



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSTGRADO EN AGRONOMÍA
TRABAJO DE GRADO



**IDENTIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS
PRESENTES EN EL CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EN PARCELAS
DEL SISTEMA DE RIEGO DEL RÍO GUÁRICO**

Ing. Agro. Luís Gerardo Guillén García
Tutora: Ing. Agro. MSc. Anna G. Maselli

Maracay, Marzo 2012

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de **Magíster**
Scientiarum en Agronomía, orientación Protección Vegetal.

Ing. Agro. MSc. Anna G. Maselli

DEDICATORIA

A mi esposa Neida y a mis hijos Alejandra y Santiago.

A mis padres, hermanos, hermanas, sobrinos, sobrinas y demás familiares....

A todos aquellos que me apoyaron para lograr esta meta.....

AGRADECIMIENTO

A Dios.

A mi familia.

A Anna Maselli por apoyarme no solo para la consecución de esta meta sino también por la formación profesional y su paciencia.

A la Universidad Central de Venezuela y al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas por brindarme las herramientas y permitirme ser cada vez mejor profesional.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado.

Al personal de los laboratorios de Bacteriología y Biotecnología del INIA CENIAP.

A Idelfonso Rodríguez, Rosemary Warnock, José Askue, Luis Alemán, Romel Méndez, Delfín Merchán, Naugira Gil, Miguel Pérez, Zulay Gutiérrez, Fernando Centeno, Carlos Guillén, Miriam Dávila.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el propósito de identificar las bacterias fitopatógenas presentes en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), evaluar las condiciones epidemiológicas que les favorecen en el Sistema de Riego del Río Guárico (SRRG) y posibles controles. Se inspeccionaron parcelas donde se realizaron muestreos de agua, suelo, plantas de arroz en aquellas áreas de las melgas donde se observaron síntomas de bacteriosis, adicionalmente se tomaron muestras de semillas en empresas distribuidoras de las mismas; las bacterias detectadas fueron identificadas mediante pruebas culturales, morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares en el laboratorio de bacteriología vegetal y biotecnología vegetal del INIA-CENIAP. También se evaluaron productos químicos y biológicos *in Vitro* utilizados para determinar su efectividad en el control de las enfermedades bacterianas, además se georeferenciaron en un plano del SRRG las parcelas que resultaron positivas con bacteriosis. La información climática provino de la estación meteorológica del INIA-Calabozo y adicionalmente se instaló una estación automatizada en la parcela 217 del SRRG. La bacteria que causa el problema de bacteriosis fue identificada como *Pantoea agglomerans*, la cual pudo ser aislada de hojas y semillas de arroz, más no se encontró en las muestras de agua ni de suelo. Los síntomas de la enfermedad ocurrieron entre los 55 y 70 días después de sembrado el cultivo. Las condiciones climáticas que prevalecieron cuando apareció la enfermedad fueron temperaturas máximas entre 30,5 y 31,2 °C; temperatura media de 26,2 °C y temperatura mínima entre 21,2 y 21,9 °C; precipitación acumulada de 0,4 mm; humedad relativa entre 80,4 y 85,2 %. El producto EPYPLANT limitó el crecimiento entre 50 y 75 % de los aislamientos evaluados. La bacteria fue ubicada en cinco parcelas del SRRG.

Palabras Clave: Arroz, bacteriosis, epidemiología, *Pantoea agglomerans*, Sistema de Riego Río Guárico

ABSTRACT

This work was carried out with the aims to identify the rice pathogenic bacteria and assess their favorable epidemiological conditions in the Guárico River Irrigation system and its possible control (SRRG). Were inspected the rice crops plots. Were taken water, soil and plant samples in the crops plots with symptoms. Further, were taken the rice seed samples in the distributors. The bacteria's detected were identified by cultural tests, morphological, physiological, biochemical and molecular in the vegetal laboratory bacteriology and biotechnology of the INIA- CENIAP Institution. Also it was assessed the chemical and biological products used in Vitro to determine their effectiveness in the bacterial disease control. The rice crop plots with bacterial positive identification were georeferenced in a Geographical Information Systems (GIS). The climate information was got from the meteorological station of Calabozo (INIA) and also from a automated station that it was installed in the SRRG crop plot 217. The bacterium that causes the problem was identified as *Pantoea agglomerans*, this could be isolated from leaves and seeds rice but not in the water and soil samples. The disease symptoms appear between the 55 and 70 days after the crop sowing. The climate conditions that stimulate at disease are the temperatures between 30.5 and 31.2 °C with the average of 26.2 °C and minimum between 21.2 and 21.9 °C. Accumulated rainfall of 0.4 mm and Relative humidity between 80.4 and 85 % The EPYPLANT product limited the growth of the 50 and 75 % of the bacterium isolated assessment. The bacterium was located on five plots of SRRG.

Keyword: Rice, bacterial, epidemiology, *Pantoea agglomerans*, Guárico River Irrigation System

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Zona de estudio	4
Características climáticas	4
Geomorfología y taxonomía de suelos	5
Ubicación taxonómica del arroz	5
Fases y etapas de desarrollo y crecimiento del arroz	6
Principales enfermedades bacterianas del cultivo del arroz	7
Tizón bacteriano del arroz	7
Síntomas	9
El patógeno	10
Relación del patógeno con otras especies vegetales	14
Efectos del ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad	15
Época del año en la cual la enfermedad es más severa	16
Control químico, físico, biológico, cultural	17
Rayado bacteriano de la hoja del arroz	21
Síntomas	21
El patógeno	22
Relación del patógeno con otras especies vegetales	24
Efectos del ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad	24
Control químico, físico, biológico, cultural	24
Bronceado bacteriano de la palea del arroz	25
Síntomas	25

El patógeno	25
Relación del patógeno con otras especies vegetales	26
Efectos del ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad	27
Otras bacterias que afectan al cultivo del arroz y que podrían ser un peligro potencial	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Muestreo	28
Suelo	28
Agua	28
Plantas de arroz	29
Semillas de arroz	29
Procesamiento de los diferentes tipos de muestras	29
Aislamiento	29
Suelo	29
Agua	30
Hojas de arroz	30
Semillas de arroz	31
Preparación de las suspensión bacteriana	31
Pruebas de patogenicidad	31
Identificación de las bacterias	32
Caracterización cultural	32
Caracterización morfológica	32
Pruebas fisiológicas y bioquímicas	33
Análisis estadístico de la caracterización cultural y las pruebas fisiológicas y bioquímicas	33
Estudios moleculares	34
Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)	34
Condiciones de reacción de la PCR	35
Identificación molecular de la bacteria <i>Pantoea agglomerans</i>	35
Interpretación de los resultados de la PCR	36
Estudios climatológicos y georeferenciación	36

Análisis estadístico de los estudios climatológicos	37
Ensayos de control <i>in Vitro</i> para la evaluación de los productos químicos y biológicos	38
Preparación de la solución bacteriana	38
Evaluación de la potencialidad los productos químicos y biológicos en el control de las bacterias en arroz	38
Análisis estadístico de los ensayos de control <i>in Vitro</i>	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Aislamientos obtenidos	41
Identificación	43
Estudios moleculares	43
Pruebas culturales, fisiológicas y bioquímicas	45
Microscopia electrónica	47
Estudios climatológicos	47
Georeferenciación	55
Ensayo de control <i>in Vitro</i> para la evaluación de los productos químicos y biológicos	57
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro

1	Fases y etapas de crecimiento y desarrollo del arroz	6
2	Características fisiológicas y bioquímicas de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo)	11
3	Características generales del genoma de Xoo	12
4	Genes que confieren resistencia a Xoo causante del tizón bacteriano del arroz	20
5	Comparación entre <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo) y <i>Xanthomonas</i> <i>oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (Xoc)	22
6	Características fisiológicas y bioquímicas de <i>P. agglomerans</i>	26
7	Bacterias que han sido señaladas en el cultivo del arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	27
8	Mezcla de reacción para la PCR	35
9	Nombres comerciales, ingredientes activos (I. A.) y concentraciones de los productos químicos y biológicos usados el ensayo de control <i>In Vitro</i>	39
10	Aislamientos obtenidos durante el ciclo de lluvia 2008	41
11	Aislamientos obtenidos durante el ciclo Norte Verano 2008 – 2009	42
12	Secuencia de los oligonucleótidos de los iniciadores diseñados	43
13	Aislamientos que fueron evaluados en la prueba molecular	44
14	Resumen de variables climatológicas de Calabozo, Edo. Guárico, años 1990-2007	47
15	Resumen de variables climatológicas, Ciclo de producción Norte-Verano 2008-2009	48
16	Parcelas muestreadas en el SRRG durante el ciclo Norte Verano 2008-2009	55
17	Análisis estadístico descriptivo para el diámetro del halo de inhibición en el control de los aislamientos MVV004B, MVV006AA, MVV006AB, con los productos EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA a diferentes dosis	59

18	Análisis estadístico descriptivo para el diámetro del halo de inhibición en el control de los aislamientos MVV006AC, MVV006B, MVV008A, con los productos EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA a diferentes dosis	59
19	Análisis estadístico descriptivo para el diámetro del halo de inhibición en el control de los aislamientos MVV011A, MVV011B, MVV015D, con los productos EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA a diferentes dosis	60
20	Análisis estadístico descriptivo para el diámetro del halo de inhibición en el control de los aislamientos Sem01SDA8, Sem01SDC2, C-PANT 72, con los productos EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA a diferentes dosis	60
21	Análisis de la varianza, del modelo, producto (EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA), dosis y dosis por producto de los aislamientos MVV004B, MVV006AA, MVV006AB, MVV006AC	61
22	Análisis de la varianza, del modelo, producto (EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA), dosis y dosis por producto de los aislamientos MVV006B, MVV008A, MVV011A, MVV011B	61
23	Análisis de la varianza, del modelo, producto (EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA), dosis y dosis por producto de los aislamientos MVV015D, Sem01SDA8, Sem01SDC2, C-PANT72	62
24	Análisis de rangos de medias de Tukey para productos (EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA) en los aislamientos MV004B, MV006AA, MV006AB, MV006AC	63
25	Análisis de rangos de medias de Tukey para productos (EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA) en los aislamientos MV006B, MV008A, MV011A, MV011B	63
26	Análisis de rangos de medias de Tukey para productos (EPYPLANT y SULFATO de ESTREPTOMICINA) en los aislamientos MV015D, Sem01SDA8, Sem01SDC2, C-PANT72	63

LISTA DE FIGURAS

Figura

1	Microfotografía de la célula de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo)	11
2	Especificidad del tejido hospedante de Xoo	13
3	Ciclo de la enfermedad tizón bacteriano del arroz	14
4	Especificidad del tejido hospedante de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. oryzicola (Xoc)	23
5	Ciclo de la enfermedad rayado bacteriano de la hoja de arroz	23
6	Secuencia de oligonucleótidos de la región 16S ARN del aislamiento tipo DSM 3493 de la bacteria <i>Pantoea agglomerans</i>	36
7	Flujodiagrama general de la metodología	40
8	Amplificación de los aislamientos MVV004B (02), MVV006AA (03), MVV006AB (04), MVV006AC (05), MVV006B (06), MVV008A (07), MVV011A (10), MVV011B (11), MVV015D (14), Sem01SDA8 (21), usando el Primer 2a 2b	44
9	Amplificación de los aislamientos Sem01SDC2 (23), C-PANT72 (31), usando el Primer 2a 2b	44
10	Dendrograma de similaridad para las pruebas culturales, fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos evaluados	46
11	Microfotografía de las células bacterianas del aislamiento SEM01SDA8	47
12	Temperaturas, precipitación y humedad relativa de Calabozo, Edo. Guárico, años 1990-2007	50
13	Temperaturas, precipitación y humedad relativa, tomadas en la parcela 217 del SRRG, durante el ciclo de producción Norte - Verano 2008-2009 ...	51
14	Velocidad y dirección del viento, tomadas en la parcela 217 del SRRG, durante el ciclo de producción Norte - Verano 2008-2009	52
15	Normales de temperatura máxima, mínima y media correspondiente a los meses de noviembre a febrero	53
16	Normales de precipitación y humedad relativa correspondiente a los meses de noviembre a febrero	54

17 Sistema de Riego Río Guárico, donde se muestran las parcelas muestreadas y aquellas donde se obtuvieron los aislamientos identificados como <i>Pantoea agglomerans</i>	53
---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo

1	Avance del quemado a partir de los puntos de inoculación	74
2	Caracterización cultural de los aislamientos	74
3	Caracterización morfológica de los aislamientos	75
4	Caracterización fisiológica de los aislamientos	75
5	Caracterización bioquímica de los aislamientos	76
6	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV004B	77
7	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV006AA	77
8	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV006AB	77
9	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV006AC	77
10	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV006B	77
11	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV008A	78
12	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV011A	78
13	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV011B	78
14	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV015D	78
15	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento Sem01SDA8	78
16	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento Sem01SDC2	79
17	Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento C-PANT72	79
18	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV004B	79
19	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV006AA	79
20	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV006AB	79
21	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV006AC	80
22	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV006B	80
23	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV008A	80
24	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV011A	80
25	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV011B	81
26	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV015D	81
27	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento Sem01SDA8	81
28	Prueba de Tukey para Producto del aislamiento Sem01SDC2	81

29 Prueba de Tukey para Producto del aislamiento C-PANT72 82

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cereales más extensamente sembrado en el planeta, tanto de forma intensiva o como cultivo de subsistencia, y constituye el alimento básico de la mitad de la población global. Para el año 2006 se produjo a nivel mundial 644.116.074 toneladas (t), 91 % de ellas en países asiáticos, mientras que en Venezuela la cifra alcanzó las 1.122.870 t, obtenidas en los estados Portuguesa, Guárico, Cojedes y Barinas (FAO, 2008). Sin embargo, su productividad está limitada por diversos factores, entre ellos las enfermedades de origen fúngico, bacteriano y viral.

Las enfermedades de origen fúngico son diversas y algunas de importancia mundial como la Piricularia; sin embargo es importante destacar que las enfermedades de origen bacteriano son de importancia considerable cuando las condiciones de hospedante-patógeno-ambiente son favorables para el desarrollo de las mismas, ocasionando pérdidas totales o parciales del cultivo, como las reportadas en varios países de Asia (Ou, 1985; Mew, 1987; Goto, 1992). En Venezuela ha sido reportada la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* como causante del tizón bacteriano del arroz, ocasionando pérdidas que van hasta el 40 % de la cosecha del cultivo (Lozano, 1977; Trujillo *et al.*, 1999; Guevara y Maselli, 1999). Recientemente ha sido señalada la bacteria *Pantoea agglomaerans* como un nuevo patógeno del arroz, el cual fue aislado a partir de síntomas foliares similares al del tizón bacteriano (González *et al.*, 2003).

En el Sistema de Riego Río Guárico (SRRG) existe preocupación por el problema creciente y confusión a nivel de agricultores y técnicos en relación a la sintomatología característica de las enfermedades causadas por bacterias de los géneros *Xanthomonas* y *Pantoea*, así como de los productos químicos y biológicos con potencial en el control de las bacterias; además hay desconocimiento de las condiciones ambientales que favorecen su desarrollo y posibles hospedantes (Peña y Carrizales, 2007).

Debido a esta problemática se ha planteado como objetivo principal de esta investigación, identificar las bacterias fitopatógenas presentes en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) y evaluar las condiciones epidemiológicas que favorecen su desarrollo en parcelas del SRRG, y obtener posibles controles.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias fitopatógenas presentes en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), evaluar las condiciones epidemiológicas que le favorecen en parcelas del Sistema de Riego del Río Guárico y sus posibles controles.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e identificar mediante estudios morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares las bacterias fitopatógenas presentes en el suelo, agua, semillas y plantas de arroz, durante los ciclos invierno 2008 y norte verano 2.008 - 2.009.
- Determinar la epidemiología que favorecen a las enfermedades bacterianas en el cultivo del arroz.
- Evaluar *in vitro* productos químicos y biológicos utilizados por los agricultores de la zona, para determinar su efectividad en el control de las enfermedades bacterianas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Este capítulo hace referencia a la zona de estudio, sus características climáticas, geomorfología y taxonomía de suelos; la ubicación taxonómica del arroz, las fases y etapas de su desarrollo. También se reseña las principales enfermedades bacterianas del cultivo como el tizón bacteriano, el rayado bacteriano y el bronceado bacteriano de la palea; de ellas se describen sus síntomas, el patógeno que la causa y la relación de éste con otras especies vegetales, condiciones ambientales favorables y control. También se listan otras enfermedades que pueden ser un peligro potencial para el país.

Zona de estudio

El área de estudio comprendió parcelas del Sistema de Riego Río Guárico (SRRG), que se encuentra ubicado al sur de la ciudad de Calabozo en el municipio Francisco de Miranda del estado Guárico, Venezuela.

- **Características climáticas**

La zona presenta precipitaciones que oscilan entre los 1.000 mm y 1.800 mm con un promedio anual de 1.386 mm, con meses secos de noviembre a abril y lluviosos de mayo a octubre. La temperatura media es de 27,8 °C; con una máxima de 33,1 °C y una mínima de 22,6 °C. La humedad relativa promedio anual es de 72 %, y la promedio mensual más baja es de 62 % (Febrero) y la más alta es de 81 % (Julio y Agosto). Los datos climáticos se obtuvieron de la estación meteorológica “Bancos de San Pedro” del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y corresponden a la serie histórica de la estación desde 1.990 hasta el 2.007, exceptuando la humedad relativa cuya serie histórica va desde 1.990 hasta 2.001. El clima del área se clasifica como una zona de vida Bosque seco Tropical (Holdridge, 1.982).

- Geomorfología y taxonomía de suelos

Los suelos del SRRG están situados en la provincia fisiográfica de los Llanos, formando parte de la subregión natural de los Llanos Centrales bajos y medios; está caracterizado por depósitos aluviales provenientes de los ríos Guárico y Tiznado, donde los ríos pueden depositar aluviones en forma de explayamiento en la parte superior de la cuenca y deltaica en la parte baja de la misma (Comerma y Ovalles, 1.987).

Rodríguez y Rico (1.995) indican que los órdenes predominantes en los suelos del SRRG, son: *Inceptisoles*, ubicados en áreas con buen drenaje, con sedimentos más recientes (serie Cachimbo); *Vertisoles*, caracterizados por ser de textura muy pesada, estructura prismática, grietas anchas, profundas y abiertas en algún tiempo del año, ocupando posición de cubeta de decantación, sujetos a inundaciones o estancamientos de aguas prolongadas (series Calabozo y Palmar); *Alfisolos*, también de textura pesada, caracterizados por la presencia de horizonte argílico a profundidad variable, aumento de carbonato de calcio con la profundidad, ubicados al pie de las sabanas altas, sujetos a inundaciones intermitentes. Todos estos suelos tienen pH ácidos o ligeramente ácidos en el estrato superior.

Ubicación taxonómica del arroz

Clase: *Monocotiledóneas*

Origen: *Glumiflorales*

Familia: *Poaceas*

Subfamilia: *Panicoides*

Tribu: *Oriceas*

Genero: *Oryza*

Especie: *sativa* L.

Grupos (razas ecogeográficas): *Indica, Japonica, Javanica.*

Fases y etapas de crecimiento y desarrollo del arroz

Las variedades sembradas actualmente en el país tienen un ciclo de vida entre los 125 y 130 días (INIA, 2004). Durante este período se distinguen tres fases:

- a) **Fase vegetativa:** Comprende el período que va desde la germinación de la semilla hasta el momento en que se inicia la formación de la panícula. Su duración en nuestro medio fluctúa alrededor de 60 a 65 días.
- b) **Fase reproductiva:** Comprende el período entre la iniciación de la panícula y el momento de la floración. Su duración aproximada es de 35 días.
- c) **Fase de maduración:** Período comprendido desde la floración hasta la completa maduración del grano. Su duración es de 30 días.

Dentro de las tres fases indicadas se presentan cambios que caracterizan e identifican determinadas expresiones morfológicas y fisiológicas inherentes al ciclo de vida de una planta de arroz. Estos cambios dan lugar a la manifestación de etapas diferenciadas dentro de cada fase de desarrollo, las cuales se identifican y especifican en el cuadro 1.

Cuadro 1. Fases y etapas de crecimiento y desarrollo del arroz.

Fases de desarrollo	Etapas de crecimiento y desarrollo
Vegetativa (55-60 días)	0. Germinación de la semilla (5-7 días). Desde el humedecimiento de la semilla hasta la aparición de la primera hoja a través del coleoptilo. 1. Plántula (15-20 días). Desde la aparición de la primera hoja hasta la aparición del primer hijo. 2. Macollamiento (30-35 días). Desde la aparición del primer hijo hasta máximo macollamiento. 3. Elongación del tallo (5-7 días). Desde el alargamiento del cuarto entrenudo hasta inicio (micro) del primordio floral.
Reproductiva (35 días)	4. Inicio de panícula (10-11 días). Desde la formación microscópica del primordio floral hasta hacerse visible. 5. Desarrollo de la panícula (20-25 días). Desde que se hace visible hasta la emergencia a través de la hoja bandera. 6. Floración (7-10 días). Desde la apertura de glumas en el tercio superior hasta la emergencia total y fecundación.
Maduración (30 días)	7. Grano lechoso (7-10 días). Desde la fecundación hasta la formación inicial del grano. 8. Grano pastoso (10-13 días). 9. Grano maduro (6-7 días)

Fuente: INIA, 2004.

Principales enfermedades bacterianas del cultivo del arroz

a) Tizón bacteriano del arroz

La enfermedad llamada tizón bacteriano del arroz (bacterial blight of rice) fue señalada por primera vez en el año 1.884 por agricultores de la prefectura de Fukuoka en Japón. Originalmente se pensó que la enfermedad era de origen fisiológico debida a suelos ácidos, pero en 1.909, se aislaron masas de bacterias de gotas de rocío turbias (exudados bacterianos) de hojas de arroz infectadas y la enfermedad fue reproducida por inoculación de plantas sanas con las gotas de rocío. Después de este estudio, su etiología como una enfermedad bacterial fue establecida y el agente causal fue aislado y clasificado como *Bacillus oryzae*. Posteriormente fue renombrada como *Pseudomonas oryzae* y luego como *Xanthomonas oryzae* (Ishiyama). En 1.978, motivado al aumento en el conocimiento de las pruebas bioquímicas y fisiológicas, y el uso del término patovar (pv.) como una denominación de carácter utilitario basado en los hospedantes que el organismo afecta, la bacteria fue reclasificada como *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Dye). En 1.990, debido a nuevas evidencias con los estudios de perfiles de ácidos grasos, perfiles de proteína e hibridación del ácido desoxirribonucleico (ADN), al patógeno se le dio su estatus actual como una nueva especie y es nombrada *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Goto, 1.992). El nombre científico de la bacteria puede abreviarse como *Xoo*, y en algunas partes del texto lo conseguirán de esta forma.

El tizón bacteriano se ha convertido en una de las enfermedades más severas del arroz en Asia, desde la introducción y siembra en extensas áreas de cultivares de altos rendimientos (que responden rápidamente a la aplicación de nitrógeno), pero que son susceptibles (Mew, 1.987). La enfermedad es conocida por presentarse en proporciones endémicas en muchas partes del mundo, ocasionando severas disminuciones de los rendimientos del cultivo, inclusive por encima del 50 % (Ou, 1.985). La severidad y magnitud de los daños causados por la infección hacen necesario el desarrollo de estrategias de control y manejo de la enfermedad, para reducir las pérdidas del cultivo y evitar epidemias.

El tizón bacteriano causado por *Xoo* es una de las enfermedades más importantes del cultivo. Se encuentra ampliamente distribuida en las regiones productoras de arroz del mundo (tanto en áreas tropicales como templadas), especialmente en países del Sureste Asiático como China, Japón, Las Filipinas, Indonesia, Tailandia, Malasia e India, entre otros (Ou, 1.985, Niño-Liu *et al.*, 2.006). También ha sido reportada en el Norte de Australia, Oeste de África, en países del Norte, Centro y Sur América como: México, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Panamá, Bolivia, Colombia, Ecuador y Venezuela (Lozano, 1.977).

Para el año 1940, en Japón el área cultivada afectada por *Xoo*, fue de 50.000 a 60.000 hectáreas (has) y para finales de la década de los 60 la superficie afectada oscilaba entre 300.000 y 500.000 has., pero recientemente la incidencia de la enfermedad ha disminuido por la incorporación de variedades resistentes y la implementación de estrictas medidas cuarentenarias (Ou, 1.985; Niño-Liu *et al.*, 2.006). En países tropicales, la enfermedad se presenta con mayor incidencia y más destructiva. Reportes de Las Filipinas, Indonesia e India estiman que las pérdidas de plántulas recién transplantadas debidas al síndrome Kresek del tizón bacteriano han alcanzado del 60 al 75 %, dependiendo del clima, localidad y variedad de arroz utilizada. Adicionalmente a la disminución de los rendimientos, la enfermedad afecta la calidad del grano por interferir con la maduración.

Lozano (1.977) observó síntomas del tizón bacteriano del arroz en Venezuela, pero la información no fue corroborada sino hasta el año 1.999, cuando en los laboratorios de bacteriología de la Universidad Central de Venezuela (UCV) y del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, específicamente en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), fueron analizadas muestras de plantas y semillas que presentaban síntomas característicos de la enfermedad y se identificó el agente causal como *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Trujillo *et al.*, 1.999; Guevara y Maselli, 1.999). Las muestras de plantas analizadas provenían de parcelas ubicadas en el estado Guárico y una vez cosechadas se estimaron pérdidas de hasta 40 %, debido a la problemática surgida.

En Venezuela la aplicación de prácticas agronómicas tales como uso desproporcionado de la lámina de agua (como riego y control de malezas) y aplicación excesiva de fertilizantes, en especial el nitrógeno, que buscan incrementos en el rendimiento, proveen microclimas ideales para el desarrollo de enfermedades fungosas y bacterianas, lo que forma parte del problema fitopatológico del arroz y que puede agravarse, si las condiciones de suelo-planta-ambiente son favorables.

Síntomas

Los síntomas foliares se hacen evidentes en la etapa de macollamiento como pequeños puntos o manchas acuosas de color verde, en el ápice y margen de hojas totalmente desarrolladas (Ou, 1.985; Niño-Liu *et al.*, 2.006). Los puntos se expanden a lo largo de las venas, fusionándose, y llegando a ser cloróticos y luego necróticos, con lesiones de color blanco grisáceas opacas, que típicamente se extienden desde el ápice hacia la base de la hoja, a lo largo de las venas y márgenes de la misma (Mew, 1.992; Mew *et al.*, 1.993; Niño-Liu *et al.*, 2.006).

En el trópico y particularmente en cultivares susceptibles de *Oryza sativa* sub-especie *indica* (*O. sativa* spp. *indica*), el patógeno causa dos síndromes de la enfermedad con síntomas distintos del típico tizón bacteriano del arroz: Kresek y hojas amarillo pálido (Mew *et al.*, 1.993; Niño-Liu *et al.*, 2.006).

Kresek es un quemado severo de plántulas que ocurre poco después del transplante del semillero al campo. La práctica común de cortar el ápice de las hojas antes de transplantarlas juega un papel importante en el desarrollo del síndrome. El seccionamiento de las hojas sirve como corte de infección al patógeno, y después de pocos días, las manchas acuosas se desarrollan por debajo del corte de los ápices. Adicionalmente, las raíces rotas resultantes del halado de las plántulas desde el semillero, sirven como punto de entrada para las bacterias presentes en campos regados por inundación. Las bacterias diseminadas a través del sistema vascular hacia los puntos de crecimiento de la planta, infectan la base de otras hojas, y matan totalmente la planta en dos o tres

semanas. Las plantas que sobreviven al Kresek sufren un limitado crecimiento y desarrollan un color verde amarillento (Mizukami y Wakimoto, 1.969; Ou, 1.985; Mew, 1.992; Mew *et al.*, 1.993; EPPO, 2.007).

Las hojas amarillo pálido son observadas en plantas viejas y algunas veces el síntoma es considerado como un efecto secundario de plántulas con hojas quemadas y marchitas. Mientras que las hojas viejas están verdes y sanas, las hojas jóvenes son uniformemente de color amarillo pálido o blanquecino, y los macollos no crecen totalmente (Mizukami y Wakimoto, 1.969; Ou, 1.985).

Aunque el quemado de la hoja ocurre en todas las etapas de crecimiento es más frecuente desde la fase de máximo macollamiento hasta maduración. El daño es extenso cuando la sintomatología tipo Kresek precede al quemado de la hoja, mientras que infecciones post floración tienen muy poco efecto sobre el rendimiento del grano. Sin embargo, si la infección ocurre durante la iniciación de la panícula o durante los estados siguientes que preceden a la floración, se ha observado un severo deterioro del desarrollo del grano y consecuente incremento en la esterilidad (Mizukami y Wakimoto, 1.969; Ou, 1.985; Mew *et al.*, 1.993; Niño-Liu *et al.*, 2.006; EPPO, 2.007).

En Venezuela, se ha reportado la enfermedad en la variedad de arroz Cimarrón, con los síntomas de quemado de hojas y panículas con granos vanos (Guevara y Maselli, 1.999; Trujillo *et al.*, 1.999). El patógeno ha sido aislado e identificado de semilla de las variedades Araure 4, Palmar, Cimarrón y Fonaiap 1 provenientes de los estados Portuguesa y Guárico (Delgado *et al.*, 2.002).

El patógeno

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* es una especie cuyas células tienen forma de bastón corto-recto y varían en longitud desde aproximadamente 0,7 μm a 2,0 μm y de ancho desde 0,4 μm a 0,7 μm . Se movilizan por medio de un flagelo polar (Figura 1). El patógeno, en medio sólido forma colonias circulares, convexas, mucoides, con bordes lisos, brillantes, de color amarillo pálido debido a la producción del pigmento xanthomonadin, característico del género (Saddler y

Bradbury, 2.001). *Xoo* es aeróbico obligado y no forma espora. La temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30 °C. En el cuadro 2 se pueden apreciar otras características fisiológicas y bioquímicas de la bacteria.



Figura 1. Microfotografía de la célula de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*).

Fuente: Guevara y Maselli, 1.999.

Cuadro 2. Características fisiológicas y bioquímicas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Pruebas	Reacción
Reacción de Gram	-
Crecimiento en medio YDC	Mucoide
Crecimiento en TZC 0,1 %	-
Crecimiento en NA	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
Lecitinasa	-
Hidrólisis de almidón	-
Hidrólisis de esculinasa	+
Licuefacción de la gelatina	Variable
Ureasa	-
Citrato	+
Producción de Indol	-
Producción de H ₂ S	+
Reacción leche de Litmus	Alcalina-no coagulación ni peptonización
Reducción de Nitratos	-
Utilización de propionato de sodio	-
Producción de ácido de:	
Glucosa	+
Sacarosa	+
Galactosa	+
Sucrosa	+
Trealosa	+
Arabinosa	+
Rafinosa	-
Lactosa	+
Maltosa	+
Manitol	-

Fuente: Guevara y Maselli 1.999; Saddler y Bradbury 2.001; Delgado *et al.*, 2.002.

Otro de los avances que se han realizado en los últimos años en el estudio de la enfermedad es la caracterización básica del genoma de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Lee *et al.*, 2.005). Al aislamiento KACC10331 de la raza Coreana 1 de *Xoo* que es virulento en arrozces que llevan el gen de resistencia *Xa21*, se le determinó que su genoma consiste en un solo cromosoma circular, de 4.941.439 pares de bases (pb), sin plásmidos aparentes y cuyo contenido de Guanina más Citosina es de 63,7 % (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características generales del genoma de *Xoo*.

Longitud en pb	4.941.439
Contenido de G + C (%)	63,7
Genes que codifican proteínas	4.637
ARN transferencia	54
ARN ribosomal	2
Plásmido	0

Fuente: Lee *et al.*, 2.005.

La bacteria puede sobrevivir en la rizósfera o base de los tallos de restos de cosecha de arroz y en malezas hospederas que se encuentren dentro de los campos cultivados o cercanos a ellos o en canales de riego hasta el próximo ciclo de cultivo, que puede ser algunas semanas después de la cosecha anterior en regiones tropicales o varios meses en zonas templadas. Estas formas en que sobrevive el patógeno se consideran las principales fuentes de inóculo de *Xoo*, para que comience la enfermedad. El patógeno también puede sobrevivir en el suelo, dependiendo de la humedad, pH y efectos antagonistas de la microflora del mismo, pero no se considera una fuente de inóculo importante (Mizukami y Wakimoto, 1.969).

La penetración típica de *Xoo* a la planta de arroz es a través de hidátodos del ápice y bordes de las hojas, pero también puede entrar por los estomas y heridas de la lámina foliar y raíces (Figura 2 a). Las células de las bacterias en la superficie de la hoja pueden llegar a estar suspendidas en fluido de gutación como exudado en la noche y entrar a la planta nadando o de forma pasiva a medida que el fluido escurre de la hoja en la mañana. La bacteria se multiplica en los espacios

intercelulares y en los tejidos adyacentes del epiteme, después se propaga en la planta a través del xilema, donde se presume que interactúa con las células parenquimáticas del mismo (Figura 2 b). El patógeno se mueve en las hojas de forma vertical a través de las venas principales, pero progresa lateralmente a través de las venas secundarias (Figura 2 c) (Mew *et al.*, 1.993; Niño-Liu *et al.*, 2.006).

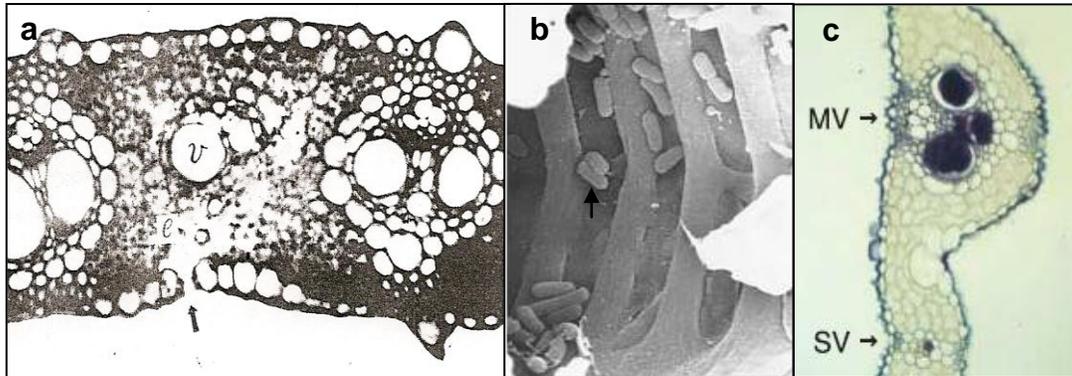


Figura 2. Especificidad del tejido hospedante de Xoo. (a) Corte transversal de una hoja de arroz, se muestra el estoma (↑), epiteme (e), vaso del xilema (v). (b) Micrografía de células de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* en un vaso del xilema de hojas de arroz (↑). (c) Corte transversal de una hoja de arroz infectada con el patógeno, la mancha de color oscuro muestra la localización de las células bacterianas en las venas principales (MV) y secundarias (SV).

Fuente: Niño-Liu *et al.*, 2.006.

Mew *et al.*, (1.993) señalan que en pocos días las células bacterianas y el polisacárido extracelular ocupan los vasos del xilema y salen por los hidátodos, formando gotas o hilos de exudado en la superficie de la hoja, siendo un signo característico de la enfermedad y una fuente de inóculo secundario. Cuando el patógeno entra por heridas en las raíces de las plántulas, se aloja en los tejidos conductores de agua, taponándolos y provocando marchitez.

Xoo puede ser diseminada por agua de riego, semillas (hay divergencia de opiniones al respecto), humanos, insectos y pájaros. Las epidemias se presentan después del paso de ciclones o grandes tormentas que diseminan la bacteria por las zonas arroceras de los países, debido a la velocidad de los vientos y el agua. Un esquema del ciclo de la enfermedad se puede ver en la figura 3. La epidemiología en el trópico no ha sido bien estudiada en detalle, pero las altas

temperaturas constantes permiten a la bacteria crecer en cualquier momento del año (Mizukami y Wakimoto, 1.969; Lozano, 1.977).

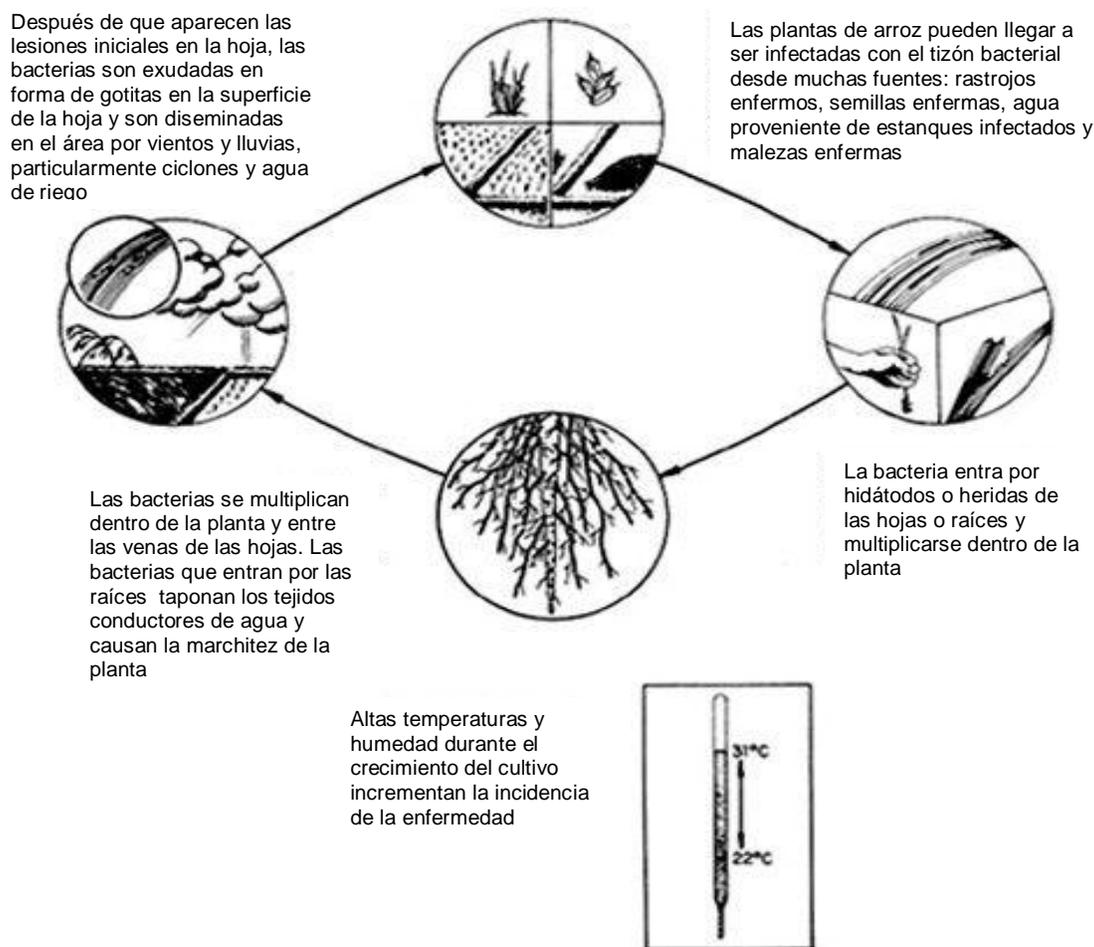


Figura 3. Ciclo de la enfermedad tizón bacteriano del arroz

Fuente: IRRI, 2.008.

Relación del patógeno con otras especies vegetales. Plantas hospedantes.

Diversas especies de arroz silvestre son hospederas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: *Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*, *Oryza australiensis* y numerosas especies de malezas de las familias *Poaceae* y *Cyperaceae*, como *Leersia sayanuka* Ohwi, *Leersia oryzoides* (L.) y *Zizania latifolia* en regiones templadas y *Leptochloa* spp. y *Cyperus* spp. en el trópico (Ou, 1.985; Bradbury, 1.986; Goto, 1.992).

Lozano (1.977) señala que síntomas similares al del tizón bacteriano del arroz han sido observado en malezas comunes de arrozales de la región tropical de

América, como *Rottboellia cochinchinensis* (Lour), *Paspalum* spp., *Panicum* spp., *Echinochloa colonum*, *Cyperus rotundus*, y enfatiza que la presencia de esas especies y su infección esta restringida a aquellas áreas donde anteriormente se ha producido el cultivo.

Trujillo *et al.* (1.999), inocularon *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* en malezas de presencia frecuente en los campos arroceros de Venezuela como *Rottboellia cochinchinensis* (Lour), *Digitaria sanguinalis* (L) Scop., *Cyperus rotundus* L., así como también *Sorghum verticilliflorum* (Steud) Staff, que no es propia de estos agroecosistema. Estas plantas presentaron después de 5 días de la inoculación, síntomas de quemado en la punta de las hojas y bordes necrosados, que se extendía hasta quemar toda la hoja, similares a los que se presentan en las plantas de arroz.

Efectos del ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad, estados nutricionales y régimen de agua que la favorecen.

Mizukami y Wakimoto (1.969) mencionan que factores como topografía, condiciones climáticas y prácticas culturales están relacionados con el desarrollo de la enfermedad. Los factores topográficos o condiciones de suelo son generalmente constantes en contraste con las condiciones climáticas variables o las prácticas culturales. Naturalmente se correlacionan estos factores variables y los no variables.

Condiciones de topografía y suelo: áreas ubicadas en zonas bajas a lo largo de ríos, cerca de pantanos o pie de monte, con suelos ácidos, de pobre drenaje, con un nivel freático alto y con frecuentes inundaciones, son características de regiones donde la enfermedad es endémica (Mizukami y Wakimoto, 1.969; Ou, 1.985).

Condiciones climáticas: El ambiente influencia grandemente el desarrollo de la enfermedad. Los factores más importantes para que sucedan las epidemias de la enfermedad son la ocurrencia de fuertes lluvias, inundaciones, alta humedad

relativa, presencia de aguas profundas para riego y vientos severos. Temperaturas relativamente altas durante el crecimiento del cultivo de arroz incrementan la incidencia, pero temperaturas muy altas acompañadas de sequía suprimen la enfermedad (Mizukami y Wakimoto, 1.969). Muko *et al.* (1.957) citado por Ou (1.985), encontraron en experimentos por inoculación que altas temperaturas (25-30 °C) son más favorable para el desarrollo de la enfermedad que las bajas (21 °C) no existiendo casi desarrollo de la misma a 17 °C. Temperaturas de 28-34 °C favorecen los síntomas de Kresek en plantas jóvenes menores de 21 días, cuando son más susceptibles (Ou, 1.985).

Prácticas culturales: Aquellas que están relacionadas con el desarrollo de la enfermedad son la preparación de semilleros, aplicación de fertilizantes y selección de las variedades de arroz a usar. Los semilleros que se realizan en zonas bajas de fácil inundación pueden estar más contaminados por la bacteria (Mizukami y Wakimoto, 1.969). Excesos de nitrógeno, especialmente en forma orgánica y como reabono, incrementan la enfermedad, así como deficiencia de fósforo y potasio, también excesos de silicato y magnesio. El efecto del nitrógeno sobre la enfermedad es debido principalmente al crecimiento vegetativo de la planta, que influye sobre la humedad y diseminación del patógeno (Ou, 1.985; Goto, 1.992; Niño-Liu *et al.*, 2.006). El uso de variedades de alto rendimiento, pero susceptible al patógeno ha provocado epidemias en el continente asiático, ejemplo de esta es la ocurrida en la India en los años 1979 – 1980 (Mew, 1.987).

Época del año en la cual la enfermedad es más severa. Condiciones generales del ambiente favorable a la enfermedad.

La enfermedad es más severa en la época de monzones en Asia, y en el país se ha reportado en las siembras de arroz que se realizan en el periodo de verano o sequía (Mizukami y Wakimoto, 1.969; Mew *et al.*, 1.993; Guevara y Maselli, 1.999; Niño-Liu *et al.*, 2.006). Se presume que la semilla viene con alta cantidad de inóculo de la bacteria y se le dan las condiciones de temperatura (época de

siembra) y humedad producto del riego en el SRRG, para su desarrollo (Trujillo *et al.*, 1.999).

Control químico, físico, biológico, cultural.

Las medidas de control incluyen prácticas culturales, control químico y biológico, así como el mejoramiento genético.

Las prácticas culturales usadas para el control del tizón bacteriano del arroz varían dependiendo de la localización y registro de incidencia de la enfermedad. En la etapa de semilleros, los métodos incluyen desinfección de la semilla, drenaje apropiado del semillero, erradicación de plantas y malezas enfermas. Previamente al transplante, los campos pueden ser desinfectados por el quemado de restos de la cosecha anterior. Las malezas deben ser removidas de canales y lomas con el fin de reducir el hábitat natural del patógeno y su dispersión a través del agua de riego. En el campo, las aplicaciones de fertilizantes y densidades de siembra adecuadas son prácticas altamente recomendadas para el control de la enfermedad. Aplicaciones de fertilizantes ricos en potasio o fósforo, así como aplicaciones de agroquímicos en la etapa de máximo macollamiento, inicio de panícula o después de grandes tormentas o severas inundaciones son prácticas comunes para reducir los focos de la enfermedad (Mizukami y Wakimoto, 1.969; Goto, 1.992; Niño-Liu *et al.*, 2.006).

El control químico de la enfermedad en campos de arroz comenzó en la década de 1950-1960 con aplicaciones preventivas de “Caldo Bordelés” y la evaluación de diversos antibióticos y compuestos a base de mercurio y cobre. A pesar de que la transmisión de la enfermedad a través de las semillas sea una fuente incierta de inóculo primario, la desinfección de éstas con compuestos de mercurio, soluciones antibióticas o agua caliente es una práctica que se lleva a cabo en muchos países de Asia tropical. En regiones templadas, el control químico de la enfermedad en semilleros y campos incluye la aplicación de probenazole al agua de riego antes y después del transplante de las plántulas, con el objetivo de inhibir la multiplicación bacteriana y prevenir o retardar la enfermedad. Otros químicos como tecloftalam,

óxido de phenazina y níquel dimethyldithiocarbamato son asperjados sobre las plantas (Oda *et al.*, 1.966; Mizukami y Wakimoto, 1.969; Goto, 1.992). Sin embargo, el control químico de la enfermedad en climas monzónicos tropicales es impráctico, y no está comercialmente disponible un bactericida de real efectividad para el control de la enfermedad (Niño-Liu *et al.*, 2.006).

En Venezuela, el laboratorio de bacteriología del INIA-CENIAP recomienda la aplicación de productos bactericidas, como el Cuprimicin 500 (Estreptomicina + Oxitetracilina + Cobre), a una dosis de 1 a 2 g l⁻¹ o Kasumin al 2 % (Kasugamicina) a una dosis de 2 a 5 ml l⁻¹ y Phytol 27 (Sulfato de cobre pentahidratado) a una dosis de 0,5 a 1 ml l⁻¹, realizando de 2 a 3 aplicaciones espaciadas cada 5 días entre ellas. Esta práctica de control solo debe hacerse cuando el cultivo presente los primeros síntomas de la enfermedad y se debe utilizar algún producto adherente (Maselli, 2.006). El uso de semillas certificadas, variedades resistentes, láminas adecuadas de riego, eliminación de plantas hospederas y adecuadas dosis de fertilizante en especial los nitrogenados, son medidas a tomar en cuenta para disminuir los riesgos de la enfermedad¹.

El control biológico es una alternativa ambientalmente amigable y rentable frente al control químico. Bacterias antagonistas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* han recibido particular atención como controladores biológicos candidatos, en gran parte debido a su rápido crecimiento, fácil manipulación y efectiva colonización de la rizosfera. Algunas razas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, suprimen significativamente la severidad del tizón bacteriano del arroz, cuando son asperjadas sobre las hojas. Similarmente, especies diferentes de *Bacillus* han sido empleadas como tratamiento a las semillas antes de la siembra, añadidas en sustancias para remojar las raíces de las plántulas antes del transplante y en aspersiones foliares en el campo. El mecanismo de supresión de la enfermedad no se conoce, pero se ha sugerido que puede existir una respuesta de resistencia sistémica al agente (Niño-Liu *et al.*, 2.006). En Venezuela en la actualidad se

¹ Maselli, 2.007. Comunicación personal

están llevando trabajos con bacterias antagónicas y extractos de plantas que pudiesen utilizarse en el control de *Xoo*^{2 y 3}.

Niño-Liu *et al.* (2.006) señalan que el mejoramiento y desarrollo de cultivares que llevan genes mayores de resistencia (R) ha sido la aproximación más efectiva al control del tizón bacteriano del arroz. Hasta el año 2.006, se habían identificado veintinueve genes de resistencia para el tizón bacteriano (Cuadro 4), la mayoría de cultivares de *Oryza sativa* spp. *indica*, pero también en algunas de variedades de la sub-especie japónica, y en otras especies de arroz silvestre como *Oryza longistaminata*, *Oryza rufipogon*, *Oryza minuta* y *Oryza officinalis*. Algunos genes de resistencia son eficientes sólo en plantas adultas (ejemplo *Xa21*), mientras que la mayoría no parece ser regulados por el desarrollo (ejemplo *Xa23*, *Xa26*). *Xa3* es efectivo sólo en plantas adultas, pero para una raza específica es efectivo en todas las etapas de desarrollo.

² Maselli, 2.007. Comunicación personal.

³ Hernández, 2.007. Comunicación personal.

Cuadro 4. Genes que confieren resistencia a *Xoo* causante del tizón bacteriano del arroz.

Gen	Cromosoma ^a	Herencia ^b	Fuente ^c	Características
Xa1	4	D	Kogyoku	Resistencia a la raza Japonesa I, no efectivo contra todas las razas Filipinas
Xa2	4	D	Tetep	Resistencia a la raza Japonesa II, susceptible a todas las razas Filipinas
Xa3	11	D	Wase Aikoku 3	Resistencia a las razas Filipinas 1, 2, 4, 5 y a todas las razas Japonesas solo en estado de embuchamiento resistencia a la raza Filipina 3 en todas las etapas de crecimiento
Xa4	11	D	TKM 6	Resistencia a las raza Filipinas 1, 4, 5, 7, 8, 10
Xa5	5	r	Líneas Aus Boros	Resistencia a las razas Filipinas 1 (en embuchamiento) y 2, 3, 5, 7, 8, 9, y 10. (en todos los estados de crecimiento)
Xa7	6	D	DV85	Resistencia a las raza Filipinas 1 (en embuchamiento) y 2, 3, 5, 7, 8 y 10. (en todos los estados de crecimiento)
Xa8	7	r	PI231129	Resistencia a las razas Filipinas 5 Y 8.
Xa10	11	D	Cas 209	Resistencia a las razas Filipinas 2, 5 y 7
Xa11	ND	D	IR8, IR944	Resistencia a las razas Japonesas IB, II, IIIA y V; ineficiente contra todas las razas
Xa12	4	D	Kogioku	Resistencia a las razas Japonesas 5.
Xa13	8	r	BJ1(Aus Boro)	Resistencia a las razas Filipinas 6
Xa14	4	D	TN1	Resistencia a las razas Filipinas 5 Y 8.
Xa15	ND	r	M41	Amplio espectro de resistencia a razas Japonesas.
Xa16	ND	D	Tetep	Resistencia a aislamientos Japoneses H8581y H8584.
Xa17	ND	D	Asominori	Resistencia a aislamientos Japoneses H8513
Xa18	ND	D	IR24, Toyonishiki	Resistencia a aislados Burmeses BM8417Y BM8429; inefectivo contra todas las razas
Xa19	ND	r	XM5	Resistencia a las razas Filipinas 1, 2, 3, 4, 5 y 6
Xa20	ND	r	XM6	Resistencia a las razas Filipinas 1, 2, 3, 4, 5 y 6
Xa21	11	D	<i>O. longistaminata</i>	Resistencia solo en estado adulto a las razas Filipinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9
Xa22	11	D	Zhachanglong	Resistencia de amplio espectro.
Xa23	11	D	<i>O. rufipogon</i>	Fuerte resistencia en todos los estados de crecimiento a todas las razas Filipinas y a la mayoría de las razas Japonesas y Chinas.
Xa24	ND	r	DV86, DV85, Aus295	Resistencia a la raza Filipinas 6.
Xa25(a)	4	D	HX-3	Resistencia a las razas Filipinas 1, 3, 4 y a varias razas Chinas
Xa25(b)	12	D	Minghui 63	Resistencia a la raza Filipinas 9
Xa26	11	D	Minghui 63	Amplio espectro de resistencia a razas Filipinas y Chinas
Xa27	6	SD	<i>O. minuta</i>	Resistencia a las razas Filipinas 2 y 5
Xa28	ND	r	Lota Sail	Resistencia a las razas Filipinas 2 y 5
Xa29(t)	1	D	<i>O. officinalis</i>	No esta totalmente caracterizado.

^a ND= No determinado; ^b D= Dominante, r= Recesivo, SD= Semidominante; ^c Cultivar *Oryza sativa* (letra normal) o especie de *Oryza* (letra itálica)
Fuente: Niño-Liu *et al.*, 2.006.

b) Rayado bacteriano de la hoja del arroz

La enfermedad rayado bacteriano del arroz (bacterial leaf streak) fue descubierta primero en Las Filipinas en 1.918, aunque fue erróneamente referida como tizón bacteriano del arroz por varios años (Ou, 1.985; Niño-Liu *et al.*, 2.006). En un estudio en China meridional en 1.957, la enfermedad fue de nuevo caracterizada como diferente del tizón bacteriano y llamada rayado bacteriano de la hoja. El agente causal fue diferenciado del que produce el tizón bacteriano y se le dio el nombre de *Xanthomonas oryzae* (Ou, 1.985). El patógeno fue más adelante renombrado *X. translucens* f. sp. *oryzae* y *X. campestris* pv. *oryzae* (Ou, 1.985). En 1.990, el patógeno fue elevado a su estado actual como nueva especie y nombrada *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Goto, 1.992). El nombre científico de la bacteria puede abreviarse como *Xoc*.

La enfermedad se restringe a gran parte a Asia tropical y subtropical, incluyendo Bangladesh, Camboya, China meridional, Las Filipinas, India, Indonesia, Malasia, Nepal, Pakistán, Tailandia, Vietnam, pero también afecta en regiones arroceras del Norte de Australia (Ou, 1.985; Niño-Liu *et al.*, 2.006) y se ha convertido recientemente en un problema significativo en países de Oeste Africano, como Madagascar, Nigeria y Senegal (Niño-Liu *et al.*, 2.006; EPPO, 2.008). Según el mapa de distribución de plagas cuarentenarias para Europa realizado por la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las plantas (EPPO), hasta septiembre del 2.006, *Xoc* no había sido reportado en los continentes de Europa y América.

Síntomas

La enfermedad puede presentarse en cualquier etapa de crecimiento e inicialmente aparece como pequeñas lesiones intervenales acuosas translúcidas y de color amarillo. Las venas actúan como barreras mientras las áreas infectadas se amplían y se unen longitudinalmente, dando por resultado el síntoma de rayado (Mew, 1.992; Niño-Liu *et al.*, 2.006). En etapas posteriores del cultivo, las hojas se tornan marrón claro, luego blanco grisáceo y mueren. Cuando las infecciones son el resultado de la entrada de la bacteria a través de roturas de las hojas como puede ocurrir debido a

fuerres vientos, los síntomas pueden extenderse a través de la lesión y expandirse longitudinalmente matando la mayoría o todas las hojas de la planta. Numerosas gotas pequeñas de color amarillo del exudado bacteriano son comunes sobre la lesión (Mew, 1.992).

El patógeno

Xoc es una especie cuyas células tienen forma de bastón, móviles con un flagelo polar, Gram negativa, no formadora de esporas, de 0,3-0,5 µm de ancho por 1,2 µm de largo (Saddler y Bradbury, 2.001). Las colonias sobre agar nutritivo son de color amarillo pálido, circulares, lisos y convexos. Las características bioquímicas que diferencian los patovares *oryzae* del *oryzicola* se mencionan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Comparación entre *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*).

Característica	<i>Xoo</i>	<i>Xoc</i>
Producción de Acetoin	-	+
Crecimiento en L-alanina como única fuente de carbón	-	+
Crecimiento en presencia de 0,001 % de Nitrato Cúprico	+	-
Crecimiento en 0,2 % vitamina libre de ácidos casamino	-	+
Fuerte peptonización de la leche Litmus	-	+
Hidrólisis del almidón	-	+

+ = Positivo, - = Negativo

Fuente: Mew, 1.992; Mew *et al.*, 1.993; EPPO, 2.007.

Ou (1.985) menciona que la bacteria penetra las hojas principalmente a través de los estomas, se multiplica en la cavidad subestomatática y después coloniza los espacios intercelulares del parénquima (Figura 4). *Xoc* puede también ingresar a través de heridas, pero permanece restringida al mesófilo y no invade el xilema.

Xoc también exuda a través de aberturas naturales en las hojas, o bajo condiciones húmedas como pequeñas gotas de exudado. El exudado amarillo en la superficie de las hojas constituye una fuente para el diagnóstico de la enfermedad, éste puede caer en el agua de riego o ser dispersado por el viento y la lluvia (Mew *et al.*, 1.993), tal como se puede apreciar en el esquema del ciclo de la enfermedad mostrado en la figura 5.

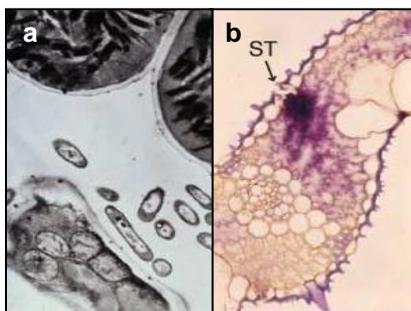


Figura 4. Especificidad del tejido hospedante de *Xoc*. (a) Microfotografía de células de *Xoc* en los espacios intercelulares del parénquima del mesófilo de una hoja de arroz. (b) Corte transversal de una hoja de arroz infectada con *Xoc* mostrando colonización bacteriana de la cámara subestomática y parénquima del mesófilo. ST, estoma.
 Fuente: Niño-Liu *et al.*, 2.006.

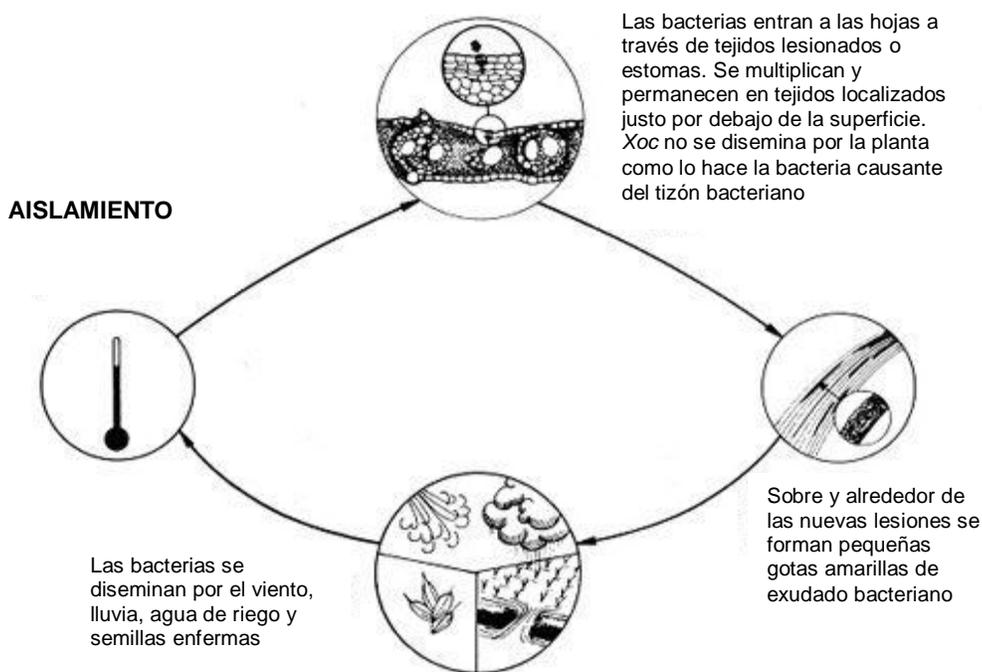


Figura 5. Ciclo de la enfermedad “rayado bacteriano” de la hoja de arroz
 Fuente: IRRI, 2.008.

Relación del patógeno con otras especies vegetales. Plantas hospedantes

El principal hospedante es el arroz (*Oryza sativa*). Otras poaceas como *Leersia* sp., *Leptochloa filiformis*, *Oryza* spp., *Paspalum orbiculare*, *Zizania palustris* y *Zoysia japonica* son consideradas como malezas hospederas de la bacteria (Bradbury, 1.986).

Efectos del ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad, estados nutricionales y régimen de agua que la favorecen

La enfermedad se presenta durante la estación de monzones en India y sureste asiático, a partir de junio a septiembre (Mew *et al.*, 1.993). El viento y la lluvia diseminan las bacterias a partir del arroz infectado y otras plantas hospederas, así como de rastrojo de arroz contaminados de ciclos previos, constituyéndose en la fuente de inóculo primario más importante. Las epidemias severas ocurren a menudo después de fuertes vientos, lluvia y granizo que causan heridas en las plantas de arroz y diseminan las bacterias. Las bacterias pueden también ser diseminadas en el agua de riego, así como por los seres humanos, insectos y pájaros (Ou, 1.985; Niño-Liu *et al.*, 2.006).

El rayado bacteriano de la hoja del arroz es importante en áreas con épocas muy húmedas y donde son usadas altas dosis de nitrógeno.

Control químico, físico, biológico, cultural

La resistencia genética es la medida de control más importante; sin embargo, se pueden aplicar otras medidas usadas para el control de *Xoo*, como la destrucción de residuos de cosechas para minimizar el inóculo primario, desinfección de la semilla con agua caliente, baja densidad de plantas para un adecuado espaciamiento entre ellas, fertilización baja en nitrógeno en áreas donde la enfermedad es endémica, eliminación de malezas de los canales de riego (Niño-Liu *et al.*, 2.006).

c) Bronceado bacteriano de la palea del arroz

El bronceado bacteriano de la palea (Bacterial Palea Browning) ocurre en varios distritos en Japón y afecta la calidad del grano. La incidencia de la enfermedad alcanza el 32 % y se han reportado en algunos lugares reducciones en el peso de 1.000 semillas del 15 % (Mew, 1.992).

En Venezuela, *Pantoea agglomaerans* (anteriormente *Erwinia herbicola*) ha sido señalada afectando plantaciones de arroz en Lecherito, estado Guárico (Contreras *et al.*, 2.001). Posteriormente, en dos localidades del circuito arrocero nacional, fue aislada una bacteria a partir de hojas de arroz con síntomas de quemado e identificada vía convencional y molecular como *Pantoea agglomerans* (González *et al.*, 2003). En el año 2.007, en varias parcelas arroceras de diferentes sectores del SRRG, fueron aisladas bacterias cuyas características bioquímicas y fisiológicas la ubicaron dentro del género *Pantoea*⁴.

Síntomas

Los síntomas generalmente aparecen al comienzo de la floración. Inicialmente, las lesiones son de color marrón clara, acuosas y aparecen en la lemma o palea; posteriormente se tornan marrón oscuro. La decoloración ocurre más frecuentemente en la palea. Al momento de la cosecha, las panículas infectadas tienen granos inmaduros y vanos (Mew, 1.992).

El patógeno

La bacteria responsable del bronceado de la palea ha sido identificada como *Pantoea agglomerans*. La bacteria es Gram negativa y fermentativa (anaeróbica facultativa), con flagelos peritricos, y produce un pigmento amarillo soluble en agua, reduce nitrato, produce ácido a partir de Arabinosa y Celobiosa (Gavini *et al.*, 1.989; Grimont y Grimont, 2.001). Otras características se muestran en el cuadro 6.

⁴ González, 2.008. Comunicación personal.

Cuadro 6. Características fisiológicas y bioquímicas de *P. agglomerans*

Pruebas	Reacción
Tinción de Gram	-
KOH al 3 %	+
Crecimiento en NaCl al 5 %	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
Ureasa	-
Hidrólisis de la gelatina	+
Hidrólisis de la esculina	+
Hugh y Leifson [aeróbica (-), anaeróbica facultativa (+)]	+
Producción de H ₂ S	+
Producción de Indol	-
Reducción de Nitratos	+
Arginina hidrolasa	-
Producción de ácidos a partir de	
Arabinosa	+
Celobiosa	+
Inositol	-
Maltosa	+
Melobiosa	-

Fuente: Azegami *et al.*, 1.983; Gavini *et al.*, 1.989; Grimont y Grimont, 2.001; Jiménez *et al.*, 2.007; Rodríguez *et al.*, 2.008

Relación del patógeno con otras especies vegetales. Plantas hospedantes

La bacteria puede ser aislada de superficies y lesiones de plantas, como invasor secundario, también a partir de semillas, agua y suelos (Bradbury, 1.986), así como de seres humanos (heridas, sangre, orina, órganos internos) y animales (Gavini *et al.*, 1.989). Algunos aislamientos han sido reportados causando agallas en *Wisteria floribunda* y *W. japonica*, *Gypsophila paniculata*; otros causando necrosis en hojas y tallo floral de cebollas (Grimont y Grimont, 2.001). Hojas marchitas y tallos con ápice necrosado de *Manihot esculenta* Crantz, son síntomas causados por *P. agglomerans* en Sudáfrica y Zwavilandia (Whitlock *et al.*, 1.986).

En Venezuela, la bacteria se ha reportado causando manchas acuosas y necróticas en el ápice de las hojas y flores de *Gloxinia alba* (Jiménez *et al.*, 2.007) y en hojas de *Dioscorea alata* L. (Rodríguez *et al.*, 2.008). En hojas de *Aglaonema* spp. causa tizón (Contreras *et al.*, 1.994). En *Mangifera indica* causa necrosis en la base del pedúnculo de los frutos (Guevara *et al.*, 1980).

Efectos del ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad yestados nutricionales que la favorecen

La enfermedad ocurre cuando la emisión de la panícula coincide con períodos de lluvia y temperaturas altas en el rango de 30-35 °C, su incidencia aumenta en campos con altos niveles de fertilización nitrogenada, especialmente en la emisión de la panícula (Mew, 1.992).

Otras bacterias que afectan al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) y que podrían ser un peligro potencial

En el cuadro 7 se listan otras especies de bacterias que han sido señaladas como patógenos del cultivo del arroz, así como, los síntomas que ellas producen.

Cuadro 7. Bacterias que han sido señaladas en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.).

Bacteria	Nombre de la enfermedad	Síntomas
<i>Acidovorax. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	Raya marrón bacteriana	Necrosis de las plántulas
<i>Burkholderia glumae</i>	Pudrición de plántulas	Necrosis de las plántulas
<i>B. plantarii</i>	Pudrición bacteriana del grano	Decoloración del grano
<i>Erwinia</i> sp. (del grupo amylovora)	Tizón de plántulas	Necrosis de las plántulas
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	Raya marrón	Necrosis de las plántulas
<i>P. syringae</i>	Pudrición marrón de la vaina	Pudrición de la vaina
<i>P. syringae</i> pv <i>aptata</i>	Raya marrón bacteriana	Necrosis de las plántulas
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Pudrición del grano	Decoloración del grano
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Pudrición bacteriana de la vaina	Pudrición de la vaina
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> *	Manchado de la gluma	Decoloración del grano
	Pudrición del pie	Pudrición de la vaina y nudos

* Ahora *Dickeya chrysantemi*

Fuente: Goto *et al.*, 1.988; Mew, 1.992; Ou, 1.985.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe la metodología empleada para la toma de muestras de suelo, agua, semillas y plantas de arroz así como sus respectivos procesamientos, preparación de la suspensión bacteriana y pruebas de patogenicidad. También se describe los procedimientos utilizados para la identificación de las bacterias (caracterización cultural, morfológica, fisiológica y molecular). Otros aspectos que se detallan son la obtención de los datos climatológicos, la georeferenciación de las parcelas muestreadas y el ensayo de control *in Vitro* para la evaluación de diferentes productos químicos y biológicos. Además se especifica la metodología estadística para el análisis de los datos.

1. Muestreos

- Suelo

Se realizó con un barreno a una profundidad de 30 centímetros (cm) en aquellos sectores de las melgas en los que se observaron plantas con síntomas de bacteriosis o que según los agricultores, habían presentado con frecuencia el problema en la zona. Se tomaron 3 muestras simples por melga, entendiéndose por una muestra simple la porción de suelo obtenido con el barreno en una sola oportunidad (Wollum, 1.982).

- Agua

La toma de muestra de agua de riego se realizó usando frascos de vidrio estériles con tapa (250 ml de capacidad), en aquellos sectores de las melgas en los que se observaron plantas con síntomas de bacteriosis o que según los agricultores habían señalado la presencia frecuente del problema. Las muestras se tomaron a dos niveles, el primero en la parte superficial de la lámina de agua y el segundo en la parte media de la misma (ésta varió de acuerdo a la profundidad de la lámina de agua). En cada nivel se tomaron dos muestras. Los frascos se destaparon al momento de tomar las muestras y se colocaron en una cava con hielo, para evitar que altas temperaturas durante el

transporte afectaran la viabilidad de las bacterias que pudieran estar presentes en el agua. Una vez en el laboratorio se guardaron en la nevera a 4 °C, hasta su procesamiento.

- Plantas de arroz

Se realizó tomando plantas de arroz de las variedades D-Sativa y Venezuela 21, que se encontraban entre la fase de máximo macollamiento (45 – 55 dds) hasta maduración (120 – 135 dds) cuyas hojas presentaban lesiones necróticas de color blanco grisáceas (quemado) que se extendían desde el ápice hacia la base de la lámina foliar a través de las venas o márgenes de las mismas, características que identifican la sintomatología típica de la bacteriosis. Las plantas con síntomas fueron transportadas con el suelo húmedo para evitar que se deshidrataran. Al llegar al laboratorio se colocaron en un recipiente con agua, hasta su procesamiento.

- Semillas de arroz

Se realizó con un calador manual de forma aleatoria entre los sacos de semillas que se encontraban en los galpones de empresas distribuidoras de agroquímicos y semillas. La muestra fue de 500 g.

2. Procesamiento de los diferentes tipos de muestras

- Aislamiento

- Suelo

En el laboratorio, se tomaron 10 g de suelo de las muestras simples previamente homogenizadas y se colocaron en una fiola Erlenmeyer con 1.000 ml de agua destilada estéril (solución madre) que se agitaron por 15 minutos (min). Pasado el tiempo de agitación se realizaron diluciones seriadas como se detalla a continuación. De la solución madre se tomó 1 ml y se vertió en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril (ADE), denominándose dilución 10^1 ; luego se agitó en un vórtex por

5 segundos (s) para homogenizar la dilución y seguidamente del primer tubo de ensayo se tomó una alícuota de 1 ml y se vertió en un segundo tubo de ensayo con 9 ml de ADE (dilución 10^2). Posteriormente se agitó por 5 s. Éste último procedimiento se repitió hasta tener la dilución 10^9 (Wollum, 1.982).

Una vez preparada las diluciones, se tomó con un ansa de platino previamente desinfectada, una porción de la dilución 10^1 y se realizó un estriado por agotamiento en placa de Petri con agar nutritivo (AN) como medio de cultivo (al que se le adicionó 40 ppm de Cicloheximide para evitar crecimiento de hongos). Este procedimiento se repitió para todas las diluciones. Una vez sembradas, las placas se sellaron con parafilm y se colocaron en una incubadora a 27 ± 2 °C por 48 horas (h) (Wollum, 1.982).

- Agua

Se tomó como solución madre el agua proveniente de los dos frascos por cada nivel. Las diluciones seriadas, siembra en placas con AN e incubación se realizó de forma similar a las muestras de suelo.

- Hojas de arroz

De las hojas de plantas de arroz que presentaban la sintomatología, se tomaron secciones de aproximadamente 7 mm de largo por 3 mm de ancho de la zona de avance de la infección. Estos trocitos de hojas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5 % por 1 min, se enjuagaron tres veces con ADE y luego fueron macerados en un mortero con ADE. Posteriormente con un ansa de platino previamente desinfectada se tomó el macerado y luego se realizó un estriado por agotamiento en placas de Petri con AN como medio de cultivo. Una vez sembrada, las placas se sellaron con parafilm y se colocaron en una incubadora a 27 ± 2 °C por 48 h (Trujillo *et al.*, 1.999).

- Semillas de arroz

La muestra de semilla se uniformizó con el homogenizador o divisor de semillas. Luego se tomó una submuestra de 200 g que fue desinfectada con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5 % por 1 min, se enjuagaron tres veces con ADE. Para la obtención de las bacterias se colocaron 100 semillas en placas de Petri con AN (25 semillas por cada placa) al que se le adicionó 40 ppm de Cicloheximide para evitar crecimiento de hongos). Una vez realizada la siembra directa, las placas se sellaron con parafilm y se colocaron en una incubadora a 27 ± 2 °C por 48 h.

- Preparación de las suspensión bacteriana

La suspensión bacteriana se preparó a partir de un cultivo puro de las bacterias aisladas del suelo, agua, semillas y hojas de arroz con síntomas de bacteriosis, de 24 horas de crecimiento en medio AN. La suspensión bacteriana se obtuvo a partir del raspado superficial del cultivo puro en la placa con AN con un varilla de vidrio estéril y ADE que se vertió en una fiola de 250 ml de capacidad y se ajustó la concentración a 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) mediante comparación visual de la turbidez de la suspensión, hasta turbidez equivalente al tubo número 3 de la escala de Mc. Farland (Klement *et al.*, 1.990).

- Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron plantas de arroz de la variedad D-Sativa, de 30 – 35 días de edad, sembradas en bolsas plásticas de 2 l de capacidad, que contenían tierra esterilizada, creciendo en condiciones de umbráculo. A la suspensión bacteriana se le adicionó 2 gotas de Tween 80 como adherente. La inoculación de las suspensiones bacterianas se realizó mediante el método de punción, utilizando alfileres provistos de un cojín de algodón impregnado con la solución bacteriana, provocando así heridas mecánicas a las primeras hojas de las plantas, facilitando la penetración de la bacteria. La misma metodología

se utilizó para las plantas testigo, pero usando ADE. Se inocularon 3 plantas por aislamiento bacteriano y se dejaron 3 plantas como testigo.

Las plantas inoculadas y testigos fueron colocadas en cámara húmeda a temperaturas de 21 – 22 °C y 90 % de humedad relativa (HR) durante 48 h; luego fueron llevadas al umbráculo y se realizaron las observaciones periódicas sobre la aparición de síntomas hasta un máximo de 21 días después de la inoculación (ddi).

3. Identificación de las bacterias

- Caracterización cultural

Se evaluó el crecimiento de las bacterias fitopatógenas en diferentes medios: agar nutritivo (AN), D₃ de Kado, SX de Schaad, agar extracto de levadura-carbonato de calcio (YCA) y fueron caracterizadas según su forma, elevación, borde, color de la bacteria (Schaad *et al.*, 2.001).

- Caracterización morfológica

A las bacterias patogénicas se les realizó tinción de Gram. Además, con el microscopio electrónico de transmisión marca HITACHI modelo H-500 del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, y utilizando la técnica de tinción negativa fueron observadas y medidas las células de las bacterias fitopatógenas.

Procedimiento:

1. Se le adicionó agua ADE a un cultivo puro que creció por 48 horas en placa de Petri y se agitó para remover la colonia bacteriana.
2. Se vertió la solución bacteriana en tubo de ensayo y se ajustó la concentración a 1×10^8 ufc/ml.
3. En un papel parafilm se colocó una gota de la solución bacteriana y sobre ella la rejilla de cobre (de 300 campos) cubierta con una película de colodión y otra de carbón.

4. La rejilla se colocó en el Microscopio electrónico de transmisión y se observó a una resolución de 17.000 X y se tomó la micrografía.
 5. Luego se copió 2 veces en papel fotográfico, por lo que la ampliación quedo a 34.000 X.
 6. Se midió el largo y ancho de 20 bacterias con una regla graduada, se promedió y luego se realizó la conversión de centímetros a micrómetros y se obtuvo las medidas de las bacterias.
- Pruebas fisiológicas y bioquímicas

Se realizaron pruebas fisiológicas de requerimientos de oxígeno, para determinar si las bacterias patogénicas son oxidativas o fermentativas, así como la capacidad de crecer a temperatura extrema de 37 °C o su tolerancia a sal (NaCl) al 3 y 5 %. También, se le realizó las pruebas de catalasa, oxidasa, licuefacción de la gelatina, reducción de nitrato, hidrólisis de almidón, hidrólisis de la esculina, producción de indol, producción de ácido sulfhídrico (H₂S). También la producción de ácidos a partir de Arabinosa, Maltosa, Manitol, Sorbitol y Xylosa (Grimont y Grimont, 2.001; Schaad *et al.*, 2.001).

- Análisis estadístico de la caracterización cultural y las pruebas fisiológicas y bioquímicas.

Se construyeron matrices básicas de datos realizando codificaciones binarias de presencia (1) / ausencia (0) a partir de los resultados obtenidos de las pruebas culturales, fisiológicas y bioquímicas. Se establecieron análisis de agrupamiento basados en el promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA, por sus siglas en inglés) con el índice de similaridad de Jaccard para la construcción de dendrograma con el programa estadístico PAST versión 2.0 (Hammer *et al.*, 2.001) para facilitar la descripción.

- Estudios moleculares

Los diferentes aislamientos patogénicos fueron identificados molecularmente, como a continuación se detalla.

- Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)

A los cultivos puros de 24 h de crecimiento en AN se les adicionó 1500 µl de ADE y fueron transferidos a tubos eppendorf. Se centrifugaron por 10 min a 13.000 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se adicionó 200 µl de solución TRIS al 0,1 M y 200 µl de solución de lisis (Tris acetato pH 7,8 40 mM, acetato de sodio 20 mM, EDTA 1mM y SDS 1%), se agitó hasta homogenizar, se agregó 700 µl de cloroformo isoamil (24:1). Se centrifugó por 10 min a 13.000 rpm a 4 °C, se tomó el sobrenadante (ADN) y se vertió en nuevos tubos eppendorf. Se le adicionó 700 µl de etanol al 90 % y se dejó precipitar el ADN de un día para otro. Al día siguiente se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C por 30 min, luego se descartó el alcohol. Se colocó el ADN a secar en el concentrador de ADN a 45 °C por 20 min. Finalmente se resuspendió el ADN en 50 µl de solución TE.

Para medir la concentración del ADN extraído se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-100. Para determinar la calidad del ADN se realizó electroforesis en geles de agarosa al 0,8 %, utilizando el marcador molecular de un Kb y el iniciador U1U2 de la región ribosomal 16S y se visualizaron las bandas con tinción de bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta (UV).

Una vez ajustada la concentración del ADN y verificada su calidad se procedió a realizar la mezcla de reacción tal como se detalla en el cuadro 8.

Cuadro 8. Mezcla de reacción para la PCR.

Mezcla	[]i	[]f	1Reac (µl)
Buffer 10X	10 X	1 X	2,5
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3
dNTPs	20 mM	0,2 mM	0,25
Primer F	50 µM	1 µM	0,5
Primer R	50 µM	1 µM	0,5
BSA	1 mg/ml	0,02 mg/ml	0,5
Taq	50 U	0,12 µ/µl	0,06
ADN	25 ng/µl	4,16 ng/µl	6
H ₂ O			11,69
		Total	25,00

Leyenda: []i: concentración inicial, []f concentración final

- Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Ciclo 1: Desnaturalización de la molécula de ADN durante 5 min a 94 °C.

Ciclo 2: 35 ciclos de: Desnaturalización durante 1 min a 94 °C.

Hibridación de iniciadores durante 1 min a 48 °C.

Elongación durante 2 min a 72 °C.

Ciclo 3: Extensión final de los amplificadores durante 10 min a 72 °C.

La verificación de la amplificación por PCR se realizó a través de electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta (UV).

- Identificación molecular de la bacteria *Pantoea agglomerans*.

Se diseñaron iniciadores a partir de una secuencia de nucleótidos conocida de la región 16S ARN ribosomal, del aislamiento tipo DSM 3493 (Grimont y Grimont, 2.001), tomado de la página del GenBank (NCIB, 2008). Para el diseño se usó el programa Primer3 v. 0.4.0 (Rozen y Skaletsky, 2.000). La secuencia se señala en la figura 6.

ORIGIN

```

1   gccctaacaac atgcaagtct gacggtagca cagaggagct tgctccttgg gtgacgagtg
61  gcggaacgggt gagtaatgtc tggggatctg cccgatagag ggggataacc actggaaacg
121 gtggctaata  cgcataacg tcgcaagacc aaagaggggg accttcgggc ctctcactat
181 cggatgaacc  cagatgggat tagctagtag gcggggtaat ggccaccta  ggcgacgatc
241 cctagctggt  ctgagaggat gaccagccac actggaactg agacacggtc cagactccta
301 cgggagggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggcgcaag cctgatgcag ccatgcccgcg
361 tgatatgaaga aggccttcgg gttgtaaagt actttcagcg gggaggaagg cgatgggggtt
421 aataaccttg  tcgattgacg ttaccgcgag aagaagcacc ggctaactcc gtgccagcag
481 ccgcgtaaat  acggagggtg caagcgttaa tcggaattac tgggcgtaaa gcgcacgcag
541 gcggtctggt  aagtcagatg tgaatcccc  gggcttaacc tgggaactgc atttgaact
601 ggcagccttg  agtctttag  aggggggtag aattccaggt gtagcgggtg aatgcgtaga
661 gatctggagg  aataccggtg gcgaaggcgg cccctgggac aaagactgac gctcaggtgc
721 gaaagcgtgg  ggagcaaaaca ggattagata ccttgtagt  ccacgccgta aacgatgtcg
781 acttgagggt  tgttcccttg aggagtggct tccggagcta acgcgttaag tgcaccgcct
841 ggggagtacg  gccgcaaggt taaaactcaa atgaattgac gggggcccgc acaagcgggtg
901 gagcatgtgg  tttaattcga tgcaacgcga agaaccttac ctactctga  catccaegga
961 atttggcaga  gatgccttag tgccttcggg aaccgtgaga caggtgctgc atggctgtcg
1021 tcagctcgtg  ttgtgaaatg ttgggttaag tcccgaacg  agcgcaaccc ttatcctttg
1081 ttgccagcga  ttcggtcggg aactcaaagg agactgcccg tgataaacgg gaggaagggtg
1141 gggatgacgt  caagtcatca tggcccttac gtagtagggt acacacgtgc tacaatggcg
1201 catacaaaga  gaagcgacct cgcgagagca agcggacctc acaaagtgcg tcgtagtccg
1261 gatcggagtc  tgcaactcga ctccgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgt ggatcagaat
1321 gccacgggtg  atacgttccc gggccttcta cacaccgcc  gtcacaccat gggagtgggt
1381 tgcaaaagaa  gtaggtagct taaccttcgg gagggcgctt accactttgt gattcatgac
1441 tggggtgaag  tcgtaacaag gtaaccgtag ggg

```

Figura 6. Secuencia de oligonucleótidos de la región 16S ARN del aislamiento tipo DSM 3493 de la bacteria *Pantoea agglomerans*
 Fuente: NCIB, 2008.

- Interpretación de los resultados de la PCR

La presencia de bandas producto de la PCR indicó la presencia de *Pantoea agglomerans* en la muestra. La PCR fue negativa si no se detectaron bandas específicas a partir del ADN amplificado.

4. Estudios climatológicos y georeferenciación

Se realizó una caracterización climática de la zona de estudio. Para ello se solicitaron datos meteorológicos de la estación climatológica “Bancos de San Pedro” perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), ubicada en el SRRG.

Se relacionó la ocurrencia de los síntomas de bacteriosis con la fenología del cultivo y las variables climáticas, para ello se instaló una estación automatizada en la parcela 217 del SRRG, donde se consideraron los datos de temperaturas máximas, mínimas y promedio del aire, precipitación, humedad relativa, velocidad y dirección del viento. Tanto la caracterización de la zona como la relación de la ocurrencia de los síntomas de bacteriosis con la fenología del cultivo y las variables climáticas, fueron expresadas mediante gráficos.

- Análisis estadístico de los estudios climatológicos

Para el análisis de los datos climáticos tanto de la serie histórica de la estación “Banco de San Pedro” como los que se registraron con la estación automatizada (EA) ubicada en la parcela 217, se utilizó estadística descriptiva, usando medidas de tendencia central como el promedio, moda, y sumatoria. Para la discriminación de los datos se tomaron las siguientes premisas:

- a. Se eliminó el valor de temperatura máxima ($T_{max.}$), sí el valor de temperatura mínima ($T_{min.}$) para el mismo día era mayor del de $T_{max.}$
- b. Se eliminó el valor de temperatura media ($T_{med.}$) cuando no estaban los dos valores de T_{max} y T_{min} , para promediar el valor de T_{med} .
- c. No se consideraron promedios mensuales de temperaturas máximas, mínimas o medias cuando en la serie mensual faltaron al menos cinco días.
- d. No se consideraron promedios mensuales de Insolación sí faltaron al menos cinco días en la serie de datos mensuales.

Se obtuvo el promedio y los límites superior e inferior de cada una de las variables de la estación “Banco de San Pedro” del INIA y se comparó con los promedios de las mismas variables tomadas por la EA, para ello se realizaron gráficos, esto para determinar si los datos climáticos tomados por la EA se encontraban entre el rango normal.

Para la georeferenciación se solicitó a la Unidad Estatal del Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (UEMPPAT) un plano del SRRG, posteriormente se digitalizó mediante el programa ArcGIS versión 9.1. Entre los meses de enero, febrero y marzo del 2009 se visitaron 12 parcelas del Sistema de Riego Río Guárico (SRRG), donde se tomaron las muestras antes mencionadas, se georeferenciaron con un geoposicionador satelital marca GARMIN modelo GPSMAP 76CSX. Luego se señalaron en el plano del SRRG,

aquellas parcelas donde se realizó el muestreo, aquellas donde detectaron las bacterias patogénicas y no patogénicas.

5. Ensayos de control *in Vitro* para la evaluación de los productos químicos y biológicos

- Preparación de la solución bacteriana

Cultivos puros de las bacterias patogénicas creciendo en medio AN por 48 horas a 28 °C, fueron removidos con ADE utilizando una varilla de vidrio estéril y homogenizadas mediante agitación. Luego se llevó la concentración a 1×10^8 ufc/ml mediante comparación visual de la turbidez de la suspensión, hasta turbidez equivalente al tubo número 3 de la escala de Mc. Farland (Klement, *et al.*, 1.990). Posteriormente se tomaron 100 µl de la suspensión bacteriana y se vertieron sobre una placa de Petri con AN y se distribuyeron sobre todo el medio de cultivo.

- Evaluación de la potencialidad de los productos químicos y biológicos en el control de las bacterias en arroz

La evaluación se realizó siguiendo el método de discos de papel en placas de Petri con AN (Lorian, 1.980). Los discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro previamente esterilizados, se colocaron en placas de Petri estériles con los productos químicos y biológicos (los nombres comerciales, ingredientes activos y concentraciones de los productos usados se mencionan en el cuadro 9). Los discos se dejaron secar durante una hora dentro de la cámara de flujo laminar para evitar el exceso de productos en papel de filtro estéril. Posteriormente, se colocaron 5 discos de papel sobre el AN con la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron por 48 horas a 27 ± 2 °C. Seguidamente se realizaron las observaciones para determinar la presencia del halo de inhibición y/o crecimiento de bacterias antagonistas alrededor de cada disco; teniendo como criterio de efecto bactericida la presencia o ausencia del halo o desarrollo de bacterias antagonistas y en caso de estar

presente tuvo mayor efecto el de mayor diámetro, el cual se midió con una regla graduada en mm.

Cuadro 9. Nombres comerciales, ingredientes activos (I. A.) y concentraciones de los productos químicos y biológicos a usados en el ensayo de control *In Vitro*

	Nombre comercial del producto	Nombre del I. A. del producto	Dosis*			
			T	D 1	D2	D3
A	Extracto Etanólico De Flor Escondida	Extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> L.	0	2,5	5	10
B	TERRA BAF	Ácido Fúlvico	0	2	5	8
C	KASUMIN	Kasugamicina	0	0,5	1,5	2,5
D	EPYPLANT	Bacterias y hongos antagonistas	0	2	4	8
E	SULFATO DE ESTREPTOMICINA	Sulfato de Estreptomicina	0	25	50	100

* Dosis: A) Porcentaje, B) Mililitro del producto por litro de agua, C y D) Litros del producto por hectárea, E) Partes por millón.

- Análisis estadístico de los ensayos de control *in Vitro*

Para los análisis estadísticos se evaluaron cinco tratamientos los cuales estuvieron constituidos por dos antibióticos, un producto biológico comercial, un extracto de planta experimental y un producto experimental, con cuatro dosis y cinco repeticiones por dosis (cuadro 9), teniendo como unidad experimental cada disco de papel de filtro colocado sobre el medio de cultivo y como respuesta la presencia o ausencia de los halos de inhibición o desarrollo de bacterias antagonistas.

En primer lugar, se utilizó el análisis descriptivo que permitió obtener el promedio, desviación y varianza de cada uno de los tratamientos. Éste análisis no dio una respuesta estadística inferencial como tal, sino que permitió conocer el comportamiento de cada uno de los tratamientos. Los datos experimentales obtenidos fueron analizados mediante el análisis de la varianza y las diferencias de medias con Tukey al 5 % de significancia con el programa estadístico InfoStat v 1.1 (2.002). El modelo utilizado fue Y (halo en mm) = $U + Producto(i) + Dosis(j) + Producto \times Dosis(ij) + E(ijk)$; que corresponde a un arreglo factorial 2^3 sobre un diseño totalmente aleatorizado.

En la Figura 7, se muestra en un flujodiagrama el resumen de la metodología empleada en el trabajo de investigación.

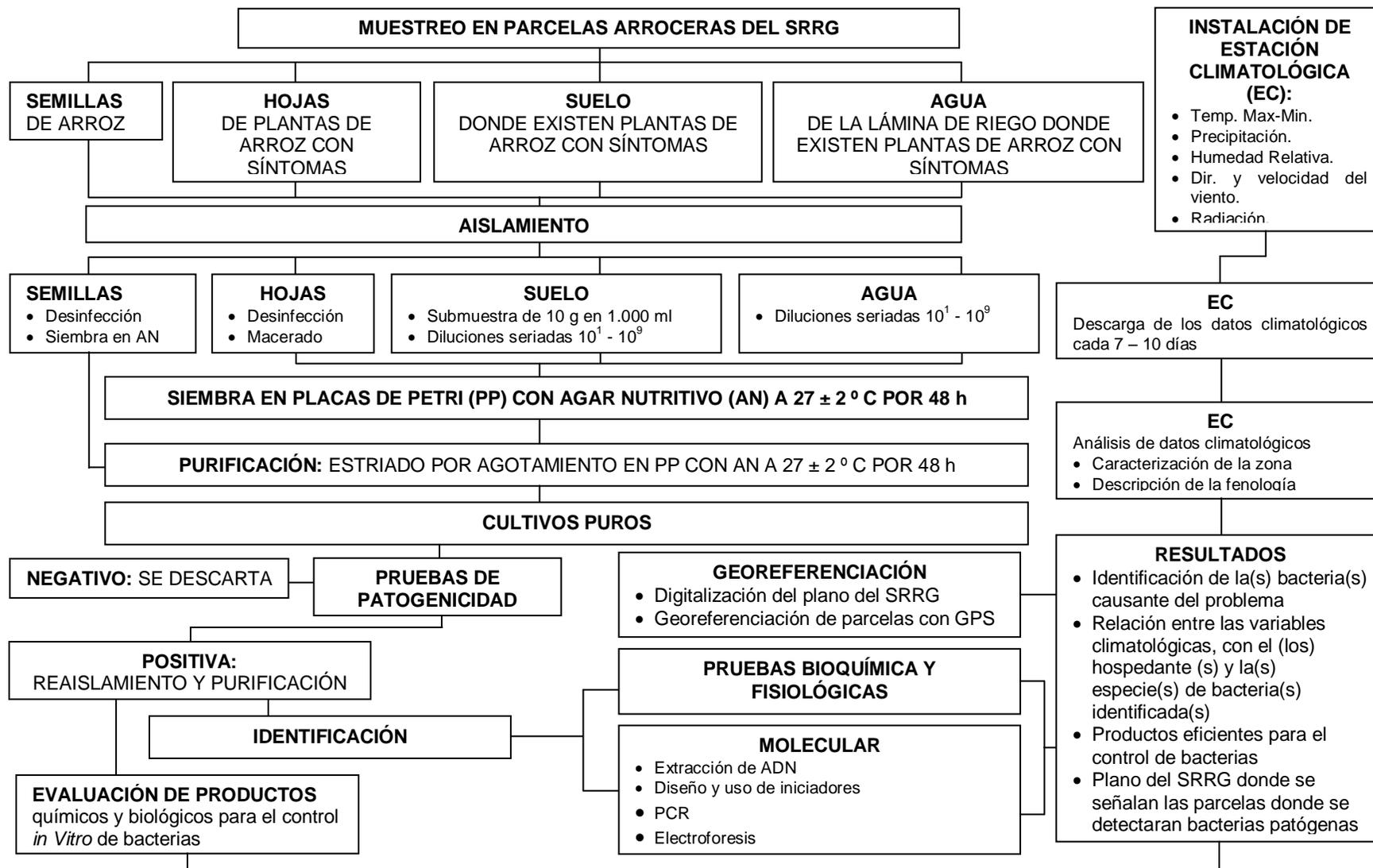


Figura 7. Flujodiagrama general de la metodología usada en este estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de los aislamientos, su identificación de forma rutinaria y molecular. También la caracterización climática de la zona, los datos de la estación climática de la parcela 217 y la relación con la aparición de los síntomas de la enfermedad y etapa fenológica del cultivo en que aparecen, así como la georeferenciación de las parcelas que fueron muestreadas y donde se identificó la bacteria. Así mismo, la evaluación de los productos químicos y biológicos del ensayo de control *in Vitro*.

1. Aislamientos obtenidos

Del ciclo de lluvias 2008 se aislaron 1 cepa a partir de suelo, 4 de agua, 22 de hojas de arroz y 1 proveniente de semillas de arroz, para un total de 28 cepas aisladas (Cuadro 10). Además se incluyen 3 cepas testigos.

Cuadro 10. Aislamientos obtenidos durante el ciclo de lluvia 2008

N°	Aislado de	Identificación*	N°	Aislado de	Identificación*
1	Hoja	A.H. M1	17	Hoja	A.H. M2F
2	Semilla	A.Sem.M1	18	Hoja	A.H. M2G
3	Hoja	A.H. M2B	19	Hoja	A.H. M9
4	Hoja	A.H. M2B	20	Hoja	A.H. M10A
5	Hoja	A.H. M2B	21	Hoja	A.H. M10B
6	Hoja	A.H. M2B	22	Hoja	A.H. M10C
7	Hoja	A.H. M2B	23	Hoja	A.H. M11A
8	Hoja	A.H. M2C	24	Hoja	A.H. M11B
9	Hoja	A.H. M2C	25	Hoja	A.H. M11C
10	Hoja	A.H. M2D	26	Hoja	A.H. M11D
11	Hoja	A.H. M2D	27	Hoja	A.H. M12
12	Agua	A. Agua Ar 10 ¹	28	Suelo	ASoM8
13	Agua	A. Agua Ar 10 ²	29	Testigo	C-1587
14	Agua	A. Agua Ar 10 ⁷	30	Testigo	C-1633
15	Agua	A. Agua Ab 10 ²	31	Testigo	C-0012
16	Hoja	A.H. M2E			

* A.H.: Aislamiento de hoja; A.Sem.: Aislamiento de semilla; A. Agua Ar.: Aislamiento de agua tomada en la parte de arriba de la lámina; A. Agua Ab.: Aislamiento de agua tomada en la parte de abajo de la lámina; A.So.: Aislamiento de suelo; C: Cepa testigo.

Fuente: Datos propios.

En este primer análisis, todos los aislamientos obtenidos durante el ciclo invierno 2008 se perdieron por contaminación y su poca capacidad de crecimiento en medios artificiales.

Del ciclo de Verano 2008 – 2009 se aislaron 3 cepas a partir de suelo, 12 de agua, 39 de hojas de arroz y 11 provenientes de semillas de arroz, para un total de 65 cepas aisladas (Cuadro 11). Se incluyen además 5 cepas testigos.

Cuadro 11. Aislamientos obtenidos durante el ciclo Norte Verano 2008 - 2009

N°	Aislado de	Identificación*	N°	Aislado de	Identificación*
1	Hoja	MVV001A	36	Hoja	MVV012B
2	Hoja	MVV001B	37	Hoja	MVV013A
3	Hoja	MVV002A	38	Hoja	MVV013B
4	Hoja	MVV002B	39	Hoja	MVV014A
5	Hoja	MVV003A	40	Hoja	MVV014B
6	Hoja	MVV003B	41	Hoja	MVV015A
7	Suelo	MSo001	42	Hoja	MVV015B
8	Hoja	MVV004A	43	Hoja	MVV015C
9	Hoja	MVV004B	44	Hoja	MVV015D
10	Hoja	MVV005A	45	Hoja	MVV015DA
11	Hoja	MVV005B	46	Hoja	MVV015DB
12	Hoja	MVV006AA	47	Hoja	MVV016A
13	Hoja	MVV006AB	48	Hoja	MVV017A
14	Hoja	MVV006AC	49	Hoja	MVV017B
15	Hoja	MVV006B	50	Agua	MA003 AR10 ²
16	Agua	MA001 AR10 ¹	51	Agua	MA003 AR10 ³
17	Agua	MA001 AB10 ²	52	Agua	MA003 AB10 ³
18	Agua	MA001 AB10 ⁴	53	Agua	MA003 AB10 ³
19	Hoja	MVV007A	54	Suelo	MSo003 101
20	Hoja	MVV007B	55	Semilla	Sem01MacAmar
21	Suelo	MSo002	56	Semilla	Sem01MacBlan
22	Agua	MA002 AR10 ¹	57	Semilla	Sem01SDA2
23	Agua	MA002 AR10 ³	58	Semilla	Sem01SDA8
24	Agua	MA002 AR10 ⁴	59	Semilla	Sem01SDB5
25	Agua	MA002 AB10 ²	60	Semilla	Sem01SDC2
26	Agua	MA002 AB10 ³	61	Semilla	Sem02 MacAma
27	Hoja	MVV008A	62	Semilla	Sem02 MacBla
28	Hoja	MVV008B	63	Semilla	Sem03 MacAmar
29	Hoja	MVV009A	64	Semilla	Sem04 MacAma
30	Hoja	MVV009B	65	Semilla	Sem04 Mac
31	Hoja	MVV010A	66	Testigo	C-PANT 64
32	Hoja	MVV010B	67	Testigo	C-PANT 72
33	Hoja	MVV011A	68	Testigo	C-1424
34	Hoja	MVV011B	69	Testigo	C-1739
35	Hoja	MVV012A	70	Testigo	C-0012

* MVV: Aislamiento de hoja; MAxxAR: Aislamiento de agua tomada en la parte de arriba de la lámina; MAxxAB: Aislamiento de agua tomada en la parte de abajo de la lámina; MSo: Aislamiento de suelo; Sem01SD: Aislamiento de semilla, siembra directa; C: Cepa testigo.

Fuente: Datos propios.

Se procedió a realizar primero una caracterización morfológica y fueron descartadas todas aquellas cepas con forma de coco.

Después de este análisis se caracterizaron 29 cepas mediante estudios moleculares y pruebas de patogenicidad. De los 29 aislamientos analizados molecularmente, 11 amplificaron bien (++) para el primer *Pantoea agglomerans* y de ellos sólo 2 fueron positivos a la prueba de patogenicidad (Anexo 1).

Los aislamientos cuya amplificación fue tenue (+) fueron descartados. Se les realizó pruebas culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas a los 11 aislamientos que amplificaron en forma evidente.

2. Identificación

- Estudios moleculares

Los iniciadores diseñados a partir del aislamiento tipo DSM 3493 de *Pantoea agglomerans* a través del programa Primer3 v 04 (Rozen y Skaletsky, 2000) son señalados en el cuadro 12. Allí se detalla el número del nucleótido de la secuencia donde inician (adelante y reverso), la longitud del iniciador y el tamaño del producto amplificado.

Cuadro 12. Secuencia de los oligonucleótidos de los iniciadores diseñados

Código	Dirección	Inicio	Secuencia de oligonucleótidos	Longitud	Tamaño del fragmento amplificado
1a	Adelante	1034	5´- TGAAATGTTGGGTTAAGTCC – 3´	20	360
1b	Reverso	1393	5´- TACTTCTTTTGCAACCCACT – 3´	20	
2a	Adelante	425	5´- ACCTTGTCGATTGACGTTAC – 3´	20	969
2b	Reverso	1393	5´- TACTTCTTTTGCAACCCACT – 3´	20	

Fuente: Datos propios.

El iniciador 1a1b amplificó para todos los aislamientos evaluados, incluyendo los aislamientos testigos negativos C-1424 y C-1739 (Genero *Xanthomonas*), razón por la cual se descartaron estos resultados para análisis posteriores. Mientras que el iniciador 2a2b amplificó algunos de los aislamientos analizados y no lo hizo para las cepas testigos negativos, por lo que se puede considerar un iniciador específico (Cuadro 13 y Figuras 8 y 9).

Cuadro 13. Aislamientos que fueron evaluados en la prueba molecular

N en el gel	Nombre del aislamiento	Reacción Primer 2a2b	N en el gel	Nombre del aislamiento	Reacción Primer 2a2b
1	MVV004A	-	18	MVV017A	+
2	MVV004B	++	19	Sem01MacAma	+
3	MVV006AA	++	20	Sem01MacBla	-
4	MVV006AB	++	21	Sem01SDA8	++
5	MVV006AC	++	22	Sem01SDB5	-
6	MVV006B	++	23	Sem01SDC2	++
7	MVV008A	++	24	Sem02MacAma	-
8	MVV009A	-	25	Sem02MacBla	-
9	MVV009B	+	26	Sem04MacAma	+
10	MVV011A	++	27	Sem04Mac	-
11	MVV011B	++	28	MA003AR10 ³	-
12	MVV012A	-	29	MVSo00310 ¹	-
13	MVV013B	-	30	C-PANT64	-
14	MVV015D	++	31	C-PANT72	++
15	MVV015DA	-	32	C-1424	-
16	MVV015DB	-	33	C-1739	-
17	MVV016	+			

(++) Amplificó bien, (+) Amplificó tenue, (-) No amplificó

Fuente: Datos propios.

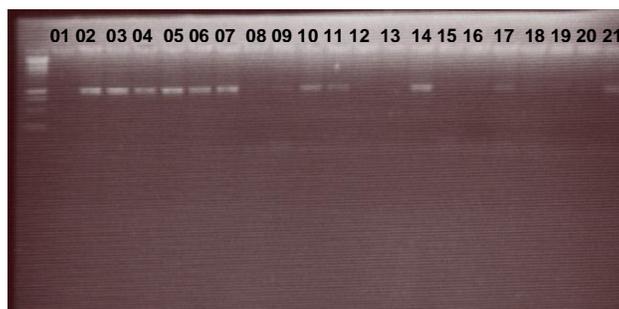


Figura 8. Amplificación de los aislamientos MVV004B (02), MVV006AA (03), MVV006AB (04), MVV006AC (05), MVV006B (06), MVV008A (07), MVV011A (10), MVV011B (11), MVV015D (14), Sem01SDA8 (21), usando el Primer 2a 2b.

Fuente: Datos propios.



Figura 9. Amplificación de los aislamientos Sem01SDC2 (23), C-PANT72 (31), usando el Primer 2a 2b.

Fuente: Datos propios.

Lee *et al.* (2010) señalan que la bacteria que causa el quemado foliar de arroz en Corea es *Pantoea agglomerans* y ellos la identificaron mediante un análisis de secuencia de genes de la región 16S rRNA comparándolo con el aislamiento tipo DSM 3493, el mismo que se utilizó en este estudio para realizar los iniciadores.

- Pruebas culturales, fisiológicas y bioquímicas

La caracterización cultural, fisiológica y bioquímica de las cepas aisladas así como de los testigos evaluados se puede observar en los Anexos 2, 3, 4 y 5. Del análisis UPGMA realizado a estas pruebas se generaron dos grupos (Figura 10). El grupo I conformado por el testigo negativo C-0012 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) siendo 98 % diferente en las pruebas realizadas en comparación con el grupo II. El segundo grupo conformado por los 11 aislamientos evaluados más el testigo positivo C-PANT 72 (*Pantoea* sp.).

El grupo II se dividió en 5 subgrupos. El subgrupo II a, estuvo conformado por los aislamientos MVV011A, MVV06B, MVV006AC, MVV006AA, MVV011B, presentando un ligero crecimiento color crema en el medio YCA. El subgrupo II b, representado por el aislamiento Sem01SDC2, teniendo un crecimiento mucoide blanco en el medio YCA. El subgrupo II c, representado por el testigo positivo C-PANT 72 presentó ligero crecimiento crema, hidrolizó la esculina y no produjo ácido a partir de manitol. El subgrupo II d, conformado por los aislamientos MVV015D y Sem01SDA8 presentaron un crecimiento mucoide amarillo en YCA, el primero no creció a 37 °C pero si lo hizo el segundo. El subgrupo II e, conformado por los aislamientos MVV008A y MVV004B presentaron crecimiento mucoide crema, el primero redujo nitrato a nitrito mientras el segundo no lo hizo, el aislamiento MVV004B produjo Indol y el aislamiento MVV008A no lo hizo.

Del análisis de similaridad realizado a los 11 aislamientos evaluados, hay grupos que difieren entre si en algunas pruebas culturales y bioquímicas, de ello se puede inferir que cada grupo de aislamientos representa a biovares diferentes de la misma especie; sin embargo Lee *et al.* (2010), utilizando el Sistema API 20E

obtuvieron reacciones divergentes al patrón de comparación, sugiriendo que la causa del problema podría ser subespecie de *Pantoea agglomerans*.

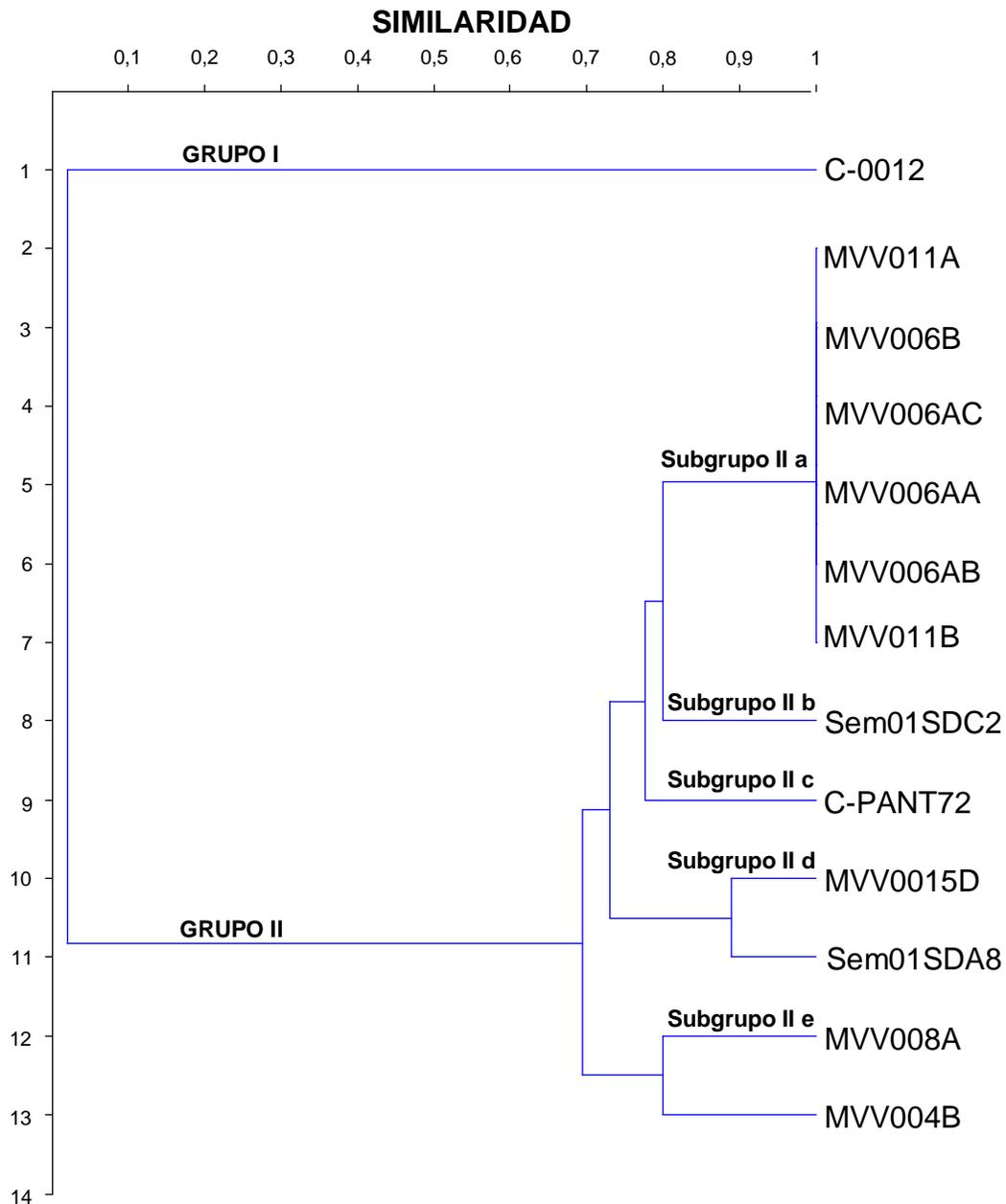


Figura 10. Dendrograma de similaridad para las pruebas culturales, fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos evaluados

Fuente: Datos propios

La caracterización cultural, fisiológica, bioquímica y morfológica ubica a los 11 aislamientos analizados como *Pantoea agglomerans*, estos resultados coinciden con lo señalado por Grimont y Grimont, 2001, Schaad *et al.*, 2001.

- Microscopia electrónica

Las células bacterianas midieron de 0,5 a 0,7 μm de ancho y de 1,0 a 1,6 μm de largo y presentaron flagelos peritricos (Figura 11), éstas medidas se encuentran en el rango señalado para la especie *Pantoea agglomerans* por Gavini *et al.* (1989), Schaad *et al.* (2001) y Grimont y Grimont (2001), así como también el tipo de flagelación.

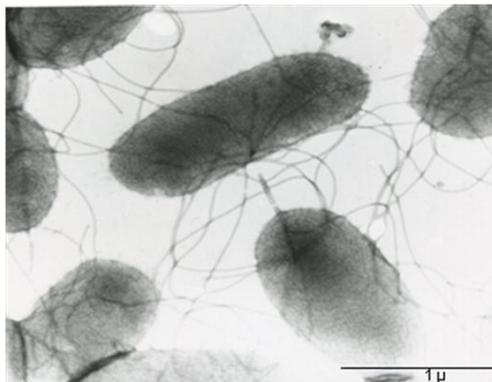


Figura 11. Microfotografía de las células bacterianas del aislamiento SEM01SDA8
Fuente: Datos propios

3. Estudios climatológicos

La precipitación media anual es de 1386,4 mm, distribuidos principalmente entre los meses de abril, mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre y noviembre, mientras que los meses secos corresponden a enero, febrero, marzo y diciembre (Cuadro 14 y Figura 12).

Cuadro 14. Resumen de variables climatológicas de Calabozo, Edo. Guárico, años 1990-2007.

	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
T. Med Aire (°C)	27,9	28,7	29,5	29,4	28,0	27,0	26,6	26,8	27,2	27,8	27,5	27,7
T. Max Aire (°C)	34,2	34,9	35,6	35,1	32,9	31,2	30,7	31,1	32,1	32,8	33,0	33,6
T. Min Aire (°C)	21,6	22,5	23,4	23,9	23,1	22,7	22,5	22,5	22,4	22,8	22,2	22,0
Precipitación (mm)	0,8	3,6	8,5	76,2	192,7	252,8	247,6	240,7	159,8	133,5	59,5	10,9
Humedad Relativa (%)	64,7	61,3	61,1	65,1	75,1	79,6	81,9	82,4	79,5	76,5	71,1	67,8

Fuente: INIA, 2008. Estación Agrometeorológica "Banco de San Pedro"

La temperatura máxima media anual fue de 33,1 °C y la mínima media fue de 22,6 °C, correspondiente a 18 años de registros, 10 de ellos son promedios mensuales y 8 provienen de valores diarios. Los meses donde la temperatura máxima media fue

mayor son enero, febrero, marzo y abril y los de temperatura mínima media menor fueron enero, febrero, julio, agosto, septiembre, noviembre y diciembre. La humedad relativa media anual fue de 72,2 %, siendo los meses de mayor humedad relativa media mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre y noviembre y los de menor humedad relativa media son enero, febrero, marzo, abril y diciembre (Figura 12).

En las parcelas del SRRG, se observó que la presencia de la sintomatología de la enfermedad en hojas ocurría entre los 55 y 70 días después de sembrado el cultivo (Figura 13), ubicándose en una etapa fenológica de elongación del tallo (final de la fase vegetativa) e inicio de la formación de la panícula (comienzo de la fase reproductiva).

Cuando el cultivo de arroz establecido en la parcela 217 llegó a esas etapas fenológicas, las condiciones microclimáticas (tomadas con la estación automatizada ubicada en dicha parcela) mostraron que la temperatura media fue de 26,2 °C, la temperatura máxima oscilo entre 30,6 y 31,2 °C, la mínima entre 21,2 y 21,9 °C, la del suelo entre 26,1 y 26,3 °C. La velocidad del viento oscilaba entre 6,5 y 6,8 km/h en dirección Oeste, la precipitación acumulada en ese período fue de 0,4 mm y la humedad relativa se encontraba entre 80,4 y 85,2 % (Cuadro 15 y Figura 13 y 14).

Cuadro 15. Resumen de variables climatológicas, Ciclo de producción Norte-Verano 2008-2009.

Días	Fecha	Temperatura (°C)				Viento		Precipitación (mm)	Humedad (%)
		Aire			Suelo	Velocidad (Km/h)	Dirección		
		Med.	Máx.	Min.					
01-10	09-11 al 18-11	27,3	32,1	22,5	28,6	5,3	W	63,8	88,3
11-20	19-11 al 28-11	26,5	30,3	22,7	27,8	4,5	W	36,8	91,5
21-30	29-11 al 08-12	26,6	30,9	22,3	28,2	6,9	W	7,6	86,4
31-40	09-12 al 18-12	26,1	31,3	20,9	27,3	5,3	W	0,0	83,7
41-50	19-12 al 28-12	25,9	31,0	20,9	26,4	7,6	WSW	0,0	80,0
51-60	29-12 al 07-01	26,2	30,6	21,9	26,3	6,5	W	0,4	85,2
61-70	08-01 al 17-01	26,2	31,2	21,2	26,1	6,8	W	0,0	80,4
71-80	18-01 al 27-01	27,4	32,2	22,6	26,6	5,8	W	0,2	81,2
81-90	28-01 al 06-02	27,0	31,5	22,4	26,7	6,4	W	12,0	83,8
91-100	07-02 al 16-02	26,4	31,7	21,1	25,7	6,7	W	2,4	79,9
101-110	17-02 al 26-02	27,1	33,0	21,2	26,1	7,4	W	0,0	74,2
111-120	27-02 al 08-03	28,0	34,2	21,8	26,2	7,4	W	0,0	73,0

Fuente: Datos propios, tomados de la estación climatológica automatizada ubicada en la parcela 217 del SRRG.

La decena de días anteriores a la aparición de los síntomas presentaron las siguientes condiciones climáticas: la temperatura media de 25,9 °C, la temperatura máxima de 31 °C, la mínima de 20,9 °C, la del suelo de 26,4 °C. La velocidad del viento de 7,6 km/h en dirección Oeste-Sur-Oeste, la precipitación acumulada en ese período fue de 0 mm y la humedad relativa en 80 % (Cuadro 15 y Figuras 13 y 14).

La comparación de las normales para las variables climáticas de temperaturas máximas, mínimas, medias; precipitación y humedad relativa para los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero que corresponden a los meses del ciclo de siembra Norte Verano reflejan que tanto los promedios de temperatura máxima como los de la media registrados por la estación automatizada (EA) ubicada en la parcela 217 (entre 1,8 - 2,9 °C y 0,5 - 1,6 °C respectivamente) estuvieron por debajo de los datos promedios de la estación agrometeorológica “Banco de San Pedro” del INIA - Calabozo para el periodo antes señalado. Los promedios de temperatura mínima oscilan entre 0,3 y 0,8 °C. Los promedios mensuales de temperatura máxima y media tomados por la EA en la parcela 217 se encuentran por debajo del límite inferior de los promedios tomados de la estación meteorológica del INIA, mientras que los promedios de temperatura media tomados por la EA en la parcela se encuentran entre el promedio y el límite inferior de los tomados de la estación meteorológica INIA (Figura 15).

Las sumatorias mensuales de precipitación registradas por la EA en la parcela 217 variaron desde 1,4 hasta 41,3 mm por arriba de las sumatorias promedios de la estación agrometeorológica “Banco de San Pedro” del INIA - Calabozo para el periodo antes señalado, siendo noviembre el mes de mayor variación. En relación a los promedios de la humedad relativa registrados por la EA en la parcela 217 éstos variaron desde 15,4 a 18,6 %, siendo éstos superiores a los promedios de la estación meteorológica del INIA, e inclusive al del límite superior durante todos los meses analizados (Figura 16).

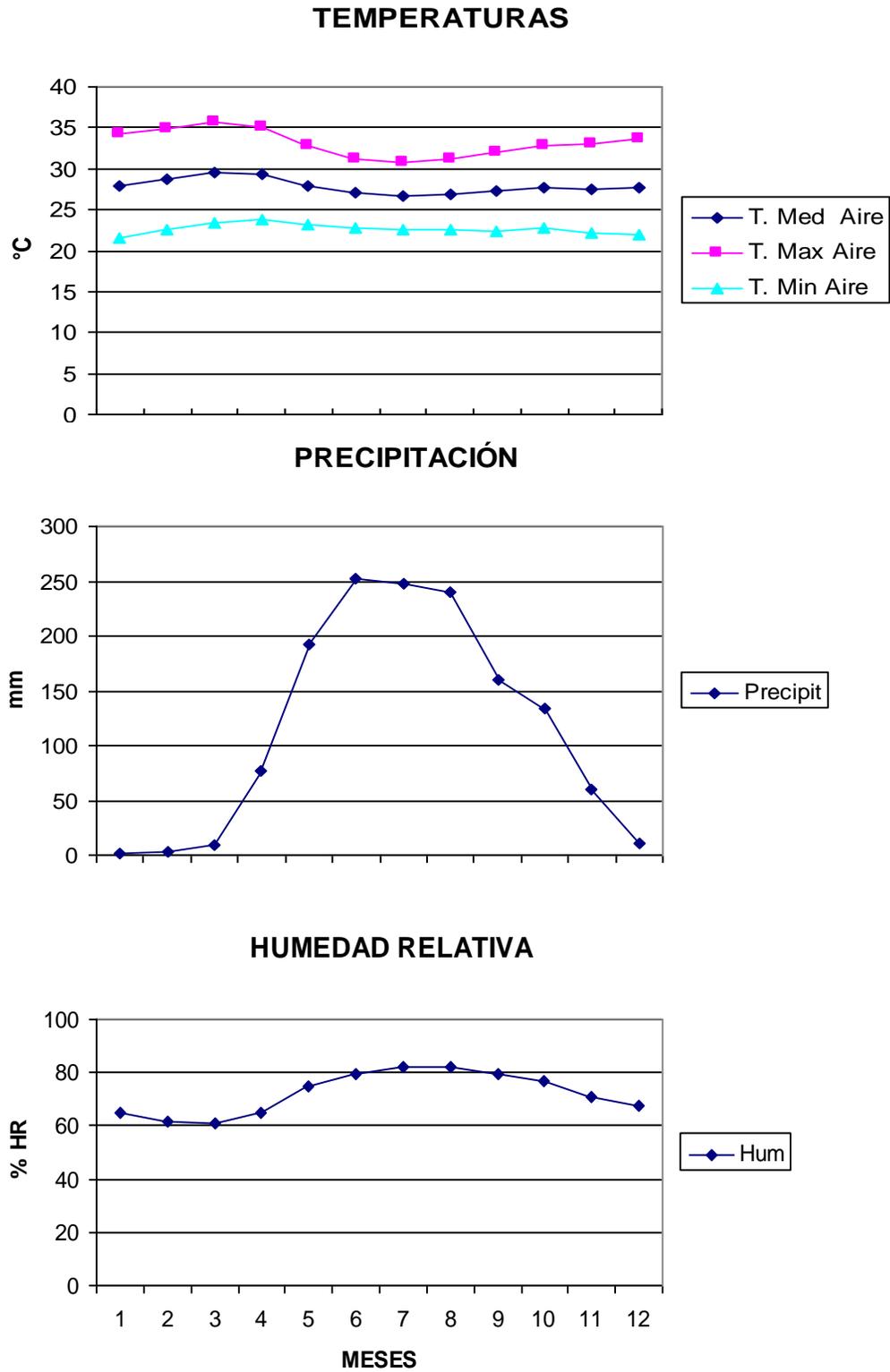
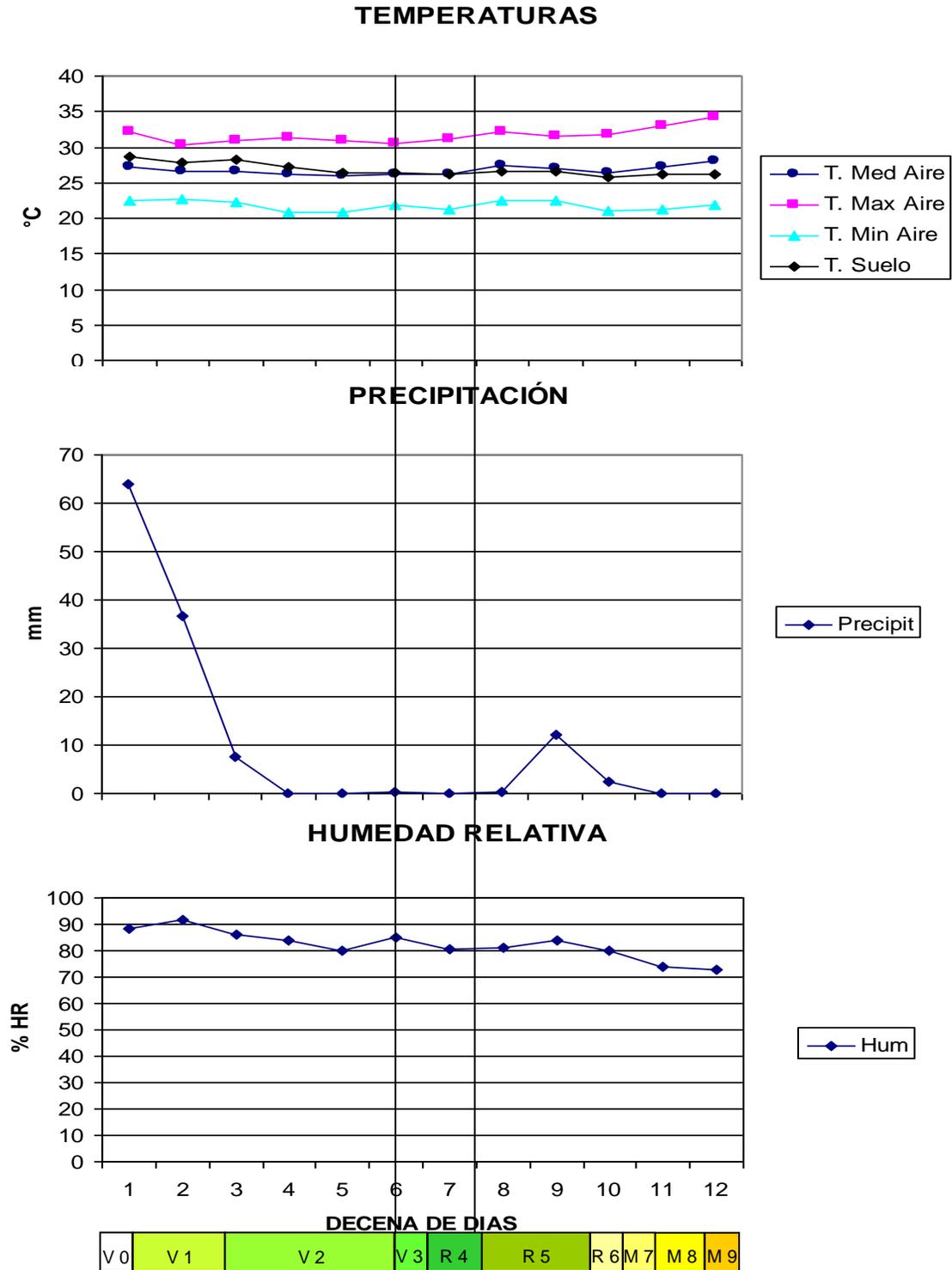


Figura 12. Temperaturas, precipitación y humedad relativa de Calabozo, Edo. Guárico, años 1990-2007.

Fuente: INIA, 2008. Estación Agrometeorológica "Banco de San Pedro"



ETAPAS DE DESARROLLO DEL ARROZ

Figura 13. Temperaturas, precipitación y humedad relativa, tomadas en la parcela 217 del SRRG, durante el ciclo de producción Norte-Verano 2008-2009.

Fuente: Datos propios, tomados de la estación climatológica automatizada ubicada en la parcela 217 del SRRG.

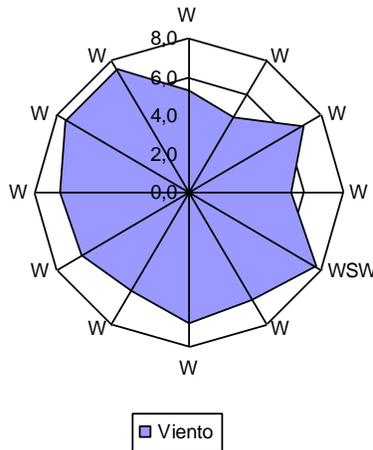


Figura 14. Velocidad y dirección del viento, tomadas en la parcela 217 del SRRG, durante el ciclo de producción Norte-Verano 2008-2009.

Fuente: Datos propios, tomados de la estación climatológica automatizada ubicada en la parcela 217 del SRRG.

Si bien las condiciones de humedad relativa ($\geq 80\%$, durante los primeros 90 días del cultivo) son favorables para la aparición de la enfermedad; los datos de temperatura máxima (30,6 a 31,2 °C, entre los 55 a 70 dds), media (26,2 °C, entre los 55 a 70 dds) se encuentran por debajo de los promedios y límites inferiores de los datos registrados por la estación agrometeorológica “Banco de San Pedro” del INIA – Calabozo. En cuanto a la precipitación, el 81,7 % (100,6 mm) fue registrado en los primeros 20 dds y sólo 0,3 % (0,4 mm) durante el periodo de aparición de los síntomas de la enfermedad.

Las variables de temperaturas máximas, medias y mínimas, así como la precipitación no parecieron ser factores epidemiológicos tan relevante en la ocurrencia de esta enfermedad, sin embargo el cambio de fase vegetativa (elongación del tallo) a reproductiva (inicio de panícula), que ocurre cuando aparecen los síntomas de quemado foliar pudieron ser más importantes epidemiológicamente (Agrios, 2007), así lo señala Schwartz *et al* (2003), en un trabajo sobre *Pantoea ananatis* en cebolla, donde la aparición de los síntomas de la enfermedad coincide con el inicio de formación de bulbos.

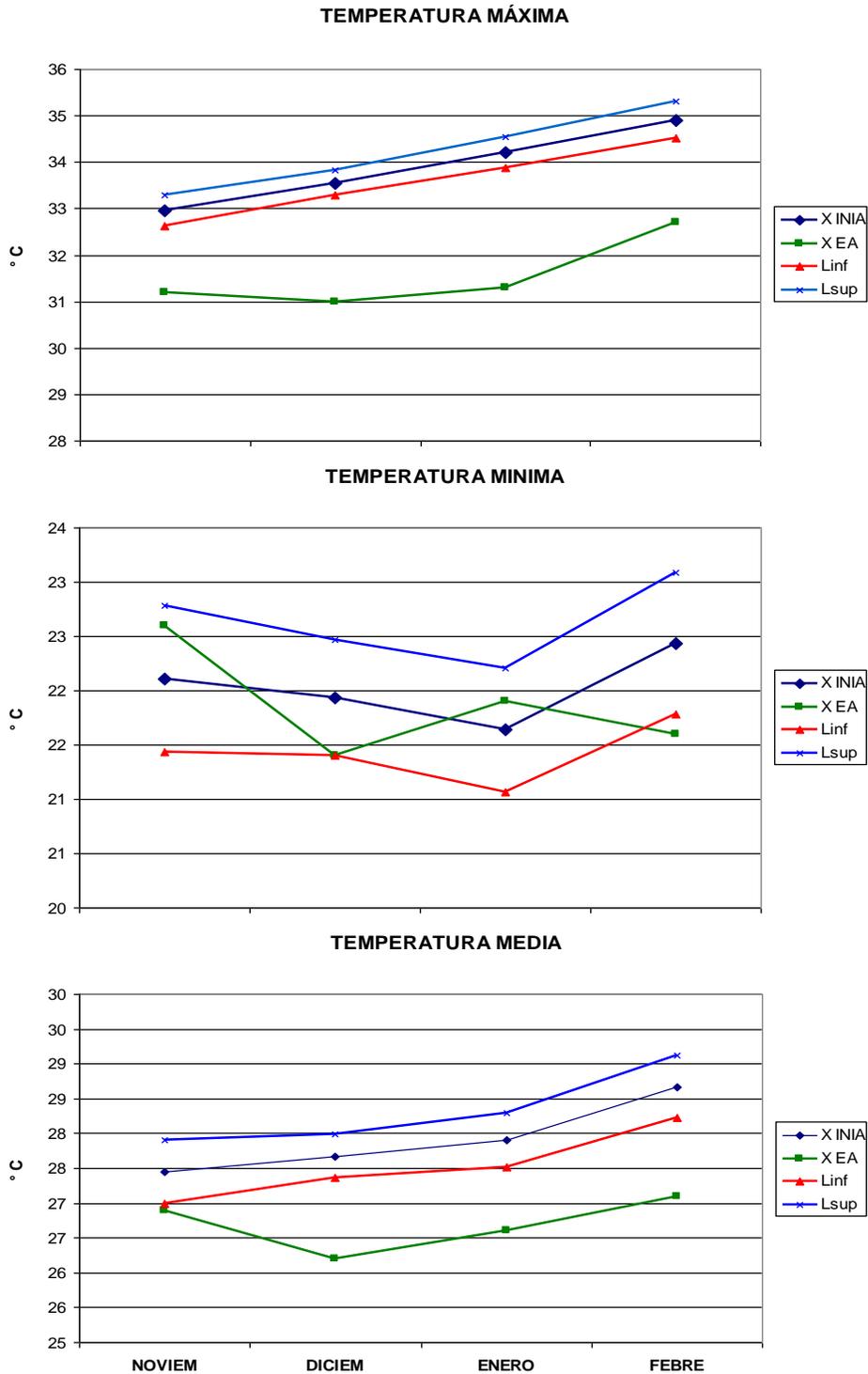


Figura 15. Normales de temperatura máxima, mínima y media correspondiente a los meses de noviembre a febrero. X INIA: promedio de la variable correspondiente a los datos del INIA; X EA: promedio de la variable correspondiente a los datos de la estación automatizada; Linf: límite inferior; Lsup: límite superior.

Fuente: INIA, 2008. Estación Agrometeorológica “Banco de San Pedro” y datos propios, tomados de la estación climatológica automatizada ubicada en la parcela 217 del SRRG.

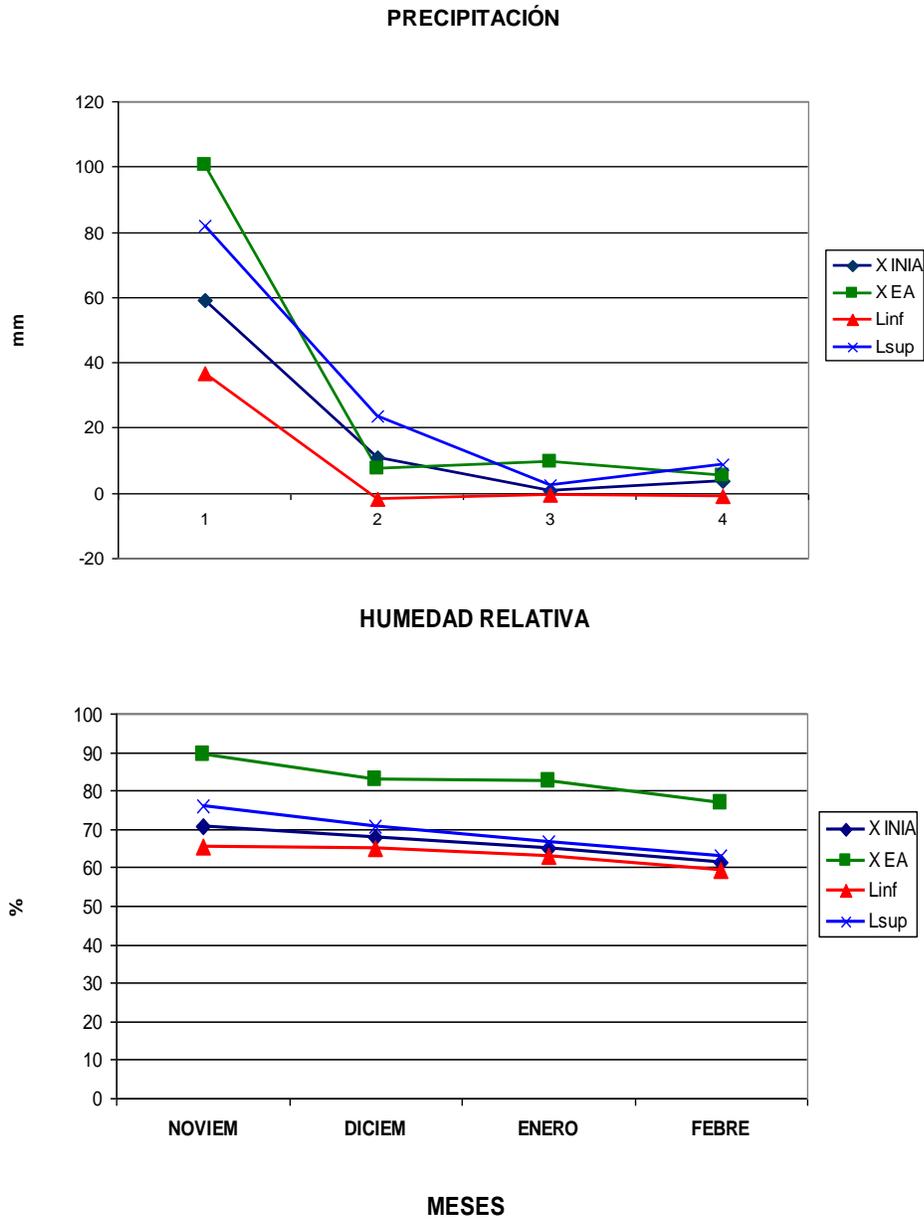


Figura 16. Normales de precipitación y humedad relativa correspondiente a los meses de noviembre a febrero. XINIA: promedio de la variable correspondiente a los datos del INIA; X EA: promedio de la variable correspondiente a los datos de la estación automatizada; Linf: límite inferior; Lsup: límite superior.

Fuente: INIA, 2008. Estación Agrometeorológica “Banco de San Pedro” y datos propios, tomados de la estación climatológica automatizada ubicada en la parcela 217 del SRRG.

4. Georeferenciación

En el cuadro 16 y figura 14 son listadas las parcelas que fueron muestreadas y además se indican en cuáles de ellas se obtuvieron aislamientos identificados como *Pantoea agglomerans* patogénicos (fila de color rojo) y no patogénicos (filas de color amarillo).

Cuadro 16. Parcelas muestreadas en el SRRG durante el ciclo Norte Verano 2008 2009

N°	Parcela	Cepa
1	71	No Patogénica
2	72	No Aislada
3	176	No Aislada
4	206	No Aislada
5	216	No Patogénica
6	217	Patogénica
7	225	No Aislada
8	229	No Aislada
9	238	No Aislada
10	501	No Aislada
11	502	No Patogénica
12	508	No Patogénica

Fuente: Datos propios

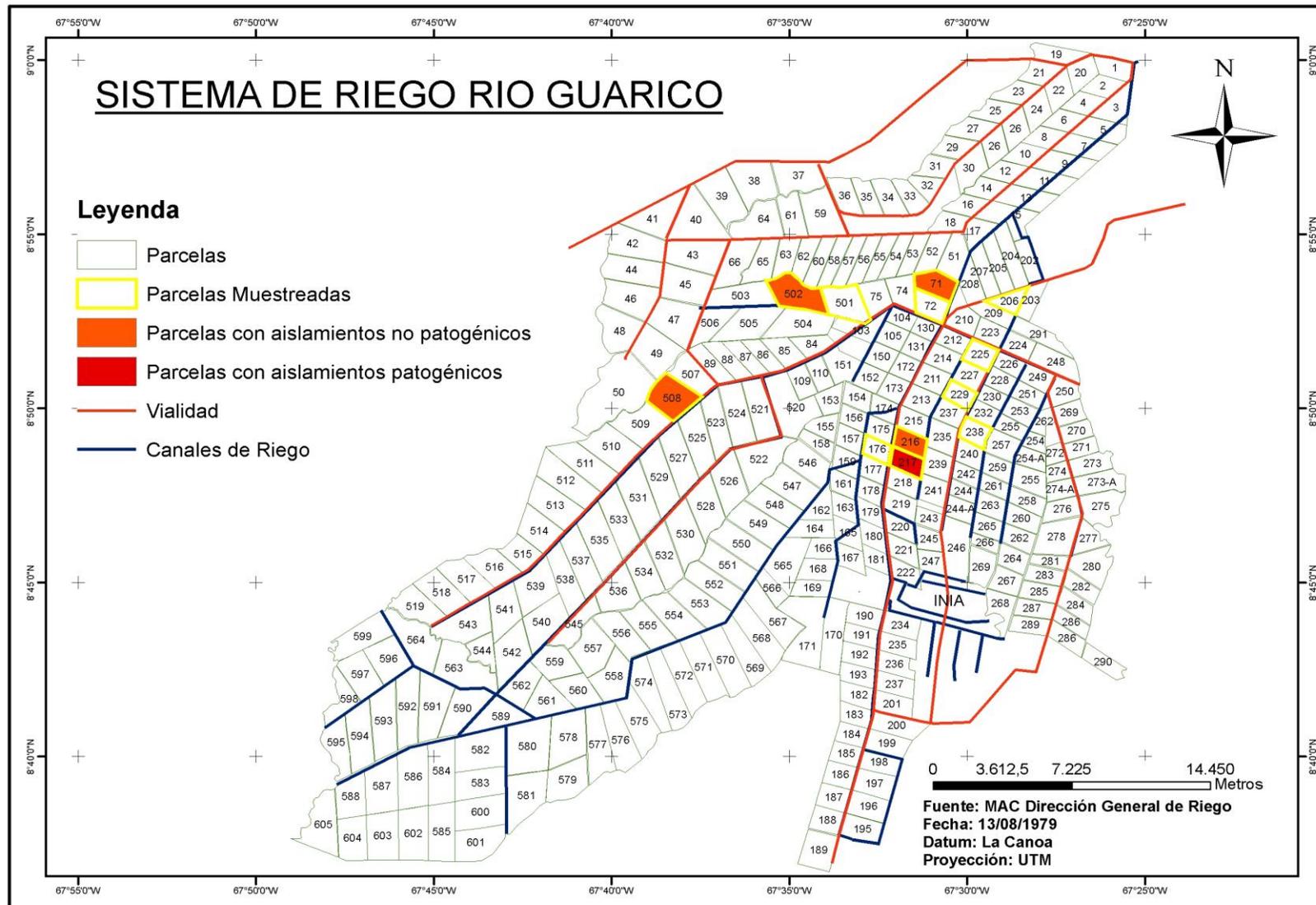


Figura. 17. Sistema de Riego Río Guárico, donde se muestran las parcelas muestreadas y aquellas donde se obtuvieron los aislamientos identificados como *Pantoea agglomerans* patogénicos y no patogénicos.

Fuente: UEMPPAT y datos propios.

5. Ensayo de control *in Vitro* para la evaluación de los productos químicos y biológicos

Los productos Extracto Etanólico de Flor Escondida (*Phyllanthus niruri* L.), TERRA BAF (Ácido Fúlvico) y KASUMIN (Kasugamicina), no inhibieron el crecimiento de las cepas bacterianas evaluadas en ningunas de las dosis ensayadas.

El análisis estadístico descriptivo permitió obtener el promedio, desviación estándar y varianza de cada producto en cada una de las dosis utilizadas sobre las cepas identificadas y testigo. Los resultados de los productos EPYPLANT y Sulfato de Estreptomicina (testigo positivo) que desarrollaron crecimiento de hongos y bacterias antagonistas y halo de inhibición respectivamente, son mostrados en los cuadros 17, 18, 19.

Los análisis de varianza (Cuadros 20, 21, 22), demostraron que hay diferencias significativas entre los productos EPYPLANT y el Sulfato de Estreptomicina (valor de $P < 0.0001$), para todos los aislamientos con excepción de Sem01SDC2. En la prueba de rangos de medias de Tukey para productos, EPYPLANT obtuvo valores de media menores que el Sulfato de Estreptomicina, para todos los aislamientos incluyendo Sem01SDC2 aunque en éste la diferencia no fue significativa (Cuadros 23, 24 y 25). Aunque EPYPLANT no logró superar al testigo, limitó el desarrollo de los diferentes aislamientos ensayados, al competir por espacio y nutrientes.

En la prueba de rangos de medias de Tukey para dosis (Anexos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17), se obtuvieron los siguientes resultados. En los aislamientos MV004B, MV006AA, MVV006AC, MVV006B y Sem01SDA8, las dosis 3 (8 l ha^{-1} y 100 ppm de EPYPLANT y Sulfato de Estreptomicina respectivamente) arrojaron rangos de medias superiores a las otras dosis; en los aislamientos MV011A y MV011B, las dosis 2 (4 l ha^{-1} y 50 ppm de EPYPLANT y Sulfato de Estreptomicina respectivamente) fueron superiores a las otras; en los aislamientos MV008A y MV015D las dosis 2 y 3 fueron las mejores y no tuvieron diferencias significativas entre ellas, en los aislamientos MV006AB y C-PANT72 no hubo diferencias

significativas entre las tres dosis y en el aislamiento Sem01SDC2 la dosis 1 (2 l ha⁻¹ y 25 ppm de EPYPLANT y Sulfato de Estreptomicina respectivamente) fue mejor. De estos resultados se puede inferir que las dosis 2 (comercial) y 3 (superior a la comercial) limitaron el crecimiento en el 75 % de los aislamientos evaluados.

En relación a la mejor dosis por producto, varió de acuerdo al aislamiento. En la prueba de rangos de medias de Tukey para dosis por productos (Anexos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 29), se tiene que para EPYPLANT en el aislamiento MV004B (no controló en ninguna de las dosis); en los aislamientos MV006AB, MVV006AC, MV015D y C-PANT72 aunque la dosis 3 obtuvo mejores valores de medias (exceptuando C-PANT72) no hubo diferencias significativas entre las tres dosis. En los aislamientos MV006AA, MVV006B, MV008A, Sem01SDA8, la dosis 3 fue mejor que las otras dosis; en los aislamientos MV011A, MV011B la dosis 2 fue mejor que las otras dosis y en el caso del aislamiento Sem01SDC2 las dosis 1 y 2 fueron las mejores (no hubo diferencias significativas). De estos resultados se puede inferir que las dosis 2 (comercial) y 3 (superior a la comercial) limitaron el crecimiento en el 50 % de los aislamientos evaluados para este producto. En cuanto al testigo positivo Sulfato de Estreptomicina en los aislamientos MV004B, MV006AA, MVV006AC, MVV006B, MV008A, la dosis 3 fue mejor que las otras dosis; en el aislamiento MV011A la dosis 2 fue mejor que las otras dosis; en los aislamientos MV011B y C-PANT72 las dosis 2 y 3 fueron mejores que la dosis 1; en los aislamientos MV006AB, MV015D, Sem01SDA8 no hubo diferencias significativas entre las tres dosis; en el aislamiento Sem01SDC2 las dosis 1 y 3 fueron mejores que la 2. De estos resultados se puede inferir que las dosis 2 (comercial) y 3 (superior a la comercial) limitaron el crecimiento en el 75 % de los aislamientos evaluados para este producto.

Para ambos productos, las dosis 2 (comercial) y 3 (superior a la comercial) limitaron el crecimiento en 50 hasta 75 % de los aislamientos evaluados.

Cuadro 17. Análisis estadístico descriptivo para el diámetro del halo de inhibición en el control de los aislamientos MVV004B, MVV006AA, MVV006AB, con los productos EPYPLANT y SULFATO De ESTREPTOMICINA a diferentes dosis.

PRODUCTO	Dosis	Aislamientos											
		MVV004B			MVV006AA			MVV006AB					
		T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3
EPYPLANT	X	0	0	0	0	0	6,6 ± 0,6 ^a	7,2 ± 0,8 ^a	8,8 ± 0,8 ^a	0	7,4 ± 0,6 ^a	7,4 ± 0,6 ^a	8,8 ± 0,5 ^a
	S	0	0	0	0	0	0,3	0,7	0,7	0	0,3	0,3	0,2
SULFATO DE ESTREPTOMICINA	X	0	11,6 ± 0,6 ^a	12,0 ± 1,0 ^a	13,6 ± 0,6 ^a	0	10,6 ± 0,9 ^a	12 ± 1,6 ^a	14,2 ± 1,3 ^a	0	14 ± 1,9 ^a	15,4 ± 3,7 ^a	15 ± 1,0 ^a
	S	0	0,3	1	0,3	0	0,8	2,5	1,7	0	3,5	13,3	1

X: Promedio (mm), ^a Desviación Estándar, S: Varianza

Dosis.

EPYPLANT: D1: 2 l ha⁻¹, D2: 4 l ha⁻¹, D3: 8 l ha⁻¹. SULFATO DE ESTREPTOMICINA: D1: 25 ppm, D2: 50 ppm, D3: 100 ppm.

Fuente: Datos propios

Cuadro 18. Análisis estadístico descriptivo para el diámetro del halo de inhibición en el control de los aislamientos MVV006AC, MVV006B, MVV008A con los productos EPYPLANT y SULFATO De ESTREPTOMICINA a diferentes dosis.

PRODUCTO	Dosis	Aislamientos											
		MVV006AC			MVV006B			MVV008A					
		T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3
EPYPLANT	X	0	8,2 ± 0,5 ^a	8,2 ± 0,5 ^a	10,0 ± 0,7 ^a	0	9,2 ± 0,5 ^a	11,0 ± 1,0 ^a	16,0 ± 0,7 ^a	0	7,0 ± 0,7 ^a	8,4 ± 0,6 ^a	9,4 ± 0,6 ^a
	S	0	0,2	0,2	0,5	0	0,2	1	0,5	0	0,5	0,3	0,3
SULFATO DE ESTREPTOMICINA	X	0	13,6 ± 0,9 ^a	13,6 ± 1,5 ^a	18,8 ± 1,1 ^a	0	14,4 ± 3,3 ^a	15,4 ± 0,6 ^a	17,6 ± 1,1 ^a	0	13,8 ± 1,3 ^a	16,6 ± 2,0 ^a	15,8 ± 0,8 ^a
	S	0	0,8	2,3	1,2	0	10,8	0,3	1,3	0	1,7	4,3	0,7

X: Promedio (mm), ^a Desviación Estándar, S: Varianza

Dosis.

EPYPLANT: D1: 2 l ha⁻¹, D2: 4 l ha⁻¹, D3: 8 l ha⁻¹. SULFATO DE ESTREPTOMICINA: D1: 25 ppm, D2: 50 ppm, D3: 100 ppm.

Fuente: Datos propios

Cuadro 19. Análisis estadístico descriptivo para el diámetro del halo de inhibición en el control de los aislamientos, MVV011A, MVV011B, MVV015D, con los productos EPYPLANT y SULFATO De ESTREPTOMICINA a diferentes dosis.

PRODUCTO	Dosis	Aislamientos											
		MVV011A			MVV011B			MVV015D					
		T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3
EPYPLANT	X	0	9,8 ± 1,6 ^a	12,8 ± 1,3 ^a	10,0 ± 1,0 ^a	0	9,8 ± 1,1 ^a	13,0 ± 1,0 ^a	8,0 ± 0 ^a	0	8,4 ± 1,1 ^a	10,6 ± 1,8 ^a	10,8 ± 1,9 ^a
	S	0	2,7	1,7	1	0	1,2	1	0	0	1,3	3,3	3,7
SULFATO DE ESTREPTOMICINA	X	0	16,0 ± 1,6 ^a	19,0 ± 1,2 ^a	17,2 ± 0,8 ^a	0	16,2 ± 0,8 ^a	19,6 ± 0,9 ^a	18,8 ± 0,8 ^a	0	18,2 ± 0,8 ^a	19,4 ± 0,9 ^a	19,6 ± 1,1 ^a
	S	0	2,5	1,5	0,7	0	0,7	0,8	0,7	0	0,7	0,8	1,3

X: Promedio (mm), ^a Desviación Estándar, S: Varianza

Dosis.

EPYPLANT: D1: 2 l ha⁻¹, D2: 4 l ha⁻¹, D3: 8 l ha⁻¹. SULFATO DE ESTREPTOMICINA: D1: 25 ppm, D2: 50 ppm, D3: 100 ppm.

Fuente: Datos propios

Cuadro 20. Análisis estadístico descriptivo para el diámetro del halo de inhibición en el control de los aislamientos Sem01SDA8, Sem01 SDC2, C-PANT72, con los productos EPYPLANT y SULFATO De ESTREPTOMICINA a diferentes dosis

PRODUCTO	Dosis	Aislamientos											
		Sem01SDA8			Sem01SDC2			C-PANT72					
		T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3	T	D1	D2	D3
EPYPLANT	X	0	9,2 ± 1,1 ^a	9,2 ± 1,1 ^a	14,2 ± 0,5 ^a	0	14,6 ± 1,7 ^a	14,2 ± 0,5 ^a	10,8 ± 1,1 ^a	0	0,3 ± 0,4 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	0
	S	0	1,2	1,2	0,2	0	2,8	0,2	1,2	0	0,17	0,13	0
SULFATO DE ESTREPTOMICINA	X	0	19,0 ± 1,2 ^a	17,4 ± 1,9 ^a	19,6 ± 1,5 ^a	0	15,8 ± 1,5 ^a	11,2 ± 1,8 ^a	15,4 ± 0,9 ^a	0	0,5 ± 0,5 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,3 ^a
	S	0	1,5	3,8	2,3	0	2,2	3,2	0,8	0	0,22	0,03	0,1

X: Promedio (mm), ^a Desviación Estándar, S: Varianza

Dosis.

EPYPLANT: D1: 2 l ha⁻¹, D2: 4 l ha⁻¹, D3: 8 l ha⁻¹. SULFATO DE ESTREPTOMICINA: D1: 25 ppm, D2: 50 ppm, D3: 100 ppm.

Fuente: Datos propios

Cuadro 21. Análisis de la varianza, del modelo, producto (Epyplant y Sulfato de Estreptomicina), dosis y la interacción dosis por producto de los aislamientos MVV004B, MVV006AA, MVV006AB, MVV006AC

F.V.	gl	Aislamientos											
		MVV004B			MVV006AA			MVV006AB			MVV006AC		
		CM	F	Valor p	CM	F	Valor p	CM	F	Valor p	CM	F	Valor p
Modelo	5	232.88	873.30	<0.0001	42.78	38.31	<0.0001	74.45	24.02	<0.0001	84.21	97.17	<0.0001
Producto	1	1153.20	4324.50	<0.0001	168.03	150.48	<0.0001	360.53	116.30	<0.0001	320.13	369.38	<0.0001
Dosis	2	2.80	10.50	0.0005	21.70	19.43	<0.0001	3.63	1.17	0.3268	40.83	47.12	<0.0001
Producto*Dosis	2	2.80	10.50	0.0005	1.23	1.10	0.3476	2.23	0.72	0.4968	9.63	11.12	0.0004
Error	24	0.27			1.12			3.10			0.87		
Total	29												

Fuente: Datos propios

Cuadro 22. Análisis de la varianza, del modelo, producto (Epyplant y Sulfato de Estreptomicina), dosis y la interacción dosis por producto, de los aislamientos MVV006B, MVV008A, MVV011A, MVV011B

F.V.	gl	Aislamientos											
		MVV006B			MVV008A			MVV011A			MVV011B		
		CM	F	Valor p	CM	F	Valor p	CM	F	Valor p	CM	F	Valor p
Modelo	5	51.09	21.74	<0.0001	83.39	64.15	<0.0001	74.21	44.09	<0.0001	113.55	154.85	<0.0001
Producto	1	104.53	44.48	<0.0001	381.63	293.56	<0.0001	320.13	190.18	<0.0001	472.03	643.68	<0.0001
Dosis	2	66.53	28.31	<0.0001	15.43	11.87	0.0003	24.63	14.63	0.0001	32.43	44.23	<0.0001
Producto*Dosis	2	8.93	3.80	0.0368	2.23	1.72	0.2008	0.83	0.50	0.6156	15.43	21.05	<0.0001
Error	24	2.35			1.30			1.68			0.73		
Total	29												

Fuente: Datos propios

Cuadro 23. Análisis de la varianza, del modelo, producto (Epyplant y Sulfato de Estreptomicina), dosis y la interacción dosis por producto de los aislamientos MVV015D, Sem01SDA8, Sem01SDC2, C-PANT72

F.V.	Aislamientos														
	MVV015D				Sem01SDA8				Sem01SDC2				C-PANT72		
	G1	CM	F	Valor p	CM	F	Valor p	CM	F	Valor p	CM	F	Valor p		
Modelo	5	129.82	70.17	<0.0001	110.51	65.01	<0.0001	23.01	13.28	<0.0001	101.18	9.31	<0.0001		
Producto	1	625.63	338.18	<0.0001	456.30	268.41	<0.0001	6.53	3.77	0.0640	381.63	35.12	<0.0001		
Dosis	2	10.90	5.89	0.0083	35.73	21.02	<0.0001	18.03	10.40	0.0006	9.70	0.89	0.4227		
Producto*Dosis	2	0.83	0.45	0.6426	12.40	7.29	0.0034	36.23	20.90	<0.0001	52.43	4.83	0.0173		
Error	24	1.85			1.70			1.73			10.87				
Total	29														

Fuente: Datos propios

Cuadro 24. Análisis de rangos de medias de Tukey para productos (Epyplant y Sulfato de Estreptomina) en los aislamientos MV004B, MV006AA, MV006AB, MV006AC.

		Aislamientos							
		MVV004B		MVV006AA		MVV006AB		MVV006AC	
Producto	n	Medias	GH	Medias	GH	Medias	GH	Medias	GH
Epyplant	15	0.00	A	7.53	A	7.87	A	8.80	A
SulfEstrept	15	12.40	B	12.27	B	14.80	B	15.33	B

GH: Grupos homogéneos

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Grados de libertad: 24

Fuente: Datos propios

Cuadro 25. Análisis de rangos de medias de Tukey para productos (Epyplant y Sulfato de Estreptomina) en los aislamientos MV006B, MV008A, MV011A, MV011B.

		Aislamientos							
		MVV006B		MVV008A		MVV011A		MVV011B	
Producto	n	Medias	GH	Medias	GH	Medias	GH	Medias	GH
Epyplant	15	12.07	A	8.27	A	10.87	A	10.27	A
SulfEstrept	15	15.80	B	15.40	B	17.40	B	18.20	B

GH: Grupos homogéneos

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Grados de libertad: 24

Fuente: Datos propios

Cuadro 26. Análisis de rangos de medias de Tukey para productos (Epyplant y Sulfato de Estreptomina) en los aislamientos MV015D, Sem01SDA8, Sem01SDC2, C-PANT72.

		Aislamientos							
		MVV015D		Sem01SDA8		Sem01SDC2		C-PANT72	
Producto	n	Medias	GH	Medias	GH	Medias	GH	Medias	GH
Epyplant	15	9.93	A	10.87	A	13.20	A	1.53	A
SulfEstrept	15	19.07	B	18.67	B	14.13	A	8.67	B

GH: Grupos homogéneos

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Grados de libertad: 24.

Fuente: Datos propios.

En Venezuela existe una poca experiencia en control de bacterias, algunos casos como para *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en yuca (Martínez *et al.*, 2007), *Xanthomonas phaseoli* en Caraota (Flores *et al.*, 2007 y Guerra, 2008), *Acidovorax avenae* subsp *avenae* en maíz (Díaz *et al.*, 2007). Sin embargo, para *Pantoea agglomerans* (*Pa*) no se encontró ningún trabajo.

Posiblemente esto se deba a que:

- *Pantoea agglomerans* ha sido reportado como patógeno de plantas, sólo en años recientes (Contreras *et al.*, 1994; Contreras *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003; Valenzuela-Morales *et al.*, 2007).
- *Pantoea agglomerans* es una bacteria que se utiliza como controlador biológico de otras bacterias fitopatógenas (Pusey *et al.*, 2008 y Pusey *et al.*, 2011).

Chase (1997), señala que Sulfato de Estreptomicina es más eficiente en el control de bacterias “Erwinias” que otros productos bactericidas”.

CONCLUSIONES

- Se identificó a *Pantoea agglomerans* como el agente causal de los síntomas de quemado foliar en arroz por vía rutinaria y estudios moleculares.
- La bacteria *Pantoea agglomerans* fue aislada en hojas y semillas de arroz, no se evidenció su presencia en las muestras de suelo ni de agua analizadas.
- La aparición de los síntomas ocurre entre los 55 y 70 días después de la siembra (dds).
- Las variables de temperaturas máximas, medias y mínimas, así como la precipitación no parecieron ser factores epidemiológicos tan relevantes en la ocurrencia de esta enfermedad, sin embargo el cambio de fase vegetativa (elongación del tallo) a reproductiva (inicio de panícula), que ocurre cuando aparecen los síntomas de quemado foliar pudieron ser más importantes epidemiológicamente.
- La bacteria *Pantoea agglomerans* fue ubicada y georeferenciada en cinco parcelas del Sistema de Riego Río Guárico.
- El producto EPYPLANT no superó al testigo positivo (Sulfato de Estreptomicina), sin embargo limitó el crecimiento de los aislamientos evaluados entre 50 % y 75 %, además la dosis 2 (4 l ha⁻¹) y 3 (8 l ha⁻¹) fueron las mejores.

RECOMENDACIONES

- Realizar más pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de biovares de la especie *Pantoea agglomerans*.
- Evaluar el porcentaje en que disminuye los rendimientos de arroz a causa de la enfermedad.
- Evaluar el manejo agronómico del cultivo en relación a la fertilización, en especial la dosis de nitrógeno aplicada; para incluirlo en el manejo integrado de la enfermedad.
- Evaluar transmisión de la bacteria a partir de la semilla a la plántula.
- Evaluar las diferentes malezas propias del sistema arrocero como posibles reservorios de la enfermedad en futuras investigaciones epidemiológicas.
- Realizar éste trabajo de investigación en el ciclo de siembra correspondiente al período de lluvias.
- Utilizar EPYPLANT en la dosis recomendada (4 l ha^{-1}) a partir de los 40 días después de sembrado el cultivo de manera preventiva o cuando la incidencia y severidad de la enfermedad sea baja y la dosis superior a la comercial (8 l ha^{-1}) en caso alta incidencia y severidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. 2007. Fitopatología. 2^{da} ed. Editorial LIMUSA. México. 838 p.
- Azegami, K.; Ozaki, K.; Matsuda, A.; Ohata, K. 1983. Bacterial palea browning, a new disease of rice caused by *Erwinia herbicola*. Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. Ser. C. 37:1-12.
- Bradbury, F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. C.A.B. International Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, England. p 332.
- Chase, A. 1997. Foliage plant disease. Diagnosis and control. APS-Press. St. Paul, Minnesota. 169 p.
- Comerma, S.; Ovalles, F. 1987. Informe sobre caracterización de sitios experimentales del estado Guárico (Sector Calabozo). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, estado Aragua. p 27.
- Contreras, N.; González, C.; Gómez, N.; Vargas, N. 2001. *Erwinia herbicola* en plantaciones de arroz (*Oryza sativa* L.) en Lecherito, estado Guárico. Resúmenes del XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Fitopatología Venezolana 14 (2) 50.
- Contreras, N.; Trujillo, G.; Hernández, Y. 1994. *Erwinia herbicola* causante de un tizón en hojas de *Aglaonema* spp. Agronomía Tropical 44 (3) 335-343.
- Delgado, M.; Ortiz A.; Guevara Y.; Subero L. 2002. Evaluación sanitaria de semillas de cuatro variedades de arroz en Venezuela. Agronomía Tropical 52 (2) 223-234.
- Díaz, O.; Hernández Y.; Trujillo, G. 2007. Aislamientos de bacterias antagonistas a *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae* causante de la quemazón de los cereales en Maíz (*Zea mays* L.). Fitopatología Venezolana 20, 47 (Abstract).

- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2007. *Xanthomonas oryzae*, Diagnostic. EPPO Bulletin (37): 543-553.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2008. EPPO A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests (version 2008-09). [en línea].
<http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA1.htm>
[Consulta: 14 de Noviembre del 2008]
- Flores, C.; Hernández, Y.; Trujillo, G. 2007. Selección de bacterias antagonistas a *Xanthomonas phaseoli* causante de la quemazón bacteriana de la Caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) Fitopatología Venezolana 20, 51 (Abstract).
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). 2008. FAOSTAT. [en línea]. <http://www.fao.org>
[Consulta: 15 de Diciembre del 2008]
- Gavini, F.; Mergaert, J.; Beji, A.; Mielcarek, C.; Izard, D.; Kersters, K.; De Ley, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijernk, 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39 (3): 337-345.
- Gonzáles, A.; Contreras, N.; Galindo, I.; Sánchez, B.; Gómez, N. 2003. Identificación convencional y molecular de *Pantoea agglomerans*, patógeno bacteriano aislado en dos localidades del circuito arrocero nacional. I Cong. Venez. Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola. [en línea].
http://www.danac.org.ve/semana/index.php?id_semana=189
[Consulta: 15 de Noviembre del 2008]
- Goto, M. 1992. Fundamentals of bacterial plant pathology. Academic press, Inc. Tokio, Japón. p 226-271.

- Goto, M.; Zeigler, R.; John, V. 1988. Progress in seed health research on seedborne and contaminant bacteria, viruses, and nematodes. In: International Rice Research Institute (ed). Rice Seed Health. Manila, Philippines. p 131-150.
- Grimont, P.; Grimont, F. 2001. *Genus XXIII. Pantoea. Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters and De Ley 1989, 343 emend. Mergaert, Verdonck and Kesters 1993.* In: Garrity, G.; Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J. (eds). Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Two, The proteobacteria. Part B, The Gammaproteobacteria. p 713-719.
- Guerra, R. 2008. Evaluación de aislamientos de rizobacterias como posibles agentes de control biológico de la bacteria *Xanthomonas phaseoli* en Caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua. p 54.
- Guevara, Y.; Rondón, A.; Solórzano, R. 1980. Bacteriosis del mango (*Mangifera indica* L.) en Venezuela. 1. Sintomatología e identificación. *Agronomía Tropical* 30 (1-6): 65-76.
- Guevara, Y.; Maselli, A. 1999. El Tizón bacteriano del arroz en Venezuela. *Agronomía Tropical* 49 (4) 505-516.
- Hammer, Ø; Harper, D; Ryan, P. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4 (1) 1-9.
- Holdridge, L. 1982. Ecología, basada en zonas de vida. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. p 216.

- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA). 2004. El Cultivo del arroz en Venezuela. Comp. Orlando Páez; Edit. Alfredo Romero. Serie Manuales de Cultivo INIA N° 1. Maracay. p 202.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA). 2008. Datos climatológicos de la estación agrometeorológica “Banco de San Pedro”, Calabozo estado Guárico, registro 1990 - 2007. Mimeografiado.
- International Rice Research Institute (IRRI). 2008. Cereal knowledge bank, Rice Doctor. [en línea].
http://www.knowledgebank.irri.org/riceDoctor/default.htm#Welcome_to_Rice_Doctor.htm
[Consulta: 15 de Diciembre del 2008]
- Jiménez, O.; Contreras, N.; Rodríguez, C. 2007. Identificación y caracterización de *Pantoea agglomerans* aislada de plantas de *Gloxinia* (*Gloxinia alba*). Bioagro 19 (1): 53-57.
- Klement, Z.; Rudolph, K.; Sands, D. 1990. Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiado. Budapest, Hungary. p 98.
- Lee, B.; Hong, P.; Kim, B. 2010. First report of leaf caused by *Pantoea agglomerans* on rice in Korea. Plant Disease 94 (11): 1372.
- Lee, B.; Park, D.; Kang, H.; Kim, J.; Song, E.; Park, I.; Yoon, U.; Hahn, J.; Koo, B.; Lee, G.; Kim, H.; Park, H.; Yoon, K.; Kim, J.; Jung, C.; Koh, N.; Go, S. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. Nucleic Acids Research 33 (2) 577-586.
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. New York, U.S.A. Department of Patology Albert Einstein College of Medicine. p 432.

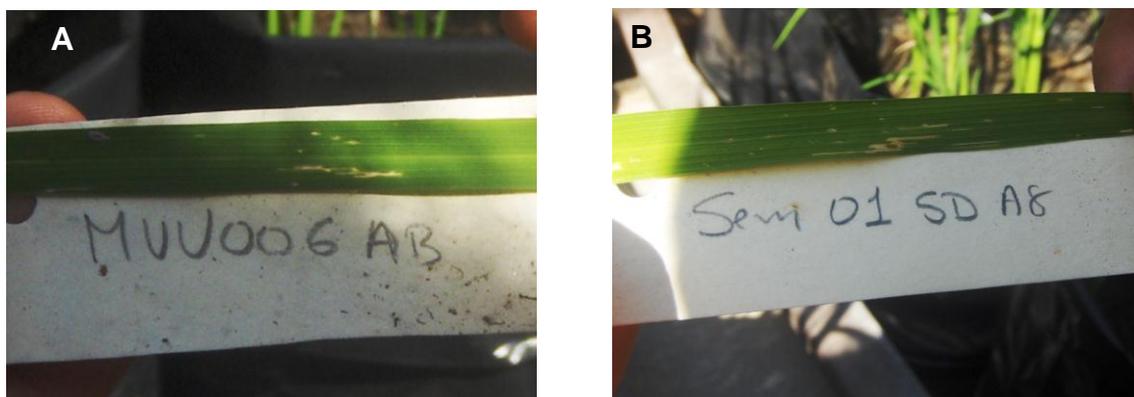
- Lozano, J. 1977. Identification of bacterial leaf blight in rice, caused by *Xanthomonas oryzae*, in America. Plant Disease Reporter 61 (8) 644-648.
- Martínez, E.; Hernández, Y.; Trujillo, G. 2007. Aislamiento preliminar de bacterias antagonistas contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. Fitopatología Venezolana 20, 47 (Abstract).
- Maselli, A. 2006. Informe Técnico. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas – CENIAP, Laboratorio de Bacteriología, Maracay. Mimeografiado.
- Mew, T., 1987. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. Annual Reviews Phytopathology 25: 359-382.
- Mew, T. 1992 Bacterial diseases. In: Webster, R.; Gunnell, P (eds). Compendium of rice diseases. The American Phytopathology Society. Minnesota, USA. p 6-12.
- Mew, T.; Alvarez, A.; Swings, J. 1993. Focus on bacterial blight of rice. Plant Disease 77: 5 - 12.
- Mizukami, T.; Wakimoto, S. 1969. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. Annual Reviews Phytopathology 7: 51-72.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2008. Nucleotide database for *Pantoea agglomerans*. [en línea].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&cmd=search&term=Pantoea+agglomerans>
[Consulta: 21 de Noviembre del 2008]
- Niño-Liu, D.; Ronald, P.; Bogdanove, A. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. Molecular Plant Pathology 7 (5) 303 – 324.

- Oda, M.; Sekizawa, Y.; Watanabe, T. 1966. Phenazines as disinfectants of the rice plant. *Applied Microbiology* 14 (3) 365-367.
- Ou, 1985. Rice disease. CAB. International Mycological Institute. Madison, USA. p 61-88.
- Peña, A.; Carrizales, A. 2007. ¿Cómo esta la bacteriosis en arroz en Calabozo? *Noticiero Agropecuario*, Junio.
- Pusey, P.; Stockwell, V.; Reardon, C.; Smits, T.; Duffy, B. 2011. Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. *Phytopathology* 101 (10): 1234-1241.
- Pusey, P.; Stockwell, V.; Rudell, D. 2008. Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 98 (10): 1136-1143.
- Rodríguez, M.; Matheus, J.; Gerstl, A.; Santana, M. 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en Ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia* 33 (7): 532-536.
- Rodríguez, P.; Rico, G. 1995. Macrocaracterización de las zonas productoras de arroz. Unidad 1. En: Rodríguez, P.; Rico, G.; Peña, J.; Monasterio, J.; Amaya, A. Manejo de suelos en arroz (eds). Módulo 1. FUNDARROZ, FONAIAP, IUTEC, UCV-agronomía. p 1 – 15.
- Rozen, S.; Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, p 365-386.
- Saddler, G.; Bradbury, J. 2001. *Genus I. Xanthomonas*. *Dowson 1939, 187^{AL} emend. Vauterin, Hoste, Kersters y Swing 1995, 483*. . In: Garrity, G.;

Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J. (eds). *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume Two, The proteobacteria. Part B, The Gammaproteobacteria. p 63-90.

- Schaad, N.; Jones, J.; Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3ra.ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. p 371.
- Schwartz, H.; Otto, K.; Gent, H. 2003. Relation of temperature and rainfall to development of *Xanthomonas* and *Pantoeas* leaf blights of onion in Colorado. *Plant Disease* 87 (1): 11-14.
- Trujillo, G.; Hernández, Y.; Subero, L.; Garrido, M.; Muñoz, C. 1999. La quemazón bacteriana del arroz causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* en Calabozo, Estado Guárico, Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 12 (1) 2-5.
- Valenzuela-Morales, G.; Silva-Rojas, H.; Ochoa-Martínez, D.; Valdez-Moctezuma, E.; Alarcon-Zuñiga, B.; Zelaya-Molina, L.; Cordova-Tellez, L.; Mendoza-Onofre, L.; Vaquera-Huerta, H.; Carballo-Carballo, A.; Farfán-Gómez. A.; Avila-Quezada, G. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Disease* 91 (10): 1365.
- Whitlock, V.; Hill, R.; Cowley, H. 1986. New bacterial pathogen causing blight of cassava in Southern Africa. *Plant Disease* 70 (2): 167-169.
- Wollum, A. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A.; Miller, R.; Keeney (eds). *Methods of soil analysis properties*, Part 2. Second edition. Chemical and microbiological properties. Agron. Ser. N° 9, Am. Soc. Agron., Inc., Madison WI. p 781-802.

ANEXOS



Anexo 1. Avance del quemado a partir de los puntos de inoculación. A) Aislamiento MVV006AB. B) Aislamiento Sem01SDA8.
Fuente: Datos propios.

Anexo 2. Caracterización cultural de los aislamientos

Aislamiento	Medios de cultivo			
	AN	D3	SX	YCA
MVV004B	+	+	-	+1
MVV006AA	+	+	-	+2
MVV006AB	+	+	-	+2
MVV006AC	+	+	-	+2
MVV006B	+	+	-	+2
MVV008A	+	+	-	+1
MVV011A	+	+	-	+2
MVV011B	+	+	-	+2
MVV015D	+	+	-	+3
Sem01SD A8	+	+	-	+3
Sem01 SD C2	+	+	-	+4
C-PANT 72	+	+	-	+2
C-0012	+	-	+	+3

AN= + Hay crecimiento, - No hay crecimiento. D3= + el medio cambia de color, - el medio no cambia de color. SX= + Hay degradación del almidón, - No hay degradación del almidón. YCA= -) No crece, +) Si crece, +1) Crecimiento mucoide crema, +2) Crecimiento ligero crema, +3) Crecimiento mucoide amarillo, +4) Crecimiento mucoide blanco.

Fuente: Datos propios.

Anexo 3. Caracterización morfológica de las colonias de los aislamientos

Aislamiento	Color	Forma	Elevación	Borde	Tinción Gram	KOH 3 %
MVV004B	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
MVV006AA	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
MVV006AB	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
MVV006AC	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
MVV006B	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
MVV008A	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
MVV011A	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
MVV011B	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
MVV015D	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
Sem01SD A8	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
Sem01 SD C2	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+
C-PANT 72	Blanco Crema	BC	Convexo	Entero	-	+
C-0012	Amarilla	BC	Convexo	Entero	-	+

Fuente: Datos propios.

Anexo 4. Caracterización fisiológica de los aislamientos

Aislamiento	Requerimiento de Oxígeno	Crecimiento a		
		37 °C	Sal 3 %	Sal 5 %
MVV004B	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
MVV006AA	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
MVV006AB	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
MVV006AC	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
MVV006B	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
MVV008A	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
MVV011A	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
MVV011B	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
MVV015D	Anaeróbica Facultativa	-	+	+
Sem01SD A8	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
Sem01 SD C2	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
C-PANT 72	Anaeróbica Facultativa	+	+	+
C-0012	Aeróbica	-	+	-

Fuente: Datos propios.

Anexo 5. Caracterización bioquímica de los aislamientos

Aislamiento	PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS A PARTIR DE												
	Catalasa	Oxidasa	GEL	Red Nit	H Almidón	H Esculina	P. Indol	P. H ₂ S	Arabinosa	Maltosa	Manitol	Sorbitol	Xylosa
MVV004B	+	-	+	-	-	-	+	+a	+	+	+	-	+
MVV006AA	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
MVV006AB	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
MVV006AC	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
MVV006B	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
MVV008A	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
MVV011A	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
MVV011B	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
MVV015D	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Sem01SD A8	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Sem01 SD C2	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
C-PANT 72	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
C-0012	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+

Fuente: Datos propios.

Anexo 6. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV004B

Dosis	Medias	n	
D1	5.80	10	A
D2	6.00	10	A
D3	6.80	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 0.57677

Error: 0.2667 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 7. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV006AA

Dosis	Medias	n	
D1	8.60	10	A
D2	9.60	10	A
D3	11.50	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 1.18027

Error: 1.1167 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 8. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV006AB

Dosis	Medias	n	
D1	10.70	10	A
D2	11.40	10	A
D3	11.90	10	A

Alfa: 0.05 DMS: 1.96653

Error: 3.1000 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 9. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV006AC

Dosis	Medias	n	
D2	10.90	10	A
D1	10.90	10	A
D3	14.40	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 1.03979

Error: 0.8667 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 10. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV006B

Dosis	Medias	n	
D1	11.80	10	A
D2	13.20	10	A
D3	16.80	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 1.71220

Error: 2.3500 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 11. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV008A

Dosis	Medias	n	
D1	10.40	10	A
D2	12.50	10	B
D3	12.60	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 1.27348

Error: 1.3000 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 12. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV011A

Dosis	Medias	n	
D1	12.90	10	A
D3	13.60	10	A
D2	15.90	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 1.44912

Error: 1.6833 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 13. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV011B

Dosis	Medias	n	
D1	13.00	10	A
D3	13.40	10	A
D2	16.30	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 0.95647

Error: 0.7333 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 14. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento MVV015D

Dosis	Medias	n	
D1	13.30	10	A
D2	15.00	10	B
D3	15.20	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 1.51917

Error: 1.8500 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 15. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento Sem01SDA8

Dosis	Medias	n	
D2	13.30	10	A
D1	14.10	10	A
D3	16.90	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 1.45628

Error: 1.7000 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 16. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento Sem01SDC2

Dosis	Medias	n	
D2	12.70	10	A
D3	13.10	10	A
D1	15.20	10	B

Alfa: 0.05 DMS: 1.47049

Error: 1.7333 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 17. Prueba de Tukey para Dosis del aislamiento C-PANT72

Dosis	Medias	n	
D1	4.00	10	A
D3	5.40	10	A
D2	5.90	10	A

Alfa: 0.05 DMS: 3.68187

Error: 10.8667 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 18. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV004B

Producto	Dosis	Medias	n	
SulfEstrept	D1	11.60	5	B
SulfEstrept	D2	12.00	5	B
SulfEstrept	D3	13.60	5	C

Alfa: 0.05 DMS: 1.00990

Error: 0.2667 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 19. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV006AA

Producto	Dosis	Medias	n	
Epyplant	D1	6.60	5	A
Epyplant	D2	7.20	5	A
Epyplant	D3	8.80	5	B
SulfEstrept	D1	10.60	5	C
SulfEstrept	D2	12.00	5	D
SulfEstrept	D3	14.20	5	E

Alfa: 0.05 DMS: 2.06660

Error: 1.1167 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 20. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV006AB

Producto	Dosis	Medias	n	
Epyplant	D1	7.40	5	A
Epyplant	D2	7.40	5	A
Epyplant	D3	8.80	5	A
SulfEstrept	D1	14.00	5	B
SulfEstrept	D3	15.00	5	B
SulfEstrept	D2	15.40	5	B

Alfa: 0.05 DMS: 3.44330

Error: 3.1000 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 21. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV006AC

Producto	Dosis	Medias	n			
Epyplant	D1	8.20	5	A		
Epyplant	D2	8.20	5	A		
Epyplant	D3	10.00	5	A		
SulfEstrept	D2	13.60	5		B	
SulfEstrept	D1	13.60	5		B	
SulfEstrept	D3	18.80	5			C

Test : Tukey Alfa: 0.05 DMS: 1.82063

Error: 0.8667 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 22. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV006B

Producto	Dosis	Medias	n			
Epyplant	D1	9.20	5	A		
Epyplant	D2	11.00	5	A		
SulfEstrept	D1	14.40	5		B	
SulfEstrept	D2	15.40	5		B	C
Epyplant	D3	16.00	5		B	C
SulfEstrept	D3	17.60	5			C

Alfa: 0.05 DMS: 2.99798

Error: 2.3500 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 23. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV008A

Producto	Dosis	Medias	n				
Epyplant	D1	7.00	5	A			
Epyplant	D2	8.40	5	A	B		
Epyplant	D3	9.40	5		B		
SulfEstrept	D1	13.80	5			C	
SulfEstrept	D3	15.80	5			C	D
SulfEstrept	D2	16.60	5				D

Tukey Alfa: 0.05 DMS: 2.22980

Error: 1.3000 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 24. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV011A

Producto	Dosis	Medias	n				
Epyplant	D1	9.80	5	A			
Epyplant	D3	10.00	5	A			
Epyplant	D2	12.80	5		B		
SulfEstrept	D1	16.00	5			C	
SulfEstrept	D3	17.20	5			C	D
SulfEstrept	D2	19.00	5				D

Alfa: 0.05 DMS: 2.53735

Error: 1.6833 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 25. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV011B

Producto	Dosis	Medias	n					
Epyplant	D3	8.00	5	A				
Epyplant	D1	9.80	5		B			
Epyplant	D2	13.00	5			C		
SulfEstrept	D1	16.20	5				D	
SulfEstrept	D3	18.80	5					E
SulfEstrept	D2	19.60	5					E

Alfa: 0.05 DMS: 1.67473

Error: 0.7333 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 26. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento MVV015D

Producto	Dosis	Medias	n					
Epyplant	D1	8.40	5	A				
Epyplant	D2	10.60	5	A				
Epyplant	D3	10.80	5	A				
SulfEstrept	D1	18.20	5		B			
SulfEstrept	D2	19.40	5			B		
SulfEstrept	D3	19.60	5				B	

Alfa: 0.05 DMS: 2.65999

Error: 1.8500 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 27. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento Sem01SDA8

Producto	Dosis	Medias	n					
Epyplant	D1	9.20	5	A				
Epyplant	D2	9.20	5	A				
Epyplant	D3	14.20	5		B			
SulfEstrept	D2	17.40	5				C	
SulfEstrept	D1	19.00	5					C
SulfEstrept	D3	19.60	5					C

Alfa: 0.05 DMS: 2.54988

Error: 1.7000 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 28. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento Sem01SD C2

Producto	Dosis	Medias	n					
Epyplant	D3	10.80	5	A				
SulfEstrept	D2	11.20	5	A				
Epyplant	D2	14.20	5			B		
Epyplant	D1	14.60	5				B	
SulfEstrept	D3	15.40	5					B
SulfEstrept	D1	15.80	5					B

Alfa: 0.05 DMS: 2.57475

Error: 1.7333 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 29. Prueba de Tukey para Producto del aislamiento C-PANT72

Producto	Dosis	Medias	n		
Epyplant	D3	0.00	5	A	
Epyplant	D2	1.60	5	A	
Epyplant	D1	3.00	5	A	
SulfEstrept	D1	5.00	5	A	B
SulfEstrept	D2	10.20	5		B
SulfEstrept	D3	10.80	5		B

Alfa: 0.05 DMS: 6.44678

Error: 10.8667 gl: 24

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)