir adelante y nunca rendirme.

A cada una de las personas que de alguna manera fueron participe de este sueño de ser una persona preparada, gracias a su apoyo y consejos brindados.

A todas mis amistades que siempre me apoyaron y estuvieron conmigo en el transcurso de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por proveerme la fuerza, la salud y los conocimientos para culminar este trabajo. Y a mis **padres** por estar siempre en cada etapa de mi vida.

A mis asesores: **Lic. Isaías Sánchez Gómez, Ing. Yanet Gutiérrez Gaitán e Ing. Patricia Contreras Estrada**, por compartir sus conocimientos, confianza y amistad en el transcurso de nuestro trabajo.

Al **Ing. Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez e Ing. Danessa Ramírez Reynoza** por brindarme su apoyo.

A la **Universidad Nacional Agraria** como alma mater por brindarme la oportunidad de formarme como profesional

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Fincas seleccionadas para la colecta de muestras	4
2. Dosis de bactericidas de uso agrícola	8
3. Bacterias identificadas en diferentes variedades de café	11
4. Resultados de identificación de géneros y especies de <i>Pseudomonas</i>	12
5. Sensibilidad de bacterias fitopatógenas a bactericidas	16

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Síntomas en hojas causados por <i>Pseudomonas</i> sp	10
2.	Síntomas en bandolas y flores causados por <i>Pseudomonas</i> sp	10
3.	Reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco inducida por aislados bacterianos provenientes de tejido de café	14
4.	Dosis de estreptomicina más oxitetraciclina (Agrymicin 16.5 WP)	17
5.	Dosis de ácido oxolínico (Starner 20 WP)	18
6.	Dosis de clorhidrato de oxitetraciclina (Farmacina 5 WP)	18

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Representación esquemática para la identificación de especies de <i>Pseudomonas</i>	23
2. Descripción de bactericidas de uso agrícola	23
3. Procedimiento para determinación de sensibilidad de especies bacterianas a bactericidas de uso agrícola	24
4. Representación esquemática de la disposición de discos en los platos Petri con las diferentes dosis de cada bactericida	24
5. Caracterización agroecológica de fincas cafetaleras de Jinotega y Matagalpa	25
6. Sensibilidad de bacterias fitopatógenas a bactericidas de uso agrícola	25
7. Análisis de varianza para los diferentes productos bactericidas	26

RESUMEN

El café es considerado un producto de gran importancia en la economía mundial y es el segundo con más valor en el mercado después del petróleo. La producción de café está limitada por plagas, que reducen las cosechas y disminuyen su calidad. Los objetivos del estudio fueron, identificación de bacterias fitopatógenas, descripción de síntomas en campo y sensibilidad in vitro a bactericidas de uso agrícola. Se seleccionaron cinco fincas cafetaleras de los departamentos de Jinotega y Matagalpa, con antecedentes de enfermedades bacterianas; las muestras de tejido colectadas consistieron en hojas, bandolas, frutos, y flores. La identificación de géneros de bacterias fitopatógenas se realizó a partir de características macromorfológicas de crecimiento bacteriano y presencia de pigmentos fluorescentes en medio agar Pseudomonas (King B). La identificación de especies se realizaron las pruebas de oxidas y pruebas de producción de ácidos. La patogenicidad de las bacterias se realizó mediante la prueba de hipersensibilidad en plántulas de tabaco. La sensibilidad de las bacterias a bactericidas se determinó mediante el método de Kirby-Bauer, la inhibición al crecimiento bacteriano por los bactericidas, fue evaluado en diámetros (mm). Los bactericidas evaluados fueron, Clorhidrato de oxitetraciclina (Farmacina 5 WP), Estreptomicina más oxitetraciclina (Agrimycin WP 16. 5), Ácido oxolínico (Sterner 20 WP) y Sulfato de cobre (Phyton 24 SC). Los datos se analizaron de manera estadística. Las especies de bacterias identificadas fueron *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata* y *Pseudomonas cichorii* Swingle 1925, *P. cichorii* predominó con mayor frecuencia en los diferentes aislados, *P. syringae*, se aisló en todas las variedades muestreadas. Las especies de bacterias aisladas resultaron positivas a la prueba de hipersensibilidad, que indica su patogenicidad en el cultivo de café. Los síntomas en hojas, bandolas y flores causados por *Pseudomonas* sp son manchas de coloración pardo-oscura, de forma y tamaño irregular, rodeada, generalmente por halos amarillentos y traslucidos. El bactericida que mostró efecto con mayores diámetros en halos de inhibición de crecimiento bacteriano fue el ácido oxolínico.

Palabras claves: *Pseudomonas* sp, sensibilidad, Hipersensibilidad

ABSTRACT

Coffee is considered a product of great importance in the world economy and is the second with more value in the market after oil. Coffee production is limited by pests, which reduce harvests and decrease their quality. The objectives of the study were identification of phytopathogenic bacteria, description of symptoms in the field and sensitivity in vitro to bactericides for agricultural use. Five coffee farms were selected from the departments of Jinotega and Matagalpa, with a history of bacterial diseases; the tissue samples collected consisted of leaves, bandolas, fruits, and flowers. The identification of phytopathogenic bacteria genera was made from macromorphological characteristics of bacterial growth and the presence of fluorescent pigments in *Pseudomonas* agar medium (King B). The species identification was done through tests of oxides and acid production tests. The pathogenicity of the bacteria was carried out by the hypersensitivity test in tobacco seedlings. The sensitivity of bacteria to bactericides was determined by the Kirby-Bauer method, the inhibition of bacterial growth by bactericides was evaluated in diameters (mm). The bactericides evaluated were oxytetracycline hydrochloride (Farmacina 5 WP), streptomycin plus oxytetracycline (Agrymicin WP 16.5), oxolinic acid (Starner 20 WP) and copper sulfate (Phyton 24 SC). The data was analyzed statistics. The bacteria identified were *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas cichorii*, the *P. cichorii* species predominated more frequently in the different isolates, *P. syringae*, was isolated in all the varieties sampled. Isolated bacteria species tested positive for the hypersensitivity test, which indicates their pathogenicity in coffee culture. The symptoms in leaves, bandolas and flowers caused by *Pseudomonas* sp are characterized by dark brown stains of irregular shape and size, surrounded, generally by aqueous and translucent halos. The bactericide that showed an effect with greater diameters in halos of inhibition of bacterial growth was oxolinic acid.

Key words: *Pseudomonas* sp, sensitivity, hypersensitivity

I. INTRODUCCIÓN

El café se considera un producto de gran importancia para la economía mundial y hasta el inicio de la "crisis del café" internacional, era el segundo producto con más valor del mercado después del petróleo. Este grano se produce en más de 70 países alrededor del mundo, de los cuales 45 son miembros de la Organización Internacional del Café (OIC), que en conjunto representan el 97% de la producción mundial de café (MIFIC, 2008).

En Nicaragua el café es cultivado por 44,000 productores en un área de 125,874 ha distribuidas en 10 departamentos, predominando el área de siembra en la zona norte del país. Constituye el primer producto de exportación llegando a alcanzar el 18% total de las exportaciones, con una producción de 2,493t. Genera el 53% del empleo agropecuario nacional, el 21% del PIB agrícola del país y el 2% de PIB Nacional (Banco Central de Nicaragua, 2017).

Existe una diversidad de plagas insectiles y enfermedades que afectan al cultivo del café y que juegan un papel fundamental sobre la productividad y rentabilidad de las plantaciones. En las últimas décadas, en los cafetales centroamericanos y otras partes del mundo, entre las enfermedades, se destacan, la roya del café, ojo de gallo y antracnosis (Avelino y Rivas, 2013).

Actualmente la producción de café es mermada al igual que todos los cultivos, por las alteraciones de las condiciones climáticas, que se reflejan en el incremento de las temperaturas, sequias, inundaciones, cambios en los patrones del viento; estos eventos pueden causar cambios en el equilibrio de los agroecosistemas y favorecer el desarrollo de nuevas plagas.

En Brasil las enfermedades bacterianas causadas por el género *Pseudomonas* fueron detectadas por primera vez a finales de 1955, en cafetales del municipio de Garca, estado de Sao Paulo, incidiendo en hojas, bandolas y frutos. Los síntomas se caracterizaron por ser manchas de coloración pardo-oscura, de forma y tamaño irregular, rodeada, generalmente por halos amarillentos (Costa y Silva, 1960).

Las enfermedades de origen fungoso han predominado en el sistema café, en zonas cafetaleras de Nicaragua, no obstante, han sido reportada algunas especies de bacteria; como *Pseudomonas cichorii* Swingle 1925, (IPSA, 2016).

Estas enfermedades han sido poco estudiadas y en muchas ocasiones la sintomatología es confundida por deficiencias nutricionales en el suelo. Existe limitada información acerca de la etiología y características sintomatológicas, que ocasionan las bacterias fitopatógenas en este cultivo y condiciones climáticas que favorecen su desarrollo.

Para el manejo de estas enfermedades bacterianas en el cultivo del café, se ha incluido las aplicaciones de bactericidas como Agrymicin 16.5 WP (Estreptomicina + oxitetraciclina), Cupramicin 20 SP (Estreptomicina) y Tacre P Cunir 32 SC (Sulfato de cobre más oxitetraciclina).

Actualmente entre los principales desafíos en el desarrollo de caficultura nicaragüense, está el diagnóstico presuntivo de campo de las enfermedades bacterianas y el diagnóstico asertivo de la identificación de las especies bacterianas; utilizando métodos convencionales y moleculares para su respectiva identificación de especies y patovares.

La importancia de esta investigación radica en la identificación de especies bacterianas, descripción de los síntomas asociados a las enfermedades bacterianas que afectan el cultivo de café. Además de la determinación de la sensibilidad in vitro de algunos productos utilizados como bactericidas, en el manejo de estas enfermedades. La información obtenida establecerá pautas para próximas investigaciones sobre el comportamiento y epidemiología de las enfermedades bacterianas en el cultivo del café,

II. OBJETIVOS

2.1.Objetivo general

- Generar información sobre el diagnóstico de enfermedades bacterianas y sensibilidad “*in vitro*” a bactericidas, en el cultivo de café (*Coffea arabica* L)

2.2.Objetivos específicos

- Describir síntomas en hojas, bandolas y frutos de enfermedades bacterianas en muestras colectadas de tejido vegetal
- Identificar bacterias fitopatógenas en muestras de tejido enfermo procedentes de plantaciones en el cultivo de café
- Determinar sensibilidad de bacterias fitopatógenas a bactericidas utilizados en el manejo de enfermedades bacterianas en el cultivo del café

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del estudio

El estudio fue descriptivo y consistió en dos etapas, la primera etapa se desarrolló en campo realizando colecta de muestras de tejido vegetal enfermo en plantaciones de café en los departamentos de Matagalpa y Jinotega (Cuadro 1). La segunda etapa consistió en el procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Protección Agrícola y Forestal de la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el km 12 ½ carretera norte, con coordenadas geográficas 12° 08' 33" latitud norte, y 86° 10' 31" longitud oeste (Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales, 2010). El estudio se realizó en el periodo enero-noviembre 2018.

Cuadro 1. Fincas seleccionadas para la colecta de muestras

No	Nombre de la finca	Departamento/Municipio	Nombre del productor
1	Los Potrerillos	Jinotega-Jinotega	Iván y Edwin Rizo López
2	El Palacio	Jinotega-Jinotega	Fernando Chaves B (Familia Chaves B)
3	Santa Maura S.A.	Jinotega- Jinotega	Jorge Armando Chaves
4	El Limón	Matagalpa- Matagalpa	Consorcio Naviero Nicaragüense (Navinic)
5	El Cairo	Jinotega-Jinotega	José Antonio Altamirano

3.2. Colecta de muestras

Las fincas cafetaleras fueron seleccionadas por presentar antecedentes de enfermedades bacterianas. En el departamento de Matagalpa fue seleccionada la finca El Limón, en Jinotega las fincas El Cairo, El Palacio, Los Potrerillos y Santa Maura. Se colectó un total de 30 muestras de tejido vegetal enfermo, que incluyeron hojas, bandolas, flores y, frutos. El tipo de colecta fue selectiva o dirigida en plantas con posibles síntomas de enfermedad bacteriana y se tomó anotaciones acerca de las características morfológicas de los síntomas.

En cada finca se levantó el historial del cultivo (área cultivada, variedades, edad de la plantación, manejo fitosanitario, manejo agronómico, temperatura y altitud).

3.3. Descripción de síntomas de tejido vegetal enfermo

Se describieron los síntomas de muestras de tejido colectadas en campo. Estas fueron observadas al estereoscopio y se seleccionaron muestras con características de manchas bacterianas y presencia de exudados bacterianos. Posterior se realizó el proceso de aislamiento e identificación de género y especie de bacteria.

3.4. Identificación de bacterias fitopatógenas en tejido vegetal de café

El proceso de identificación de las bacterias fitopatógenas consistió en el aislamiento de las bacterias en tejido vegetal enfermo, para el cual se utilizó la técnica de inducción al crecimiento bacteriano. Se realizaron pruebas bioquímicas, para identificación de especies de bacterias y prueba de reacción de hipersensibilidad en plantas no huésped (tabaco), para comprobar la patogenicidad de las bacterias identificadas.

3.4.1. Técnica de inducción al crecimiento bacteriano

La técnica de inducción al crecimiento para el aislamiento de bacterias de tejido vegetal enfermo consistió en la realización de cortes de 5mm de tejido vegetal con síntomas de enfermedad bacteriana y se desinfectó con hipoclorito de sodio al 0.5% y alcohol histológico al 95%, posteriormente se lavó con agua destilada estéril y se realizó secado en superficie de papel filtro estéril, se sembró en 5 platos por muestra y 5 cortes por plato en medio nutritivo (AN). Finalmente, los platos se sellaron con Parafilm y rotulados con la debida información (Gutiérrez, 2012).

3.4.2. Identificación de géneros y especies de bacterias fitopatógenas mediante características morfológicas y pruebas bioquímicas

La identificación de géneros de bacterias fitopatógenas se realizó a partir cultivos puros de colonias bacterianas, con crecimiento de 24 horas; esta consistió, en observar las características macromorfológicas de crecimiento de colonias bacterianas que incluyen forma, color, aspecto y presencia de pigmentos fluorescentes en medio agar Pseudomonas (King B).

Se realizaron las pruebas de KOH al 3%, oxidasa y Tinción Gram. Para identificación de especies se realizaron las pruebas de producción de ácidos a partir de sorbitol, celobiosa, trehalosa, sacarosa (Schaad, 2001) (Anexo 1)

3.4.3. Prueba de hipersensibilidad en planta no huésped

Para las pruebas de hipersensibilidad, se estableció un vivero de plántulas de tabaco. Las plántulas fueron inoculadas cuando alcanzaron un crecimiento de 20 -25 cm de altura. Por cada plántula se inoculó las bacterias previamente identificadas, un control positivo que consistió en la inoculación de *Ralstonia solanacearum* obtenido del laboratorio de microbiología de la UNA y un control negativo que consistió en la infiltración agua destilada estéril.

Se preparó una suspensión bacteriana de 1×10^{-8} a partir de cultivos puros con 48 horas de incubación. La inoculación se realizó en hojas totalmente expandidas, utilizando una jeringa hipodérmica, para infiltrar la suspensión bacteriana en los espacios intervenales. Las plántulas fueron irrigadas con agua destilada estéril y cubiertas con bolsas plásticas para crear condiciones de humedad.

Se evaluó la reacción de hipersensibilidad positiva, mediante la observación de lesiones necróticas localizadas o la presencia de halos cloróticos amarillos a las 48-72 horas después de inoculación (Mariano, 2005, citado por Raimundi, 2013).

3.5. Prueba de sensibilidad “in vitro” a bactericidas

Las bacterias que resultaron patogénicas fueron seleccionadas de acuerdo con la intensidad de la reacción de hipersensibilidad. Se utilizaron cuatro bactericidas de uso agrícola, estreptomicina más oxitetraciclina (Agrymicin 16.5 WP), Clorhidrato de oxitetraciclina (Farmicina 5 WP) y Acido Oxolínico (Starner 20 WP) y Sulfato de cobre (Phyton 24 SC) a diferentes dosis (Cuadro 2 y Anexo 2).

Se utilizaron cuatro dosis por cada producto (dosis mínima de referencia, mínima recomendada, media y máxima recomendada en la etiqueta) y cinco repeticiones por dosis.

La dosis mínima de referencia es menor que la dosis mínima recomendada en la etiqueta del producto y se usó para conocer si las bacterias eran sensibles a esta dosis y de esta manera poder recomendarla para su utilización (Cuadro 2).

Para la prueba de sensibilidad a antibióticos, se utilizó el método de Kirby-Bauer (1966). Este método consistió en preparar una suspensión bacteriana de turbidez 0,5 escala Mackfarland. Con un aplicador de madera punta de algodón humedecido con la suspensión bacteriana se inoculo el medio nutritivo (AN) (Anexo 3). Posterior a la inoculación se colocaron 4 discos impregnados con los bactericidas a diferentes dosis y un disco impregnado con agua destilada estéril como testigo negativo (Anexo 4).

Se realizó evaluación cualitativa de la sensibilidad a bactericidas en un periodo 24 horas. Consistió en la medición en mm del área o halo de inhibición de crecimiento bacteriano, causada por la dosis de bactericida (CNDR, 2004).

Se consideran sensibles los aislados que no crecieron alrededor del disco impregnado con el bactericida produciendo halos de inhibición mayores de 14 mm y resistentes los aislados bacterianos que presentaron crecimiento bacteriano alrededor del disco impregnados con el bactericida, mostrando halos de inhibición menores de 14 mm (CLSI, 2016).

Cuadro 2. Dosis de bactericidas de uso agrícola para la sensibilidad a las bacterias

Bactericida	Dosis g/200L			
	Referencia	Mínima	Media	Máxima
Estreptomicina + oxitetraciclina (Agrymicin 16.5 WP)	100	240	260	280
Clorhidrato de oxitetraciclina (Farmicina 5 WP)	100	250	350	500
Ácido oxolínico (Starner 20 WP)	100	500	750	1000
Sulfato de Cobre (Phyton 24 SC)	100	500	750	1000

3.6. Análisis de datos

La información obtenida en campo fue analizada de manera descriptiva. Los datos de sensibilidad a bactericidas fueron organizados en una base de datos en EXCEL y se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA). Se realizó una separación de medias con la prueba de Tukey $\alpha= 0.05$).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características de fincas cafetaleras en estudio

Las fincas donde se colectaron las muestras son fincas con grandes extensiones cafetaleras, mayores a 60 ha de café por finca. El nivel tecnológico en relación con el uso de insumos es alto, con sistemas de producción agroforestales de café. La fertilización de café está basada en análisis de suelo, manejo integrado de plagas, así como la aplicación de buenas prácticas agrícolas (Anexo 5).

La temperatura promedio de las fincas es de 25°C y la altitud promedio es de 1,068 msnm. Generalmente en estas fincas tienen establecido variedades de café Pacamara, Parainema, Caturra y Marsellesa. Las variedades establecidas en las fincas son adecuadas para las condiciones agroclimáticas (Anexo 5).

4.2. Síntomas en tejido vegetal causados por el género *Pseudomonas*, en el cultivo de café

Los síntomas en hojas causados por *Pseudomonas*, se observaron manchas de coloración pardo-oscuro, de forma irregular y rodeada por halo acuoso amarillo y traslucido, frecuentemente asociadas con manchas necróticas causadas por el complejo de hongos; *Cercospora coffeicola* (Berk & Cooke), *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome) y *Mycena citricolor* (Berkeley & Curtis). En algunas muestras los síntomas se observaron manchas necróticas extendidas a lo largo de las nervaduras de las hojas (Figura 1).

En bandolas se observaron manchas necróticas de forma irregular, generalmente las manchas se observaron en los entrenudos de las bandolas. En los brotes florales los síntomas observados fueron manchas pequeñas de coloración pardo-oscuro, de forma y tamaño irregular (Figura 2).



Figura 1. Síntomas en hojas causados por *Pseudomonas* sp



Figura 2. Síntomas en bandolas y flores causados por *Pseudomonas* sp

En investigación sobre diagnóstico de enfermedades bacterianas en el cultivo de café, Rodrigues (2013) relaciona daño de *P. syringae* con manchas foliares necróticas irregulares, de coloración marrón, rodeadas por un halo amarillento que pueden coalescer, formando grandes áreas necrosadas.

Los síntomas ocasionados por las diferentes especies de *Pseudomonas* a nivel de campo no mostraron diferenciación entre ellos, lo que dificulta su caracterización a nivel de especie.

Según Raimundi (2013) y Rodrigues (2017), las diferentes especies bacterianas patógenas del café producen síntomas similares, razón por la cual la identificación de *P. cichorii* y *P. syringae* debe realizarse mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

4.3. Identificación de bacterias fitopatógenas en tejido vegetal de café

Las bacterias identificadas en las diferentes variedades de café mediante pruebas bioquímicas fueron *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas corrugata*. Estas mostraron reacciones positivas a la reacción con KOH 3% y morfología de bacilos Gram negativos al observarlos al microscopio óptico con tinción Gram. La especie *P. cichorii* predominó en los crecimientos bacterianos, mientras que las especies *P. syringae*, se identificó en todas las variedades. La especie de *P. corrugata*, se identificó en las variedades Pacamara y Caturra (Cuadro 3).

Las especies de *P. syringae* y *P. cichorii* produjeron pigmentación en el medio nutritivo y King B, la prueba de oxidasa fue positiva para las especies *P. cichorii* y *P. corrugata*, mientras que para *P. syringae* fue negativa. En el caso de las pruebas de carbohidratos *P. syringae* fue la que mostró capacidad de fermentar la sacarosa y trehalosa (Cuadro 4).

Cuadro 3. Bacterias identificadas en las diferentes variedades de café

Variedades de café	Bacterias identificadas		
	<i>P. syringae</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. corrugata</i>
Parainema	3	5	---
Marsellesa	1	4	---
Caturra	1	4	3
Pacamara	1	2	1
Catuaí	1	---	---
Total	7	15	4

Cuadro 4. Resultados de identificación de géneros y especies de *Pseudomonas*

Aislado	KOH	Oxi	Cel	Sac	Sor	Trea	Benz	HR	Género y especie
PAF	+	-	-	+	-	+		+	<i>Pseudomonas syringae</i>
PBP1	+	+	-	-	-	+		+	<i>Pseudomonas corrugata</i>
BPP2	+	+	-	-	-	+		+	<i>Pseudomonas corrugata</i>
PMP	+	-	-	+	-	+		+	<i>Pseudomonas syringae</i>
4A	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
11	+	+	-	+	-	+		+	<i>Pseudomonas corrugata</i>
6	+	+	-	-	-	+		+	<i>Pseudomonas corrugata</i>
16	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
10	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
30	+	-	-	+	-	+		+	<i>Pseudomonas syringae</i>
29	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
31	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
33	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
41	+	-	-	+	-	-		+	<i>Pseudomonas syringae</i>
52	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
64	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
67F	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
69	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
60	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
66	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
54	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
62	+	-	-	+	-	-		+	<i>Pseudomonas syringae</i>
89	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
96	+	-	-	+	-	-		+	<i>Pseudomonas syringae</i>
82	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
71	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>
80	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas cichorii</i>

(KOH): Hidróxido de potasio; (Oxi): Oxidasa; (Cel): Celobiosa; (Sac): Sacarosa; (Sor): Sorbitol; (Tre): Trehalosa; (Benz): Benzoato; (HR): Reacción de hipersensibilidad.

En estudio realizado por Raimundi (2013) en relación al diagnóstico de enfermedades bacterianas en el cultivo de café se identificaron mediante técnicas convencionales las especies de *P. syringae* y *P. cichorii* en las variedades Catuaí y Mundo nuevo. Otras investigaciones hacen referencia a la identificación de la especie *P. syringae* mediante morfología y crecimiento en medios cultivos selectivos, a partir de hojas de café (Rodrigues, 2017 y Zoccoli, 2011).

4.3.1. Prueba de reacción de hipersensibilidad en planta no huésped

Los aislados bacterianos identificados como de *P. syringae*, *P. cichorii* y *P. corrugata*, mostraron resultados positivos a la prueba de hipersensibilidad en tabaco, indicando patogenicidad para el cultivo de café (Figura 3). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Raimundi (2013); Belan (2016) y Rodrigues (2017), que determinaron la patogenicidad de las especies de *Pseudomonas cichorii* y *syringae* aisladas de tejido de café e inoculadas en hojas de plantas de tabaco. La especie *P. corrugata* no ha sido reportada afectando el cultivo de café, sin embargo, se ha reportado su patogenicidad en algunas solanáceas como tomate, tabaco, pimiento y berenjena (Silverio, 1994).

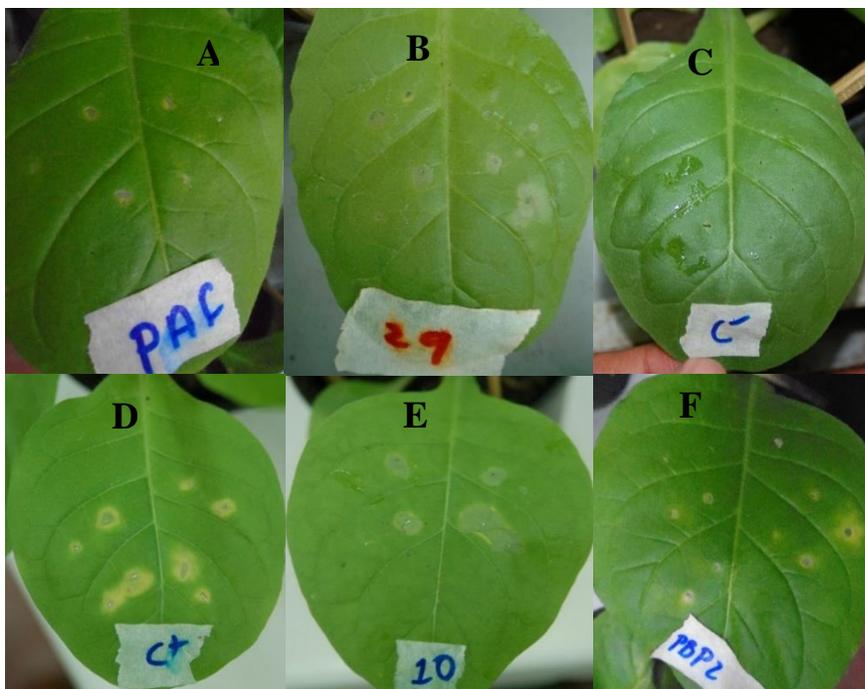


Figura 3. Reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco inducida por aislados bacterianos provenientes de tejido de café. (A) *P. syringae*, (B, E), *P. cichorii*, (C), Control negativo (D) Control positivo, (F) *P. corrugata*.

4.4. Sensibilidad de bacterias fitopatógenas a bactericidas de uso agrícola

Se seleccionaron 9 aislados bacterianos tomando como criterio de selección la intensidad de la reacción en la prueba de hipersensibilidad en tabaco. Los aislados seleccionados fueron cuatro de *P. cichorii*, tres de *P. syringae* y dos de *P. corrugata*.

Streptomycin + oxitetracycline (Agrymicin 16.5 WP) inhibited the growth of the bacterial isolates *Pseudomonas cichorii* (67F), *Pseudomonas corrugata* (PBP), *Pseudomonas syringae* (PAF). However, it did not inhibit the growth of the bacterial isolates *Pseudomonas cichorii* (4A, 19B). Oxolinic acid (Starner 20 WP) inhibited the growth of the bacterial isolates *Pseudomonas cichorii* (4A), *Pseudomonas corrugata* (PBP). However, it did not inhibit the growth of the bacterial isolates *Pseudomonas cichorii* (67F, 71C).

Clorhidrato de oxitetraciclina (Farmacina 5 WP) inhibió el crecimiento de los aislados bacterianos *Pseudomonas cichorii* (67F), *Pseudomonas syringae* (PAF). Sin embargo, no inhibió el crecimiento en los aislados bacterianos *Pseudomonas cichorii* (29B), *Pseudomonas corrugata* (PBP2). Sulfato de Cobre (Phyton 24 SC) no inhibió el crecimiento bacteriano del género *Pseudomonas*, indicando que las bacterias son resistentes al producto (Cuadro 3 y Anexo 6).

Cuadro 5. Sensibilidad de bacterias fitopatógenas a bactericidas

Aislado	Bacteria identificada	Estreptomicina + oxitetraciclina		Oxitetraciclina		Ácido Oxolínico		Sulfato de cobre	
		Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación	Diámetro (mm)	Interpretación
71C	<i>P. cichorii</i>	16	Sensible	18	Sensible	8	Resistente	8	Resistente
67F	<i>P. cichorii</i>	23	Sensible	30	Sensible	8	Resistente	8	Resistente
29B	<i>P. cichorii</i>	8	Resistente	10	Resistente	17	Sensible	8	Resistente
96D	<i>P. syringae</i>	16	Sensible	18	Sensible	28	Sensible	8	Resistente
PMP	<i>P. syringae</i>	21	Sensible	17	Sensible	28	Sensible	8	Resistente
PBP2	<i>P. corrugata</i>	18	Sensible	12	Resistente	28	Sensible	8	Resistente
PAF	<i>P. syringae</i>	23	Sensible	25	Sensible	30	Sensible	8	Resistente
PBP	<i>P. corrugata</i>	24	Sensible	24	Sensible	33	Sensible	8	Resistente
4A	<i>P. cichorii</i>	13	Resistente	23	Sensible	35	Sensible	8	Resistente

Sensibilidad: No hay crecimiento alrededor del disco, Resistencia: Hay crecimiento alrededor del disco, no hay presencia de halo de inhibición

Estudio realizado por Schauffler & Piero (2017) determinó que la dosis de 10 mg/ml de Estreptomicina + Oxitetraciclina usado como testigo en *Pseudomonas syringae* aislada de tomate, presentó halos de inhibición de 16.2 mm, resultando sensible a dicho producto. Estudio realizado por Scheck (1998) con cepas de *P. syringae*, pv. *Syringae* aisladas de plantas ornamentales mostraron resistencia a estreptomicina y sulfato de cobre CuSO₄ en ensayos in vitro, mientras que investigación realizada por Zoccoli (2011) afirma que la posibilidad de que ocurran interacciones adversas entre metales como el cobre y el medio de cultivo son muy alta existiendo la posibilidad de que en el medio de cultivo el cobre no esté disponible, lo que puede llevar a resultados inconclusos.

4.4.1. Análisis de sensibilidad a bactericidas

Los productos estreptomicina más oxitetraciclina, ácido oxolínico y clorhidrato de oxitetraciclina; en el análisis de separación de medias de Tukey se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) en las dosis. Las dosis que presentaron mejores resultados, en el caso de estreptomicina más oxitetraciclina fueron de 260 y 280 g/200 L(Figura 4), mientras que en el ácido oxolínico, las dosis con mejores resultados fueron de 750 y 1000 g/200 L(Figura 5). En el caso de clorhidrato de oxitetraciclina, los mejores resultados se observaron en las dosis de 350 y 500 g/200 L (Figura 6). En este estudio los datos de sensibilidad para sulfato de cobre no se ajustaron al modelo de Tukey.

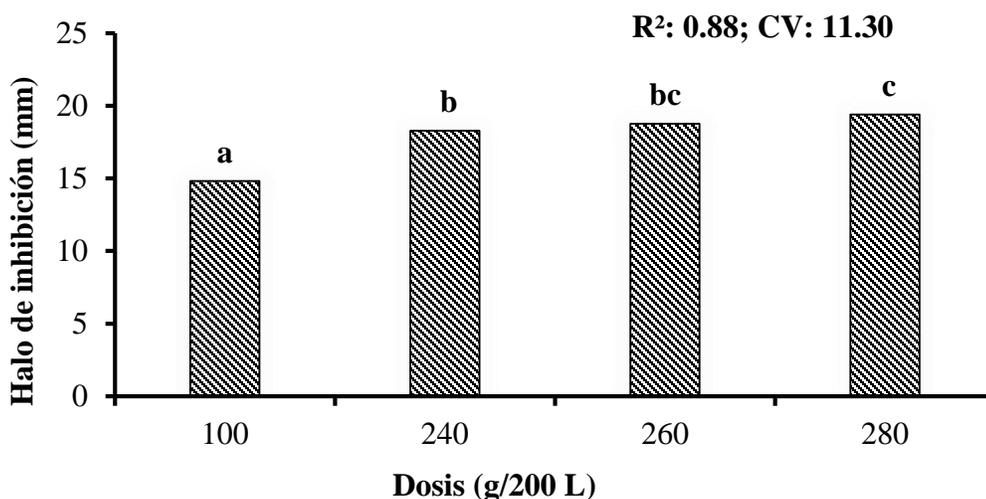


Figura 4. Dosis de estreptomicina más oxitetraciclina (Agrymicin 16.5 WP)

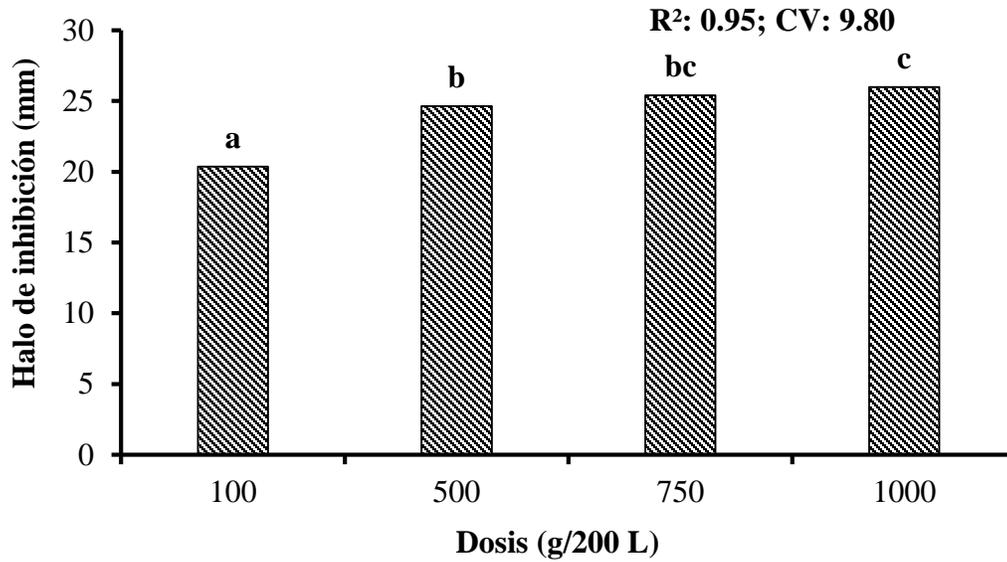


Figura 5. Dosis de ácido oxolínico (Starner 20 WP)

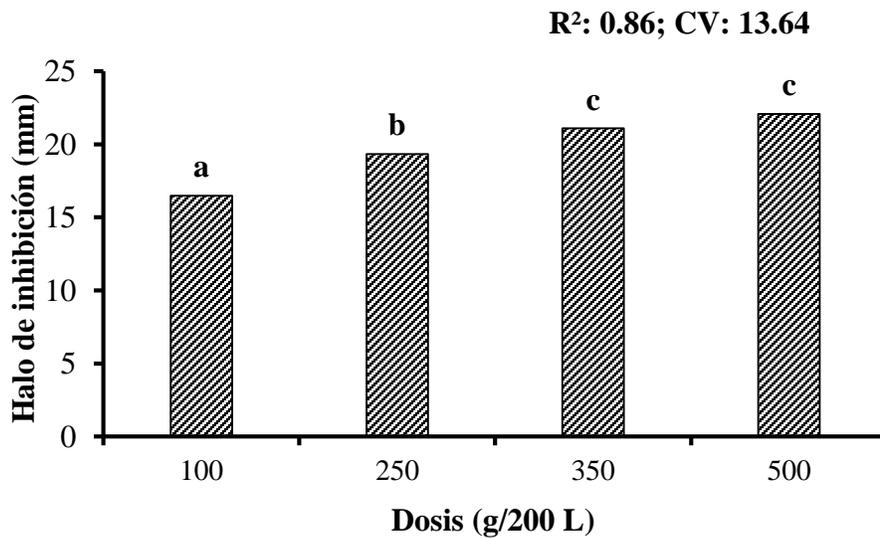


Figura 6. Dosis de clorhidrato de oxitetraciclina (Farmacina 5 WP)

Estudio realizado por McManus y Jones (1994) afirma que la oxitetraciclina tiene un efecto bacteriostático y es menos efectiva que la estreptomycin, que tiene efecto bactericida, pero esta es más efectiva cuando se aplica para el manejo de cepas bacterianas que son resistentes a la estreptomycin.

V. CONCLUSIONES

El género *Pseudomonas* fue el principal causante de enfermedades bacterianas, en el cultivo de café, afectando principalmente hojas, bandolas y flores. Los síntomas se caracterizan por ser manchas de coloración pardo-oscuro, de forma y tamaño irregular, rodeada, generalmente por halos acuosos y traslucidos.

Se identificaron especies de bacterias del género *Pseudomonas*, *P. cichorii*, *P. syringae* y *P. corrugata*; mostrando resultados positivos a la prueba de hipersensibilidad en plántulas de tabaco.

Los bactericidas de uso agrícola clorhidrato de oxitetraciclina, ácido oxolínico, estreptomicina más oxitetraciclina inhibieron el crecimiento bacteriano de los aislados *P. syringae* y *P. corrugata*, indicando la sensibilidad de los aislados a estos productos, sin embargo, no inhibieron el crecimiento bacteriano de los aislados *P. cichorii*. El bactericida que mostró mayor efecto de inhibición en el crecimiento bacteriano fue el ácido oxolínico (Starner 20 WP).

VI. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de diagnóstico de enfermedades bacterianas del cultivo de café, mediante pruebas moleculares.

Realizar estudios relacionados a sensibilidad de bacterias con una mayor lista de productos bactericidas.

Realizar estudios de mecanismos de resistencia de bacterias fitopatógenas.

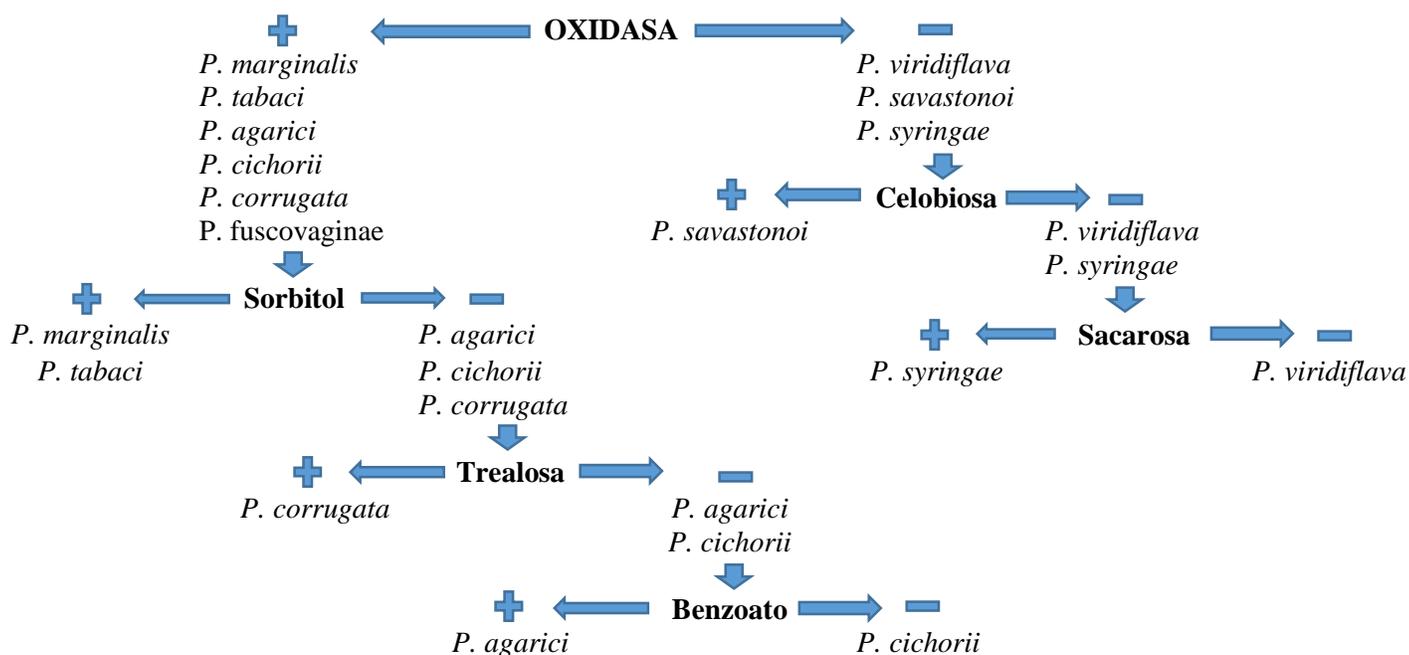
VII. LITERATURA CITADA

- Avelino, J.; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del café. https://www.researchgate.net/publication/260789530_La_roya_anaranjada_del_cafeto
- Banco Central de Nicaragua (BCN). 2017. Informe Anual 2017. Managua, Nicaragua. 166 p.
- Belan, L. L., Pozza, E. A., de Oliveira Freitas, M. L., Raimundi, M. K., de Souza, R. M., & da Cruz Machado, J. 2016. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee seeds. *Australian Journal of Crop Science*, 10: 1015.
- Centró Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR). 2004. Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica. (pp.273-297). Managua, Nicaragua
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. USA.
- Costa, A. S.; Silva, D. M. A. 1960. Mancha aureolada do café. *Bragantia*. 19: 63-69.
- Gutiérrez Y. 2012. Universidad nacional agraria Módulo práctico: Técnicas de laboratorio. Managua, Nicaragua. 1º Edición, 2012. 61p.
- Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales (INETER). 2010. Estación Meteorológica del Aeropuerto Internacional Augusto Cesar Sandino. Managua, Nicaragua.
- McManus, P. y Jones, A. 1994. Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology*, 84: 627-633.
- Raimundi, M. K. 2013. Caracterização e identificação de isolados bacterianos patogênicos ao café. (Tesis de maestría). Universidad Federal de Lavras, Brasil
- Rodrigues, L. M. R; Almeida, I. M. G; Patricio, F. R. A; Beriam. L. O. S. 2013. Mancha aureolada do café causada por *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*. Instituto Agrônomo, Campinas. Recuperado de http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes_online/pdf/boletimtecnico212online.pdf.
- Rodrigues, L. M., Sera, G. H., & Beriam, L. O. 2017. First report of mixed infection by *Pseudomonas syringae* pathovars *garcae* and *tabaci* on coffee plantations. *Bragantia*, 76: 850-855.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. USA: *American Phytopathological Society* (APS Press). 3: 373.

- Schauffler, G. P., & Piero, R. M. 2017. Extratos de própolis no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) e da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae*) em tomateiro. Universidad federal de Santa Catarina, Brasil. Recuperado de: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/174321>
- Scheck, H. J., & Pscheidt, J. W. 1998. Effect of Copper Bactericides on Copper-Resistant and - Sensitive Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. American Phytopathological Society, 397-406.
- Siverio, F., & Lopez, M. 1994. Patogenicidad de *Pseudomonas corrugata* sobre tomate, pimiento y otras especies de interés agrícola. Universidad de La Laguna. España. 6: 136-159.
- Zoccoli, D. M., Takatsu, A., & Uesugi, C. H. 2011. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. *Bragantia*. 70: 843-849.

VIII. ANEXOS

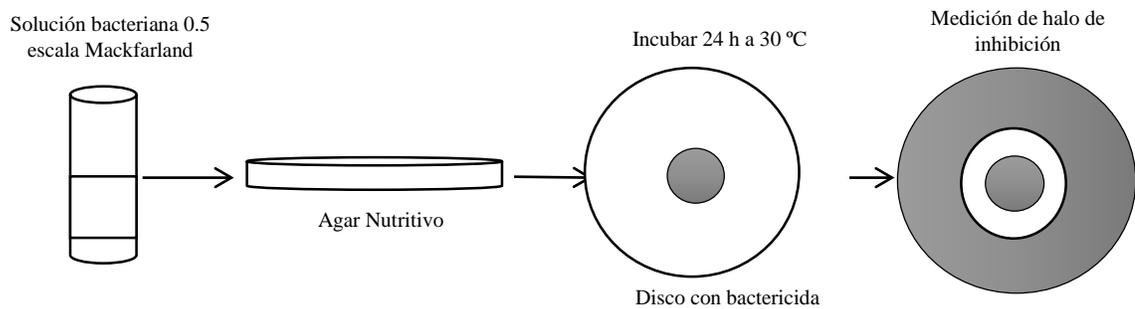
Anexo 1. Representación esquemática para la identificación de especies de *Pseudomonas*



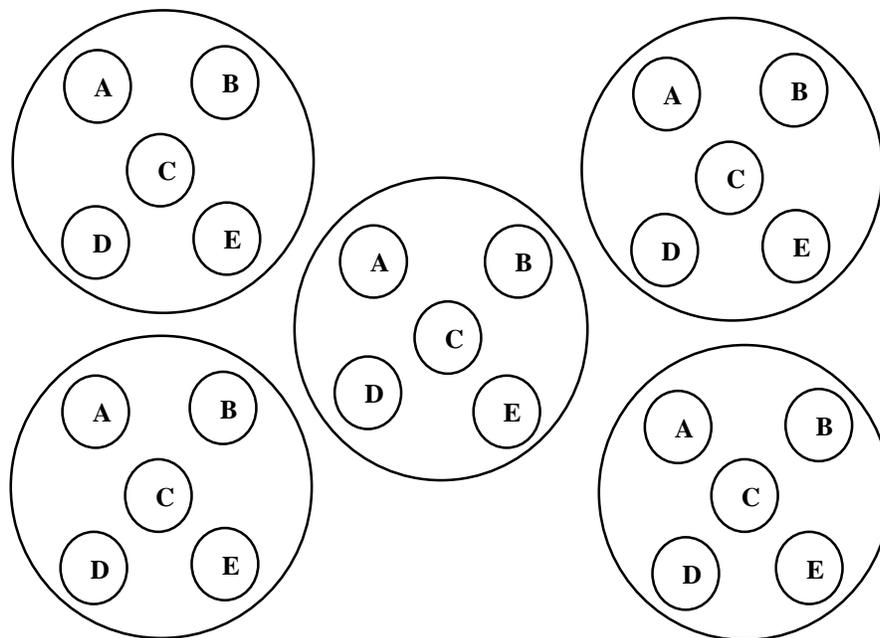
Anexo 2. Descripción de bactericidas de uso agrícola

Producto		Modo de penetración	Uso
Nombre comercial	Ingrediente activo		
Agrymicin 16.5 WP	Estreptomicina + oxitetraciclina	Contacto	Bactericida
Starner 20 WP	Ácido oxolínico	Contacto	Bactericida
Farmacina 5 WP	Clorhidrato de oxitetraciclina	Sistémico	Bactericida
Phyton 24 SC	sulfato de pentahidratado cobre	Sistémico	Fungicida- Bactericida

Anexo 3. Procedimiento para determinación de sensibilidad de especies bacterianas a bactericidas de uso agrícola



Anexo 4. Representación esquemática de la disposición de discos en los platos Petri con las diferentes dosis de cada bactericida

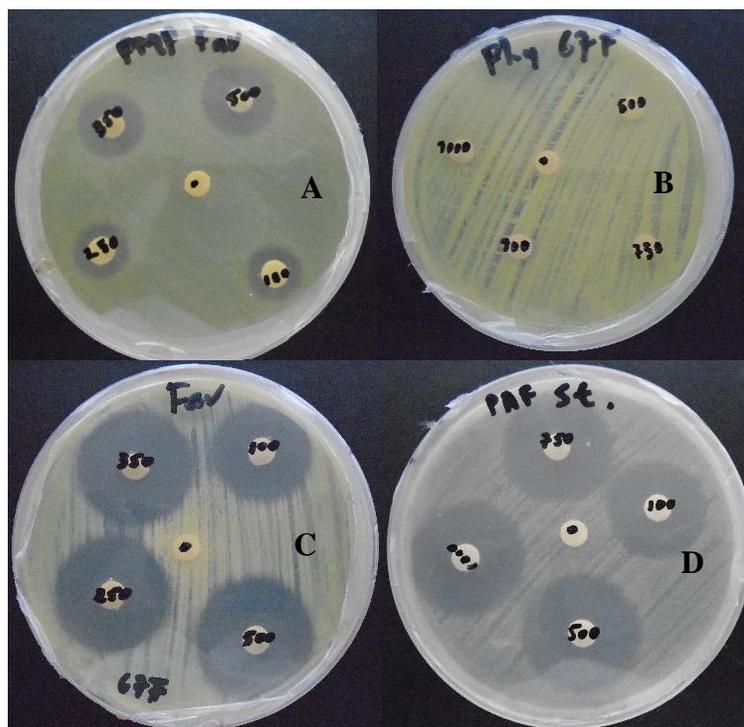


(A) Dosis mínima de referencia, (B) dosis mínima recomendada (D) dosis media recomendada, (E) Máxima recomendada y (C) Agua destilada estéril

Anexo 5. Caracterización agroecológica de fincas cafetaleras de Jinotega y Matagalpa

Finca	Variedades	Área ha	Nivel Tecnología	Altitud msnm	Temperatura °C
Santa Maura	Pacamara Caturra Parainema	352	Alto	980-1200	24-28
Potrerillos	Parainema Pacamara Marsellesa	500	Alto	950-1200	21-28
El Cairo	Parainema Catuaí	62	Alto	950-1100	25-27
El Palacio	Parainema Marsellesa Caturra	200	Alto	1000-1200	22-25
El limón	Caturra Marsellesa	330	Alto	900-1200	24-26

Anexo 6. Sensibilidad de bacterias fitopatógenas a bactericidas de uso agrícola



Halos de inhibición producidos por los bactericidas Farmacina (A y C), Sterner (D), Ausencia de inhibición bacteriana (B) por Phyton.

Anexo 7. Análisis de varianza para los diferentes productos bactericidas.

A. Análisis de varianza para la inhibición de Estreptomicina + oxitetraciclina (Agrymicin 16.5 WP)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Inhibicion	180	0.88	0.87	11.30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4876.41	15	325.09	80.23	<0.0001
Aislado	4297.30	8	537.16	132.56	<0.0001
Agrymicin	566.02	3	188.67	46.56	<0.0001
Repeticion	13.09	4	3.27	0.81	0.5220
Error	664.54	164	4.05		
Total	5540.95	179			.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.09207

Error: 4.0521 gl: 164

Agrymicin	Medias	n	E.E.	
100.00	14.82	45	0.30	A
240.00	18.29	45	0.30	B
260.00	18.76	45	0.30	B C
280.00	19.40	45	0.30	C

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

B. Análisis de varianza para la inhibición de Clorhidrato de oxitetraciclina (Farmacina 5 WP)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Inhibicion	180	0.86	0.85	13.64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7232.26	15	482.15	66.53	<0.0001
Aislado	6410.98	8	801.37	110.58	<0.0001
Farmacina	815.08	3	271.69	37.49	<0.0001
Repeticion	6.20	4	1.55	0.21	0.9304
Error	1188.47	164	7.25		
Total	8420.73	179			.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.46043

Error: 7.2467 gl: 164

Farmacina	Medias	n	E.E.	
100.00	16.47	45	0.40	A
250.00	19.33	45	0.40	B
350.00	21.09	45	0.40	C
500.00	22.07	45	0.40	C

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

C. Análisis de varianza del halo de inhibición de Ácido oxolínico (Starner 20 WP)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Inhibicion	180	0.95	0.95	9.80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18207.93	15	1213.86	217.74	<0.0001
Aislado	17294.90	8	2161.86	387.79	<0.0001
Starner	882.78	3	294.26	52.78	<0.0001
Repeticion	30.26	4	7.56	1.36	0.2512
Error	914.27	164	5.57		
Total	19122.20	179			.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.28092

Error: 5.5748 gl: 164

Starner	Medias	n	E.E.	
100.00	20.36	45	0.35	A
500.00	24.64	45	0.35	B
750.00	25.40	45	0.35	B C
1000.00	26.00	45	0.35	C

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