



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Trabajo de Tesis

Fitobacterias identificadas en semillas de maíz (*Zea mays* L.) y su efecto sobre la germinación, Nicaragua 2023

Autor

Br. Samuel Ezequiel Bustos Meza

Asesores

MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

MSc. Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez

Lic. Roger Iván Moreira Centeno

Presentado a la consideración del honorable comité
evaluador como requisito final para optar al grado de
Ingeniero en Sanidad Vegetal

Managua, Nicaragua
Diciembre, 2023

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la decanatura de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero en Sanidad Vegetal

Miembros del Comité Evaluador

(Nombre y apellidos)
Presidente

(Nombre y apellidos)
Secretario

(Nombre y apellidos)
Vocal

Lugar y fecha: Managua, Nicaragua, <día/mes/año>

DEDICATORIA

Va para aquellas personas que me ayudaron a terminar el trabajo, no es necesario escribir nombre, ellos saben quiénes son.

AGRADECIMIENTO

Les agradezco al IPSA y a mis asesores por haberme apoyado en todo ... y a mí por haberme esforzado.

Samuel Ezequiel Bustos Meza.

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Origen del maíz como cultivo	4
3.2 Producción nacional de maíz	4
3.3 Características para la obtención de semilla de calidad	4
3.4 Variedades de maíz producidas en Nicaragua	5
3.5 Enfermedades ocasionadas por bacterias	5
3.5.1 Condiciones agroecológicas para el desarrollo de bacterias en semilla	6
3.6 Bacterias transmisibles por semilla	6
3.6.1 Síntomas de <i>Clavibacter</i> spp en maíz	6
3.6.2 Síntomas de <i>Pseudomonas</i> spp en maíz	7
3.6.3 Síntomas de <i>Erwinia</i> spp en maíz	7
3.6.4 Síntomas de <i>Burkholderia</i> spp en maíz	7
3.7 Métodos de identificación de fitobacterias	7
3.8 Pruebas de patogenicidad	8
3.9 Ensayos de germinación	8
3.10 Estudios realizados de fitobacterias en semillas de maíz	8
IV MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1 Ubicación del estudio	9

4.2	Diseño metodológico	9
4.3	Obtención de muestra	9
4.4	Diseño experimental	10
4.4.1	Aislamiento y purificación de fitobacterias a partir de semilla	10
4.4.2	Identificación de géneros de fitobacterias	11
4.4.3	Pruebas fenotípicas para identificación de especies de fitobacterias	11
4.4.4	Pruebas de patogenicidad	12
4.4.5	Ensayo de germinación	12
4.5	Análisis de datos	13
4.6	Variables evaluadas	13
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5.1	Número de géneros y especies de fitobacterias	14
5.2	Patogenicidad de fitobacterias aisladas	16
5.2.1	Síntomas ocasionados por <i>Burkholderia andropogonis</i>	16
5.2.2	Síntomas ocasionados por <i>Pseudomonas syringae</i>	17
5.3	Identificación de los síntomas observados	18
5.4	Efecto de fitobacterias sobre la germinación	18
VI	CONCLUSIONES	21
VII	RECOMENDACIONES	22
VIII	LITERATURA CITADA	23
IX	ANEXOS	28

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Tabla de pruebas bioquímicas para la identificación de especies de bacterias en maíz	14
2. Resultados de los ensayos de germinación en plántulas de maíz inoculadas con fitobacterias	19

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Sintomatología presentada en plantas de maíz inoculadas con <i>Burkholderia andropogonis</i> . A. Rayado en hojas bajas, B. manchas rojizas en el centro de la hoja, C. rayado longitudinal en las hojas	16
2.	Sintomatología presentada en plantas de maíz inoculadas con <i>Pseudomonas syringae</i> . A. manchas de color blancas en la hoja, B. manchas marrones iniciales en las hojas basales de la planta, C. síntoma avanzado con halo amarillento, D. manchas blancas observadas en partes terminales de la hoja	17
3.	Semillas que pasaron por el proceso de bacterización posterior al ensayo de germinación. A. Semillas inoculadas por <i>Pseudomonas syringae</i> , B. semillas inoculadas por <i>Burkholderia andropogonis</i> C. semillas testigos inoculadas con agua destilada estéril	20

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Medios de cultivos diferenciales y específicos para la identificación de géneros y especies de fitobacterias en el LNDFCS (Schaad <i>et al.</i> , 2001)	28
2.	Pruebas fenotípica rápidas para la identificación de bacterias fitopatógenas (Schaad <i>et al.</i> , 2001)	29
3.	Pruebas fenotípicas para la identificación de géneros de bacterias fitopatógenas (Schaad <i>et al.</i> , 2001)	29
4.	Pruebas fenotípicas para la identificación de especies de <i>pseudomonas</i> spp. (Schaad <i>et al.</i> ,2001)	30
5.	Pruebas fenotípicas para la identificación de especies de <i>Xanthomonas</i> spp (Schaad <i>et al.</i> ,2001)	30
6.	Pruebas fenotípicas para la identificación de especies de <i>Burkholderia</i> spp (Schaad <i>et al.</i> ,2001)	31
7.	Pruebas fenotípicas para la identificación de especies de <i>Erwinia</i> spp (Schaad et al., 2001)	31
8.	Medio O/F reaccionado en el sistema abierto, bacterias con crecimiento aeróbico	32
9.	Daños en las primeras hojas en plántulas de maíz ocasionado por <i>Burkholderia andropogonis</i>	32

RESUMEN

Las fitobacterias presentes en maíz (*Zea mays* L.) generan daños en el desarrollo de las plantas, así como pérdidas económicas al contaminar las semillas y el suelo donde estas se siembren. En Nicaragua se produce principalmente por los pequeños y medianos productores, parte de la producción se destina al comercio y otra en semilla, no obstante, la producción se ve afectada por problemas ocasionados por patógenos, afectando el rendimiento de la cosecha. En esta investigación se describe el efecto de bacterias fitopatógenas durante la germinación en semillas de maíz en Nicaragua. Se utilizaron 50 muestras de semillas proporcionadas por el IPSA provenientes de los departamentos de Managua, Chinandega, Matagalpa y León. En el aislamiento de las bacterias se utilizaron cámaras húmedas, medios de cultivos específicos y diferenciales, pruebas fenotípicas para identificar las especies; además de aplicar los postulados de Koch inoculando 20 plantas por bacteria y un testigo, para la confirmación por sintomatología y posterior aislamiento e identificación. Se realizó un ensayo de germinación utilizando 120 semillas para cada bacteria y un testigo. Se obtuvieron 16 aislados que correspondían a *Burkholderia andropogonis* y uno a *Pseudomonas syringae* que fueron identificados mediante pruebas fenotípicas y postulados de Koch. Se observaron en las plantas inoculadas por *B. andropogonis* manchas en las hojas de colores rojizas castañas y se observó en las plantas inoculadas por *P. syringae* manchas claras de forma elípticas con halos amarillos en la punta de las hojas bajas síntomas característicos de ambas fitobacterias identificadas. Mediante la prueba de germinación se comprobó que estas no inciden en la germinación de las semillas, pero sí en el desarrollo y crecimiento de las plántulas afectando las hojas verdaderas y las raíces.

Palabras clave: postulados, bioquímicas, patogenicidad, bacterias.

ABSTRACT

Phytopathogenic bacteria present in corn (*Zea mays* L.) cause damage to the development and growth of plants, as well as economic losses by contaminating seeds and the soil where they are planted. In Nicaragua it is produced mainly by small and medium producers, part of the production is destined for trade and another part for seed, however, production is affected by problems caused by pathogens, affecting crop yield. This research describes the effect of phytopathogenic bacteria during germination in maize seeds in Nicaragua. Fifty seed samples provided by IPSA from the departments of Managua, Chinandega, Matagalpa, and Leon were used. Wet chambers, specific and differential culture media, phenotypic tests to identify the species were used to isolate the bacteria; in addition to applying Koch's postulates, inoculating 20 plants per bacterium and a control, for confirmation by symptomatology and subsequent isolation and identification. A germination test was carried out using 120 seeds for each bacterium and a control. Sixteen isolates corresponding to *Burkholderia andropogonis* and one to *Pseudomonas syringae* were obtained and identified by phenotypic tests and Koch's postulates. They were observed in the plants and were identified by phenotypic tests and Koch postulates for confirmation. The plants inoculated by *B. andropogonis* showed reddish-brown spots on the leaves and the plants inoculated by *P. syringae* showed clear elliptical spots with yellowish halos on the tips of the lower leaves, characteristic symptoms of both phytopathogenic bacteria identified. The germination test showed that these did not affect seed germination, but did affect seedling development and growth, affecting true leaves and roots.

Keywords: postulates, biochemistry, pathogenicity, bacteria.

I INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es un cereal que se ha usado desde tiempos inmemorables para el consumo humano, sus primeros reportes de consumo se registran en las regiones de América y Asia. Una gran parte de los pueblos del mundo en su dieta diaria consumen maíz como cereal, esto hace indicar su gran importancia en la seguridad alimentaria (Urango, 2018).

El uso del maíz varía según las regiones del planeta y mayoritariamente en la cultura latinoamericana, además proporciona a nivel global lo que se estima que es entre 10 al 20 % de las proteínas consumidas (Ocampo, 2013).

La producción mundial de esta cereal ronda aproximadamente los 958.97 millones de toneladas, en lo que son el maíz blanco y el amarillo a nivel global siendo Estados Unidos el máximo productor, en la región centro americana los países con niveles de producción más altos por hectárea son El Salvador, Honduras y Nicaragua (Orus,2023).

En Nicaragua es uno de los principales cultivos sembrados en su mayoría por productores pequeños específicamente concentrados en las regiones de la costa caribe. El maíz es un cultivo que puede estar en temperaturas que rondan los 24 a 38 °C (Cajina y Moreno 2013).

Debido a que en los últimos años el comercio del grano de maíz ha ido aumentando en el país, también ha aumentado la producción de semillas, esto trae como consecuencia la propagación de enfermedades provocadas por hongos y bacterias, estas últimas se propagan de manera más rápida lo que facilita su permanencia por largos periodos en el suelo y la semilla (Peralta *et al.*, 2021).

Las fitobacterias que afectan maíz principalmente son *Dickeya zea* que afecta los tallos ocasionado pérdidas totales en los cultivos que se ven afectados, además se transmiten por semillas, así como *Xanthomonas translucens* que afecta las hojas, *Clavibacter* spp que se trasmite por semillas y que representa un peligro el ingreso de este patógeno al país, así como *Pseudomonas syringae*, y *Burkholderia andropogonis* patógenos foliares que afectan principalmente en el desarrollo vegetativo y estar en reservorios en el suelo (Pérez *et al.*, 2012; Ocampo, 2013; Navarrete *et al.*, 2014).

Para evitar que fitobacterias en semillas contaminen el suelo y afecten a los productores se debe de cumplir con lo establecido en el RTCA 65.05.53:10 (2010) la cual indica que el material de propagación no debe de superar el 2% la presencia de microorganismo para la certificación fitosanitaria dada por la ONPF (organismo nacional de protección fitosanitaria) del país.

A partir de lo antes mencionado se evaluó el efecto de fitobacterias identificadas sobre la germinación de semillas de maíz en Nicaragua. Lo cual es fundamental para evitar su propagación en los centros de producción, de tal manera que se pueda reducir las pérdidas económicas para los productores de semillas. También es importante conocer el efecto de las bacterias en la capacidad germinativa, emergencia de plántula y el nivel incidencia sobre las semillas.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de fitobacteria identificadas sobre la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) procedentes de áreas productivas de Nicaragua en proceso de certificación.

2.2 Objetivos específicos

Identificar mediante pruebas fenotípicas géneros y especies de fitobacteria aisladas a partir de semillas de maíz.

Realizar pruebas de patogenicidad en plantas de maíz mediante los postulados de Koch, para descripción de sintomatología foliares.

Valorar la germinación de semillas de maíz mediante la inoculación de fitobacterias identificadas.

III MARCO DE REFERENCIA

3.1 Origen del maíz como cultivo

El origen del maíz se estima que tiene aproximadamente entre 7000 a 10,000 años, siendo evidencia las primeras plantas sembradas por agricultores, la prueba más antigua proviene de México donde se encuentra mazorcas con una antigüedad aproximada de al menos 5000 años en cuevas de primitivos. En la región asiática se podría haber generado en regiones del Himalaya entre el cruzamiento de algunas *Coix* spp y andropogóneas probablemente especies *Sorghum* spp, esta hipótesis no ha sido apoyada debido a que se considera que se originó como alimento en el nuevo mundo (Urango, 2018).

3.2 Producción nacional de maíz

El maíz es producido por pequeños productores en distintas zonas del país, en reportes del año 2021 se menciona que la producción fue de aproximadamente de 8.1 millones de quintales, esto representa un incremento del 2% con respecto a años anteriores (Aviles *et al.*, 2021).

Las mayores zonas productoras en el país son, la región atlántica con producción entre el 25 al 35% de lo cosechado, seguido de Jinotepe con alrededor del 10% que equivale al 50% total y el resto se subdivide en los demás departamentos (Aviles *et al.*, 2021).

3.3 Características para la obtención de semilla de calidad

Hay parámetros a considerar al determinar la calidad de la semilla , como lo es la autenticidad de la semilla que deben de ser la variedad y cultivo que se necesita , así como la pureza lo cual significa que no debe de haber presencia de material no deseado y cerciorarse que no contenga material extraño como piedras o restos de plantas (Chávez *et al.*, 2010).

Con la finalidad de mantener la calidad de semilla para su comercio , ésta pasa un proceso de certificación fitosanitaria y etiquetado de venta, debe cumplir con parámetros de pureza que debe mantenerse como máximo al 99% y germinación que debe ser del 80 % como mínimo , dichas características están regidas por RTCA para la exportación (Rodriguez *et al.*, 2008).

Un proceso que se realiza previo al comercio de semilla es el curado, este consiste en la aplicación de un producto antifúngico e insecticida que previene el desarrollo de patógenos que son comunes en el almacenamiento que pueden dañar la capacidad germinativa y a su vez previene la presencia de insectos que pueden dañar el embrión , no obstante la aplicación del producto preventivo no basta, se debe de tener condiciones de almacenamiento optimas cuidando la humedad y temperatura cualquier alteración podría causar la proliferación de plagas y afectar la calidad (Magdaleno-Hernández *et al.*, 2020).

3.4 Variedades de maíz producidas en Nicaragua

Las variedades de maíz que se cultivan en Nicaragua son producidas por el INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria), entre ellas tenemos el H INTA 991 es un híbrido con alta productividad y resistente a enfermedades, H INTA oro doble, un híbrido de ciclo intermedio y alta productividad con alta concentración de aminoácidos, lisina y triptófano, NB6 variedades sintética ciclo intermedio, NB9043 variedad sintética con un alto potencial de rendimiento, NBS es una variedad sintética de ciclo precoz (Ferrufino, 2013).

3.5 Enfermedades ocasionadas por bacterias

Este cultivo es afectado por una gran cantidad de patógenos y en estudios realizados anteriormente menciona una amplia gama de hongos y bacterias estas últimas son de gran relevancia en la que se mencionan según Perotti *et al.*(2005) y otros estudios relacionados en maíz.

Pseudomonas alboprecipitans, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Burkholderia andropogonis*, *Clavibacter michiganensis* sbsp. *nebrakensis* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Navarrete *et al.*, 2014).

Pseudomonas alboprecipitans, causa la enfermedad conocida como podredumbre del tallo, manifestando síntomas con manchado de color blanco que se oscurece (Navarrete *et al.*, 2014).

La mancha bacteriana de la fruta causada *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, se caracteriza por manchas rojizas en la parte central de la hoja, pudrición en los brotes apicales, suelen verse en fases vegetativas jóvenes hasta el desarrollo del cultivo (Hernández y Trujillo 2001).

Burkholderia andropogonis, produce rayas largas, de color rojo en las hojas y también puede afectar las flores causando daños similares los cuales se extienden por toda la hoja ocasionando la necrosis y muerte de la hoja (Navarrete *et al.*, 2014).

Clavibacter michiganensis sbsp. *nebrakensis*, una de las principales características a destacar de esta bacteria es el hecho de ser Gram positiva, además de que el daño se localiza en las hojas, principalmente en las nervaduras, se tiene registro que afecta sorgo, teniendo como hospedero secundario al maíz (Pérez *et al.*, 2012).

La enfermedad causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, se caracteriza por presentar síntomas en la parte terminal de la hoja más baja de la planta son de color verde, a medida que el daño avanza se observan manchas redondas y elípticas de color marrón a blanco (Pérez *et al.*, 2012).

3.5.1 Condiciones agroecológicas para el desarrollo de bacterias en semilla

Las fitobacterias que afecta los tallos y hojas de maíz, necesitan para su desarrollo humedades mayores al 80 % y temperaturas que van desde los 25 a 30°C (Agrios, 1985).

Por lo general el crecimiento bacteriano requiere ciertas condiciones para su desarrollo. A nivel general se puede decir que a altas humedades y temperaturas mayores a los 30 grados son óptimas para su aparición, así como lo es un suelo con un pH de 7 a 7.5 para su sobrevivencia. La prevalencia de las bacterias en semilla dependerá de las condiciones de almacenaje y embalaje de los lotes (Agrios, 1985).

3.6 Bacterias transmisibles por semilla

Según Navarrete *et al.* (2014) menciona en su investigación que las principales bacterias transmitidas en semillas de maíz son: *Xanthomonas translucens*, *Clavibacter* spp, *Pseudomonas syringae*, *Dickeya zea* y *Burkholderia andropogonis*.

3.6.1 Síntomas de *Clavibacter* spp en maíz

Rueda *et al.* (2009), Menciona que esta fitobacteria causa un tizón foliar, donde se pueden ver manchas oscuras y humedecidas con rayas en toda la nervadura de la hoja, los síntomas se notan

a partir de la emergencia del estigma, pueden verse quemaduras en la hoja generalmente en la punta, los exudados bacterianos generados suelen secarse y dar apariencia de brillo en la hoja, estos daños suelen confundirse con estrés por falta de agua.

3.6.2 Síntomas de *Pseudomonas* spp en maíz

Esta bacterias suele afectar tejidos foliares, así como las flores , causando manchas que son circulares y en tonalidades rojizas en las plantas , los cultivos hospederos son varios según la especie como: tomate, arroz y maíz (Sil Palacios, 2015).

3.6.3 Síntomas de *Erwinia* spp en maíz

Según Ordax (2008) describe que la podredumbre bacteriana del maíz se caracteriza por la decoloración de las hojas y nódulos de los tallos se desarrolla rápidamente extendiéndose por las hojas, al momento del avance de la enfermedad se puede llegar a sentir olores desagradables típicos de las *Erwinia* spp, dentro del tallo se puede observar lo que es tejido con síntomas blandos y viscosos, los factores que inciden en su presencia son alta temperatura con humedades relativas elevadas.

3.6.4 Síntomas de *Burkholderia* spp en maíz

Es una enfermedad que afecta a las hojas, así como a los frutos, causa lesiones en las hojas nuevas que suelen ser de forma alargadas y delgadas de un color rojizo opaco que puede tornarse castaño, además si afecta en estadios jóvenes o en plántula llega a detener el crecimiento ocasionando su muerte (Pérez *et al.*, 2012).

3.7 Métodos de identificación de fitobacterias

Entre los métodos de identificación bacteriana existen dos procedimientos que podemos mencionar: genotípicos y fenotípicos. El método común más utilizado, es el convencional por las propiedades químicas y morfológicas que presenta cada grupo de bacterias, haciendo más fácil su identificación. Es importante mencionar el uso de técnicas serológicas para la identificación de patógenos de difícil procesamiento por el método mencionado, de igual manera la aplicación de técnicas PCR, que son utilizadas para aquéllos, cuyo aislamiento y manipulación *in vitro* es casi imposible, siendo uno de los métodos de identificación hasta el

momento aceptado a nivel internacional para los grupos de fitopatógenos considerados fastidiosos. Sin embargo, es válido mencionar que cada metodología utilizada implica un coste diferente por los reactivos que se utilizan en cada uno (Espinal, 2005).

3.8 Pruebas de patogenicidad

Son todos aquellos procedimientos para comprobar la presencia de un patógeno en un hospedero definido, a través de su sintomatología. Algunas fitobacterias suelen tener síntomas característicos en cultivos de preferencias, es válido mencionar que esta prueba es útil para la confirmación del diagnóstico clínico además se utiliza en casos de patógenos que no se tiene mucha información de su comportamiento, especialmente en enfermedades no endémicas presentes en el país. Es un método confirmativo confiable para el diagnóstico, cabe señalar que conjuntamente se puede complementar con la prueba de hipersensibilidad en una especie no hospedera (Cavallini, 1998).

3.9 Ensayos de germinación

La realización de estos ensayos consiste en medir la capacidad que tiene una semilla de poder emerger o su facultativo germinativo, los requerimientos para su ejecución es el uso de sustrato estéril, donde colocar la semilla a analizar, así como hay normativas como los son las normas ISTA (2019) que estipulan el uso de 400 semillas, en sustrato estéril y el periodo establecido para la emergencia de la plántula varía según la especie botánica (Iglesias *et al.*, 2005).

3.10 Estudios realizados de fitobacterias en semillas de maíz

Navarrete *et al* (2014), Ocampo 2013, Maya 2013 y Pérez *et al* (2012) mencionan que las fitobacterias en maíz son principalmente *Dickeya zea* afectando los tallos, seguido de *Pseudomonas syringae* afectando hojas y por últimos de manera ocasional *Burkholderia andropogonis* y *Clavibacter* sp las cuales son transmitida por semillas.

Además mencionan que mayoritariamente este cultivo es afectado por hongos no obstante las bacterias han tomado auge al ser transmitida por semillas y al poder permanecer en el embrión, esto dificulta su manejo, facilita su diseminación y les permite sobrevivir de manera prologada.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

El estudio se desarrolló en el laboratorio de bacteriología, ubicado en el Centro Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Calidad de Semilla, del Instituto Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA). Km 12 ½ c. sur, comarca San José de la Cañada 2 km al noroeste, Managua, en las coordenadas geográficas 12°04'49" N y 86°20'05" W. Otra parte del estudio se realizó en el invernadero del departamento de Protección Agrícola y Forestal (DPAF) de la Universidad Nacional Agraria con coordenadas 12°08'45"N y 86°09'46"W.

4.2 Diseño metodológico

Es una investigación del tipo cualitativa de corte transversal donde se identificó fitobacterias que están presente en semillas de maíz, esta etapa de la investigación se realizó en el laboratorio de bacteriología del LNDFCS. Se utilizó un kg por muestra de semilla del cual se tomaron 100 semillas para montaje de cámaras húmedas ocupando 50 semillas por cada una (utilizando 100 platos Petri) y posteriormente se aisló a partir de exudados bacterianos usando medios de cultivos diferenciales y específicos.

Las pruebas de patogenicidad y germinación se realizaron en el invernadero del DPAF mediante un diseño completamente aleatorizado (DCA). Con 20 plantas por especie de fitobacteria identificada realizando suspensiones bacterianas, además se utilizó un testigo absoluto con el mismo número de repeticiones. Para un total de 60 plantas en el ensayo. Las pruebas de germinación consistieron en 120 semillas por bacteria identificada y un testigo absoluto.

4.3 Obtención de muestra

Se utilizaron 50 muestras de semillas de maíz, las que fueron proporcionadas y codificadas por el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Calidad de Semillas (LNDFCS) del IPSA, provenientes de áreas productivas que se encuentran en proceso de certificación para producción de semillas, distribuidas de la siguiente manera: 17 muestras provenían de Managua, con códigos MG001 al MG017, seis muestras del departamento de Chinandega con codificación de CH001 a CH006, 23 muestras del departamento de León con codificación

LE001 a LE023 y cuatro del departamento de Matagalpa con codificación MT001 a MT004, las que ingresaron al laboratorio de bacteriología (LNDFCS), durante los meses de mayo a julio del 2023.

La codificación se le proporcionó en base al origen del departamento como es el caso: MG para las muestras de Managua, LE para muestras de león, CH para las muestras de Chinandega y MT para las muestras de Matagalpa, el número que se les asignó de acuerdo al orden cronológico que ingresaban al LNDFCS para su análisis.

4.4 Diseño experimental

Para realización esta investigación se trabajó con metodología convencional, proporcionada por el laboratorio de bacteriología del IPSA, usando los medios descritos en las guías que se utilizan para el diagnóstico en el LNDFCS (Anexo 1 y 2).

En la realización de los ensayos de patogenicidad se ocuparon 20 plantas por patógeno identificado y un testigo absoluto y para el ensayo de germinación se utilizó una bandeja de 120 semillas de maíz igualmente por patógeno identificado y un testigo

4.4.1 Aislamiento y purificación de fitobacterias a partir de semilla

La metodología de aislamiento fue descrita por Sosa-Moss *et al.* (1997) que consiste en el lavado de la semilla con agua destilada, para eliminar el tratamiento químico. Agregando hipoclorito de sodio al 1% durante 30 segundos. Se enjuagó la muestra con agua destilada estéril tres veces consecutivas con intervalos de un minuto entre enjuague.

Para la siembra en cámara húmeda de platos Petri (con un diámetro de 150 mm) de la siguiente manera: Se depositó papel filtro en el plato Petri, posteriormente se adicionó agua destilada estéril, hasta obtener una humedad homogénea. Sosa-Moss *et al.* (1997). Se colocaron, con ayuda de una pinza estéril, 50 semillas por plato Petri, para un total de dos cámaras húmedas y 100 semillas por muestra. Se incubaron por un periodo de 48 horas a temperatura de laboratorio, finalizado el tiempo, se procedió a la revisión, mediante el uso de un estereoscopio, para la detección de exudados bacterianos.

En caso de encontrar exudados bacterianos se procedió al aislamiento y purificación, de la siguiente manera:

Con la ayuda de un ansa bacteriológica, se tomó una porción del exudado, para su correspondiente inoculación (rayado) en un medio de cultivo de crecimiento general, Nutriente Agar (NA). Se incubaron los aislados bacterianos a 35°C por 48 horas. Finalizada la incubación, se realizó una prueba de Gram con hidróxido de potasio diluido con agua destilada al 3%, para la determinación de Gram (negativo o positivo). Posteriormente se procedió a transferir a medio de cultivo NA, las muestras bacterianas Gram negativas para su purificación. Se incubaron a 35°C por 48 horas.

4.4.2 Identificación de géneros de fitobacterias

Una vez obtenida las colonias bacterianas purificadas, se procedió a transferir (inocular), a medios de cultivo específicos, aplicando la metodología utilizada por la Sección de bacteriología del LNDFCS y por Schaad *et al.*(2001) que consistieron en: medio YDC (Yeast Dextrose Carbonate) para forma y color de las colonias, oxidasa, crecimiento a 40°C, fluorescencia, crecimiento aeróbico y anaeróbico, medio XA (Anexo. 3).

4.4.3 Pruebas fenotípicas para identificación de especies de fitobacterias

Se usaron las pruebas bioquímicas descritas por Schaad *et al.* (2001) que consisten en: desdoblamiento de fuentes de Carbono, di-hidrólisis de la Arginina, fluorescencia, licuefacción de la gelatina, crecimiento a 40°C, tolerancia al NaCl (3% y 5 %), crecimiento aeróbico y anaeróbico, oxidación- fermentación, oxidasa, reacciones bioquímicas en medio de cultivo como: king KB, Xanthomonas agar XA, Xanthomonas especies SX, medio almidon NAAL , caldo purpura de bromocresol CPB (Anexos 4,5,6 y 7).

Para la inoculación de las pruebas bioquímicas se utilizaron asas bacteriológicas de 3 mm y una ansada por prueba utiliza. En el caso de medios solidos se utilizó en método de rayado por estrías.

4.4.4 Pruebas de patogenicidad

A los 10 DDE (días después de la emergencia), se inocularon 250 µl de la suspensión en el tallo usando el método de punción con una jeringa hipodérmica en cada una de las plantas. Se realizaron observaciones cada 24 horas, hasta la aparición de síntomas en las plantas (Torres-González *et al.*, 2013).

En el ensayo de patogenicidad (postulado de Koch), se utilizaron 20 plantas sanas de maíz sembradas en sustrato estéril para inocular cada fitobacteria aislada y el testigo absoluto, las que fueron inoculadas con suspensiones bacterianas para describir la sintomatología (Suryani *et al.*, 2012; Münch, 2003).

La suspensión bacteriana se preparó usando la escala de McFarland en grado de turbidez 0.5 (de uso comercial que viene lista para su uso). Ésta se preparó en tubos de ensayo hasta un volumen de 10 ml de agua destilada estéril, con ayuda de un asa de tres milímetros se fue agregando el inóculo hasta obtener la turbidez deseada a una concentración de 1×10^8 UFC. Se utilizaron aislados purificados con menos de 48 horas de crecimiento, lo cual asegura su virulencia, (Chellemi *et al.*, 1994; McFarland 1907).

4.4.5 Ensayo de germinación

Para la realización del ensayo de germinación se utilizaron 120 semillas, que se lavaron con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto y tres lavados de agua destilada estéril de 30 segundos cada uno, posteriormente se secó en papel toalla. Se preparó una suspensión de 100 ml de agua destilada estéril con las bacterias identificadas a concentración de 1×10^8 ml (escala de turbidez McFarland 0.5). Se realizó bacterización (método de inoculación de patógenos en semilla) con la suspensión por un tiempo de una hora (Beracochea, 2011; Patandjengi *et al.*, 2021; McFarland, 1907).

Posteriormente se decantó el inóculo y se colocaron las semillas en cámaras húmedas para su germinación, éstas se mantuvieron durante una semana a temperatura ambiente. Se utilizó un testigo absoluto el cual consistió en 120 semillas sin bacterización, únicamente se les aplicó agua destilada estéril (Beracochea, 2011; Patandjengi *et al.*, 2021).

Se utilizaron 120 semillas de acuerdo con los procedimientos del laboratorio de bacteriología de los LNDFCS debido a que los porcentajes de incidencia se miden con base a 100 semillas (Rueda-puentes *et al.*, 2009).

Posteriormente se realizó un cálculo del porcentaje germinación e incidencia de daños en las plantas este se hizo en base a las semillas utilizadas al ser 100 unidades, el total de plántulas emergidas correspondería al porcentaje total de germinación al igual que la total y porcentajes de daños observados.

4.5 Análisis de datos

Se elaboró una base de datos en el software Microsoft Excel para cada una de las variables evaluadas.

Los variables géneros y especies de fitobacterias aisladas, patogenicidad y efecto sobre la germinación, se analizaron con estadística descriptiva y se expresaron mediante figuras y cuadros.

4.6 Variables evaluadas

Número de géneros y especies de fitobacterias: se identificaron los géneros y especies de bacterias mediante el uso de medios de cultivos generales, selectivos y diferenciales y se complementó con pruebas fenotípicas.

Patogenicidad de fitobacterias aisladas: como parte del diagnóstico confirmativo se aplicaron los postulados de Koch para la observación de síntomas presentes en las plantas y de esta manera determinar la coincidencia con lo descrito en la literatura.

Efecto de fitobacterias sobre la germinación: se realizó de manera descriptiva se contabilizó el porcentaje de germinación y síntomas en plántulas.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Número de géneros y especies de fitobacterias

De 50 muestras analizadas en el laboratorio de bacteriología del LNDFCS, 23 presentaron exudados bacterianos, que posteriormente fueron purificados en NA, para luego ser sometidas a pruebas rápidas como: prueba de Gram, oxidasa y catalasa, comprobando que eran fitobacterias.

Solamente 16 aislados bacterianos resultaron ser Gram negativas, oxidasas negativas y catalasas positivas. No hubo reducción de nitratos, ni producción de indol, además se obtuvieron resultados positivos en el medio O/F para reacciones aerobias facultativas (anexo 8), mostrando que todos los aislados crecen en condiciones aeróbica según Garcés de Granada (1996) y a partir de este resultado, se descartó la presencia de *Erwinia* spp. La prueba de Lugol en medio nutritivo enriquecido con almidón (NAAL), no mostró zona de inhibición, indicando la utilización del almidón, descartando la presencia de *Xanthomonas* spp todo esto descrito en la literatura de Schaad *et al.* (2001).

Cuadro 1. Tabla de pruebas bioquímicas para la identificación de especies de fitobacterias en maíz

Códigos (muestras)	Origen	Pruebas bioquímicas											Bacterias identificadas
		Sac	Threa	NaCl3%	Lac	Gel	Sorb	Oxi	Arg	C 40°	O/F	Flue	
MG004	Managua	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
MG012	Managua	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
CH004	Chinandega	+	-	-	-	+	+	-	-	-	±OF ^A	+	<i>Pseudomonas syringae</i>
LE008	León	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
MG008	Managua	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>

MG016	Managua	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
LE005	León	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
MG011	Managua	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
MG002	Managua	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
MG010	Managua	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
LE003	León	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
LE009	León	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
LE020	León	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
LE007	León	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
LE011	León	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>
LE021	León	-	+	-	+	+	+	-	-	-	±OF ^A	-	<i>Burkholderia andropogonis</i>

+ Reacciones positivas; - reacciones negativas; ±OF^A para reacciones positivas en medio O/F en crecimiento aeróbico; Sac: sacarosa; Threa: threalosa; NaCL3%: crecimiento en cloruro de sodio al 3%; Lac: lactosa; Sorb: sorbitol; Oxi: oxidasa; Arg: Arginina di hidrolizada; C40^o: crecimiento a 40 grados Celsius; O/Oxidación, fermentación; Flue: fluorescencia; Gel: licuefacción de la gelatina.

Las colonias en el medio YDC presentaron colores blancos-opacos, características similares a las descrita por Araque *et al.* (2009) y se determinó que todas las muestras a excepción de la CH004 correspondían al género *Burkholderia* spp.

Se determinó mediante pruebas bioquímicas que la bacteria identificada con el código CH004 presentó pigmentos fluorescentes no difusible características similares a la obtenida por Sánchez *et al.* (2017), hidrólisis de la gelatina positivo, desdoblamiento de las fuentes de carbono: sacarosa y sorbitol, di-hidrólisis de la arginina negativo, oxidasa negativa y de acuerdo con

Schaad *et al.* (2001), y García (2015), identifica de manera fenotípica esta fitobacteria que corresponde a *Pseudomonas syringae* (Cuadro 1).

El género *Burkholderia* spp resultó con fluorescencia negativa, para las pruebas de desdoblamiento de fuentes carbono sorbitol, lactosa, threalosa y licuefacción de la gelatina resultados similares a los obtenidos por Gonzales y Santamaría (2014) positiva, oxidasa negativa y sin crecimiento a 40 °C (Cuadro 1). El resultado corresponde a la fitobacterias *Burkholderia andropogonis* según (García y Rodicio 2007; Reyes *et al.*, 2022)

5.2 Patogenicidad de fitobacterias aisladas

5.2.1 Síntomas ocasionados por *Burkholderia andropogonis*

Se encontraron síntomas iniciales en 15 plantas donde se observaron en forma de rayado sobre las hojas bajas (figura 1.A) durante los primeros cinco días después de inoculado, a los nueve días se observó cambio de color hasta llegar a manchas rojizas que fueron más notable al llegar a los 13 días ver (Figura 1, B). Además, en otras plantas inoculadas hubo pérdida de turgencia en las hojas y disminución en el crecimiento comparado con el testigo.

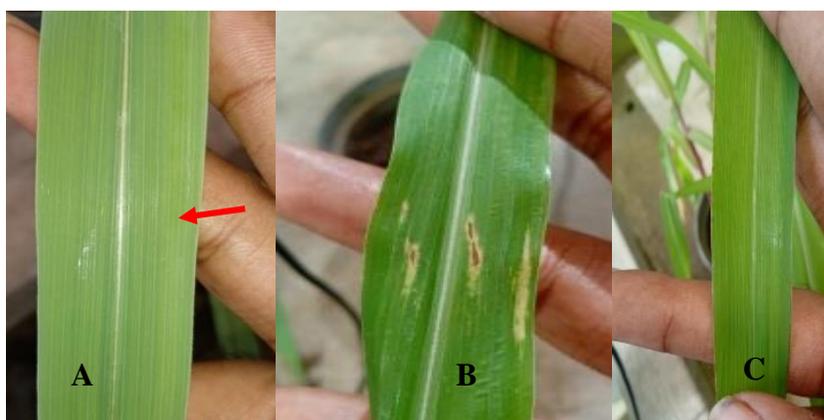


Figura 1. Sintomatología presentada en plantas de maíz inoculadas con *Burkholderia andropogonis*. A. Rayado en hojas bajas, B. manchas rojizas en el centro de la hoja, C. rayado longitudinal en las hojas.

Pérez *et al.* (2012) describe síntomas a lo largo de todas las hojas como coloraciones rojas castañas, que pueden llegar a tener tonalidades amarillas en los bordes y que en estados vegetativo jóvenes de las plantas pueden llegar a detener el crecimiento lo cual coincide con los síntomas encontrados en la prueba de patogenicidad de esta investigación.

Uno de los principales hospederos de *Burkholderia andropogonis* son las gramíneas y entre ellas el maíz, dañando las hojas y crecimiento de las plántulas jóvenes que puede presentarse en la etapa vegetativa principalmente, no obstante, puede dañarse la planta en cualquier momento del ciclo vegetativo (Plazas *et al.*, 2014; De Rossi *et al.*, 2016).

5.2.2 Síntomas ocasionados por *Pseudomonas syringae*

En 12 plantas a los ocho días posteriores al inicio del ensayo se comenzaron a manifestar los primeros síntomas tipo clorosis en las hojas y en la zona de inoculación, a los 10 días se observaron las primeras manchas blancas en las hojas (figura 2. D), a los 13 días se observó pérdida de turgencia acompañada de manchas en las hojas con forma elíptica y un halo amarillento con coloración clara que eran grises a tonos blancos.

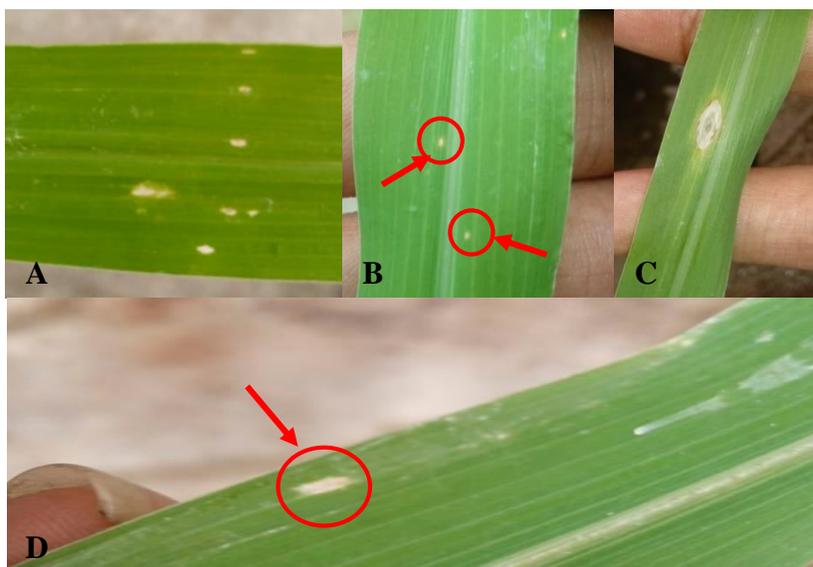


Figura 2. Sintomatología presentada en plantas de maíz inoculadas con *Pseudomonas syringae*. A. manchas de color blancas en la hoja, B. manchas marrones iniciales en las hojas basales de la planta, C. síntoma avanzado con halo amarillento, D. manchas blancas observadas en partes terminales de la hoja.

Sil Palacios (2015) menciona que las manchas ocasionadas por *Pseudomonas syringae* son manchas de color blanco o marrón, con un halo amarillento alrededor de ellas con forma circular o elíptica. De la misma manera en la prueba de patogenicidad realizada en este estudio se encontró el síntoma reportado por la literatura consultada.

Giménez (2017) menciona a *Pseudomonas syringae* como patógeno del maíz, ocasionando síntomas en la parte foliar también, puede permanecer de manera inactiva en todo el ciclo del cultivo actuando de manera saprofita y endófito lo que dificulta su detección, al ser oportunista al haber las condiciones óptimas para su desarrollo se vuelve una bacteria epifita y al ser transmitido por semillas es común detectarlo en las primeras etapas fenológica.

5.3 Identificación de los síntomas observados

Siguiendo los postulados de Koch, de las hojas con síntomas de los patógenos mencionados se procedió a aislar nuevamente en NA, para su purificación y análisis bacteriológico arrojando que todas las bacterias encontradas eran Gram negativas, oxidasa negativa y catalasa positiva.

Las muestras obtenidas de plantas inoculadas con *Pseudomonas syringae*, tuvieron fluorescencia, arginina di-hidrolisis negativa y desdoblamiento de fuentes de carbonos: sacarosa y sorbitol, dando positivo para la fitobacterias mencionada.

Las muestras obtenidas de las plantas inoculadas con *Burkholderia andropogonis*, no presentaron fluorescencia en el medio KB, y en el medio YDC presentaron color blanco opaco y desdoblamiento de fuentes de carbono: sorbitol, lactosa, threalosa y licuefacción de la gelatina, resultando positivo para la fitobacterias mencionada.

5.4 Efecto de fitobacterias sobre la germinación

Después de siete días se observaron las semillas para cuantificar los porcentajes de germinación al realizar el conteo se determinó que en el ensayo las fitobacterias no ejercieron efecto alguno, no obstante, al revisar las plántulas a detalle se notaron síntomas en una gran cantidad de estas que fueron para *Pseudomonas syringae* daños en las raíces acompañado por necrosis y para *Burkholderia andropogonis* manchas en las primeras hojas verdaderas con tonalidades rojizas-castañas y necrosis.

Cuadro 2. Resultados de los ensayos de germinación en semillas de maíz inoculadas con fitobacterias

Bacterias inoculadas	SOEP	PSG
Testigo (ADE)	0	82.5
<i>Burkholderia andropogonis</i>	51	88.3
<i>Pseudomonas syringae</i>	43	76.6

SOEP: Síntomas observados en plántulas; PSG: Porcentaje de semilla germinada.

Los porcentajes de germinación obtenidos en el ensayo fueron: testigo con 82.5%, *B. andropogonis* 88.3% y *P. syringae* 76.6% (cuadro 2), resultados del proceso de bacterización, no hubo disminución en el nivel germinativo, no obstante, el desarrollo de las plantas fue afectadas por la presencia de daños en las raíces y hojas.

De acuerdo con los resultados de las pruebas de germinación, se observó que el nivel germinativo de la semilla no es afectado por las fitobacterias, sin embargo, existen daños en raíces y hojas que afectan el desarrollo y crecimiento de las plantas.

En estudios realizados anteriormente se menciona que ambos patógenos están presentes en suelo y semilla, afectando estados vegetativo jóvenes de las plantas, pero se desconocía si eran capaces de ejercer efecto en la germinación al momento de realizar el ensayo se comprobó que no son capaces de reducir la germinación.

Maya (2013), menciona que las bacterias pueden llegar a la semilla desde que están en campo o antes de la cosecha, estas pueden sobrevivir durante meses. Al sembrarse y en presencia de las condiciones favorables humedad y temperatura optima, esta infectará la planta mas no afectará el poder germinativo corroborando los resultados obtenidos en el ensayo.

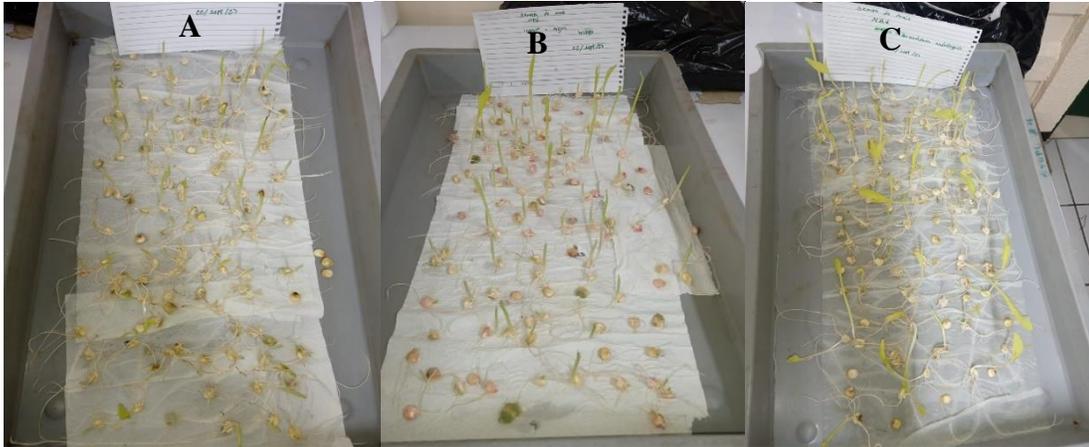


Figura 3. Semillas que pasaron por el proceso de bacterización posterior al ensayo de germinación. A, Semillas inoculadas por *Pseudomonas syringae*, B, semillas inoculadas por *Burkholderia andropogonis*, C, semillas testigos inoculadas con agua destilada estéril.

Stefanova (2009) y Ocampo (2013) menciona que *Pseudomonas syringae* y *Burkholderia andropogonis* se pueden transmitir por escorrentías, salpicaduras y la más común por semilla y que pueden verse en cualquier momento de la etapa vegetativa pero no afecta su poder germinativo, por lo tanto, los síntomas vistos en las plántulas fueron ocasionadas por las fitobacterias al momento de ser expuesta a estas, suelen presentarse posteriores a la emergencia y que no generan daños en la germinación, solo en el desarrollo y crecimientos de las plantas, justamente como se observa en la (Figura 3).

Barret (2016) hace referencia a los microorganismos que afecta a la semilla son amplios y para poder calcular el nivel de afectación por complejos bacterianos se realiza a partir de plántulas emergidas para observar síntomas justamente como realizo en el ensayo para contabilizar la incidencia. Además, el manejo de patógenos de semilla es complejo porque se hospedan en el embrión, por lo tanto, aunque se trate la semilla con algún producto preventivo, las bacterias aparecerán en estadios vegetales iniciales o avanzados (Anexo 9).

VI CONCLUSIONES

Mediante pruebas bioquímicas fenotípicas se identificaron las especies de fitobacterias *Pseudomonas syringae* y *Burkholderia andropogonis* a partir de semillas de maíz.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad mediante postulados de Koch mostraron que los síntomas presentes en las plantas tales como manchas rojizas castañas en las hojas son ocasionados por *Burkholderia andropogonis* y manchas claras elípticas y con bordes amarillos en las hojas bajas son característicos de *Pseudomonas syringae*.

Las bacterias identificadas no inciden en la germinación de las semillas de maíz, pero si en el desarrollo vegetativo de las plántulas.

VII RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar más estudios de patógenos en semillas enfocados en hongos y virus para identificar cuales están presentes en el país y evaluar su incidencia sobre la capacidad germinativa de las semillas, tomando en cuenta las variedades más producidas en el país.

Para un diagnóstico más preciso de las fitobacterias se recomienda la confirmación por PCR, técnica LAMP y ELISA.

VIII LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. (1985). *Fitopatología* ;Limusa, 200-450.
- Araque, Y., Vitelli-Flores, J., Ramírez, A., Alonso, G., & Rodríguez Lemoine, V. (2008). *Identificación bioquímica y PCR especie-específica de cepas de Burkholderia cepacia de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología,* 28(2), 82-88.http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562008000200003&lng=es&tlng=es.
- Aviles, yader A. P., Rodriguez, E., y Bentancourth, G. (2021). *Estudio econométrico sobre el rendimiento productivo de granos básicos en Nicaragua (arroz, maíz y frijol), 2007-2017. Revista de Investigación Sigma,* 8(2), 31-41. <https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/Sigma/article/view/2558>.
- Barret, M., Guimbaud, J. F., Darrasse, A., & Jacques, M. A. (2016). *Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. Molecular plant pathology,* 17(6),791,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6638484/pdf/MPP-17-791.pdf>.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas*, tesis de grado, universidad de la república de Uruguay <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1666/1/uy24-15387.pdf>.
- Cajina, R. C.,y Moreno, R. B. (2013). *Caracterización del Cultivo de Maíz en Nicaragua: Un análisis de Varianza de los Determinantes del Rendimiento*. Documentos de Trabajo, 33,1 40. https://www.bcn.gob.ni/sites/default/files/documentos/DT-33_Documento_final_Caracterizacion_del_maiz.pdf.
- Cavallini, L. F. A. (1998). *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. Editorial Universidad de Costa Rica. <https://acortar.link/nKVlZn>.
- Chávez, E. C., Flores, J. L., Fuentes, Y. M. O., Acevedo, L. G., Badii Zabeth, M. H., y Portugal, V. O. (2010). *Evaluación de aceites y extractos vegetales para el control de Sitophilus zeamais y su efecto en la calidad de semilla de maíz. Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias,* 42(1), 135–145. <https://www.redalyc.org/pdf/3828/382837646009.pdf>.
- Chellemi, D.O, Dankers, H.A, Olson, S.M, Hodge, N.C & Scott, J.W (1994). Evaluating Bacterial Wilt-resistant Tomato Genotypes Using a Regional Approach. *Journal of the American Society for Horticultural Science jashs,* 119 (2), 325-329. <https://doi.org/10.21273/JASHS.119.2.325>.
- De Rossi, R., Guerra, F., Plaza, M. C., Vuletic, E., Brücher, E., Guerra, G., y Magnone, G. (2016). Enfermedades del maíz en las últimas cinco campañas. In Actas resúmenes XXIV Congreso Aapresid-Resiliar. Rosario, Argentina (3).https://www.researchgate.net/profile/roberto-de-rossi-2/publication/310794438_enfermedades_del_maiz_en_las_ultimas_cinco_campanas/links/5836f96b08ae3d91723bb044/enfermedades-del-maiz-en-las-ultimas-cinco-campanas.pdf.

- Espinal, G. (2005). *Manual de prácticas de microbiología I*. INTEC. <https://acortar.link/bsAtqA>.
- Ferrufino Coqueugniot, A. (2013). Catálogo de semillas de granos básicos. Variedades de arroz, frijol, maíz y sorgo liberadas por el INTA. <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/19830/CDNI22028614e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Garcés de Granada, E., Coba de Gutierrez, B., y Castillo, N. I. (1996). Identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/53386/9586281280.PDF?sequence=1&isAllowed=y>.
- Garcia, E. M. F. (2015). *Variabilidade genética e fenotípica de Pseudomonas syringae pv. actinidiae, agente causal do cancro da actinídea, na região do Entre Douro e Minho*. Instituto politecnico de viana dos castelo (Master's thesis) http://repositorio.ipvc.pt/bitstream/20.500.11960/1465/1/Eva_Garcia_13846.pdf.
- Giménez Pecci, M. D. L. P., De Rossi, R. L., Maurino, M. F., Barontini, J. M., Druetta, M., Torrico Ramallo, A. K., Y Laguna, I. G. (2017). *Enfermedades del maíz de siembra tardía causadas por virus, mollicutes y bacterias*. En *Uhart, S (Ed.), El mismo maíz un nuevo desafío* 128-146. Dow Agrosiences, <http://www.maizar.org.ar/documentos/maiztardio/primerocompendio/compendio1.pdf>.
- Gonzales A, J. Rodicio M.R. (2007). *Caída de botón floral en kiwi causada por pseudomonas viridiflava y pseudomonas syringae en el principado de Asturias*. *Boletín de sanidad vegetal y plagas*. (33), 517- 525. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_plagas/bsvp_33_04_517_525.pdf
- González, A. Q., Y Santamaría, F. G. (2014). *Burkholderia glumae en el cultivo de arroz en Costa Rica*. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 371-381. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15452>
- Hernández, Y., y Trujillo, G. (2001). *Detección de bacterias fitopatógenas en semillas de maíz (zea mays L.)*. *Interciencia*, 26 (3), 108-112. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33905404.pdf>.
- Iglesias, M. N. A., Hernanz, A., Soblechero, E., Altisent, J. M. D., y Jiménez, C. (2005). *Las Normas Ista: análisis de pureza*. *Agricultura: Revista agropecuaria y ganadera*, 879, 814-817. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Agri/Agri_2005_879_814_817.pdf.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2019). *International Rules for Seed Testing*. Zürich, Switzerland. 243 p.

- Magdaleno-Hernández, E., Magdaleno- Hernández, A., Mejía-Contreras, A., Martínez-Saldaña, T., Jiménez-Velázquez, M. A., Sánchez-Escudero, J., y García-Cué, J. L. (2020). *Evaluación de la calidad física y fisiológica de semilla de maíz nativo. Agricultura Sociedad y Desarrollo*, 17 (3), 569–581. <https://www.revista-asyd.org/index.php/asyd/article/view/1372/599>.
- Maya, R. N. (2013). *Generalidades de la Transmisión de Bacterias Fitopatógenas por Semillas. Revista Mexicana de fitopatología*, 31. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/suplemento.pdf>.
- McFarland, j. (1907). *El nefelómetro: instrumento para estimar el número de bacterias en suspensiones utilizado para el calculamiento del índice opsonico y para las vacunas. Jama: revista de la asociación médica estadounidense*, 14, 1176- 1178. Doi:10.1001/jama.1907.25320140022001f 10.1001/jama.1907.25320140022001f.
- Münch, R. (2003). *Robert Koch. Microbes and Infection*, 5 (1), 69–74. Doi: 10.1016/s1286-4579(02)00053-9. PMID: 12593975.
- Navarrete, M., Aranda, S., Rodríguez, M. de L., Moya, S., y González, M. (2014). *Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 75–88. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61243856001.pdf>.
- Ocampo, S. A. (2013). *Enfermedades Bacterianas Asociadas a Semillas de Cereales. Revista Mexicana de Fitopatología*, 31, 71-72. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/suplemento.pdf>
- Ordax Ibáñez, M. (2008). *Supervivencia de Erwinia amylovora en condiciones de estrés: influencia de la presencia de cobre y la limitación de nutrientes* [disertación doctoral, Universidad politécnica de valencia], <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/2283/tesisUPV2759.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Orus, A. (15 de febrero 2023). *Ranking de los principales productores de maíz a nivel mundial en 2021*. Statista. <https://es.statista.com/estadisticas/613419/principales-productores-de-maiz-en-el-mundo/>.
- Patandjengi, B., Junaid, M., & Muis, A. (2021). *The presence of bacterial stalk rot disease on corn in Indonesia: A review. Conference series: earth and environmental science*, 911 (1), 1-12, <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/911/1/012058/pdf>.
- Peralta, Y. A. A., Ortega, E. R., y Lagos, G. A. B. (2021). *Estudio econométrico sobre el rendimiento productivo de granos básicos en Nicaragua (arroz, maíz y frijol), 2007-2017. Revista de Investigación SIGMA*, 8 (02), 31-41. <https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/Sigma/article/view/2558>.
- Pérez, R., Díaz, J. C. C., Ruíz, J. A. C., y Hernández, J. A. M. (2012). *Patogenicidad bacteriana en maíz (Zea mays). Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*: (1),1-15. <https://www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/13/11>.

- Perotti, E. B. R., Menéndez, L. T., Gaia, O. E., y Pidello, A. (2005). *Supervivencia de Pseudomonas fluorescens en suelos con diferente contenido de materia orgánica*. *Revista Argentina de Microbiología*, 37 (2), 102–105. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v37n2/v37n2a11.pdf>.
- Plazas, M. C., Vilaró, M. L., Guerra, F. A., De Rossi, R. L., Vuletic, E., Conci, L. R., y Guerra, G. D. (2020). *Bacteriosis foliares del cultivo de maíz en Argentina, investigación, ciencia y universidad*, 3 (4). http://repositorio.umaza.edu.ar/bitstream/handle/00261/1596/ICU%20V3N4%202019_resumen%20p90.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- RTCA 65.05.53:10, (2010). *Requisitos para la producción y comercialización de semilla certificada de granos básicos y soya*. COMIECO-LIX <https://www.ipsa.gob.ni/Portals/0/4%20Sanidad%20Vegetal%20y%20Semillas/Departamento%20de%20Semilla/Normas%20Internacionales/RTCA%20Granos%20Basicos%20y%20Soya%20COMIECO.pdf>
- Reyes, D. V. F., Herrera, N. J. P., Gómez, I. E. S., & Zamora, M. J. R. (2022). *Identificación fenotípica y molecular de Burkholderia spp en panículas de arroz (Oryza sativa L.)*. *La Calera*, 22(39) DOI: <https://doi.org/10.5377/calera.v22i39.15205>
- Rodriguez, I., Guilles, A., y Duran, J. M. (2008). *Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas*. *Revista Agropecuaria*, 78, 836–842. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/37372/1/articulo%20definitivo%20agricultura>.
- Rueda, E. O., Duarte Medina, M., Alvarado Martínez, A. G., García Ortega, A. M., Tarazón Herrera, M. A., Holguín Peña, R. J., Murillo Amador, B., García Hernández, J. L., Flores-Hernández, A., y Orona-Castillo, I. (2009). *Clavibacter michiganensis ssp sepedenicus: una enfermedad bacteriana en el cultivo de papa (Solanum tuberosum L.) en Sonora, México*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10 (2), 169–175. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93912989005>.
- Rueda-Puente, E. O., Villegas-Espinoza, J. A., Gerlach-Barrera, L. E., Tarazón-Herrera, M. A., Murillo-Amador, B., García-Hernández, J. L., ... y Preciado-Rangel, P. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la germinación de Salicornia bigelovii*. *Terra Latinoamericana*, 27(4), 345-354. <https://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v27n4/v27n4a9.pdf>
- Sánchez, M. C., Clemente, G. E., Yommi, A. K., Alippi, A. M., & AdelC, R. (2017). *Detección y caracterización de Pseudomonas patógenas de kiwi en la provincia de Buenos Aires*. In *Congreso Argentino de Fitopatología* (Vol. 4). <https://host170.sedici.unlp.edu.ar/server/api/core/bitstreams/2594236c-4ddb-4c39-b1cc-ea3899fc88b6/content>
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*. In *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society (APS Press), 45-180.
- Sil Palacios, G. (2015). *Caracterización de Pseudomonas sp. asociadas a diferentes variedades de maíz* [tesis de grado, Benemérita, Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/8500>.

- Sosa-Moss, C., Perdomo Roldán, F., Brathwaite, C. W., y Salazar Cruz, J. J. (1997). *Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Diagnóstico fitosanitario II*. IICA Biblioteca Venezuela, 61-98. <https://acortar.link/PlqhYs>.
- Stefanova, M., Sala, P. I. A., Damasceno, J. P., y Marques, A. S. (2009). *Optimización de la recuperación de Pseudomonas syringae pv. tabaci por la modificación de dos medios de cultivo*. *Tropical Plant Pathology*, 34, 178-781. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000300008>.
- Suryani, L., Aini, L. Q., Sugiharto, A. N., & Abadi, A. L. (2012). *Characterization of bacterial pathogen causing wilt and leaf blight on corn (Zea mays) by physiological, biochemical, and molecular methods*. *Agrivita, Journal of Agricultural Science*, 34 (3), 286-295, <https://agrivita.ub.ac.id/index.php/agrivita/article/view/169/572>.
- Torres-González, C., Casas, M., y Díaz Ortiz, J. E. (2013). *Manejo de Ralstonia solanacearum raza 2 a través de productos químicos y biológicos*, 10 (2), 217-223. <http://www.scielo.org.co/pdf/itec/v10n2/v10n2a09.pdf>.
- Urango, L. A. (2018). *Componentes del maíz en la nutrición humana*. Fondo Editorial Biogénesis, 185-209. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/336229/20791758>.

IX ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivos diferenciales y específicos para la identificación de géneros y especies de fitobacterias en el LNDFCS (Schaad *et al.*, 2001).

Medios de Cultivo	Resultados
NA	Medio de crecimiento general. Las colonias bacterianas generalmente son de color blanco lechoso a amarillo claro.
NAAL	Medio usado para comprobar la utilización del almidón. Se complementa con una Solución de yoduro de Lugol.
CNO ₃	Medio líquido utilizado para corroborar el proceso de la reducción de nitratos a nitritos, utilizando el reactivo de Griess.
TZC (II)	La coloración rojiza que sean tenues se tomase como positivas para <i>Ralstonia solanaceraum</i> y las de color rojo fuerte para <i>Pectobacterium caratovororum</i>
LOGAN	Los colores que van de rosado a rojo purpura son positivos para <i>Pectobacterium caratovororum</i> , de rosado a rojo purpura para <i>Pectobacterium caratovororum pv. atréptica</i> y el color rojo oscuro para <i>Dickeya chrysanthemi</i>
NSA	Las colonias blanco-lechosas son positivas para las patógenas <i>Pseudomonas fuscovagine</i>
YDC	Las bacterias fitopatógenas crecen de colores que van desde amarillo claro a opaco, siendo más notable en el género <i>Xanthomonas</i> spp
GYCA	Para la observación de pigmentación en <i>Xanthomonas</i> spp. Incubar a 35 C por 7 días. el aparecimiento de una pigmentación de color azul se interpreta como positivo
PSDI	Crecimiento de color rojizo es positivos para <i>Pectobacterium carotovora pv. carotovora</i>
KING B	Para comprobación fluorescencia, que es positivo para <i>Pseudomonas syringae</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>
O/F	Comprobación del facultativo de la bacteria
G	Para comprobar la hidrólisis de la gelatina
XA	El cambio del medio de verde musgo a amarillo limón es positivo para el género <i>Xanthomonas</i> spp
SX	Para caracterización de <i>Xanthomonas axonopodis pv axonopodis</i> y otras especies
CPB	Las fitobacterias inoculadas pasadas las 48 horas deben virar el color del medio de purpura a amarillo por el desdoblamiento de la fuente de carbono, si se observa el cambio de color la prueba se considera positiva para corroborar la capacidad de <i>Xanthomonas</i> spp y <i>Pseudomonas</i> spp de realizar la hidrólisis de la gelatina y el almidón
AG	
ARF	Cambio en el color del medio se toma como una reacción positiva
AD	Para ver la arginina di hidrolizada el cambio de color del medio de rojo a rosado se considera positivos para cepas del género <i>Pseudomonas</i> spp

Anexo 2. Pruebas fenotípicas rápidas para la identificación de bacterias fitopatógenas (Schaad *et al.*, 2001).

Prueba	Resultados
Oxidasa	El cambio de color a tonalidades azules en menos de 10 segundos se considera positiva
Catalasa	La formación de burbuja a partir del Peróxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂) al 3%, debido a la liberación de oxígeno se considera positiva
Gram	La formación de un halo mucoso por el rompimiento de la pared celular, utilizando Hidróxido de Potasio al 3%, se considera positivo
Lugol	La detección de zonas de inhibición (sin tinción) en un medio que contiene almidón, utilizando una solución de Yoduro de Lugol, se considera positiva
Reducción de NO ₃ a NO ₂	La presencia de un cambio de color en un caldo de Nitratos conteniendo colonias bacterianas, utilizando los reactivos de Griess (Solución A y Solución B), se interpreta como reducción de los nitratos a nitritos.
Indol	La formación de un halo negro en la parte superficial del medio reaccionado (reducción de nitratos), utilizando las gotas reactivas se considera positivos
Fluorescencia	La determinación de pigmentos fluorescentes en cultivos bacterianos inoculados en medio King B se realiza con la ayuda de una lámpara de luz UV.

Anexo 3. pruebas fenotípicas para la identificación de géneros de bacterias fitopatógenas (Schaad *et al.*, 2001).

Pruebas	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Clavibacter</i>	<i>Bacillus</i>
Gram positivas	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Crecen anaeróbicamente	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Crecen aeróbicamente	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Colonias amarillas o naranjas sobre YDC o NBY	-	+	-	-	-	-	+ ^b	-	+	-
Colonias mucoides sobre YDC a 30 C	-	-	+	-	+	-	+	+	+	N
Pigmentos fluorescentes sobre KB	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Crecen a 40 grados Celsius	-	V	+	-	-	+	-	-	-	+
Oxidasa	-	-	+	-	+	+	-	+	-	V

Anexo 4. Pruebas fenotípicas para la identificación de especies de *Pseudomonas* spp (Schaad *et al.*, 2001).

Pruebas	<i>P. marginalis</i>	<i>P. tolaasi</i>	<i>P. agarici</i>	<i>P. cichorri</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. savastoni</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. fuscovagina</i>	<i>P. corrugata</i>
Fluorescente difusible	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pigmento no difusible	-	-	-	-	V	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Arginina di hidrolasa	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento a 37 C	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Hidrolisis de gelatina	ND	ND	ND	-	+	-	V	ND	+
Manitol	+	+	+	+	+	-	V	ND	+
Geraniol	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Benzoato	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	+	-	ND	-
Sorbitol	+	+	-	-	+	-	+	ND	-
Threalosa	+	V	-	-	-	+	-	ND	+

Anexo 5. Pruebas fenotípicas para la identificación de especies de *Xanthomonas* spp (Schaad *et al.*, 2001).

Pruebas	<i>X. Campestri</i>	<i>X. Fragariae</i>	<i>X. Albillineans</i>	<i>X. cassavae</i>	<i>X. hyacinthi</i>	<i>X. oryzae</i>	<i>X. pisi</i>	<i>X. translucens</i>
Crecimientos mucoides en YDC	+	+	-	+	+	+	+	+
Crecimiento en 35 grados	+	-	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en SX	+	-	-	-	-	-	+	-
Hidrolisis de almidón	+	+	-	+	+	-	+	+
Digestión de proteínas	+	-	-	+	+	+	+	+
Nucleación loe	-	+	-	-	-	-	-	+
Arabinosa	+	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	-	+	-	-	-	+	-
Melibiosa	V	-	-	-	-	-	+	-

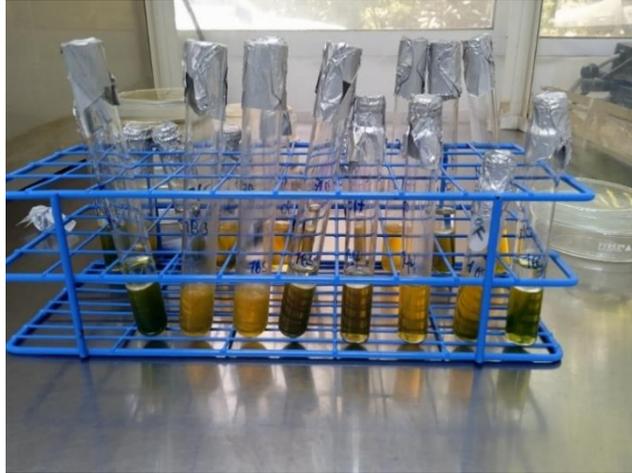
Anexo 6. Pruebas fenotípicas para la identificación de especies de *Burkholderia* spp (Schaad et al., 2001).

Pruebas	<i>B. andropogonis</i>	<i>B. caryophylli</i>	<i>Cepacia</i>	<i>gladioli</i>	<i>Glumae</i>	<i>plantarii</i>
Oxidasa	-	+	+	v	ND	ND
Crecimiento a pH 8	ND	-	+	+	V	-
Crecimiento a 40 grados	-	+	+	+	+	+
Crecimiento en NaCL al 3%	ND	-	V	-	+	-
Arginina di hidrolasa	-	+	-	-	+	V
Hidrolisis de gel	+	-	-	V	+	+
Hidrolisis de almidón	ND	-	-	-	-	-

Anexo 7. Pruebas fenotípicas para la identificación de especies de *Erwinia* spp (Schaad et al., 2001).

Pruebas	<i>E. amylovora</i>	<i>E. allotivora</i>	<i>E. nigrifluens</i>	<i>E. paradisiaca</i>	<i>E. persicinus</i>	<i>E. pyriformis</i>	<i>E. quercina</i>	<i>E. rubrifaciens</i>	<i>E. salicis</i>	<i>E. tracheiphila</i>
Pigmento rosa en YDC	-	-	-	ND	+	ND	-	+	-	-
Crecimiento a 39 C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Prueba de indol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitrato	-	-	-	ND	+	-	-	-	-	-
Licuación de gelatina	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	+	+	+	ND	+	-	+	-
Melibiosa	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Inositol	-	-	+	ND	ND	ND	ND	-	+	ND
L-arabinosa	V	-	+	+	+	+	-	+	-	ND

Anexo 8. Medio O/F reaccionado en el sistema abierto , bacterias con crecimiento aerobico.



Anexo 9. Daños en las primeras hojas en plántulas de maíz ocasionado por *Burkholderia andropogonis*.

