

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



Fenotypic and molecular identification of *Burkholderia* spp in rice panicles (*Oryza sativa* L.)

Fornos Reyes, Dagne Valeria; Peralta Herrera, Norvin Josué; Sánchez Gómez, Isaías Ezequiel; Rodríguez Zamora, Markelyn José

 Dagne Valeria Fornos Reyes 1
dfornosreyes@gmail.com
Universidad Nacional Agraria, Nicaragua

 Norvin Josué Peralta Herrera 2
norvinp24@gmail.com
Universidad Nacional Agraria, Nicaragua

 Isaías Ezequiel Sánchez Gómez 3
isanchez@ci.una.edu.ni
Universidad Nacional Agraria, Nicaragua

 Markelyn José Rodríguez Zamora 4
markelyn.rodriguez@ci.una.edu.ni
Universidad Nacional Agraria, Nicaragua

La Calera
Universidad Nacional Agraria, Nicaragua
ISSN: 1998-7846
ISSN-e: 1998-8850
Periodicidad: Semestral
vol. 22, núm. 39, 2022
Edgardo.jimenez@ci.una.edu.ni

Recepción: 17 Mayo 2022
Aprobación: 08 Noviembre 2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/306/3063461015/>

DOI: <https://doi.org/10.5377/calera.v22i39.15205>



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

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

Palabras clave: Añublo bacteriano, fragmento, grano, manchado.

Abstract: The disease known as bacterial blight of rice is caused by *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladiolii* and the blight of rice seedlings caused by *Burkholderia plantarii*, are bacteria considered important in rice cultivation (*Oryza sativa* L.). The effects have increased in recent years causing large annual economic losses in the countries that produce this grain. The objective of this research was to identify, through phenotypic and molecular tests, *Burkholderia* species

in rice panicles (*Oryza sativa* L.). The collection of samples was carried out in the municipality of Sébaco, Matagalpa in the TAI-NIC Experimental Center and farm Virginia, Agrícola Miramontes in the department of Boaco and farm La Doña, municipality of Malacatoya, Granada. Bacteria were isolated from panicles with symptoms of the disease and species identification was performed by biochemical tests (carbohydrates and differentiation). Confirmation of the *Burkholderia* species was carried out using the molecular technique PCR (Polymerase Chain Reaction). The isolates of *B. gladiolii* in the King B medium presented grayish white or yellowish colonies, producing the non-fluorescent diffuse yellow pigment, while *B. plantarii* showed yellow, translucent, and convex, non-fluorescent colonies, in the case of *B. cepacia* colonies were translucent, convex, non-fluorescent. Identification with biochemical tests showed the presence of 18 positive isolates for *B. gladiolii*, two isolates for *B. plantarii* and one positive for *B. cepacia*. With the PCR technique, 18 positive samples were identified for *B. gladiolii* that amplified 479 bp fragments and two positive samples for *B. plantarii* with 597 bp fragments. In the case of *B. glumae*, it was not identified by phenotypic or molecular tests.

Keywords: Bacterial blight, fragment, grain, weathered, spotted.

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

El género *Burkholderia* fue reportado y aislado por primera vez por Azegami *et al.* (1987) en distrito de Kyushu, Japón y desde entonces se ha reportado en importantes zonas productoras de arroz en todo el mundo como en China, Taiwán, Malasia, Las Filipinas, Indonesia, Venezuela, Panamá, Nicaragua, Colombia y Estados Unidos.

En fincas productoras de arroz severamente afectadas por la enfermedad alcanzan hasta 75 % de pérdidas de la producción debido a que las bacterias del género *Burkholderia* causan diversidad de daños como aborto floral, pudrición de panículas, vaneado de las vainas y caída del grano (Gañán, 2011).

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

NOTAS DE AUTOR

- 1 Graduada de la carrera de Ingeniería en Sanidad Vegetal
- 2 Graduado de la carrera de Ingeniería en Sanidad Vegetal
- 3 MSc. en Sanidad Vegetal, Departamento de Protección Agrícola y Forestal
- 4 MSc. en Sanidad Vegetal, Departamento de Protección Agrícola y Forestal

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

En Nicaragua se conoce de afectaciones causadas por estas bacterias, sin embargo, no se ha estudiado su distribución y pérdidas económicas. Tampoco existen reportes de las cepas que atacan las diferentes zonas arroceras. El objetivo de esta investigación fue aportar información sobre la identificación mediante pruebas fenotípicas y moleculares de especies de *Burkholderia* en panículas de arroz (*Oryza sativa* L.) con síntomas de enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

La identificación de especies de *Burkholderia* spp en panículas de arroz, se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicado en el km 12 carretera Norte, Managua.

Colecta de muestras

Las muestras de panículas se colectaron en la finca Virginia y en el Centro Experimental TAI-NIC (Taiwán-Nicaragua) del municipio de Sébaco, Matagalpa; también se colectaron muestras de la empresa arrocera Agrícola Miramontes S.A, ubicada en San Lorenzo, Boaco y la finca La Doña en el municipio de Malacatoya, Granada (Cuadro 1). Se realizaron muestreos dirigidos a plantas que presentaban panículas café, decolorada o vaneadas (Quesada-González y García-Santamaría, 2014) las muestras fueron colectadas durante la mañana y se trasladaron en bolsas Ziploc previamente rotuladas al laboratorio de microbiología de la UNA para el aislamiento de *Burkholderia* spp. El cultivo de las áreas muestreadas coincidió con las etapa de precosecha y cosecha, correspondiente a las fases fenológicas de espigamiento, en su fase final, y cosecha.

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

Lugar de colecta	Finca	Número de muestras	Coordenadas geográficas
Sébaco, Matagalpa	Virginia	5	12°52'53" N 86°07'43" O
Sébaco, Matagalpa	Centro Experimental TAI-NIC	7	12°47'59" N 86°09'40" O
San Lorenzo, Boaco	Agrícola Miramontes	6	12°07'54" N 85°43'07" O
Malacatoya, Granada	La Doña	4	12°08'30" N 85°52'46" O

Aislamiento de *Burkholderia* spp

Se pesaron 0.5 g de granos de arroz con síntomas de vaneado y manchas, se desinfectaron con alcohol al 70 % por un minuto y se enjuagó con agua destilada sobre un vidrio reloj; se dejó secar sobre papel toalla. Posteriormente se colocaron en morteros para macerarlas con 10 ml de agua destilada estéril; luego con un asa redonda se tomó una pequeña muestra del macerado y se realizó rayado en cuatro cuadrantes del platos Petri con medio de cultivo King B (KB), Las placas se incubaron por 48 horas a temperatura de 30 °C, para observar el crecimiento de colonias circulares y convexas de color amarillento con halos blanquecinos (Quesada-González y García-Santamaría, 2014). Las bacterias sospechosas de *Burkholderia* spp fueron reaisladas en medios de cultivo King B para obtener colonias puras.

Identificación mediante pruebas fenotípicas

Las colonias bacterianas con características de crecimiento de *Burkholderia* spp en el medio de cultivo King B (KB) se les realizó pruebas bioquímicas de crecimiento a pH 4, crecimiento a 40 °C, crecimiento en 3 % de NaCl e hidrolisis de gelatina, además de observación de pigmentos en medios de cultivo King B y la utilización de carbohidratos adonitol y sacarosa (Schaad *et al.*, 2001) (Cuadro 2).

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

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

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

Extracción de ADN de *Burkholderia* spp

La extracción de ADN de los aislados bacterianos se realizó con el protocolo Doyle y Doyle, (1987); para tejido vegetal que consiste en adicionar 500 µl de solución de lisis e incubar a 65 °C en el baño maría durante 30 minutos, posteriormente se adicionó 3 µl de enzima RNasa para ser incubado a 37 °C por 30 minutos, luego se le agregó 200 µl de solución CTAB (Cetiltrimetilamonio Bromuro) y se procedió a incubar a 65 °C 30 minutos, después se procedió a centrifugar a 13 000 rpm por tres minutos, se transfirió el sobrenadante en un vial de 1.5 ml y se le adicionó 250 µl de Isopropanol, se incubó en hielo por cinco minutos y centrifugó a 13 000 rpm por dos minutos, se procedió a desechar el sobrenadante y adicionar 200 µl de etanol al 70 % y centrifugar a 10 500 rpm durante cinco minutos; se dejó secar sobre papel toalla y se hidrató con 50 µl de agua libre de nucleasa (Takeuchi *et al.*, 1997).

Amplificación por técnica PCR Punto Final

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

Se utilizaron cebadores específicos como Fglu ^{3'}GAAGTGTCGCCGATGGAG^{5'} y Rglu ^{5'}CCTTCACCGACAGCACGCAT^{3'} para *B. glumae*, Fpla ^{3'}TCGAGCTGGCTGCGCCTC^{5'} y Rpla ^{5'}GTCGTCGCCCGAGGTCTCG^{3'} para *B. plantarii*, y Fgla ^{3'}CTGCGCCTGGTGGTGAAG^{5'} y Rgla CCGTCCCGCTGCGGAATA para *B. gladiolii*, cada uno en un volumen final de 25 µl que contenía master mix 12.5 µl, cebadores delantero y reverso 1µl respectivamente, DNA 0.5 µl y 10 µl de agua libre de nucleasa. Los productos PCR se amplificaron en un termociclador (Eppendorf); para *B. plantarii* fue 94 °C por tres minutos (desnaturalización inicial), seguido de cuarenta ciclos a 94 °C por 45 segundos (desnaturalización), 57.3 °C por 45 segundos (anillamiento), 72 °C por un minuto (extensión) y 72 °C por siete minutos (extensión final), finalizando el programa a 4 °C por 10 minutos (enfriamiento); para *B. gladiolii* fue 94 °C por tres minutos (desnaturalización inicial), seguido de cuarenta ciclos a 94 °C por 45 segundos (desnaturalización), 54.7 °C por 45 segundos (anillamiento), 72 °C por un minuto (extensión) y 72 °C por siete minutos (extensión final), finalizando el programa a 4 °C por 10 minutos (enfriamiento). Los productos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.6 % teñidos con gel red, donde la amplificación de un fragmento de tamaño de 597 pares de bases (pb) se considera positivo para *B. plantarii*, 479 pb para *B. gladiolii* y 529 pb para *B. glumae* (Maeda *et al.*, 2006).

Análisis de datos

Los datos fueron ingresados a una hoja de cálculos de Microsoft Excel 2016, donde se determinó la frecuencia de aparición de las bacterias identificadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación fenotípica de Burkholderia spp

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

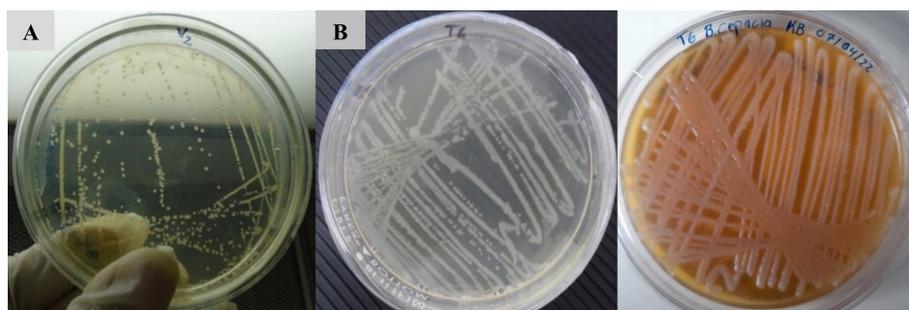


FIGURA 1.
Aislados de *B. gladiolii* (A), *B. plantarii* (B) y *B. cepacia* (C)
a partir de panículas de arroz en medio de cultivo King B.

CUADRO 3.
Pruebas bioquímicas en especies de *Burkholderia* aisladas de panículas de arroz

Código	Sac	Ado	C. 40 °C	C. pH 4	C. 3 % NaCl	H. Gel	Bacteria identificada
D1I	-	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
D1II	-	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
D3II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
D3II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
D4II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
M1II	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
M4II	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
M1II	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
D2II	-	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
D2I	-	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
M6II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
M3I	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
M2I	-	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
M5II	+	+	+	+	+	+	<i>B. gladiolii</i>
V1II	+	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
T6	+	+	+	-	+	+	<i>B. plantarii</i>
T2	-	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
T5	-	+	+	-	+	+	<i>B. plantarii</i>
V5	-	+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
V2		+	+	+	+	-	<i>B. gladiolii</i>
T6Col-2	+	+	+	+	+	-	<i>B. cepacia</i>

Sac: Sacarosa; Ado: Adonitol; C. 40 °C: Crecimiento a 40 °C; C. pH 4: Crecimiento en pH 4; C. 3 % NaCl: Crecimiento en cloruro de sodio al 3 %; H. gel: Reacción en hidrólisis de gelatina; M: Miramonte; D: Finca La Doña; T: TAI-NIC; V: Finca Virginia; 1...6: Número de muestra; I, II: Número de placa; Col: Colonia.

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

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

Azegami *et al.* (1987) aisló y reportó a *B. plantarii* como la causante del tizón de las plántulas de arroz, clasificada como *Pseudomonas plantarii* en 1987. Urakami *et al.* (1994) comprobó que *B. plantarii* está estrechamente relacionada con *B. glumae*, que es un importante patógeno del arroz que produce la sustancia conocida como tropolona; sin embargo *B. plantarii* se caracteriza, por provocar clorosis en la parte basal de las hojas, seguido del pardeamiento y marchitamiento de las plantas, pero éstas no se pudren. A pesar de que existe información de esta especie no se ha informado de estudios genéticos y moleculares sobre la virulencia de esta sobre las plantas de arroz.

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

Identificación molecular de Burkholderia spp

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

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

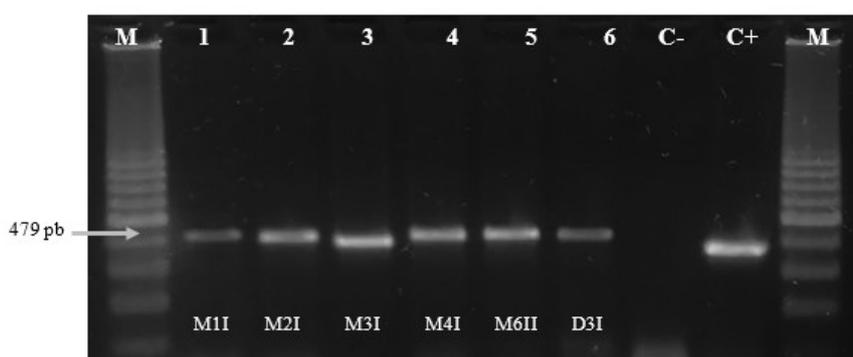


Figura 2.

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

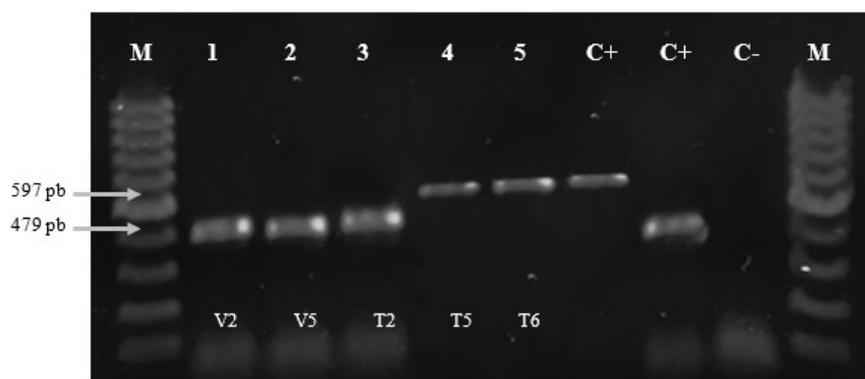


FIGURA 3.

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

Los resultados obtenidos coinciden con los de Maeda *et al.* (2006) quienes obtuvieron bandas de 479 pb para *B. gladiolii*, 597 pb para *B. plantarii*. Se conoce muy poco de la ecología y mecanismo de patogenicidad de *B. gladiolii* en las plantas de arroz, además, de la actividad antagonista de *B. gladiolii* sobre *B. glumae* y *B. plantarii* en arroz. Esto nos muestra que conocer sobre la ecología de *B. gladiolii* facilitaría no solo el desarrollo de sistemas de manejo, sino también, una comprensión más amplia de la ecología de *B. glumae* y *B. plantarii* en plantas de arroz.

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

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

CONCLUSIONES

Según características fenotípicas se identificaron las especies de *Burkholderia gladiolii*, *Burkholderia plantarii* y *Burkholderia cepacia* en panículas de arroz y con la técnica PCR Punto Final se confirmó la presencia de *B. gladiolii* y *B. plantarii*, estos resultados nos indican que por métodos fenotípicos y moleculares se puede identificar las especies de *Burkholderias* que ocasionan daños en el cultivo de arroz

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araque, Y. (2008). *Estudio Fenotípico y Molecular del Complejo Burkholderia cepacia y Generos Relacionados* [Tesis de doctorado, Universidad de los Andes]. Biblioteca Digital ULA. http://bdigital.ula.ve/storage/pdftesis/postgrado/tde_arquivos/23/TDE-2011-02-15T20:51:30Z-589/Publico/araqueyasmira.pdf
- Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuch, A., & Fukazawa, C. (1987). *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the Causal Agent of Rice Seedling Blight. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 475–475. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-475>

- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA insolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11–15. https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf
- Gañán, L. (2011). Manejo Integrado del añublo bacterial de la panícula del arroz (*Oryza sativa* L.) causado por *Burkholderia glumae*. Una revisión. *Agronomía Mesoamericana*, 19(2), 79–90.
- Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezaki, T., Vandamme, P., Tsushima, S., & Hikichi, Y. (2006). Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladiolii* using *gyrB* and *rpoD* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), 1031–1038. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64184-0>
- Moreira, D. (2014). *Detección de Burkholderia spp Asociadas a Semillas de Arroz Nacionales e Importadas* [Tesis de maestría, Universidad Federal de Rio Grande del Sur].
- Nandakumar, R., Shahjahan, A., Yuan, X., Dickstein, E., Groth, D., Clark, C., Cartwright, R., & Rush, M. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the Southern United States. *Plant Disease*, 93(9), 896-905. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0896>
- Pedraza, D. (2012). *Estado del arte de Burkholderia glumae como Patógeno de Cultivos de arroz (Oryza sativa L.)* [Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional Pontificia Universidad Javeriana. <http://hdl.handle.net/10554/11793>
- Quesada-González, A. y García-Santamaría, F. (2014). *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 371–381. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15452>
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *Journal of Analytical Psychology*, 50(3), 812–814. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8774.2005.00541.x>
- Sotelo, C. (2014). *Identificación Molecular de Burkholderia glumae, causante del añublo bacterial, en cinco zonas arroceras de Nicaragua* [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio Institucional UNA. <https://repositorio.una.edu.ni/2736/1/tnh20s717.pdf>
- Takeuchi, T., Sawada, H., Suzuki, F., & Matsuda, I. (1997). Specific Detection of *Burkholderia plantarii* and *Burkholderia glumae* by PCR Using Primers Selected from the 16S-23S rDNA Spacer Regions. *Japanese Journal of Phytopathology*, 63(6), 455–462. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.63.455>
- Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K. I., & Komagata, K. (1994). Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(2), 235–245. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-235>