



"Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible"

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA

## Trabajo de Tesis

### Identificación fenotípica y molecular de *Burkholderia* spp en panículas de arroz (*Oryza sativa* L.) 2022

#### Autores

**Br. Dagne Valeria Fornos Reyes**  
**Br. Norvin Josué Peralta Herrera**

#### Asesores

**MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez**  
**MSc. Markelyn José Rodríguez Zamora**

**Managua, Nicaragua**  
**Mayo, 2022**



"Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible"

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

## FACULTAD DE AGRONOMÍA

### Trabajo de Tesis

## Identificación fenotípica y molecular de *Burkholderia* spp en panículas de arroz (*Oryza sativa* L.) 2022

### Autores

**Br. Dagne Valeria Fornos Reyes**  
**Br. Norvin Josué Peralta Herrera**

### Asesores

**MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez**  
**MSc. Markelyn José Rodríguez Zamora**

Presentado a la consideración del Comité Evaluador  
como requisito final para optar al grado de  
Ingeniero en Sanidad Vegetal

**Managua, Nicaragua**  
**Mayo, 2022**

## Hoja de aprobación del Comité Evaluador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el Comité Evaluador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

***Ingeniero en Sanidad Vegetal***

---

Miembros del Comité Evaluador

Presidente (PhD. Arnulfo Monzón  
Centeno)

Secretario (MSc. Eliezer Hazael  
Lanuza)

---

Vocal (MSc. Andrea María Zamora)

Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es dedicado a Dios por brindarme salud, fuerza, sabiduría, amor e inteligencia para lograr culminar mis estudios profesionales ya que este logró es por gracia de Él.

A mis padres María Eunice Reyes Andrade y Jorge Alberto Fornos Espinoza por el apoyo tanto económico como emocional, por sus consejos y valores que me brindaron a lo largo de mi carrera.

A mi hermano José René Fornos Reyes por sus confianzas y apoyo para culminar mi carrera.

Br. Dagne Valeria Fornos Reyes

## **DEDICATORIA**

Dedicado a mis padres Sonia del Carmen Herrera Monzón y Junior Alberto Peralta Oliva, por su apoyo incondicional desde el inicio de mi formación académica hasta el presente, por todo el esfuerzo y sacrificio para poder darme todo lo que he necesitado.

A mis abuelos Mercuria del Carmen Monzón Córdoba y Antolín Herrera Palacio por motivarme a continuar mi formación académica y apoyarme siempre en los buenos y malos momentos.

Br. Norvin Josué Peralta Herrera

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por regalarme la oportunidad de culminar mis estudios, todo es para honra y gloria de él.

A mis padres y hermano que siempre confiaron en mí y en mi capacidad de poder concluir esta meta y enseñarme que si te propones algo en la vida lo puedes lograr con la ayuda de Dios.

A mi compañero de Tesis Norvin Josué Peralta Herrera por su apoyo, paciencia, amor y dedicación para culminar este documento.

A nuestros asesores MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez y MSc. Markelyn José Rodríguez por haber confiado en mí para llevar a cabo esta investigación, por regalarnos sus valiosos tiempo y conocimientos, por los aprendizajes que nos compartieron.

Al personal Técnico y docente del Laboratorio de Microbiología de la UNA Ing. Rudy Javier Cáceres Murillo y Ing. Dannelsa Joseph Ramírez Reynosa por habernos apoyado y regalado valiosos aprendizajes.

Br. Dagne Valeria Fornos Reyes

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, doy gracias a Dios por la salud, fuerza y sabiduría que me ha brindado para superar cada obstáculo en mi vida, hasta alcanzar este logro.

Agradezco a mis padres y hermanas, por brindarme su amor y apoyo incondicional, por educarme, por sus consejos y por motivarme a superarme cada día.

A mis abuelos, por estar presentes en mi vida desde mi niñez hasta hoy, por ser parte de mi formación personal, por el apoyo que han brindado a mi persona, a mi madre y hermanas.

A mi compañera de tesis Dagne Valeria Fornos Reyes, por su dedicación a nuestro trabajo, paciencia, amor y motivación para seguir adelante en nuestra investigación.

A nuestros asesores MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez y MSc. Markelyn José Rodríguez por haber confiado en mí para llevar a cabo esta investigación, por regalarnos su valioso tiempo, conocimientos, consejos y aprendizajes que nos compartieron.

Al personal Técnico del Laboratorio de Microbiología de la UNA Ing. Rudy Javier Cáceres Murillo e Ing. Dannelsa Joseph Ramírez Reynosa por habernos apoyado y regalado valiosos aprendizajes.

A todas las personas que directa e indirectamente han contribuido en mi formación personal y académica, al cuerpo docente de la Universidad Nacional Agraria que me impartieron las diferentes competencias.

Br. Norvin Josué Peralta Herrera

## ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
<b>DEDICATORIA</b>	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
<b>III. MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>4</b>
3.1. Aspectos generales de <i>Burkholderia</i> spp	4
3.2. Clasificación taxonómica y características morfológicas de <i>Burkholderia</i> spp	4
3.2.1. Ciclo de vida de <i>Burkholderia</i> spp	5
3.3. Hospederos de <i>Burkholderia</i> spp	5
3.3.1. Condiciones favorables para el desarrollo de <i>Burkholderia</i> spp	5
3.3.2. Transmisión de <i>Burkholderia</i> spp	6
3.4. Sintomatología de <i>Burkholderia</i> spp	6
3.5. Reportes de <i>Burkholderia</i> spp en Nicaragua	7
3.6. Métodos de identificación convencionales de <i>Burkholderia</i> spp	7
3.6.1. Aislamiento	7
3.6.2. Tinción Gram	8
3.6.3. Pruebas bioquímicas	8
3.7. Técnicas moleculares	8
3.7.1. PCR punto final	8
3.7.2. PCR tiempo real	8
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
4.1. Ubicación del estudio	9
4.2. Colecta de muestras	9



4.3. Aislamiento de <i>Burkholderia</i> spp	10
4.4. Identificación mediante pruebas fenotípicas	10
4.5. Identificación molecular de <i>Burkholderia</i> spp a partir de ADN bacteriano	11
4.6. Amplificación por técnica PCR punto final	11
4.7. Variables evaluadas	12
4.8. Análisis de datos	12
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>13</b>
5.1. Identificación fenotípica de <i>Burkholderia</i> spp	13
5.2. Identificación molecular de <i>Burkholderia</i> spp	15
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>18</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>19</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b>	<b>20</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>22</b>

---

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO</b>		<b>PÁGINA</b>
1.	Sitios de colectas de muestras en fincas productoras de arroz	9
2.	Características usadas en la identificación de especies de <i>Burkholderia</i> spp	10
3.	Resultados de pruebas bioquímicas en muestras de panículas de arroz sospechosas de <i>Burkholderia</i> spp	14

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1.	Aislados de <i>B. gladiolii</i> (A), <i>B. plantarii</i> (B) y <i>B. cepacia</i> (C) a partir de panículas de arroz en medio de cultivo KB	13
2.	Amplificación de <i>B. gladiolii</i> a partir de colonias bacterianas aisladas de panículas de arroz. M: Marcador de peso molecular de 100pb, 1-6: muestras positivas para <i>B. gladiolii</i> , C-: Control negativo, C+: Muestra control positivo	16
3.	Amplificación de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i> a partir de colonias bacterianas aisladas de panículas de arroz. M: Marcador de peso molecular de 100pb, 1-3: muestras positiv. para <i>B. gladiolii</i> , 4-5 muestra positiva para <i>B. plantarii</i> , C+: Muestra control positivo <i>B. plantarii</i> y <i>B. gladiolii</i> y C-: Control negativo	16

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO</b>		<b>PÁGINA</b>
1.	Colecta de panículas con síntomas de la enfermedad, en finca La Doña	22
2.	Daño tisular y obstrucción de los haces vasculares en las plantas de arroz, impidiendo la formación del grano	22
3.	Clorosis en la parte basal de las hojas, pardeamiento y marchitamiento de las panículas	23
4.	Bacterias identificadas con pruebas bioquímicas y técnica PCR	24

## RESUMEN

La enfermedad conocida como Añublo bacteriano del arroz es causado por *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladiolii* y el Tizón de las plántulas de arroz causado por *Burkholderia plantarii*, son bacterias consideradas de importancia en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Las afectaciones han aumentado en los últimos años causando grandes pérdidas económicas anuales en los países productores de este grano. El objetivo de esta investigación fue identificar mediante pruebas fenotípicas y molecular, especies de *Burkholderia* en panículas de arroz (*Oryza sativa* L.). La colecta de muestras se realizó en el municipio de Sébaco, Matagalpa en el Centro experimental TAINIC y Finca Virginia, Agrícola Miramontes en el departamento de Boaco y Finca la Doña, municipio de Malacatoya, Granada. Las bacterias fueron aisladas a partir de panículas con síntomas de la enfermedad y la identificación de especies se realizó mediante pruebas bioquímicas (carbohidratos y diferenciación). La confirmación de las especies de *Burkholderia* se realizó mediante la técnica molecular PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Los aislados de *B. gladiolii* en el medio King B (KB) presento colonias blancas grisáceas o amarillentas, produce el pigmento amarillo difuso no fluorescente, mientras *B. plantarii* mostraron colonias amarillas, translúcidas y convexas, no fluorescentes, para el caso de *B. cepacia* las colonias fueron translúcidas, convexas no fluorescentes. La identificación con pruebas bioquímicas demostró la presencia de 18 aislados positivos para *B. gladiolii*, dos aislados para *B. plantarii* y uno positivo a *B. cepacia*. Con la técnica PCR se identificaron 18 muestras positivas para *B. gladiolii* que amplificó fragmentos de 479 pb y tres muestras positivas a *B. plantarii* con fragmentos de 597 pb, para el caso de *B. glumae* no fue identificada mediante prueba fenotípicas, ni molecular.

**Palabras clave:** Añublo, Fragmento, Vaneado, Manchado

## ABSTRACT

The disease known as bacterial blight of rice is caused by *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladiolii* and the blight of rice seedlings caused by *Burkholderia plantarii*, are bacteria considered important in rice cultivation (*Oryza sativa* L.). The effects have increased in recent years causing large annual economic losses in the countries that produce this grain. The objective of this research was to identify, through phenotypic and molecular tests, *Burkholderia* species in rice panicles (*Oryza sativa* L.). The collection of samples was carried out in the municipality of Sébaco, Matagalpa in the TAINIC Experimental Center and Finca Virginia, Agrícola Miramontes in the department of Boaco and Finca la Doña, municipality of Malacatoya, Granada. The bacteria were isolated from panicles with symptoms of the disease and the identification of species was carried out through biochemical tests (carbohydrates and differentiation). The isolates of *B. gladiolii* in the King B medium (KB) presented grayish white or yellowish colonies, producing the non-fluorescent diffuse yellow pigment, while *B. plantarii* showed yellow, translucent, and convex, non-fluorescent colonies, in the case of *B. cepacia* colonies were translucent, convex, non-fluorescent. Identification with biochemical tests showed the presence of 18 positive isolates for *B. gladiolii*, two isolates for *B. plantarii* and one positive for *B. cepacia*. With the PCR technique, 18 positive samples were identified for *B. gladiolii*, which amplified 479 bp fragments, and three positive samples for *B. plantarii* with 597 bp fragments. In the case of *B. glumae*, it was not identified by phenotypic or molecular tests.

**Keywords:** Blight, Fragment, Weathered, Spotted

## I. INTRODUCCIÓN

El añublo bacterial causado por *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladiolii* y el tizón de las plántulas de arroz causado por *Burkholderia plantarii*, son consideradas enfermedades de importancia en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) ya que sus afectaciones han crecido en los últimos años causando grandes pérdidas económicas anuales en los países productores de este grano; debido a la poca información de los productores respecto a su detección temprana, prevención y control de la enfermedad (Pedraza, 2012).

El género *Burkholderia* fue reportado y aislado por primera vez por Azegami *et al.*, (1987) en distrito de Kyushu, Japón y desde entonces se han ido reportando en importantes zonas productoras de arroz en todo el mundo como en China, Taiwán, Malasia, Las Filipinas, Indonesia, Venezuela, Panamá, Nicaragua, Colombia y Estados Unidos. En fincas productoras de arroz severamente afectadas por la enfermedad alcanzan hasta 75% de pérdidas de la producción ya que estas bacterias del género *Burkholderia* causan diversidad de daños como aborto floral, pudrición de panículas, vaneado de las vainas y caída del grano (Gañán, 2011).

Sotelo (2014) afirma que “la enfermedad se puede transmitir de forma directa a través de semillas, lotes infectados y malezas hospedera”. En el año 2010 la Asociación Nacional de Arroceros de Nicaragua (ANAR), expresaron su preocupación por los bajos rendimientos obtenidos en las cosechas y advirtieron sobre la presencia de la bacteria en sus campos.

La identificación del género *Burkholderia* se hace un poco difícil debido a que los métodos tradicionales se basan en características fenotípicas (pruebas bioquímicas, fisiología y morfología de las colonias), las cuales requieren un tiempo considerable; esto hace necesario el desarrollo de una prueba más rápida y específica para el diagnóstico temprano de la enfermedad. La técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés), es un método que permite una alta especificidad ya que se usan cebadores específicos para este género, contribuyendo así a determinar medidas de manejo más adecuadas que contrarresten esta enfermedad en una etapa temprana.

En Nicaragua se conoce de afectaciones causadas por estas bacterias, sin embargo, no se ha estudiado su distribución y pérdidas económicas. Tampoco existen reportes de las cepas que atacan las diferentes zonas arroceras. El objetivo de esta investigación es aportar información

sobre las maneras adecuadas para poder detectar la enfermedad en una etapa temprana y brindarles a los productores de arroz de nuestro país la información para reducir las pérdidas de rendimiento en las zonas arroceras de Nicaragua.



## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Generar información sobre la identificación mediante pruebas fenotípicas y moleculares de especies de *Burkholderia* en panículas de arroz (*Oryza sativa* L.) con síntomas de enfermedad, en Nicaragua

### **2.2 Objetivos específicos**

Identificar mediante pruebas fenotípicas las especies de *Burkholderia* spp en panículas de arroz

Identificar la presencia de especies de *Burkholderia* spp mediante la técnica PCR punto final

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1. Aspectos generales de *Burkholderia* spp

En 1967, Kurita nombró por primera vez al género de bacterias causantes de la pudrición del grano del arroz como *Pseudomonas* spp. En 1992 basándose en características fenotípicas y secuenciaciones, *Pseudomonas* spp cambia a *Burkholderia* spp. (Pedraza, 2012). Este género fue reportado por primera vez en el distrito de Kyushu en Japón y desde entonces se han ido reportando en importantes zonas productoras de arroz en todo el mundo como en China, Taiwán, Malasia, Las Filipinas, Indonesia, Venezuela, Panamá, Nicaragua, Colombia y Estados Unidos (Gañán, 2011).

El género *Burkholderia* causa la enfermedad conocida como añublo bacterial de la panícula del arroz, que es de gran impacto económico en el mundo, provocando pérdidas de hasta 40% de la producción, está asociada al suelo, rizosfera y a la superficie de una gran diversidad de plantas hospederas; además, es causante del marchitamiento en muchos cultivos de campo como: tomate, chile, berenjena, papa, girasol (Quesada-González y García-Santamaría, 2014).

#### 3.2. Clasificación taxonómica y características morfológicas de *Burkholderia* spp

*Burkholderia* spp causante del añublo bacterial pertenece al Filo Proteobacteria, Clase  $\beta$  Proteobacteria del orden *Burkholderiales* de la Familia *Burkholderiaceae* perteneciente al género *Burkholderia* de las especies *B. glumae*, *B. gladiolii* y *B. plantarii*, son Gram negativa y sus colonias son de crecimiento lento, de forma circular, elevadas y con márgenes lisos (Sotelo, 2014). Son capaces de reducir el nitrato, hidrolizar la gelatina y degradan el almidón (Pedraza, 2012).

*B. glumae* tiene forma de varilla, es móvil debido a la presencia de uno a tres flagelos polares; las colonias son de color blanco grisáceo o amarillento, fluorescente debido a la producción de la fitotoxina toxoflavina; en cambio *B. gladiolii* tiene forma de bastoncillos que pueden ser rectos o ligeramente curvados, no fluorescente, presenta reacción positiva a catalasa, es móvil debido a la presencia de flagelos polares y, como *B. glumae* produce el pigmento amarillo difuso en medio de cultivo KB debido a la producción de fitotoxina toxoflavina (Moreira, 2014).

La toxoflavina es un importante factor de virulencia ya que, según varias investigaciones, está directamente relacionada con la sintomatología y característica de la enfermedad del añublo

bacterial en los cultivos de arroz. Por otro lado, *B. plantarii* posee estructuras en forma de bastoncillos en pares o de cadenas cortas son móviles debido a la presencia de uno o tres flagelos polares; las colonias son de color amarillo, traslucidas y convexas; no es fluorescente y la reacción es positiva a catalasa y oxidasa (Moreira, 2014).

### **3.2.1. Ciclo de vida de *Burkholderia* spp**

El patógeno permanece en la semilla donde, se alojan en la parte basal del lodículo y al interior del grano de arroz. *Burkholderia* spp, puede sobrevivir en semillas almacenadas a temperatura ambiente hasta tres años, pero no en semillas mantenidas a campo abierto durante cinco meses (Flóres y Uribe, 2011).

Cuando las plántulas emergen en el campo, el patógeno se traslada a las vainas foliares inferiores, donde crece epifíticamente durante la etapa de macollamiento y desempeña un papel importante como fuente de inóculo primario de la pudrición del grano, puesto que el período crítico de infección se manifiesta en la emergencia de panícula y en floración (Gañán, 2011).

### **3.3. Hospederos de *Burkholderia* spp**

El arroz es el principal hospedante del patógeno, aunque ha sido reportado en otros hospedantes de la familia gramíneas; sin embargo, se conoce otros hospedantes secundarios, no pertenecientes a la familia de este grano tales como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), ají (*Capsicum annuum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), perilla (*Perilla frutescens* var. japonica Hara) y ajonjolí (*Sesamum indicum* L.), en los que causa síntomas de marchitamiento vascular, similar al ocasionado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Gañán, 2011).

#### **3.3.1. Condiciones favorables para el desarrollo de *Burkholderia* spp**

La gravedad de los daños de *Burkholderia* spp en plantas de arroz depende de su capacidad para multiplicarse, condiciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes. La bacteria se desarrolla entre 30 y 35°C (Espinosa-victoria *et al.*, 2020).

Según Pedraza (2012), la temperatura para un crecimiento óptimo de la bacteria es de 30°C a 35°C; para las especies de *B. glumae* y *B. gladiolii* necesitan entre 30°C y 37°C para sintetizar la toxina, lo que determina que la bacteria es más patógena. La temperatura también puede

actuar de manera indirecta, puesto que un aumento nocturno de esta, aumenta la respiración en las plantas, incrementando la utilización de productos fotosintéticos, predisponiendo la planta al ataque de *Burkholderia* spp (Gañán, 2011).

La humedad relativa favorece el desarrollo de la enfermedad, Tsushima (1996) determinó que la incidencia de la enfermedad fue mayor bajo condiciones de humedad relativa alta (HR>95%) y menor cuando las plantas no fueron incubadas en cámara húmeda.

### **3.3.2. Transmisión de *Burkholderia* spp**

Las especies del género *Burkholderia* spp que afectan las panículas de arroz son *B. gladiolii*, *B. plantarii* y *B. glumae*, que se diseminan principalmente por semilla infectada facilitando la transmisión en otras regiones y países debido a la exportación e importación de la misma, además se dispersa por salpicadura, viento durante la lluvia y por contacto entre panículas, (Gañán, 2011). Estas bacterias invaden las semillas germinadas, inhabilitan las raíces y las vainas inferiores; empieza a crecer sobre la planta como un organismo epífita (Quesada-González y García-Santamaría, 2014).

Según Tsushima (1996) el período de mayor susceptibilidad de las espiguillas es de aproximadamente tres a cuatro días después de la emergencia de panícula. Luego que el patógeno invade las espiguillas, se multiplica rápidamente, estableciendo focos de infección en el campo que van a ser fuente de infecciones secundarias.

### **3.4. Sintomatología de *Burkholderia* spp**

El añublo bacterial causado por *B. glumae* provoca que las panículas se mantengan verdes, sin lesiones ni decoloración, las flores afectadas detienen su crecimiento o son abortadas; el estado más crítico de la enfermedad se presenta cuando emerge la panícula, altas densidades de la bacteria genera la producción de la toxoflavina, que genera peróxido de hidrógeno provocando daño tisular y obstrucción de los haces vasculares (reduce el crecimiento del follaje) en las plantas de arroz, impidiendo la llegada de monosacáridos y disacáridos esenciales para la formación del almidón en la panícula, dificultandola formación del grano (Quesada-González y García-Santamaría, 2014).

*B. gladiolii*, en algunos casos es responsable del Añublo bacterial de la panícula, ya que produce que los granos tomen tonalidades verdes hasta pasar a un tono café oscuro antes de secarse, sin

embargo, es aislada con menos frecuencia y es menos virulenta que *B. glumae*, aunque causan síntomas similares, la severidad de *B. glumae* es mayor produciendo hasta 90% de vaneamiento de grano (Quinaloa, 2016).

*Burkholderia plantarii* es un patógeno que causa el tizón de las plántulas de arroz; que produce la sustancia conocida como tropolona, el tizón producido por *B. plantarii* se evidencia por la clorosis que ocurre en la parte basal de las hojas, seguida por el pardeamiento y marchitamiento de las plántulas, pero nunca se pudre (Solis *et al.*, 2006).

### **3.5. Reportes de *Burkholderia* spp en Nicaragua**

El agente causal del añublo bacterial de la panícula de arroz fue reportada en Nicaragua en el año 2009 provocando grandes pérdidas económicas a productores del grano, por lo que este problema infeccioso amerita un abordaje integral para evitar un impacto en la productividad nacional (Quesada-González y García-Santamaría, 2014).

Según Sotelo (2014) en el año 2010 la Asociación Nacional de Arroceros de Nicaragua (ANAR), advirtió sobre la presencia de la bacteria en sus campos arroceros y expresaron su preocupación por los bajos rendimientos; en Nicaragua se conoce de afectaciones causadas por la bacteria, sin embargo, no se ha estudiado su distribución y pérdidas económicas, tampoco existen reportes de las cepas que atacan las diferentes zonas arroceras.

En base a la experiencia que han tenido los países que actualmente están manejando esta enfermedad, 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 de la enfermedad (Moreira, 2017).

### **3.6. Métodos de identificación convencionales de *Burkholderia* spp**

#### **3.6.1. Aislamiento**

Esta práctica se basa en el método de aislamiento de un microorganismo encontrado en su hábitat a partir de una muestra de tejido vegetal o suelo. Tiene como objetivo purificar el organismo de interés utilizando técnicas convencionales tales como la utilización de medios artificiales que facilitan el crecimiento y desarrollo, el cual brindará información para la posterior identificación mediante características morfológicas (Antonio, 2015).

### **3.6.2. Tinción Gram**

Es definida como una Tinción diferencial, ya que utiliza colorantes para clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas; las bacterias Gram positivas se observan de color azul oscuro a morado, mientras que las Gram negativas se observan de color rosa a rojo. La respuesta de la tinsión se debe a las propiedades químicas de la bacteria (López-Jácome *et al.*, 2014).

### **3.6.3. Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas permiten determinar algunas características metabólicas de las bacterias siendo esto base para su identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas y algunas lentas, ya que evalúan la presencia de una enzima mediante prácticas de carbohidratos, catalasa, oxidasa, entre otras (López-Jácome *et al.*, 2014).

## **3.7. Técnicas moleculares**

### **3.7.1. PCR punto final**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia objetivo es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **3.7.2. PCR tiempo real**

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores en 1992, desde entonces el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Ubicación del estudio

Para la identificación al agente causal del vaneado de la panícula de arroz, se colectaron muestras de panículas de arroz en zonas arroceras, las que fueron procesadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicado en el km 12 carretera norte, Managua.

### 4.2. Colecta de muestras

Las muestras de panículas, fueron tomadas de la finca Virginia (12°52'53" N 86°07'43" W) y del Centro Experimental TAINIC (12°47'59" N 86°09'40" W) del municipio de Sébaco, Matagalpa que poseen suelos francos arcillosos ricos en materia orgánica y con poco drenaje una altitud de 480 msnm con climas secos y temperaturas de 23°C-25°C; también se colectaron muestras de Agrícola Miramontes ubicada en San Lorenzo, Boaco y finca La Doña en el municipio de Malacatoya; se realizaron muestreos dirigidos, las muestras fueron tomadas en las primeras horas de la mañana y se trasladaron al laboratorio de microbiología para el aislamiento de *Burkholderia* spp.

Se realizó la identificación y aislamiento de *Burkholderia* spp a partir de muestras de panículas con síntomas de la enfermedad, recolectadas en campo (Cuadro 1). Las fincas muestreadas contaban con el cultivo en la etapa de pre-cosecha y cosecha. Se colectaron las muestras que presentaban síntomas como la presencia de panículas café, decolorada o vaneadas (Quesada-González y García-Santamaría, 2014).

Se introdujeron las panículas en bolsas plásticas, se rotularon y fueron trasladadas en un termo al laboratorio de microbiología donde se realizó el procesamiento.

Cuadro 1. Sitios de colectas de muestras en fincas productoras de arroz

Lugar de Colecta	Nombre de la finca	No de muestras
Sébaco, Matagalpa	Virginia	5
Sébaco, Matagalpa	Centro experimental TAINIC	7
San Lorenzo, Boaco	Agrícola Miramontes	6
Malacatoya, Granada	La Doña	4

### 4.3. Aislamiento de *Burkholderia* spp

Se tomaron granos de arroz con síntomas (0.5g), se desinfectó con alcohol al 70% por un minuto y se enjuagó con agua destilada sobre un vidrio reloj; se dejó secar sobre papel toalla. Posteriormente se colocaron en morteros para macerarlas con 10 ml de agua destilada estéril; con la punta de un aza se tomó una pequeña muestra del macerado y se realizó rayado en cuatro cuadrantes en platos Petri con medio de cultivo King B (KB), para observar el crecimiento de las colonias (circulares y convexas de color amarillento con halos blanquecinos) observadas a las 24 a 48 horas a temperatura de 32°C (Quesada-González y García-Santamaría, 2014).

Las bacterias sospechosas de *Burkholderia* spp fueron reaisladas en medios de cultivo KB para obtener colonias puras.

### 4.4. Identificación mediante pruebas fenotípicas

Posterior al crecimiento de las colonias bacterianas en medio de cultivo KB se realizaron pruebas fenotípicas de crecimiento a pH 4, crecimiento a 40°C, crecimiento en 3% de NaCl, la técnica de Tinción Gram y bioquímica de hidrólisis de gelatina, observación de pigmentos en medios de cultivo KB y la utilización de carbohidratos adonitol y sacarosa (Schaad *et al.*, 2001) (Cuadro 2)

Cuadro 2. Características usadas en la identificación de especies de *Burkholderia* spp.

Especies de <i>Burkholderia</i>	Pruebas bioquímicas				Carbohidratos	
	C. 40°C	C. 3% NaCl	C. pH 4	H. de gelatina	Adonitol	Sacarosa
<i>andropogonis</i>	-	ND	ND	+	+	-
<i>gladiolii</i> pv <i>agaricico</i>	ND	ND	+	+	+	+
<i>caryophyllii</i>	+	-	-	-	+	+
<i>glumae</i>	+	+	-	+	+	-
<i>gladiolii</i>	+	-	+	V	+	V
<i>plantarii</i>	+	-	+	+	-	V
<i>cepacia</i>	+	V	+	-	+	+

+: Reacción positiva, -: Reacción negativa, ND: No Determinado, V: Entre 21-79% de aislados positivos, C. 40°C: Crecimiento a 40°C, C. 3% NaCl: Crecimiento en cloruro de sodio al 3%, C. pH 4: Crecimiento en pH 4, H de gelatina: Hidrólisis de gelatina (Schaad, 2001).



#### 4.5. Identificación molecular de *Burkholderia* spp a partir de ADN bacteriano

La extracción de ADN de los aislados bacterianos se realizó con el protocolo Doyle & Doyle, (1987); para tejido vegetal que consiste en adicionar 500 µl de solución de lisis e incubar a 65°C en el baño maría durante 30 minutos, posteriormente se adicionó 3 µl de RNasa para ser incubado a 37°C por 30 minutos, luego se le agregó 200 µl de solución precipitante para incubar en hielo por cinco minutos, después se procedió a centrifugar a 13 000 rpm por tres minutos, se transfirió el sobrenadante en un vial de 1.5 ml y se le adicionó 600 µl de Isopropanol se incubó en hielo por cinco minutos y centrifugó a 13 000 rpm por dos minutos, se procedió a desechar el sobrenadante y adicionar 200 µl de etanol al 70% y centrifugar a 10 500 rpm durante cinco minutos; se dejó secar sobre papel toalla y se hidrató con 50 µl de agua libre de nucleasa (Takeuchi *et al.*, 1997).

#### 4.6. Amplificación por técnica PCR punto final

La amplificación de la PCR se realizó con cebadores GL13f (<sup>3'</sup>ACACGGAACACCTGGGTA<sup>5'</sup>) y GL 14r (<sup>5'</sup>5TCGCTCTCCCGAAGAGAT<sup>3'</sup>) para *B. glumae*; el programa utilizado fue de 94°C por 2.5 minutos (desnaturalización inicial), seguido de 35 ciclos a 94°C por un minuto (desnaturalización), 60°C por un minuto (anillamiento), 72°C por dos minutos (extensión), 72°C por cinco minutos (extensión final), finalizando el programa a 4°C por diez minutos (Takeuchi *et al.*, 1997).

Se utilizaron cebadores específicos como Fglu <sup>3'</sup>GAAGTGTCGCCGATGGAG<sup>5'</sup> y Rglu <sup>5'</sup>CCTTCACCGACAGCACGCAT<sup>3'</sup> para *B. glumae*, Fpla <sup>3'</sup>TCGAGCTGGCTGCGCCTC<sup>5'</sup> y Rpla <sup>5'</sup>GTCGTCGCCCGAGGTCTCG<sup>3'</sup> para *B. plantarii*, y Fgla <sup>3'</sup>CTGCGCCTGGTGGTGAAG<sup>5'</sup> y Rgla CCGTCCCGCTGCGGAATA para *B. gladiolii*, cada uno en un volumen final de 25 µl que contenía master mix 12.5 µl, cebadores delantero y reverso 1µl respectivamente, DNA 0.5 µl y 10 µl de agua libre de nucleasa. Los productos PCR se amplificaron en un termociclador (Eppendorf); para *B. plantarii* fue 94°C por tres minutos (desnaturalización inicial), seguido de cuarenta ciclos a 94°C por 45 segundos (desnaturalización), 57.3°C por 45 segundos (anillamiento), 72°C por un minuto (extensión) y 72°C por siete minutos (extensión final), finalizando el programa a 4°C por 10 minutos (enfriamiento); para *B. gladiolii* fue 94°C por tres minutos (desnaturalización inicial), seguido de cuarenta ciclos a 94°C por 45 segundos (desnaturalización), 54.7°C por 45 segundos

(anillamiento), 72°C por un minuto (extensión) y 72°C por siete minutos (extensión final), finalizando el programa a 4°C por 10 minutos (enfriamiento). Los productos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.6% teñidos con gel red, en donde la amplificación de un fragmento de tamaño de 597 pares de bases (pb) se considera positivo para *B. plantarii*, 479pb para *B. gladiolii* y 529 pb para *B. glumae* (Maeda *et al.*, 2006).

#### **4.7. Variables evaluadas**

En el desarrollo de la investigación se evaluaron variables sobre:

**Identificación morfológica:** Forma de las colonias y el color característico en el medio de cultivo King B.

**Pruebas bioquímicas:** Se evaluaron las reacciones de las colonias en bases de carbohidratos (sacarosa, adonitol), y crecimiento en pH 4, crecimiento en 3% de NaCl, crecimiento a 40°C e hidrolisis de gelatina.

**Número de especies identificables mediante la técnica PCR.** Presencia de *Burkholderia* spp en muestras de panículas de arroz colectadas.

#### **4.8. Análisis de datos**

Se realizó un análisis semi-cuantitativo no experimental descriptivo de corte transversal donde se determinó la frecuencia de aparición de la bacteria, los datos fueron ingresados a una hoja de cálculos Excel 2016.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Identificación fenotípica de *Burkholderia* spp

A partir de las muestras de panículas de arroz se obtuvo 18 aislados de *B. gladiolii* que presentaron colonias de color amarillo, de forma convexa y mucoide, con la presencia del pigmento difusible (Figura 1), y manifestaron reacciones positivas a las pruebas de crecimiento a 40°C, crecimiento pH 4, hidrolisis de gelatina y crecimiento en NaCl<sub>2</sub>, reacciones negativas a sacarosa y adonitol positivo; y dos aislados de *B. plantarii* con colonias de color amarillo, translúcidas, de forma convexa que manifestaron reacciones positivas a las pruebas de sacarosa, crecimiento a 40°C, hidrolisis de gelatina, crecimiento en NaCl<sub>2</sub> y negativo a adonitol; con crecimiento pH 4 negativo (Cuadro 3). Se encontró un aislado de *B. cepacia* la cual presentó colonias no fluorescentes de color blanco, mucoide con reacciones positivas a sacarosa, adonitol, crecimiento pH 4, crecimiento en NaCl<sub>2</sub>, crecimiento a 40°C e hidrolisis de gelatina. Por otro lado, los aislados sospechosos de *B. glumae* no manifestaron las reacciones para determinar su presencia en las muestras de panículas de arroz.

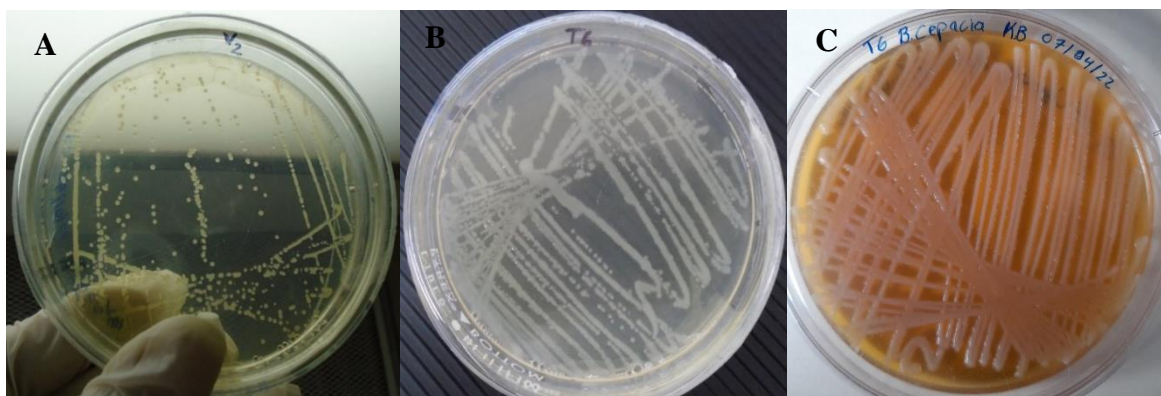


Figura 1. Aislados de *B. gladiolii* (A), *B. plantarii* (B) y *B. cepacia* (C) a partir de panículas de arroz en medio de cultivo KB.

Sotelo, (2014) afirma que las colonias de *B. glumae* son de color blanco grisáceo o amarillento, fluorescente debido a la producción de la Fitotoxina toxoflavina, Moreira (2014) en su investigación caracteriza las colonias de *B. glumae* y *B. gladiolii* de color blanco grisáceo o amarillento, mucoide y de forma convexa debido a la producción de la fitotoxina toxoflavina, considerado un importante factor de virulencia para causar pudrición, reduce el crecimiento de hojas y raíces de plántulas de arroz, son pectolíticas y capaces de inducir la reacción de hipersensibilidad en las hojas de tabaco. *B. glumae* y *B. gladiolii* presentan síntomas y

características en común como la producción de toxoflavina, la pigmentación de las colonias entre otras; pero su diferencia está en que *B. glumae* es más virulenta y agresiva en comparación con *B. gladiolii*.

Cuadro 3. Resultados de Pruebas bioquímicas en especies de *Burkholderia* spp aisladas de panículas de arroz.

Código	Sac	Ado	C. 40°C	C. pH 4	C. NaCl <sub>2</sub>	H. Gel	Bacteria identificada
D <sub>1</sub> I	-	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>1</sub> II	-	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>3</sub> II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>3</sub> II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>4</sub> II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>1</sub> II	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>4</sub> II	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>1</sub> II	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>2</sub> II	-	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>2</sub> I	-	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>6</sub> II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>3</sub> I	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>2</sub> I	-	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>5</sub> II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
V <sub>1</sub> II	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
T <sub>6</sub>	+	+	+	-	+	+	<i>B. plantarii</i>
T <sub>2</sub>	-	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
T <sub>5</sub>	-	+	+	-	+	+	<i>B. plantarii</i>
V <sub>5</sub>	-	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
V <sub>2</sub>		+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
T <sub>6</sub> Col-2	+	+	+	+	+	-	<i>B. cepacia</i>

Sac: Sacarosa, Ado: Adonitol, C.40°C: Crecimiento a 40°C, C. pH 4: Crecimiento en pH 4, C. 3%NaCl: Crecimiento en cloruro de sodio al 3%, H. gel: Reacción en Hidrolisis de gelatina, M: Miramonte, D: finca la Doña, T: TAINIC, V: Finca Virginia, 1,2,3...: numero de muestra, I, II, III...: numero de placa, Col: colonia.

Azegami *et al.*, (1987) aisló y reportó a *B. plantarii* como la causante del tizón de las plántulas de arroz y la cual estaba clasificada como *Pseudomonas plantarii* en 1987. Urakami *et al.*, (1994) comprobó que *B. plantarii* está estrechamente relacionada con *B. glumae*, que es un

importante patógeno del arroz que ya que produce la sustancia conocida como tropolona; sin embargo *B. plantarii* se caracteriza por provocar clorosis en la parte basal de las hojas, seguido del pardeamiento y marchitamiento de las plantas, pero estas no se pudren. A pesar de que existe información de esta especie no se han informado de estudios genéticos y moleculares sobre la virulencia de esta sobre las plantas de arroz.

Araque (2008), afirma que *B. cepacia* pertenece al grupo de báculos aerobio no fermentadores, aerobio; cuya temperatura óptima de crecimiento es de 30°C a 35°C. Crece en medios de cultivo generales como: agar nutritivo y en medios selectivos como agar MacConkey y agar KB. Es no fluorescente de color verde-amarillenta, y pigmentos de color marrón, rojo o púrpura. Estos pigmentos no se difunden hacia la superficie del medio de cultivo, están solo presentes en las colonias.

## **5.2. Identificación molecular de *Burkholderia* spp**

Los 18 aislados identificados como *B. gladiolii* mediante pruebas bioquímicas, fueron sometidos a la técnica PCR, para su confirmación obteniendo como resultado 18 muestras positivas con tamaños de fragmentos de 479 pb (Figura 2, Anexo 4). En el caso de dos aislados identificados con pruebas bioquímicas como *B. plantarii*, en la técnica PCR el resultado fue positivo con amplificación de fragmentos de tamaño aproximado de 597 pb (Figura 3, Anexo 4)

Los resultados de esta investigación sugieren que la identificación por pruebas fenotípicas continúa siendo útiles para la identificación de patógenos, aunque demandan mayor tiempo para la obtención de resultados a diferencia de la PCR que los resultados son obtenidos en menor tiempo, pero requiere mayor inversión económica. Los aislados de *B. gladiolii* fueron identificadas por pruebas fenotípicas y técnica PCR en las cuatro fincas donde se realizó la colecta de panículas de arroz (Centro experimental TAI-NIC, Virginia, La Doña y Agrícola Miramontes), mientras que *B. plantarii* fue colectada únicamente en dos muestras del Centro experimental TAI-NIC (Anexo 4).

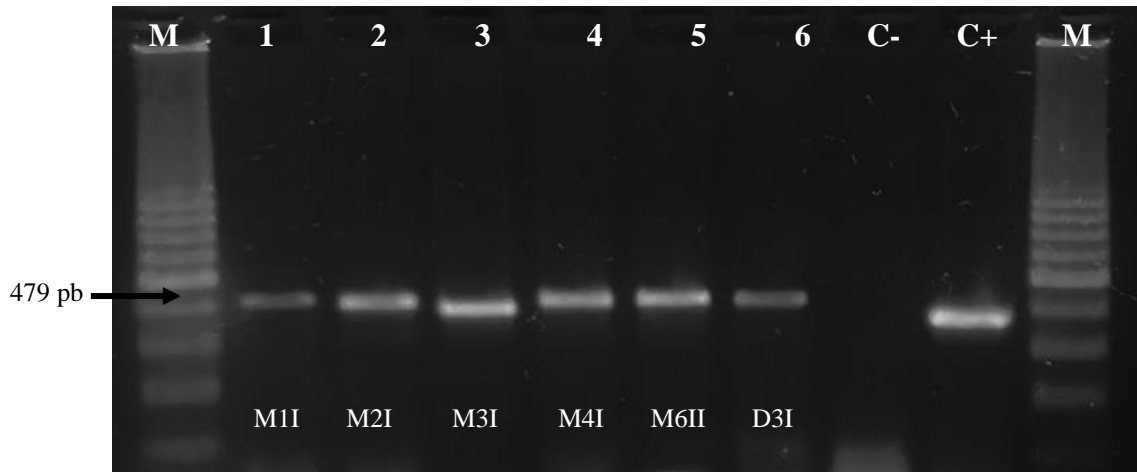


Figura 2. Amplificación de *B. gladiolii* a partir de colonias bacterianas aisladas de panículas de arroz. M: Marcador de peso molecular de 100pb, 1-6: muestras positivas para *B. gladiolii*, C-: Control negativo, C+: Muestra control positivo.

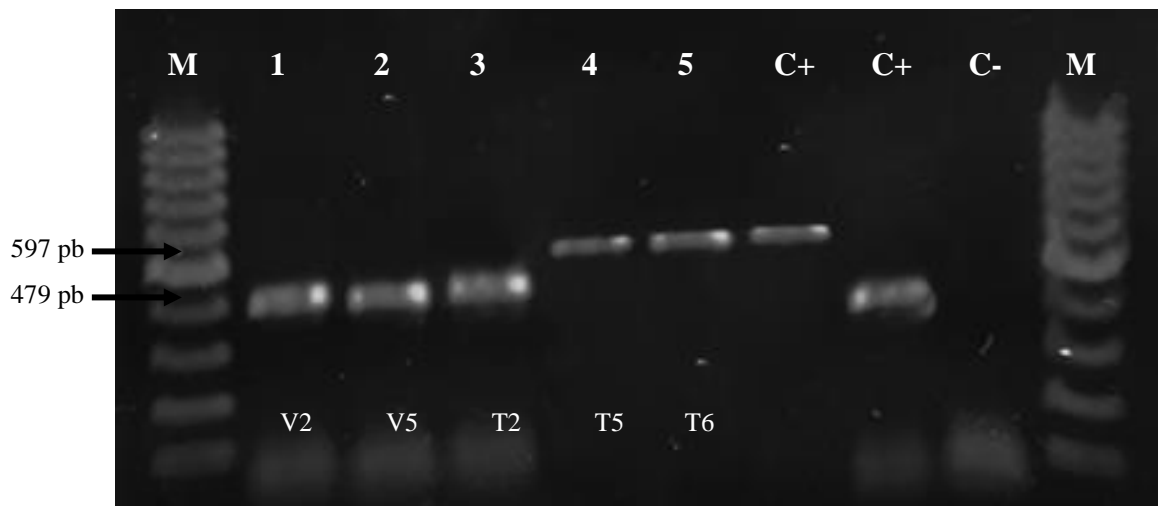


Figura 3. Amplificación de *B. gladiolii* y *B. plantarii* a partir de colonias bacterianas aisladas de panículas de arroz. M: Marcador de peso molecular de 100pb, 1-3: muestras positivas para *B. gladiolii*, 4-5 muestra positiva para *B. plantarii*, C+: Muestra control positivo *B. plantarii* y *B. gladiolii* y C-: Control negativo.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los de Maeda *et al.*, (2006) donde obtuvieron bandas de 479 pb para *B. gladiolii*, 597 pb para *B. plantarii*. Se conoce muy poco de la ecología y mecanismo de patogenicidad de *B. gladiolii* en las plantas de arroz, además, de la actividad antagónica de *B. gladiolii* sobre *B. glumae* y *B. plantarii* en arroz. Esto nos muestra que conocer de la ecología de *B. gladiolii* facilitaría no solo el desarrollo de sistemas de control,

sino también una comprensión más amplia de la ecología de *B. glumae* y *B. plantarii* en plantas de arroz.

Nandakumar *et al.*, (2009), utilizó cebadores específicos para detectar e identificar *B. glumae* y *B. gladiolii*, los resultados de su investigación demostraron que estas especies bacterianas fitopatógenas, fueron las más importantes y comúnmente aisladas del arroz marchito en panículas recolectados en áreas arroceras del sur de los Estados Unidos.

El añublo bacterial de la panícula de arroz, es una enfermedad que ha adquirido gran importancia, ya que representa una amenaza en la producción de arroz, por esto, es de gran relevancia identificar las especies de *Burkholderia* responsables de enfermedades para poder prevenir la entrada y desarrollo del patógeno en los campos arroceros evitando así la propagación, logrando disminuir las pérdidas económicas en campo.

## VI. CONCLUSIONES

Según características fenotípicas se identificaron las especies de *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia plantarii* y *Burkholderia cepacia*.

Mediante la técnica PCR punto final se confirmó la presencia de *B. gladioli* y *B. plantarii*.



## VII. RECOMENDACIONES

Ampliar el estudio en zonas productoras de arroz de Nicaragua en búsqueda de patógenos causantes de vaneado (*B. gladiolii* y *B. glumae*) y tizón (*B. plantarii*).

Evaluar patogenicidad y virulencia de *B. gladiolii* y *B. plantarii* en variedades de arroz.

Realizar pruebas de sensibilidad a bactericidas de uso agrícola con las especies identificadas.

Evaluar mecanismos de resistencia naturales y adquiridos mediante pruebas fenotípicas y moleculares.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Antonio, A. (2015). *Aislamiento e Identificación de Especies Pertenecientes al Género de Burkholderia sp., en dos Regiones del Estado de Puebla*. [Tesis de Licenciatura, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla].
- Araque, Y. (2008). *Estudio Fenotípico y Molecular del Complejo Burkholderia cepacia y Generos Relacionados*. [Tesis de Doctorado, Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela] [http://bdigital.ula.ve/storage/pdftesis/postgrado/tde\\_arquivos/23/TDE-2011-02-15T20:51:30Z-589/Publico/araqueyasmira.pdf](http://bdigital.ula.ve/storage/pdftesis/postgrado/tde_arquivos/23/TDE-2011-02-15T20:51:30Z-589/Publico/araqueyasmira.pdf)
- Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuch, A., & Fukazawa, C. (1987). *Pseudomonas plantarii sp. nov., the Causal Agent of Rice Seedling Blight*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), p. 475–475. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-475>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA insolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), p. 11–15. [https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)
- Espinosa-Victoria, D., López-Reyes, L., Carcaño-Montiel, M. G., & Serret-López, M. (2020). *The Burkholderia genus: between mutualism and pathogenicity El género Burkholderia: entre el mutualismo y la patogenicidad*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(3), p. 337–359. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2004-5>
- Flóres, N., y Uribe, D. (2011). *Determinación de la Infección de Burkholderia glumae en Semillas de Variedades Comerciales Colombianas de Arroz*. *Facultad Nacional de Agronomía*, 64(2), p. 6093–6104.
- Gañán, L. (2011). *Manejo Integrado del añublo bacterial de la panícula del arroz (Oryza sativa L.) causado por Burkholderia glumae*. Una revisión, *Agronomía Mesoamericana*, 19(2), p. 79–90.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación* (6a. ed.). México D.F.
- López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2014). *Las Tinciones Básicas en el Laboratorio de Microbiología*. *Investigación En Discapacidad*, 3, p. 10–18. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
- Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezaki, T., Vandamme, P., Tsushima, S., & Hikichi, Y. (2006). *Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of Burkholderia plantarii, Burkholderia glumae and Burkholderia gladiolii using gyrB and rpoD sequences*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), 1031–1038. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64184-0>
- Moreira, D. (2014). *Detección de Burkholderia spp Asociadas a Semillas de Arroz Nacionales e Importadas*. [Tesis de Maestría, Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Puerto Alegre, Brasil.]

- Moreira, R. (2017). *Evaluación in vitro de la Eficacia de Bactericidas Sobre la Inhibición del crecimiento de Burkholderia glumae*. [Tesis de Ingeniería, Universidad Nacional Agraria, Managua] <http://repositorio.una.edu.ni/3622/1/tne10s687.pdf>
- Nandakumar, R., Shahjahan, A., Yuan, X., Dickstein, E., Groth, D., Clark, C., Cartwright, R., & Rush, M. (2009). *Burkholderia glumae and B. gladioli cause bacterial panicle blight in rice in the Southern United States*. *Plant Disease*, 93(9), 896-905. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0896>
- Pedraza, D. (2012). *Estado del arte de Burkholderia glumae como Patogeno de Cultivos de arroz (Oryza sativa L.)*. [Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá]
- Quesada-González, A., y García-Santamaría, F. (2014). *Burkholderia glumae en el cultivo de arroz en Costa Rica*. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), p. 371–381. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15452>
- Quinaloa, J. (2016). *Evaluación de la patogenicidad de Burkholderia glumae y Burkholderia gladioli, en semillas, plántula y planta de tres variedades de arroz (Oryza sativa L.)*, [Tesis de Ingeniería, Universidad Central del Ecuador]
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. *Journal of Analytical Psychology*, 50(3), p. 812–814. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8774.2005.00541.x>
- Solis, R., Bertani, I., Degrassi, G., Devescovi, G., & Venturi, V. (2006). *Involvement of quorum sensing and RpoS in rice seedling blight caused by Burkholderia plantarii*. *Microbiol Lett*, 259, p. 106–112. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00254.x>
- Sotelo, C. (2014). *Identificación Molecular de Burkholderia glumae, causante del añublo bacterial, en cinco zonas arroceras de Nicaragua*. [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Agraria, Managua]
- Takeuchi, T., Sawada, H., Suzuki, F., & Matsuda, I. (1997). *Specific Detection of Burkholderia plantarii and Burkholderia glumae by PCR Using Primers Selected from the 16S-23S rDNA Spacer Regions*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 63(6), p. 455–462. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.63.455>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. *Investigación en Discapacidad*, 2, p. 70–78.
- Tsushima, S. (1996). *Epidemiology of bacterial grain rot of rice caused by Pseudomonas glumae*. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 30(2), p. 85–89.
- Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K. I., & Komagata, K. (1994). *Transfer of Pseudomonas plantarii and Pseudomonas glumae to Burkholderia as Burkholderia spp and description of Burkholderia vandii sp. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(2), p. 235–245. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-235>

## IX. ANEXOS

Anexo 1. Colecta de panículas con síntomas de la enfermedad, en finca La Doña



Anexo 2. Daño tisular y obstrucción de los haces vasculares en las plantas de arroz, impidiendo la formación del grano



Anexo 3. Clorosis en la parte basal de las hojas, pardeamiento y marchitamiento de las panículas



Anexo 4. Bacterias identificadas con pruebas bioquímicas y técnicas PCR.

<b>Código</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Bacteria identificada con bioquímica</b>	<b>Bacteria identificada por PCR</b>
D <sub>1</sub> I	Malacatoya, Granada	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>1</sub> II	Malacatoya, Granada	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>3</sub> II	Malacatoya, Granada	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>3</sub> II	Malacatoya, Granada	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>4</sub> II	Malacatoya, Granada	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>1</sub> II	San Lorenzo, Boaco	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>4</sub> II	San Lorenzo, Boaco	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>1</sub> I	San Lorenzo, Boaco	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>2</sub> II	Malacatoya, Granada	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
D <sub>2</sub> I	Malacatoya, Granada	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>6</sub> II	San Lorenzo, Boaco	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>3</sub> I	San Lorenzo, Boaco	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>2</sub> I	San Lorenzo, Boaco	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
M <sub>5</sub> II	San Lorenzo, Boaco	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
V <sub>1</sub> II	Sébaco, Matagalpa	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
T <sub>6</sub>	Sébaco, Matagalpa	<i>B. plantarii</i>	<i>B. plantarii</i>
T <sub>2</sub>	Sébaco, Matagalpa	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
T <sub>5</sub>	Sébaco, Matagalpa	<i>B. plantarii</i>	<i>B. plantarii</i>
V <sub>5</sub>	Sébaco, Matagalpa	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
V <sub>2</sub>	Sébaco, Matagalpa	<i>B. gladiolii</i>	<i>B. gladiolii</i>
T <sub>6</sub> Col-2	Sébaco, Matagalpa	<i>B. cepacia</i>	-----

M: Miramonte, D: finca la Doña, T: TAINIC, V: Finca Virginia, 1,2,3...: numero de muestra, I, II, III...: numero de placa, Col: colonia.