

IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA BACTERIOSIS DEL FOLLAJE DEL ARROZ EN PANAMÁ.¹ 1999.

Kilmer Von Chong¹; Denise Broce²; Diana Rodríguez³; Johanna Vargas⁴

RESUMEN

Durante el segundo semestre de 1999 se caracterizaron e identificaron los agentes causales de la bacteriosis del follaje del arroz en los laboratorios de IDIAP – Divisa. La gran variabilidad en la intensidad de daño y en la sintomatología ha llevado a confundirlos con las causadas por hongos o deficiencias de nitrógeno. Las muestras colectadas en las provincias de Chiriquí, Veraguas, Herrera, Los Santos, Coclé y Panamá se clasificaron con base a su sintomatología y se identificaron las cepas bacteriales en género y especies de acuerdo a sus características morfológicas, reacción a pruebas bioquímicas e inmunoenzimáticas (ELISA). La sintomatología observada es causada por un complejo de cuatro especies bacteriales del género *Pseudomonas* y dos especies del género *Xanthomonas*. En el follaje, la incidencia de las especies de *Xanthomonas* fue superior a la de las especies de *Pseudomonas* y ambos géneros se encuentran presentes en todas las áreas arroceras del país. En la población bacteriana se detectó la presencia de bacterias gram (-) que no pertenecen a las especies identificadas. La sintomatología no representa un buen criterio para establecer diferencias entre géneros bacteriales. El diagnóstico basado en pruebas de laboratorio es la mejor herramienta para identificar el género y especies bacteriales.

¹ Ph.D. Fitopatólogo. IDIAP Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC).
e:mail: idiap_div@cwpanama.net

² Lic. en Biología con especialización en Microbiología Fac. CNEyT.

³ Lic. en Biología con especialización en Microbiología Fac. CNEyT.

⁴ Lic. en Biología con especialización en Microbiología Fac. CNEyT.

PALABRAS CLAVES: *Oryza sativa*; arroz; bacteriosis; *Pseudomonas*; *Xanthomonas*; identificación; etiología; Panamá.

IDENTIFICATION OF THE ETIOLOGICAL AGENT OF THE FOLIAR BACTERIAL DISEASES OF RICE IN PANAMA. 1999.

The causal agents of rice foliar bacterial diseases in Panama were identified based on symptomalogical and morfological characteristics of the bacterium and its colonies; biochemical reaction and inmunoenzimatic test (ELISA). The rice foliar bacterial caused a variety of damage and symptoms which were confused with thus caused by nitrogen deficiency and fungi. The samples were collected in the provinces of Chiriquí, Veraguas, Herrera, Los Santos, Cocolé and Panama. The foliar rice bacterial diseases are caused by a complex of four especies of the genus *Pseudomonas* and two species of the genus *Xanthomonas*. The incidence of isolates belonging to the genus *Xanthomonas* were higher than the isolates of *Pseudomonas*; and both are present throught the rice producing areas of the country.

KEYWORDS: *Oryza sativa*; rice; bacterial diseases; *Pseudomonas*; *Xanthomonas*; identification; etiology; Panama.

INTRODUCCIÓN

En el país, la bacteriosis del follaje del arroz se ha convertido en un problema endémico de importancia económica, que causa síntomas diversos y variabilidad en la intensidad de daño.

En el arroz la bacteriosis afecta todos los órganos de la planta granos, espiguillas, hojas, vainas y corona del tallo.

La bacteriosis del arroz es causada por tres géneros de bacterias: *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. La pudrición de la

corona y el manchado marrón bacterial de la palea son causados respectivamente por *Erwinia chaysanthemi* (Agarwal y col., 1989); y *Erwinia herbicola* (Aze-gamik y col., 1983).

El fuego bacterial del arroz y el rayado bacterial son causados por *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* y *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola* (Agarwal y col., 1989; Swing y col., 1990).

La pudrición de la vaina, la pudrición del grano, el rayado bacterial y la pudrición café de la vaina son causados respectivamente por: *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (Van Hall); *Pseudomonas glumae* (Kurita; Tabei); *Pseudomonas avenae* (Manns) y *Pseudomonas fuscovaginae* (Miyajima Tani y Akita) (Ziegler y Alvarez, 1990).

Algunos de los síntomas de la bacteriosis pueden asociarse a los causados por infecciones fungosas o a deficiencias de nitrógeno. Los productores y técnicos, guiándose por esta sintomatología, han realizado aplicaciones de fungicidas y

de fertilizantes nitrogenados sin lograr la corrección del problema. Por el contrario, esta práctica ha favorecido no sólo el incremento de los costos de producción al aumentar el número de aplicaciones y agroquímicos, sino también el incremento significativo en las mermas en calidad y cantidad de las cosechas.

Se hace necesario el uso de métodos de diagnósticos rápidos y confiables, para determinar la etiología de la bacteriosis del follaje del arroz.

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la etiología de la bacteriosis asociada al follaje del arroz, mediante el empleo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), pruebas bioquímicas y características morfológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en los meses de julio a diciembre de 1999, en los laboratorios de IDIAP, Sanidad Vegetal y Comité

Nacional de Semilla ubicados en Divisa.

Las muestras estudiadas se colectaron en un mínimo de seis (6) y un máximo de nueve (9) fincas de las provincias de Chiriquí (Guarumal – Alanje) Veraguas (Suai – Sona – La Candelaria – Pueblo Nuevo); Los Santos (Tonosí), Herrera (Rincón de Santa María – Instituto Nacional de Agricultura – Misión China); Coclé (El Caño – Río Grande – Las Guabas – Juan Hombrón – Río Hato) y Panamá (Juan Díaz – Pacora – Chepo).

Las muestras se clasificaron de acuerdo con los síntomas observados (puntitos cloróticos húmedos, amarillamiento, anaranjamiento, necrosis de márgenes y puntas, manchas café y tizón chocolate. Estos daños pueden ser producidos por insectos y por algunos hongos, se descartó esta posibilidad.

La confirmación de la presencia de bacterias en las hojas colectadas se realizó mediante la prueba de flujo bacterial bajo el

microscopio compuesto. Las muestras foliares se sometieron a lavado bajo chorro de agua del grifo por 30 minutos, luego se cortaron en trozos de 3 mm² y se maceraron en morteros con 1ml de agua estéril.

El extracto de hojas se estrió en los medios King B. enmendada con factor de crecimiento y penicilina G y luego se incubaron a 30 °C por 48 horas (Ziegler y Alvarez, 1988). Las diferentes colonias fueron transferidas a platos nuevos, para lograr cultivos puros. Las características morfológicas de las colonias tales como: color, forma, apariencia, fluorescencia, prueba de gram y formas de las bacterias se establecieron para las diferentes colonias con 24 horas de crecimiento (Ziegler y Alvarez, 1988).

Se determinaron las características bioquímicas de los aislamientos empleando los medios diferenciales más importantes.

Para los patovares de *Xanthomonas oryzae* se recomiendan las pruebas: utilización de almidón –gelatina, producción de acetona y

sensibilidad al nitrato cúprico, (Webster y Gunnel, 1992; Agarwal y col., 1989). Para identificar las especies de *Pseudomonas* se recomiendan las pruebas: utilización de arginina, sucrosa, producción de H₂S y oxidasa (Ziegler y Alvarez, 1988).

La prueba ELISA se utilizó para caracterizar los aislamientos de *Pseudomonas fuscovaginae* y *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*.

Se determinó la patogenicidad de los aislamientos identificados, inoculando suspensiones bacteriales de los diferentes aislamientos con 24 horas de crecimiento, mediante inyección, a una pulgada del cuello de los plántones de arroz con 21 días de germinados.

Las lecturas de la prueba de patogenicidad se realizaron a los 15 días después de la inoculación, considerándose como positiva la presencia de síntomas necróticos partiendo del punto de inyección hacia arriba (Agarwal y col., 1989).

Los aislamientos se clasificaron empleando los resultados de las

reacciones a las pruebas bioquímicas reportados para los géneros y especies de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* que afectan al arroz.

Finalmente, se compararon los promedios de las poblaciones de aislamientos identificados como pertenecientes a los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas* mediante la prueba "t" Student.

RESULTADOS

Los aislamientos bacteriales del follaje obtenidos por provincias se identificaron clasificaron como: *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas avenae*, y *Pseudomonas glumae*, *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola* mediante sus características morfológicas, pruebas bioquímicas y ELISA (Cuadros 1 y 2).

Los aislamientos de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* se detectaron en 53.91% de las muestras, *Pseudomonas fusco-*

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS POR ESPECIES.

Almidón	Gelatina	Producción de acetona	Sensibilidad al nitrato cuprico	Elisa X _{co}	Especie	Total
-	-	-	+	+	<i>Xanthomonas oryzae pv oryzae</i>	117
+	+	+	-	-	<i>Xanthomonas oryzae pv oryzae</i>	11
					<i>oryzicola</i>	
Arginina	Sucrosa	H ₂ S	Oxidasa	Elisa Pf	Especie	Total
+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>	40
-	+	-	-	-	<i>Fuscovagina</i>	16
-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas syringae</i>	3
+	-	-	-	-	<i>Pseudomonas avenae</i>	2
					<i>glumae</i>	
					No identificadas	
+	+	-	+	-	Cd ₁	8
-	+	-	+	-	Cd ₂	2
-	+	-	+	-	Cd ₃	3
+	+	+	+	-	Cd ₄	3
+	-	+	-	-	Cd ₅	3
-	-	+	-	-	Cd ₆	2
-	-	+	+	-	Cd ₇	7

Cd = cepas desconocidas

CUADRO 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS POR ESPECIE.

Color	Características de la Colonia						Total de aislamientos
	Forma	Apariencia	Fluorescencia	Gram	Forma de bacteria	Especie	
Blancas a café claro	Circular	Lisa	+	-	Bacilar	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	61
Blanquecinos márgenes traslúcidos	Circular	Entera	+	-	Bacilar	<i>Pseudomonas syringae</i>	20
Crema	Circular	Enteras elevadas	-	-	Bacilar	<i>Pseudomonas avenae</i>	5
Blancos	Circular	Enteras elevadas	-	-	Bacilar	<i>Pseudomonas gluriae</i>	3
Amarillas	Circular	Mucoides	-	-	Bacilar	<i>Xanthomonas oryzae</i> <i>pv oryzae</i>	117
Blanquecinos al principio más tarde amarillas	Circular	Mucoides	-	-	Bacilar	<i>Xanthomonas oryzae</i> <i>pv oryzicola</i>	11
Total							217

vaginae en 18.43%; *Pseudomonas syringae* en 7.37%; *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola* en 5.06%; *Pseudomonas avenae* en 1.38%; *Pseudomonas glumae* en 0.92% y, además, un 12.9% de cepas desconocidas (Cuadro 3).

En las hojas analizadas con síntomas descritos como puntos húmedos cloróticos, amarillamientos, anaranjamientos, necrosis de márgenes y puntas, manchas café y tizón chocolate se detectó el complejo de especies reportadas de *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

La prueba de patogenicidad permitió establecer que todos los aislamientos identificados indujeron síntomas necróticos en los tallos inoculados (Cuadro 4).

La comparación de los promedios poblacionales de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* permitió detectar que, a nivel nacional y en las provincias de Chiriquí, Los Santos y Herrera predomina en el follaje el género *Xanthomonas* al 95% de significancia y que no exis-

ten diferencias entre los promedios poblacionales de los *Pseudomonas* y *Xanthomonas* en las muestras foliares de las provincias de Veraguas, Coclé y Panamá (Cuadro 5).

DISCUSIÓN

La caracterización de los géneros bacteriales detectados en el follaje del arroz permitió establecer que los síntomas observados son causados por un complejo de especies de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

La diversidad de síntomas y la gran variabilidad en la intensidad de daños observados puede ser el resultado directo de la interacción entre el complejo de especies de los géneros reportados, las condiciones ambientales predominantes en las zonas de producción y los materiales genéticos cultivados.

Además, el complejo de especies de *Pseudomonas* y *Xanthomona* puede actuar en forma sinergista y reducir significativamente el área fotosinté-

ticamente activa de las plantas y, por ende, disminuir la capacidad productiva.

La mayor incidencia de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* y *Pseudomonas fuscovaginae* en el follaje indican que estas especies son las responsables directas de los síntomas observados (Mew, 1992, citado por Webster y Gunnell, 1992); y que las otras especies de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* se encuentran asociadas epifíticamente al follaje (Agarwal y col., 1989), ya que éstas se especializan en inducir síntomas en plántulas, vainas y granos.

La detección de un complejo de especies bacteriales en el follaje descalifica el empleo de los síntomas como una herramienta útil para identificar el /o los géneros causales de las bacteriosis. Estos resultados coinciden con los reportados por Cottyn y col. (1996) quienes establecieron que los síntomas causados por las especies patogénicas asociados al complejo de la pudrición de la vaina y al síndrome del manchado del grano son indistinguibles ba-

sados en la sintomatología solamente.

Paralelamente, la prueba de patogenicidad permitió confirmar los hallazgos de Cottyn y col. (1996), quienes observaron solamente la generación de síntomas necróticos en los tejidos inoculados y no de los diversos síntomas observados en el follaje y empleados para realizar los aislamientos.

La presencia de un 12.9% de aislamientos no identificados, conjuntamente con los clasificados, es explicado por Cottyn y col. (1996) como pertenecientes a otras especies saprófitas facultativas de *Pseudomonas* u otros géneros de bacterias Gram (-), cuyo papel no es bien conocido en el desarrollo de las enfermedades, pero que pueden participar junto con cepas patogénicas en la inducción de síntomas.

Siguiendo a la identificación del o/los agentes etiológicos de la bacteriosis asociada al follaje del arroz, así como la comprobación de su amplia distribución en el país podemos decir que los esfuerzos

CUADRO 3. GÉNEROS Y ESPECIES DE BACTERIAS CAUSALES DEL SÍNDROME BACTERIAL DEL FOLLAJE DEL CULTIVO DEL ARROZ POR PROVINCIA. 1999.

Provincias	<i>P. avenae</i>	<i>P. glumae</i>	<i>P. fuscovirgatae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>X.o. pv oryzae</i>	<i>X.o.pv oryzicola</i>	No identificados	Total
Coclé	0	0	9	1	22	1	4	37
Chiriquí	0	0	5	4	15	3	6	33
Herrera	0	2	9	6	27	3	3	50
Los Santos	1	0	10	0	25	2	8	46
Panamá	0	0	6	2	12	2	2	24
Veraguas	2	0	1	3	16	0	5	27
Total	3	2	40	16	117	11	28	217
X	0.056	0.044	0.888	0.355	2.6	0.244	0.622	
Porcentaje	1.38	0.92	18.43	7.37	53.91	5.06	12.9	

CUADRO 4. INCIDENCIA DE ESPECIES BACTERIALES POR SÍNTOMAS Y PATOGENICIDAD.

Síntomas	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	Patogenicidad
Puntitos cloritos húmedos	<i>X.o. pv. Oryzae</i>	<i>P. fuscovaginatae</i>	+
	<i>X.o. pv. Oryzicola</i>	<i>P. syringae</i> <i>P. avenae</i>	
Amarillamiento	<i>X.o. pv. Oryzae</i>	<i>P. fuscovaginatae</i>	+
	<i>X.o. pv. Oryzicola</i>	<i>P. syringae</i> <i>P. avenae</i>	
Anaranjamiento	<i>X.o. pv. Oryzae</i>	<i>P. fuscovaginatae</i>	+
	<i>X.o. pv. Oryzicola</i>	<i>P. syringae</i> <i>P. avenae</i>	
Necrosis en los márgenes y puntas	<i>X.o. pv. Oryzae</i>	<i>P. fuscovaginatae</i>	+
	<i>X.o. pv. Oryzicola</i>	<i>P. syringae</i> <i>P. glumae</i>	
Tizon chocolate	<i>X.o. pv. Oryzae</i>	<i>P. fuscovaginatae</i>	+
Mancha café	<i>X.o. pv. Oryzae</i>	<i>P. fuscovaginatae</i>	+

CUADRO 5. PROMEDIOS DE INCIDENCIA DE LOS AISLAMIENTOS DE Pseudomonas Y Xanthomonas ESTIMADAS MEDIANTE LA PRUEBA t STUDENT (95% DE SIGNIFICANCIA) A NIVEL NACIONAL Y PROVINCIAL.

NIVEL	PROMEDIO <i>Pseudomonas</i>	PROMEDIO <i>Xanthomonas</i>	T. CALCULADA	T. TABULADA	HIPOTESIS
Nacional	1.35	2.84	-11.92	1.677	$H_a: \mu_p \neq \mu_x$
Cochila	1.42	3.28	1.38	1.94	$H_o: \mu_p = \mu_x$
Chiliquí	1.28	2.57	-2.30	1.94	$H_a: \mu_p \neq \mu_x$
Herrera	2.12	3.75	-2.20	1.90	$H_a: \mu_p \neq \mu_x$
Los Santos	1.22	3	2.02	1.86	$H_a: \mu_p \neq \mu_x$
Panamá	1.14	2.00	1.11	1.94	$H_o: \mu_p = \mu_x$
Veraguas	0.85	2.28	-1.42	1.94	$H_o: \mu_p = \mu_x$

Nota: T calculada = t de student calculada;

T tabulada = t de student tabulada;

μ_p = Medias de *Pseudomonas*

H_a = Hipótesis alternativas

H_o = Hipótesis nula

μ_x = Medias de *Xanthomonas*

en mejoramiento genético se deben dirigir al complejo bacterial reportado para el cultivo del arroz, en vez de sólo introducir resistencia para las especies *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* y *Pseudomonas fuscovaginae*.

Finalmente, en la certificación de semilla se deben considerar como patógenos transmitidos por semilla los patovares de *Xanthomonas oryzae* reportados aquí y las especies de *Pseudomonas*: *syringae*, *avenae* y *glumae*.

CONCLUSIONES

- Las especies de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* se encuentran presentes en todas las áreas de producción arroceras del país.
- La etiología de la bacteriosis del follaje del arroz es causada por el complejo bacterial conformado por *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae*, *Pseu-*

domonas avenae, *Pseudomonas glumae*, *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola*.

- No se puede establecer la etiología de la bacteriosis del follaje del arroz con base en los síntomas solamente.
- La frecuencia de detección de los aislamientos de las especies del género *Xanthomonas* en el follaje es mayor comparada los de las especies del género *Pseudomonas*.
- En la población de bacterias aisladas se detectó la presencia de bacterias Gram -, que no pertenecen a las especies y géneros identificados.

RECOMENDACIONES

Emplear biotécnicas como PCR para corroborar los resultados obtenidos en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, P.C.; MONTESEN, C.N.; MATHUR, S.B. 1989. Seed borne diseases and health testing of rice. Phytopathological. CAB. International Mycological Institute N°30. pp. 58-88.
- 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.
- CIVEROLO, R.L.; FAN, F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme linked immuno-sorbent assay. Plant disease 66: 231-236.
- COTTYN, B.; VAN OUTRYNE, M.F.; CEREZ, M.T.; DECLEENE, M.M.; SWINGS, J.; MEW, T.W. 1996. Bacterial diseases of rice. II. Characterization of pathogenic bacteria associated with rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. Plant Disease 80: 438-445.
- JONES, R.K.; BARNES, L.W.; GONZÁLEZ, C.F.; LEACH, J.E.; ALVAREZ, A.M.; BENE-DICT, A.A. 1989. Identification of low – virulence strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from rice in the United States. Phytopatology 79: 984-990.
- LOZANO, J.P. 1977. Identification of bacterial leaf blight in rice caused by *Xanthomonas oryzae* in America. Plant Disease Report 61: 644-648.
- SWING, J.; VAN der MOOTER, M.; VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; GILLIS, M.; MEW, T.W.; KERSTERS, K. 1990. Re-classification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex ISHIYAMA 1992) sp. nov. nom.rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 309-311.

- WEBSTER, R.K.; GUNNEL, P.S. 1992. Compendium of rice diseases. American Phytopathological Society Press: 1-10.
- XIE, G.L.; MEW, T.W. 1998. A leaf inoculation method for detection of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola* from rice seed. Plant Disease 82: 1007-1011.
- ZIEGLER, R.S.; ALVAREZ, E. 1985. A differential culture medium for *Pseudomonas* species causing sheat rot and grain discoloration of rice. Centro de Investigaciones Agrícolas Tropicales (CIAT). Cali, Colombia.
- ZIEGLER, R.S.; ALVAREZ, E. 1988. *Pseudomonas* spp. causing sheat rot of rice in Latin America. In Proceeding of the 5th Int. Congress of Plant Pathology, Kioto, Japan.
- ZIEGLER, R.S.; ALVAREZ, E. 1990. Characteristics of *Pseudomonas* spp. causing grain discoloration and sheat rot of rice and associated. *Pseudomonad epiphytes*. Plant Disease 79: 917-922.