



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CAMPECHE

**POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO**

**Identificación molecular de bacterias cultivables asociadas a las
hojas de arroz (*Oryza sativa* L.) con síntomas de tizón en el
municipio de Escárcega, Campeche**

JOSÉ ORLANDO PUC UITZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE

2017

La presente tesis titulada: **Identificación molecular de bacterias cultivables asociadas a las hojas de arroz (*Oryza sativa* L.) con síntomas de tizón en el municipio de Escárcega, Campeche**, realizada por el estudiante **José Orlando Puc Uitz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOSPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

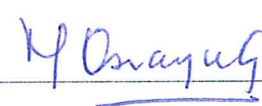
CONSEJO PARTICULAR

Consejero:




Dr. Alfredo Sánchez Villarreal

Directora de Tesis:



Dra. Ma. Mónica Leticia Osnaya González

Asesora:



Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

Sihochac, Champotón, Campeche, junio de 2017

**Identificación molecular de bacterias cultivables asociadas a las hojas de arroz
(*Oryza sativa* L.) con síntomas de tizón en el municipio de Escárcega, Campeche**

José Orlando Puc Uitz, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

La identificación molecular de bacterias cultivables, asociadas a hojas de arroz con síntomas de tizón, mostrará la diversidad microbiana presente en la variedad Aztecas, lo cual será útil para comprender la interacción de este cultivo y su microbiota. Se colectaron plantas de arroz con síntomas de tizón foliar en el municipio de Escárcega, Campeche, de las cuales se aislaron y purificaron 45 bacterias. Las características morfológicas y apariencia de las colonias revelaron 14 morfotipos diferentes; además el 82.6% de los aislamientos fueron bacterias Gram negativas y el restante 17.4% Gram positivas. La identificación mediante la secuenciación del gen 16S rDNA mostró que las especies del género *Pantoea* sp. y *Pseudomonas* sp. representaron el 55.4% del total de los aislamientos. Otras bacterias presentes fueron especies del género *Enterobacter* con el 15.5%, *Bacillus*, con 11.1% y el género *Leclercia*, con el 6.6%, así como *Exiguobacterium acetylicum*, *E. indicum*, *Escherichia hermanni*, *Microbacterium* sp. y *Serratia nematodiphila*. Además el 22% de los aislamientos fueron identificados como potenciales patógenos, que se dividieron en dos grupos. El grupo 1 con un modo de acción lento en el desarrollo de los síntomas, conformado por *Enterobacter* sp., *E. indicum*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea* sp. y *S. nematodiphila*; y el grupo 2 con un modo de acción rápido conformado por *Enterobacter* sp., *Pantoea dispersa*, *Flavimonas oryzihabitans*, *P. parafulva*, y *P. taiwanensis*.

Palabras clave: diversidad bacteriana, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas taiwanensis*, *Flavimonas oryzihabitans*

Molecular identification of cultivable bacteria associated to rice leaves (*Oryza sativa* L.) with blight symptoms in the municipality of Escárcega, Campeche

José Orlando Puc Uitz, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Molecular identification of cultivable bacteria, associated at rice leaves with blight symptoms, will show the microbial diversity present in the Aztecas variety. It will be useful to understand the interaction of this culture and its microbiota. Rice plants with leaf blight symptoms were collected in the municipality of Escárcega, Campeche. 45 bacteria were isolated and purified. The morphological characteristics and appearance of the colonies revealed 14 different morphotypes; in addition, 82.6% of the isolates were Gram negative bacteria and 17.4% Gram positive bacteria. Identification of bacteria by sequencing the 16S rDNA gene, showed that the species of the genus *Pantoea* sp. and *Pseudomonas* sp. represented 55.4 % of total isolates. The genus *Enterobacter* was present with 15.5%, *Bacillus* with 11.1%, and the genus *Leclercia* with 6.6%, as well as *Exiguobacterium acetylicum*, *E. indicum*, *Escherichia hermanni*, *Microbacterium* sp. and *Serratia nematodiphila*. In addition, 22% of the isolates were identified as potential pathogens, which formed two groups, group 1 with a slow mode of action in the development of symptoms, consisting of *Enterobacter* sp., *E. indicum*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea* sp. and *S. nematodiphila*; And group 2 with a mode of rapid action conformed by *Enterobacter* sp., *Pantoea dispersa*, *Flavimonas oryzihabitans*, *P. parafulva*, and *P. taiwanensis*.

Key words: Bacteria diversity, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas taiwanensis*, *Flavimonas oryzihabitans*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT).

A la Maestría en Bioprospección y Sustentabilidad Agrícola en el Trópico.

Al Colegio de Postgraduados Campus Campeche por haberme brindado todas las herramientas necesarias y darme la oportunidad de continuar con mis estudios profesionales.

A la Dra. Ma. Mónica L. Osnaya González, el Dr. Alfredo Sánchez Villarreal y la Dra. Hilda V. Silva Rojas por su orientación y apoyo en la culminación del presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Fitopatología del Campus Campeche y Biotecnología de Semillas del Campus Montecillo, por proporcionarme el espacio y materiales necesarios para realizar esta investigación.

DEDICATORIA

Con mucha alegría dedico este trabajo de investigación a mi familia, Mi esposa **Laura Becerril Domínguez**, a mis hijas **Metzli Gisel Puc Becerril** y **Valeria Puc Becerril**, como muestra de mi más profundo amor, admiración y gratitud. Por la paciencia y por el sacrificio que tuvieron que pasar para que yo pueda culminar esta etapa de mi vida. Gracias por apoyarme siempre y darme su respaldo para superar juntos las adversidades... gracias por el aguante... los amo.

A mis queridos padres **Orlando Puc Tun** y **Elsa María Uitz** por ser mi ejemplo de fuerza coraje y sacrificio, por enseñarme el valor de la vida... gracias papá, gracias mamá, a toda mi familia por la alegría que hemos compartido... gracias.

A mis amigos, la súper banda de: Juan (alias "Juan c"), Mari😊, Misael (la misha), Edgar, Hilda, Laura (se está poniendo rojo el cielo), Elisa, Susy, Julia, Elías, Brenda, Javier, Gisela, Teo, Eliseo, Alma, gracias por todos los momentos que compartimos juntos, las reuniones, las fiestas, las salidas a Campeche, a Sihochac, a Champotón, por las cervezas que compartimos (la flor de caña), por los incomparables momentos que pasamos a la hora del desayuno, almuerzo y cena, gracias por compartir su comida y despensa conmigo muchas gracias...😊.

A la Dra. Itzel (Qué milagro Josefo, hasta que te dejas ver) a José Luis (ánimo, fuerza si se puede amigo), gracias por sus consejos, conocimientos y su apoyo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
2.1 Generalidades	5
2.1.1 Origen del cultivo de arroz	5
2.1.2 Morfología y taxonomía del arroz	6
2.1.3 Importancia del cultivo de arroz	9
2.1.4 Problemática del cultivo de arroz	12
2.2 Enfermedades bacterianas del cultivo de arroz	13
2.2.1 Tizón bacteriano de la panícula	15
2.2.2 Rayado bacteriano de la hoja	16
2.2.3 Pudrición marrón de la vaina	17
2.2.4 Raya roja bacteriana	18
2.2.5 Tizón bacteriano	19
2.2.6 Tizón de la hoja de arroz causada por <i>Pantoea ananatis</i>	21
2.2.7 Tizón bacteriano causado por <i>Pantoea agglomerans</i>	22
2.3 Métodos de diagnóstico de bacterias	23
2.3.1 Determinación de las características fisiológicas	24
2.3.2 Características bioquímicas	24
	vii

2.3.3	Características serológicas	25
2.3.4	Reacción en cadena de la polimerasa	25
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1	Material biológico	28
3.1.2	Aislamientos bacterianos	29
3.1.3	Obtención de aislamientos de bacterias en medio agar nutritivo (AN)	29
3.1.4	Purificación de las colonias	30
3.1.5	Tinción de Gram	30
3.1.6	Descripción morfológica de las colonias	31
3.1.7	Sepsia de semillas	31
3.1.8	Germinación de semillas y crecimiento de plantas	33
3.1.9	Pruebas de patogenicidad	34
3.2	Extracción de DNA de los cultivos bacterianos	36
3.2.1	Amplificación por PCR del DNA ribosómico 16S	37
3.2.2	Secuenciación y análisis de secuencias	39
4.	RESULTADOS	40
4.1	Aislamientos bacterianos	40
4.1.1	Asepsia y germinación de las semillas de arroz de la variedad Aztecas	44
4.1.2	Pruebas de patogenicidad	48
4.1.3	Extracción de DNA	54
4.1.4	Amplificación por PCR del gen 16S rDNA	55
4.1.5	Secuenciación e identificación de los aislamientos bacterianos	56
5.	DISCUSIÓN	62
6.	CONCLUSIONES	70
7.	BIBLIOGRAFÍA	72

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género <i>Oryza</i> (NCBI).	6
Cuadro 2. Producción mundial de arroz 2016 (FAO, 2017).	10
Cuadro 3. Producción de arroz palay en México (SIAP, 2015).	11
Cuadro 4. Enfermedades bacterianas del cultivo de arroz (modificado de Mew et al., 2004).	14
Cuadro 5. Diferentes métodos de asepsia utilizados en las semillas de arroz de la variedad Aztecas.	32
Cuadro 6. Características morfológicas de las cepas aisladas de las hojas enfermas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).	41
Cuadro 7. Porcentaje de germinación, contaminación por hongos y bacterias en semillas de arroz de la variedad Aztecas, sometidas a diferentes tratamientos de desinfección.	45
Cuadro 8. Promedios de la zona de avance de la enfermedad en las hojas, a los 7 y 30 días después de la inoculación.	51
Cuadro 9. Cuantificación de DNA total por espectrofotometría.	54
Cuadro 10. Bacterias asociadas a hojas de arroz con signos de tizón, identificadas por secuenciación del 16S rDNA.	57
Cuadro 11. Bacterias Gram-negativas aisladas de hojas de arroz con síntomas de tizón, del municipio de Escárcega Campeche.	59
Cuadro 12. Bacterias Gram-positivas aisladas de hojas de arroz con síntomas de tizón, del municipio de Escárcega Campeche.	60

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Sistema radical de la planta de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) (Imagen tomada de Compendium of Rice Diseases, 1992).	7
Figura 2.	Morfología de la planta de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) (Imagen tomada de Compendium of Rice Diseases, 1992).	9
Figura 3.	Síntomas de la enfermedad del tizón bacteriano de la panícula, causado por <i>Burkholderia glumae</i> (Foto tomada de Nandakumar et al., 2009).	15
Figura 4.	Lesiones lineares ocasionadas por <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (Foto tomada de Afaboli et al., 2016) .	17
Figura 5.	Granos y tallos manchados causados por una infección con <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> . (Foto tomada de Cother et al., 2010).	18
Figura 6.	Síntomas del rayado marrón causado por <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> en plántulas de arroz (Foto tomada de Bin Li et al., 2011).	19
Figura 7.	Síntomas de tizón foliar ocasionado por <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Foto tomada de Afaboli et al., 2016).	21
Figura 8.	Tizón de la hoja en arroz causada por <i>Pantoea ananatis</i> (Foto tomada de Mondal et al., 2008., Kini et al., 2016).	22
Figura 9.	Hojas con síntomas del tizón bacteriano (A, B D y E) causado por <i>Pantoea agglomerans</i> (C). (Foto tomada de Lee and Hong, 2008).	23
Figura 10.	Municipio donde se realizó la colecta de las plantas de arroz (Google Maps, 2016)	28
Figura 11.	Métodos de inoculación por inyección y corte de la punta.	35
Figura 12.	Medición de la zona de avance de las lesiones causadas por las bacterias inoculadas en las hojas de arroz de la variedad Aztecas.	36
Figura 13.	Esquema que muestra los iniciadores 8F y 1492R utilizados para la amplificación del gen 16S rDNA	38
Figura 14.	Bacterias aisladas y purificadas de hojas de arroz enfermas. Se ilustran distintas morfologías y coloración de colonias crecidas en medio agar-nutritivo: a) aislamiento L2-17 b) aislamiento L1-27, c) aislamiento L2-5, d) aislamiento L2-6, e) aislamiento L1-48 y f)	40
Figura 15.	Plántulas de arroz de la variedad Aztecas, de 20 días de crecimiento mantenidas en invernadero.	47

Figura 16.	Plantas de arroz de la variedad Aztecas con presencia de tizón después de 45 días de crecimiento, mantenidas en invernadero.	48
Figura 17.	Plantas de arroz de la variedad Aztecas a los 75 días después de la siembra, a) Planta inoculada con el aislamiento L1-27, con desarrollo rápido de síntomas, b) Planta inoculada con el aislamiento L1-16, que presentó avance lento de síntomas.	50
Figura 18	Hojas de arroz de la variedad Aztecas con signos de tizón a) hoja inoculada con el aislamiento L2-7., b) hoja inoculada con el aislamiento L2-16., c) medición de la zona de avance en hojas de arroz.	52
Figura 19	Plantas de arroz de la variedad Aztecas de 75 dds, a) plantas testigo, inoculadas únicamente con agua., b) plantas inoculadas con las cepas bacterianas aisladas.	53
Figura 20	Gel de agarosa con el producto del PCR de la amplificación del gen 16S rDNA, de bacterias aisladas de hojas de arroz con síntomas tizón.	55

1. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una fuente primaria de alimento para la mitad de la población mundial; junto con el trigo y el maíz proporcionan el 49% de las calorías consumidas en el mundo, de las cuales el 23% son proporcionadas por el arroz, el 17% el trigo y el 9% el maíz. Por lo tanto, casi una cuarta parte de las calorías consumidas por toda la población mundial provienen del arroz (Prasanta *et al.*, 2006).

En 2016 se sembraron en el mundo 165 millones de hectáreas (ha) de arroz con un rendimiento de 4.44 toneladas por hectárea ($t\ ha^{-1}$) y una producción total de 741.5 millones de t (FAOSTAT, 2017), se estima que para el 2017 la producción mundial será de 758.9 millones de t (FAOSTAT, 2017).

En México se producen 254,063 t (SIAP, 2016) de arroz palay, los estados con mayor producción son Nayarit, Campeche y Veracruz.

Las enfermedades de las plantas se consideran importantes factores bióticos que limitan y restringen la producción, ya que conducen a grandes pérdidas de las cosechas en todo el mundo. A grandes rasgos las pérdidas de rendimiento directo causados por patógenos, insectos y malezas oscilan entre el 20 y 40% de la producción agrícola mundial. En el cultivo de arroz se estima que afectan aproximadamente el 31% de la producción (Oerke, 2006), lo que aumenta los costos de producción, debido a los gastos realizados por la adquisición y aplicación de insumos necesarios para su control.

Entre las enfermedades bacterianas que se presentan en el cultivo de arroz destacan el tizón bacteriano causado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Mew *et al.*, 1993), el rayado

bacteriano de la hoja causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Swings *et al.*, 1990), la pudrición marrón de la vaina causada por *Pseudomonas fuscovaginae* (Zeigler *et al.*, 1987) y la raya bacteriana causada por *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Baravidan *et al.*, 1982; Shakya *et al.*, 1983).

Nuevos estudios han reportado la aparición de bacterias emergentes que antes no se consideraban patógenos para el cultivo de arroz, dando origen a nuevas enfermedades, como el tizón de la hoja de arroz, reportado en la India y Corea, causado por el género *Pantoea agglomerans* y *P. ananatis* (Mondal *et al.*, 2011; Lee y Hong, 2009; Yan *et al.*, 2010); o el tizón en plántulas de arroz causado por *Burkholderia plantarii* (= *Pseudomonas plantarii*) en el norte y suroeste de China (Wang *et al.*, 2016). Asimismo también se han reportado la presencia de cepas bacterianas mucho más agresivas (Chen *et al.*, 2016) y de enfermedades en lugares donde antes no tenían presencia (Afolabi *et al.*, 2016). Por esta razón la presente investigación tiene como objetivo la identificación molecular de las bacterias cultivables, asociadas a las hojas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Aztecas, que presentan síntomas de tizón y determinar la patogenicidad de los aislamientos, para tomar las medidas necesarias para su control.

1.1 JUSTIFICACIÓN

El arroz es uno de los cereales más valiosos en el mundo por su alto contenido de energía y proteínas. En nuestro país actualmente se producen más de 200,000 t de arroz, siendo el estado de Campeche el que aporta más del 20% de la producción nacional (SIAP, 2016). Sin embargo, uno de los problemas más importantes para este cultivo son las enfermedades de origen bacteriano que reducen la producción del cultivo. En el estado de Campeche alrededor de 4,000 mil ha ubicadas en el municipio de Escárcega, están siendo afectadas por una enfermedad con síntomas de tizón foliar, reduciendo la producción en un 25%. Debido a la importancia que tiene el cultivo de arroz para el estado de Campeche, este trabajo de investigación tiene como objetivo la identificación molecular de las bacterias cultivables, asociadas a las hojas de arroz de la variedad Aztecas, que presentan síntomas de tizón y determinar la patogenicidad de los aislamientos, para tomar las medidas necesarias para su control.

1.2 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Identificar a nivel molecular las bacterias cultivables, asociadas a hojas de arroz con síntomas de tizón, del municipio de Escárcega, Campeche.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aislar las bacterias cultivables presentes en las hojas de arroz con síntomas de tizón.
- ✓ Caracterizar morfológicamente las especies bacterianas cultivables asociadas a las hojas de arroz con síntoma de tizón.
- ✓ Identificar a nivel molecular las bacterias cultivables asociadas a las hojas de arroz con síntomas de tizón.
- ✓ Determinar la patogenicidad de los aislamientos bacterianos identificados.

1.4 HIPÓTESIS

- ✓ Existen bacterias patogénicas y no patogénicas asociadas al tizón de la hoja de arroz.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades

2.1.1 Origen del cultivo de arroz

El género *Oryza*, posiblemente se originó hace más de 130 millones de años y se extendió como una planta silvestre en Gondwana, el súper continente que finalmente fragmentó y dio origen a Asia, África, Australia y la Antártida (Chang, 1976). Esto explica la distribución de las especies *Oryza* en todos estos continentes excepto en la Antártida.

La domesticación de los arroces silvestres probablemente comenzó hace unos 9,000 años. Se cree que el arroz común, *O. sativa*, y el arroz africano, *O. glaberrima* evolucionaron de forma paralela, ya que el progenitor silvestre de *O. sativa* es el arroz asiático silvestre común, *O. rufipogon*, que muestra variación en cuanto al período vegetativo, de perennes a anuales y se les conoce con el nombre específico de *O. nivara*, que fueron domesticados para convertirse en *O. sativa* (Khush, 1997). En Asia podría haber ocurrido de forma independiente y al mismo tiempo en varios sitios, dentro o al borde de un ancho cinturón que se extiende por debajo de las llanuras orientales de la cordillera del Himalaya en la India y a través de la parte superior de Myanmar, al norte de Tailandia, Laos y Vietnam, así como al suroeste y al sur de China (Roschevitz, 1931; Chang, 1976). Probablemente el desarrollo de estas especies de arroz en estas regiones del este de la India, el norte de Asia y oeste de China se debió a las condiciones geográficas y climáticas como la sequía, así como la variación de temperaturas (Whyte, 1972).

De las dos especies que se cultivan, el arroz cultivado en Asia (*Oryza sativa*), es el que se

cultiva en todo el mundo, mientras que el arroz africano (*O. glaberrima*), solamente se cultiva a una escala limitada en África occidental (Prasanta *et al.*, 2006). Al igual que los demás cereales como el trigo, maíz, cebada, sorgo, avena y centeno, el arroz pertenece a la familia Poaceae.

2.1.2 Morfología y taxonomía del arroz

En el Cuadro 1 se presenta la clasificación taxonómica de la especie de arroz cultivada en América y Asia principalmente.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género *Oryza* (NCBI).

Nivel taxonómico	Clasificación
Super reino	Eukaryota
Dominio	Viridiplantae
Phylum	Streptophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	<i>Oryza</i>
Especie	<i>Oryza sativa</i> L.

Las características morfológicas de la planta se muestran en la Fig. 1 y 2.

El arroz es una planta monocotiledónea, las cuales se caracterizan por tener un sistema fibroso de raíces, es decir no tienen una sola raíz principal bien definida, sino varias o muchas.

También se caracterizan por el crecimiento de raíces adventicias. El sistema de raíces del arroz consiste en dos tipos principales: las raíces de la corona y las raíces nodales (Fig. 1). Las raíces que se desarrollan a partir de nodos por encima de la superficie del suelo, por lo general se conocen como nodales. Éstas se encuentran a menudo en los cultivares de arroz, que crecen en las profundidades del agua por encima de 80 cm. La mayoría de las raíces de las variedades de arroz llegan a una profundidad máxima de 1 m o más en los suelos de tierras suaves. En suelos inundados, sin embargo, las raíces del arroz rara vez exceden una profundidad de 40 cm.

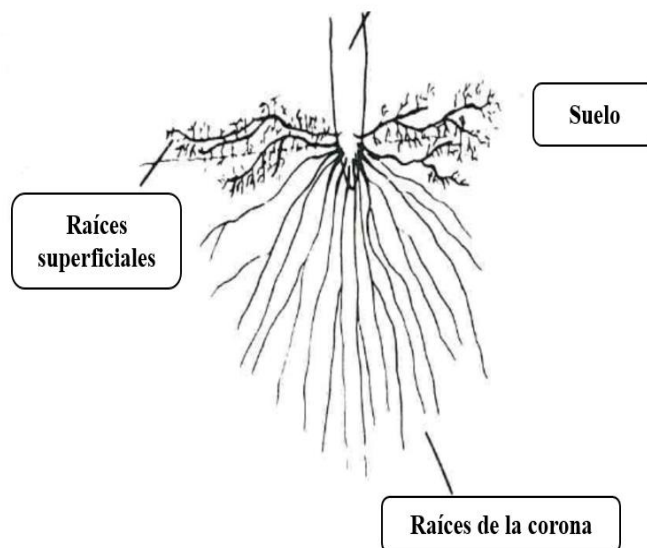


Figura 1. Sistema radical de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.) (Imagen tomada de Compendium of Rice Diseases, 1992).

Cada tallo de arroz está formado por una serie de nudos y entrenudos (Fig.2). Los

entrenudos varían en longitud dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales, pero generalmente aumentará de la parte inferior a la superior del vástago. Cada nudo superior lleva una hoja y una yema. El número de nudos varía entre 13 a 16, sólo en la parte superior hay 4 ó 5 separados por entrenudos largos (GRISP, 2013).

La lámina de la hoja se fija en el nudo por la vaina de la hoja, que rodea el vástago. Una especie de pelos gruesos cubre la superficie de las aurículas. Inmediatamente por encima del pabellón auricular está una membrana delgada, en posición vertical llamada lígula (GRISP, 2013, ver fig. 2).

La fase de amacollamiento comienza cuando la plántula es capaz de mantener su propio peso y generalmente termina con la iniciación de la panícula. Es la producción de brotes laterales y de brotes cerca del suelo, lo que da como resultado que la planta de arroz tenga varios brotes en lugar de uno, por lo general comienza cuando las plántulas tienen cinco hojas. El primer vástago se desarrolla entre el tallo principal y la segunda hoja de la base de la planta. Posteriormente, cuando la sexta hoja emerge, el segundo vástago se desarrolla entre el tallo principal y la tercera hoja de la base (GRISP, 2013). Los vástagos que crecen desde el tallo principal son llamados vástagos primarios. Estos pueden generar vástagos secundarios, que a su vez puede generar vástagos terciarios que se producen de una manera sincronizada. Aunque los macollos deben permanecer unidos a la planta, en las demás etapas son independientes porque producen sus propias raíces. Las variedades y razas de arroz difieren en la capacidad de amacollamiento; los factores ambientales también lo afectan, principalmente la distancia entre plantas, la cantidad de luz, el suministro de nutrientes y las prácticas culturales.

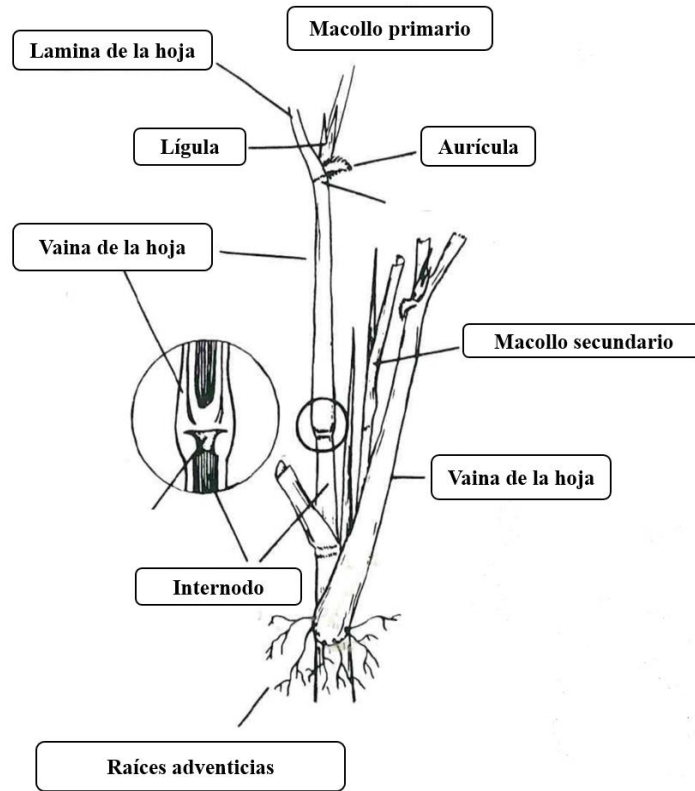


Figura 2. Morfología de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.) (Imagen tomada de Compendium of Rice Diseases, 1992).

2.1.3 Importancia del cultivo de arroz

En el 2015 se sembraron en el mundo 165 millones de ha de arroz con un rendimiento de 4.44 t ha⁻¹ y una producción total de 741.5 millones de t. Los principales países productores fueron: China con una superficie de 30.35 millones de ha, con un rendimiento de 6.85 t ha⁻¹ y una producción de 208.2 millones de t; India con 43 millones de ha, un rendimiento de 3.59 t ha⁻¹ y una producción total de 156.6 millones de t (Cuadro 2); seguidos de Indonesia, Bangladesh,

Tailandia y Vietnam (FAO, 2017).

La importancia del arroz en la dieta varía entre los países, es responsable de más del 70% de la ingesta de calorías diarias en países como: Bangladesh, Camboya, Laos, Myanmar y Vietnam (Prasanta *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Producción mundial de arroz (FAO, 2017)

	2012-2014 Promedio	2015	2016 Estimación	2017 Pronóstico
	<i>millones de toneladas</i>			
MUNDO	741.5	740.3	751.9	758.9
Países en desarrollo	715.5	715.2	725.7	733.2
Países desarrollados	26.0	25.1	26.2	25.7
ASIA	672.4	669.6	680.1	686.4
Bangladesh	51.2	52.5 G	52.6	53.1
Camboya	9.3	9.3 G	10.0 G	9.7
China	206.5	209.8	208.5	210.1
de la cual, China (continental)	204.8	208.2 G	206.9 G	208.4
India	158.7	156.6 G	163.3 G	165.3
Indonesia	70.4	73.0	72.7	74.2
Irán, República Islámica del	2.4	2.3 G	2.5	2.6
Japón	10.8	10.5 G	10.7	10.7
Corea, República de	5.6	5.8 G	5.6 G	5.5
Lao RDP	3.6	3.8	3.9	4.0
Malasia	2.7	3.3 G	3.0	3.1
Myanmar	28.1	27.5 G	28.0	28.3
Nepal	4.8	4.3 G	5.2 G	5.4
Pakistán	9.7	10.2 G	10.0 G	10.3
Filipinas	18.6	17.5 G	18.4 G	18.6
Sri Lanka	3.9	4.8 G	4.4 G	3.0
Tailandia	36.1	28.5	32.6	33.3
Viet Nam	44.3	45.2 G	43.6 G	44.0
ÁFRICA	27.7	28.8	30.8	30.7
África del Norte	6.1	5.9	6.3	6.2
Egipto	6.1	5.9	6.3	6.2
África Occidental	13.5	14.3	15.4	16.0
Côte d'Ivoire	0.8	0.9	0.8	0.9
Guinea	2.0	2.0 G	2.2 G	2.2
Malí	2.1	2.3 G	2.8 G	2.8
Nigeria	4.7	4.8	5.0	5.3
Sierra Leona	1.2	1.0 G	1.1 G	1.1
África Central	0.5	0.5	0.5	0.5

México consume por año, 1 millón 100 mil toneladas de arroz, del cual importa el 80%, principalmente de Estados Unidos de Norte América, Argentina y Uruguay (SAGARPA, 2016). Solo el 20% es producido en nuestro país, en una superficie sembrada de 42,310.56 ha con un rendimiento de 5.81 t ha⁻¹ y una producción total de 236,017.92 t (SIAP, 2015). Los estados con mayor producción en el país son, Nayarit 65,289.78 t, Campeche con 41,215.65 t y Michoacán con 33,260.59 t (Cuadro 3).

Cuadro 3. Producción de arroz palay en México (SIAP, 2015).

Estado	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t ha⁻¹)	PMR (\$/t)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Campeche	8,883.00	8,843.50	41,215.65	4.66	3,424.38	141,137.99
Chiapas	539.50	539.50	912.26	1.69	3,749.78	3,420.77
Colima	3,125.00	3,116.00	18,221.64	5.85	3,644.81	66,414.37
Guerrero	390.50	390.50	1,971.91	5.05	5,204.76	10,263.33
Jalisco	3,767.70	3,735.20	19,817.05	5.30	4,316.56	85,541.58
Michoacán	3,942.00	3,942.00	33,260.59	8.44	3,531.28	117,452.43
Morelos	1,265.60	1,265.60	12,893.38	10.19	4,598.33	59,287.98
México	68.00	68.00	536.52	7.89	4,323.16	2,319.46
Nayarit	10,487.12	10,320.12	65,289.78	6.33	3,345.36	218,418.01
Tabasco	3,518.00	2,093.00	12,833.70	6.13	3,196.93	41,028.38
Tamaulipas	2,740.14	2,740.14	16,256.84	5.93	3,200.00	52,021.89
Veracruz	3,584.00	3,584.00	12,808.60	3.57	3,941.49	50,485.02
TOTAL	42,310.56	40,637.56	236,017.92	5.81	3,592.06	847,791.21

En el estado de Campeche, la producción de arroz se encuentra en los municipios de Palizada y Escárcega, Estos municipios se caracterizan por poseer suelos con ligeras ondulación tendiendo a planos, profundos y permeables, frágiles en la parte superior, cimentados en una capa arcillosa compacta, que es lo que les permite inundarse, con altos contenidos de fierro. Estos municipios reciben entre 1,200 y 1,800 mm de precipitación en los meses de junio a octubre, lo que hace que tengan un potencial alto para la siembra del cultivo de arroz (Agenda Técnica Agrícola de Campeche, 2015), además el arroz es el cuarto cultivo más importante después del maíz, en cuanto al valor de la producción y a la superficie sembrada (SIAP, 2015). En el municipio de Escárcega se siembra una superficie de más de 2000 ha, mientras que en el municipio de Palizada se concentra la mayoría de la superficie sembrada con un total de 4, 434 ha (SIAP, 2015).

2.1.4 Problemática del cultivo de arroz

Algunos cambios tecnológicos han tenido un impacto importante en el desarrollo de las enfermedades como: la generación de variedades bien adaptadas, de menor duración en el período vegetativo y el uso de variedades uniformes. Estos cambios permitieron la intensificación del cultivo de arroz en el tiempo y el espacio, si bien fue importante para lograr una mayor productividad del cultivo, la intensificación también aumentó la vulnerabilidad de los cultivos de arroz mediante la exposición continua a plagas y enfermedades. El uso de variedades genéticamente uniformes redujo la capacidad amortiguadora en el sistema de cultivo (Mew *et al.*, 2004).

Durante décadas, los sistemas de control de plagas y enfermedades se han basado principalmente en el uso de nuevas variedades resistentes y en la aplicación de plaguicidas. En muchos casos, el nivel de protección se erosiona o se pierde por los cambios en las poblaciones de patógenos, debido a la creciente presión de selección impuesta por la resistencia del huésped o el uso de pesticidas. Cuando esto sucede los agricultores responden con el incremento en la aplicación de pesticidas, especialmente, para el control de plagas y enfermedades. En consecuencia gran parte de la utilización de plaguicidas en las últimas décadas ha sido innecesaria o excesiva; lo que ha provocado la degradación del medio ambiente; por otro lado, la intensificación y la uniformidad del cultivo favorecen epidemias de enfermedades con mayor frecuencia y brotes de plagas de insectos (Mew *et al.*, 2004).

Las enfermedades causadas por factores bióticos reducen la producción y aumentan las pérdidas de las cosechas en el mundo. Las pérdidas de rendimiento directo por patógenos, insectos y malezas, oscilan entre el 20 y 40% de la productividad agrícola mundial (Oerke, 2006). En el cultivo de arroz se estima que afectan aproximadamente el 31% de la producción mundial (Oerke, 2006).

2.2 Enfermedades bacterianas del cultivo de arroz

Las enfermedades bacterianas son de gran importancia en el cultivo del arroz, en el cuadro 4, se muestran algunas de importancia en diferentes regiones del mundo.

Cuadro 4. Enfermedades bacterianas del cultivo de arroz (modificado de Mew et al., 2004).

Bacteria	Enfermedad	Síntomas	Distribución Geográfica
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Tizón bacteriano	Bandas húmedas en la lámina foliar	Europa, Asia, África, Norte, Centro y Sur de América, el Caribe y Oceanía
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Rayado bacteriano de la hoja	Rayas húmedas intervenales	Europa, Asia, África y Oceanía
<i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>syringae</i>	Tizón foliar bacteriano	Pudrición de la vaina y decoloración del grano	Australia, China, Hungría, Japón y Chile
<i>Microbacterium</i> sp.	Raya roja	Lesiones en la hoja	India
<i>Pantoea ananatis</i>	Tizón bacteriano de la hoja	Lesiones en la hoja	India, Togo y Benin
<i>Pantoea</i> sp.	Tizón bacteriano de la hoja	Lesiones en la hoja	India
<i>Pantoea stewartii</i>	Tizón bacteriano de la hoja	Lesiones en la hoja	Togo
<i>Pantoea agglomerans</i>	Bronceado bacteriano de la pálea	Lesiones en la pálea	Japón y Corea
<i>Burkholderia glumae</i>	Tizón bacteriano de la panícula	Necrosis de la panícula y decoloración del grano	Japón, Taiwán, China, Corea, India, Filipinas, Tailandia, Estados Unidos, Panamá, Costa Rica, República Dominicana, Venezuela y Colombia
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	Rayado marrón bacteriano	Necrosis de las plántulas	Asia, África, América y Europa

2.2.1 Tizón bacteriano de la panícula

La bacteria causante es *Burkholderia glumae*, es una bacteria aeróbica, Gram negativa, con forma de bacilo, que produce una toxina llamada toxoflavina, la cual se mueve por los tejidos, tanto por el xilema de los tallos, vainas, hojas y granos (Chien *et al.*, 1987; Mew *et al.*, 1993). Esta toxina causa obstrucción de las haces vasculares, originando la manchado y al evitar el paso de nutrientes por los tejidos conductores del xilema y floema, ocasiona que el grano no se llene (Mew *et al.*, 1993). La toxoflavina inhibe la germinación de la semilla, causa tizón de la panícula, pudrición de las vainas, esterilidad de las flores y aborto de los granos (Nandakumar *et al.*, 2009; Mew *et al.*, 1993). Los síntomas se presentan en la vaina de la hoja principal y en las panículas (Fig. 3).



Figura 3. Síntomas de la enfermedad del tizón bacteriano de la panícula, causado por *Burkholderia glumae* (Foto tomada de Nandakumar *et al.*, 2009).

2.2.2 Rayado bacteriano de la hoja

El agente causal del rayado bacteriano de la hoja es *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Es una bacteria Gram negativa, con forma de bacilo (Swings *et al.*, 1990); penetra en las hojas principalmente a través de las aberturas naturales, como los estomas. La bacteria se multiplica en la cavidad subestomática y coloniza los espacios intercelulares del parénquima. También puede ingresar a través de heridas, pero en este caso, permanece únicamente en el mesófilo y no invade los haces vasculares (Ou, 1977). En condiciones de humedad, la bacteria forma pequeñas gotas de exudado de color amarillo, en la superficie de las hojas (Niño-Liu *et al.*, 2006).

La enfermedad se presenta en cualquier etapa de crecimiento del cultivo, como pequeñas rayas húmedas intervenales acuosas translúcidas de color amarillo (Kang *et al.*, 2008). Las nervaduras actúan como barreras, mientras las áreas infectadas se amplían y se unen longitudinalmente, dando como resultado el síntoma del rayado (Niño-Liu *et al.*, 2006), posteriormente las hojas se tornan de color marrón claro, luego blanco grisáceo y mueren (Fig. 4).



Figura 4. Lesiones lineares ocasionadas por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Foto tomada de Afaboli et al., 2016) .

2.2.3 Pudrición marrón de la vaina

La bacteria causante es *Pseudomonas fuscovaginae*, es una bacteria con forma de bacilo, Gram negativa (Miyajima *et al.*, 1983). En el cultivo de arroz, aparecen los síntomas en forma de manchas acuosas de color verde, que luego se tornan de color marrón oscuro, principalmente en la vaina de la hoja principal (Miyajima *et al.*, 1983; Soriano, 2006). Los granos de la panícula que emergen presentan una decoloración o un color marrón claro, con deformaciones y generalmente están vacíos (Mew *et al.*, 1993) (Fig.5).



Figura 5. Granos y tallos manchados causados por una infección con *Pseudomonas fuscovaginae*. (Foto tomada de Cother et al., 2010).

2.2.4 Raya roja bacteriana

La bacteria causante de esta enfermedad es *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, es una bacteria con forma de bacilo, Gram negativa. Se localiza entre las glumas y el pericarpio (Shakya et al., 1986).

Los síntomas se caracterizan por un rayado en las hojas y/o pudrición en la planta. El inicio de los síntomas se da principalmente en las vainas inferiores como bandas longitudinales húmedas, de color verde oscuro, que luego se tornan marrón oscuro. La enfermedad pueden causar enanismo, muerte de las plántulas, o la muerte prematura de las hojas en plantas jóvenes (Fig. 6).

Las semillas presentan manchado de moderado a severo en las glumas y en el endospermo. En casos extremos el grano se pudre completamente y no hay llenado del mismo (Soriano, 2006).

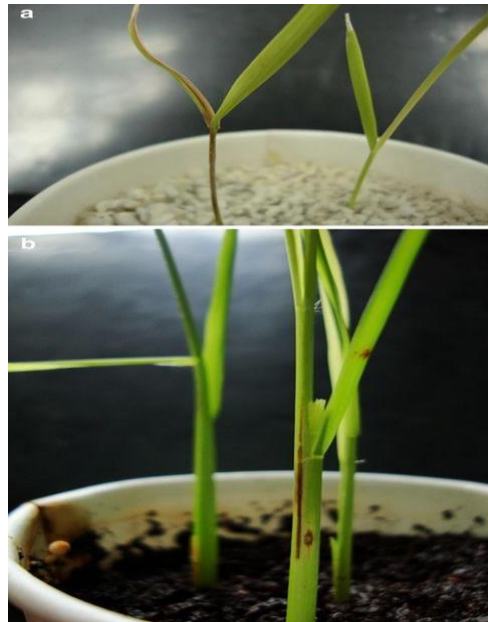


Figura 6. Síntomas del rayado marrón causado por *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* en plántulas de arroz (Foto tomada de Bin Li *et al.*, 2011).

2.2.5 Tizón bacteriano

Es causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Swings *et al.*, 1990). Es una bacteria Gram-negativa con forma de bacilo.

El tizón bacteriano es una de las enfermedades más importantes del arroz, es la más conocida y de las más antiguas, la cual fue reportada por primera vez en los campos de Fukuoko,

Japón, a inicios de 1884 (Mizukami, 1962).

Los síntomas se caracterizan por presentar lesiones blancas a lo largo de nervaduras, que se observan con mayor frecuencia en la etapa de amacollamiento; además de la aparición de rayas húmedas que se producen a lo largo de uno o ambos márgenes de la hoja y en la parte superior de la lámina foliar de las hojas enfermas, que se amplían y llegan a tornarse de color amarillo. Con el tiempo, las lesiones coalescen y cubren toda la hoja, se puede extender a los extremos inferiores de las vainas foliares, tornándose de color blanco y posteriormente a un color gris; en esta etapa es posible observar el crecimiento de hongos saprófitos (Reddy *et al.*, 1981).

La incidencia de la enfermedad aumenta con el crecimiento de las plantas y se expresa con mayor intensidad en la etapa de floración.

Las semillas asintomáticas pueden albergar poblaciones bajas de *X. oryzae* pv. *oryzae*, que sirven como fuente de inóculo para la introducción del patógeno en campos libres de enfermedad (Mew *et al.*, 1993).

La etapa más grave de tizón bacteriano es el síndrome Kresek, o de marchitamiento y del tizón. Los síntomas aparecen de 2 a 3 semanas después del trasplante; se presenta en los trópicos y es favorecida por la práctica agrícola de cortar puntas de las hojas antes del trasplante. Las hojas enfermas se vuelven de color gris, el avance es a lo largo de la nervadura central, y con el tiempo las hojas se marchitan por completo (Fig. 7). Las bacterias alcanzan el punto de crecimiento de la planta, a través del sistema vascular e infectan las bases de otras hojas y, finalmente ocasionan la muerte de la planta (Reddy *et al.*, 1981).



Figura 7. Síntomas de tizón foliar ocasionado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Foto tomada de Afaboli *et al.*, 2016).

2.2.6 Tizón de la hoja de arroz causada por *Pantoea ananatis*

Pantoea ananatis, es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, con forma de bacilo.

Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en la punta de la hoja, con apariencia húmeda, posteriormente las lesiones se propagan hacia las láminas de las hojas y finalmente las lesiones se tornan de color marrón claro, exhibiendo una apariencia deteriorada o de tizón (Fig. 8). La enfermedad es más severa durante la etapa de post-floración (Mondal *et al.*, 2008). El

tizón de la hoja de arroz causado por *P. ananatis* se ha reportado en los estados del norte de la India y en Benín, ubicado al oeste de África (Kini *et al.*, 2016).



Figura 8. Tizón de la hoja en arroz causada por *Pantoea ananatis* (Foto tomada de Mondal *et al.*, 2008., Kini *et al.*, 2016)

2.2.7 Tizón bacteriano causado por *Pantoea agglomerans*

La bacteria *Pantoea agglomerans* es un bacilo Gram negativo, que causa el tizón foliar y la pudrición del tallo en arroz. Se caracteriza por presentar lesiones que aparecen como rayas con apariencia húmeda o manchas de color marrón claro a ligeramente rojizas, en las partes superiores de las hojas, (Lee and Hong, 2008) (Fig.9). Esta enfermedad se ha reportado en provincias de Corea.

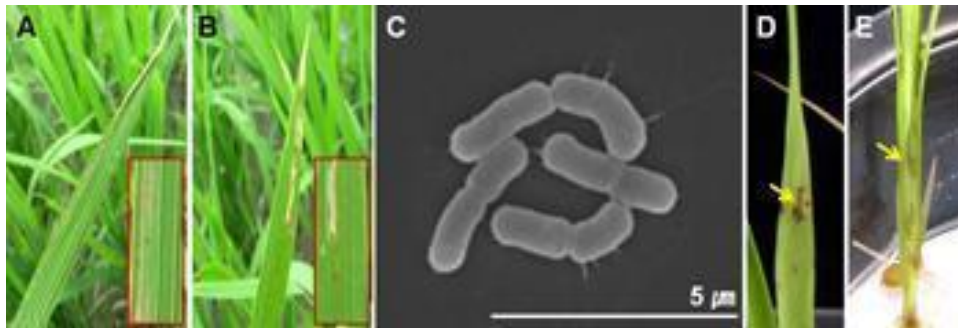


Figura 9. Hojas con síntomas del tizón bacteriano (A, B D y E) causado por *Pantoea agglomerans* (C). (Foto tomada de Lee and Hong, 2008).

2.3 Métodos de Diagnóstico

El diagnóstico de enfermedades en las plantas, ha dependido de la utilización de métodos indirectos o convencionales, como las pruebas bioquímicas, serológicas e inmunofluorescencia. Tradicionalmente los microorganismos han sido caracterizados por su fenotipo, sus características celulares observables, morfología, propiedades fisiológicas, su desarrollo y por la estructura de sus componentes celulares (Barnes, 1994; Amann y Bou *et al.*, 2011).

Sin embargo, para poder realizar estas técnicas y poder identificar a los microorganismos, es necesario cultivarlos, lo que se ha visto limitado ya que el 90% de éstos, no pueden ser cultivados usando las técnicas convencionales (Nyström, 2003).

Es por eso que durante los últimos años se ha incrementado el uso de los métodos directos o técnicas moleculares para conocer la identidad de un microorganismo o la diversidad microbiana en comunidades complejas y que además aplicación estudios filogenéticos para identificarlos, como las técnicas de amplificación (PCR), hibridación (Sondas, Microarrays), y secuenciación (Díaz y Wachter, 2003).

2.3.1 Determinación de las características fisiológicas

La determinación de las características fisiológicas de los diferentes grupos de bacterias se puede hacer mediante el crecimiento en medios de cultivo a diferentes temperaturas, por ejemplo, 4°C o 37°C; el punto de muerte térmica (que para las bacterias patógenas de plantas normalmente es de 50 a 55 °C, cuando se mantiene durante 10 min a esta temperatura en un medio líquido); el crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, 2. 5 y 7%, o el patrón de resistencia a diferentes antibióticos. Además la detección de la producción de toxinas y la actividad de nucleación de hielo, pueden aportar características adicionales útiles en la identificación de bacterias patógenas de plantas (Janse, 2005).

2.3.2 Características bioquímicas

Estas pruebas se utilizan para determinar la expresión del material genético a través de los diversos sistemas enzimáticos de la bacteria. Se basa principalmente en ofrecer a las bacterias, nutrientes en un tubo de cultivo o placa de agar para determinar si las bacterias son capaces de utilizar ciertas fuentes de C (azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, glucósidos) y/o fuentes de N (aminoácidos). Se puede determinar mediante la inoculación con una única fuente de carbono (C) o de nitrógeno (N) en medio mínimo, incluyendo un indicador de pH. Si la bacteria es capaz de descomponer el C o la fuente de N a los productos de ácido o álcali, el indicador de pH (y por lo tanto el color del medio) va a cambiar. También se puede determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de la glucosa que es una prueba importante para la diferenciación entre géneros bacterianos. Otras pruebas bioquímicas se utilizan para determinar la formación de ciertos productos finales de las bacterias, por ejemplo, la formación de H₂S a

partir de cisteína, indol a partir de triptófano, NO_2 o NH_4 derivado de nitrato (NO_3) entre otras. Algunos efectos de las enzimas también pueden ser visualizados directamente o después de la tinción en ciertos medios con agar, que contienen los sustratos para las enzimas, como la hidrólisis de la pectina, la gelatina, el almidón, la caseína, la celulosa o ácidos grasos por la acción de pectinasas, gelatinasas, amilasas y caseasas (Janse, 2005).

Las pruebas más utilizadas para la caracterización bioquímica de las bacterias patógenas de plantas son: dihidrolasa de arginina, catalasa, hidrólisis de pectina, actividad de esterasa, hidrólisis de gelatina, la producción de sulfuro de hidrógeno a partir de triptófano o cisteína, prueba de oxidasa y reducción de nitrato (Janse, 2005).

2.3.3 Características serológicas

La serología es una herramienta importante, que ha proporcionado información adicional en el proceso de identificación de bacterias fitopatógenas, sin embargo, una bacteria no puede ser identificada únicamente sobre la base de su comportamiento serológico. Los anticuerpos (proteínas de defensa en el suero sanguíneo, llamadas inmunoglobulinas) son formados por los animales en contra de compuestos introducidos en su cuerpo (estos compuestos se denominan antígenos), en nuestro caso se trata de una bacteria o partes del mismo patógeno de la planta (Janse, 2005).

2.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia en el diagnóstico de enfermedades, es rápida y económica. La PCR es una técnica desarrollada Mullis y Faloona

(1987), permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de DNA, basándose en la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del DNA durante la división celular (Powledge, 2004; Medina *et al.*, 2010).

Esta técnica se basa en varios ciclos de copiado, constituido por tres etapas en las cuales un pequeño fragmento específico de DNA es copiado a partir de un ácido nucleico molde (Claverie *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2010). Las etapas que forman este ciclo son:

a) Desnaturalización, el DNA de doble cadena presente en la muestra, es separado a dos cadenas sencillas, mediante la aplicación de temperaturas entre 90-95 °C aproximadamente durante 30-90 segundos.

b) Alineamiento, la mezcla de reacción se incuba a una temperatura en un intervalo de entre 40-60 °C, por un tiempo determinado. En esta etapa los se unen y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno de los oligonucleótidos sintéticos (iniciadores) a las cadenas sencillas del DNA, el cual funciona como un molde, quedando los oligonucleótidos alineados a éste, para formar una pequeña región de doble cadena. La enzima *Taq* DNA polimerasa se une al pequeño fragmento de DNA de doble cadena y comienzan a polimerizar en sentido 5' - 3'.

c) Extensión, generalmente se lleva a cabo a una temperatura de 72 °C, en la cual la *Taq* DNA polimerasa alcanza su máxima actividad para continuar la síntesis del o los fragmentos de DNA de doble cadena obtenidos en la etapa anterior, a partir de los desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) en solución.

Como resultado de cada ciclo se obtiene la duplicación de la secuencia de DNA molde, delimitada por el par de iniciadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos, la cantidad de DNA obtenido se incrementa exponencialmente. De este modo, al final de “n” ciclos, el número de copias de DNA por cada molécula será de 2^n . Un proceso de PCR típico, de entre 20 a 35 ciclos, permite amplificar por tanto un millón de veces como mínimo, el número de copias del fragmento de DNA molde que existe en la muestra original (Babalola, 2003; Rodríguez, 2004). Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y se pueden utilizar distintos métodos de tinción para su visualización.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

Las plantas de arroz con síntomas de tizón foliar provinieron de parcelas de la empresa arrocera Tollocan, ubicada en el municipio de Escárcega, Campeche. Se colectaron tres lotes (lote 1, lote 2 y lote 19) (Fig.10), durante 2015 y 2016. Las plantas se transportaron dentro de bolsas de plástico en un contenedor de unicel, que contenía hielo para preservar las muestras hasta su llegada al Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche (ubicado en Sihochac, Campeche, México), posteriormente fueron utilizadas para realizar los aislamientos bacterianos.

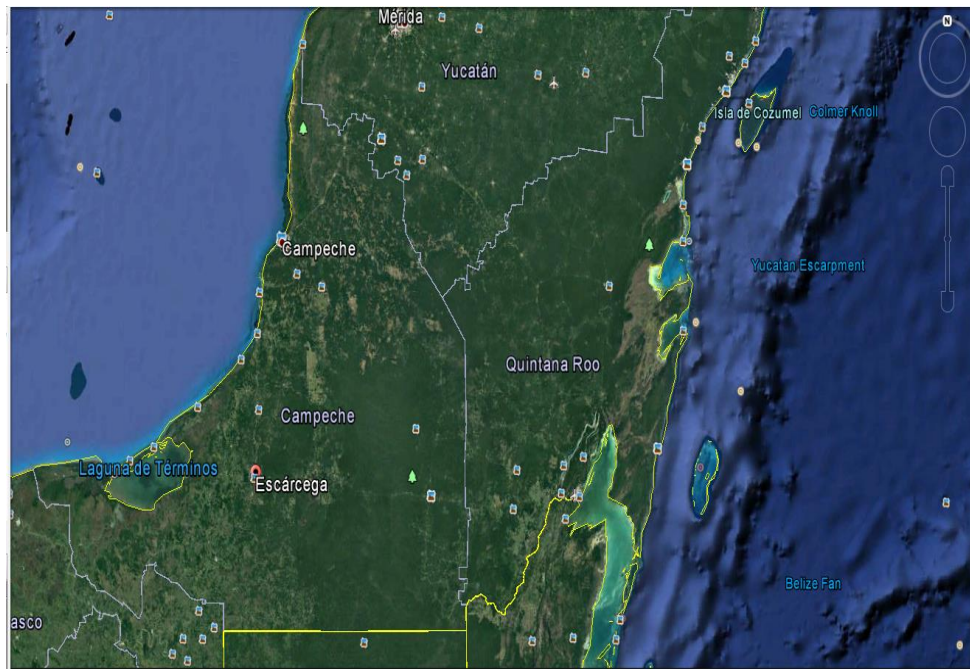


Figura 10. Municipio donde se realizó la colecta de las plantas de arroz (Google Maps, 2016).

El municipio de Escárcega, se ubica geográficamente entre los paralelos 18° 51' y 18° 09' N y los paralelos 90° 20' y 91° 33' W, se encuentra a una altura de 60 metros sobre el nivel del mar. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, la temperatura promedio anual es de 26 °C.

3.1.2 Aislamientos bacterianos

Se seleccionaron de forma individual hojas de las plantas colectadas con síntomas de tizón, las cuales se limpiaron superficialmente con etanol al 70%, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces; posteriormente las hojas se colocaron en papel estéril dentro de la campana de flujo laminar, para remover el exceso de cloro y agua; finalmente para obtener los extractos de las hojas, cada hoja seleccionada se colocó por separado en un mortero de porcelana estéril, se adicionó 1mL de agua estéril y se realizó la maceración con un pistilo estéril. El extracto obtenido se recuperó y se depositó en tubos eppendorf de 1.5mL que posteriormente fueron utilizados para aislar las bacterias.

3.1.3 Obtención de aislamientos de bacterias en medio agar nutritivo (AN)

Para obtener los aislamientos bacterianos, se prepararon cajas de Petri con medio agar nutritivo (que contenía 3 g de extracto de carne, 5 g de peptona, 16 g de agar bacteriológico por cada un litro de agua). El AN permite el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Se adicionaron 100 uL del extracto obtenido de cada hoja, en las cajas de Petri con medio

AN, en un extremo de ésta se realizó una siembra por estría cruzada para obtener colonias aisladas de las bacterias. Posteriormente se colocaron las cajas de Petri de forma invertida en una incubadora, a temperatura de 28°C durante 24 a 72 h, hasta la aparición de las colonias.

3.1.4 Purificación de las colonias

Todas las colonias de aspecto morfológico diferente se recuperaron y se resembraron en medio AN para obtener cultivos puros. A partir de éstos se determinó la morfología de las colonias; se tomó una Unidad formadora de Colonia (UFC) de cada cultivo para realizar la extracción de DNA y posteriormente la identificación molecular, así como para emplearlas en las pruebas de patogenicidad.

3.1.5 Tinción de Gram

Las bacterias aisladas se sembraron en medio AN y se dejaron crecer de 24 a 72 h. Se colocó una pequeña gota de agua estéril sobre la superficie de un portaobjeto de vidrio limpio, con la ayuda de un asa bacteriológica se tomó una pequeña parte de la UFC y se realizó un frotis de la bacteria sobre el portaobjeto, tratando de que este sea apenas perceptible a simple vista.

Para fijar y secar las bacterias, el portaobjeto se pasó por lo menos 4 veces sobre la flama de un mechero bunsen evitando que este no se sobrecalentara. Una vez seco, el frotis se cubrió completamente con cristal violeta y se dejó reposar un minuto, enseguida se enjuagó con agua para eliminar el exceso de cristal violeta. Posteriormente el portaobjetos se cubrió con la solución de yodo lugol y se dejó reposar por un minuto, enseguida se lavó con etanol al 95 % por 30 segundos y se enjuagó con agua. Finalmente el frotis se tiñó con safranina por 10 segundos,

se enjuagaron con abundante agua y se dejaron secar. Así las bacterias fijadas en el portaobjetos que no retuvieron el colorante cristal violeta se contra tiñeron (Fox, 1993).

Posteriormente cada una de las muestras procesadas se examinó en un microscopio (Leica CME) con el objetivo 100X utilizando aceite de inmersión.

3.1.6 Descripción morfológica de las colonias

Para la descripción morfológica, todas las bacterias purificadas se sembraron por estría cruzada en medio AN para obtener colonias aisladas.

Se incubaron de 24 a 72 h a una temperatura de 28°C. Empleando un microscopio estereoscopio se realizó la descripción morfológica de las bacterias incluyendo la forma de la colonia, el color, los bordes, la elevación y la consistencia de la colonia.

3.1.7 Asepsia de semillas

Debido a que no se encontró un método o protocolo de asepsia para semillas de arroz, que asegurara la germinación de plantas completamente libres de bacterias, para emplearlas en los ensayos de patogénesis, se procedió a utilizar una combinación de desinfección con cloro comercial más la aplicación de temperatura a las semillas.

En el cuadro 5 se muestran seis diferentes combinaciones que se utilizaron para la asepsia de las semillas.

Cuadro 5. Diferentes métodos de asepsia utilizados en las semillas de arroz de la variedad Aztecas.

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
	Baño maría: 37 °C x 20 min, 50° C x 40 min y 28° C x 15 min.	Baño maría: 37 °C x 20 min, 50° C x 50 min y 28° C x 15 min.	Baño maría: 37 °C x 20 min, 50° C x 50 min y 28° C x 15 min.	Baño maría: 37 °C x 20 min, 50° C x 50 min y 28° C x 15 min.
Cloro al 1.5% por 15 minutos en agitación	Cloro al 1.5 % x 15 min en agitación	Cloro al 5% por 1 h en agitación	Cloro al 5% mas Tween 20 al 2%por 1 h en agitación	Cloro al 5% mas Tween 20 al 2%por 1 h en agitación
3 enjuagues de 5 minutos cada uno	3 enjuagues con agua destilada estéril 5 min por cada lavado	5 enjuagues con agua destilada estéril 5 min por cada lavado	5 enjuagues con agua destilada estéril 5 min por cada lavado	6 enjuagues con agua destilada estéril 5 min por cada lavado
Poner a germinar	Poner a germinar	Alcohol al 95% por 5 min. 5 enjuagues con agua destilada estéril 5 min por cada lavado Agrimy 500 CU al 0.006% por 15 min	Agrimy 500 CU al 0.006% por 15 min	Agrimy 500 CU al 0.006% mas Cupravit por 30 min
		Dejar secar sin enjuagar	Dejar secar sin enjuagar	Dejar secar sin enjuagar
		Poner a germinar	Poner a germinar	Poner a germinar

3.1.8 Germinación de semillas y crecimiento de plantas.

Para las pruebas de patogenicidad se germinaron semillas de la variedad Azteca, provenientes de las parcelas de la empresa arrocera Tolloacan y posteriormente las proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Zacatepec).

Las semillas desinfectadas se colocaron en hojas de papel estraza estéril, se humedecieron con agua destilada estéril, posteriormente el papel estraza se enrolló junto con las semillas y se colocaron en oscuridad durante 24 h a 28 C°.

Al término de este periodo las semillas se pusieron en el laboratorio en condiciones de luz natural y a temperatura ambiente hasta su germinación.

Las semillas germinadas de 5 días de edad se trasplantaron en bolsas negras de 1kg, que contenía peat moss (premier) como sustrato, el cual previamente se esterilizó en una olla de presión a 120 °C y 15 libras de presión durante 4 h. Posteriormente las plantas se trasladaron al invernadero con condiciones de temperatura ambiente. El experimento se realizó de diciembre de 2015 a abril de 2016.

Durante 2 meses y medio las plantas se regaron por inundación, con la solución nutritiva de Hewitt, que contenía macro y micronutrientes para el desarrollo de la planta.

3.1.9 Pruebas de patogenicidad

Los aislamientos bacterianos purificados se sembraron en medio AN a 28°C, de 24 a 72 h, dependiendo de la bacteria. Posteriormente se prepararon tubos Falcon estériles con 6 mL de agua estéril y se etiquetaron con el nombre de cada uno de los aislamientos. Se seleccionó una colonia aislada del cultivo bacteriano con un asa bacteriológica y se depositó en el tubo con agua estéril; los tubos con las muestras se colocaron en el vortex para homogeneizar la suspensión bacteriana y se ajustó su concentración (añadiendo agua o más masa bacteria) en el espectrofotómetro, a una densidad óptica de 0.2 para cada muestra.

Estas suspensiones bacterianas se utilizaron para inocular las plantas de arroz de 30, 45 y 75 días después de la siembra (dds). El método de inoculación fue por medio de corte de la punta de la hoja, utilizando tijeras sumergidas en la suspensión bacteriana y al mismo tiempo se inyectó 1.0 mL de suspensión bacteriana en el tallo de la planta (Fig. 11).

El mismo procedimiento se utilizó para inocular las plantas testigo, sin embargo, para éstas en vez de la suspensión bacteriana, se utilizó agua ultra-pura estéril.

Al término de las inoculaciones las plantas se incubaron a una temperatura de 28°C y humedad relativa de 80%, durante 72 h.

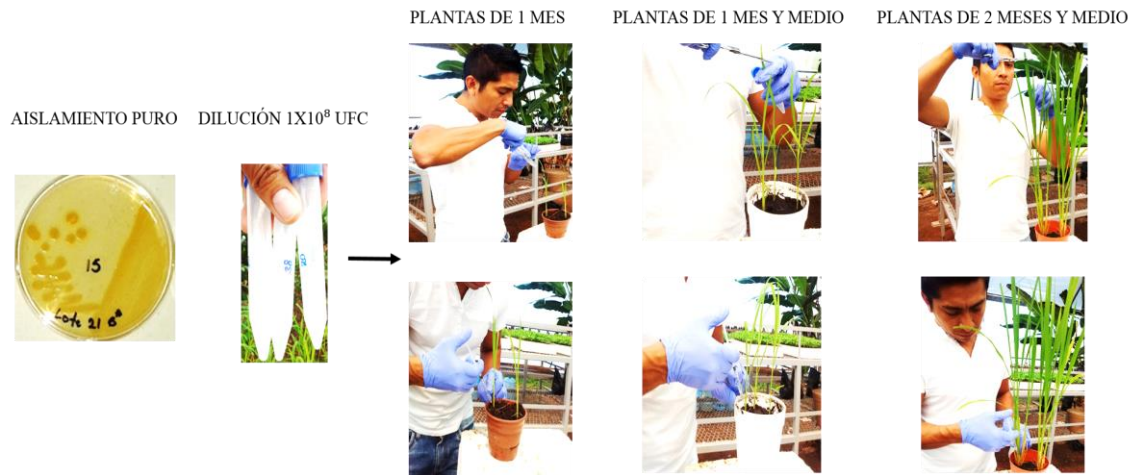


Figura 11. Métodos de inoculación por inyección y corte de la punta de la hoja.

Posterior a la inoculación con las suspensiones bacterianas, las plantas se evaluaron a los 7 y 30 días. En la primera evaluación se realizó una inspección visual, para observar si la planta presentaba marchitamiento, pérdida de vigor, o alguna lesión en la zona donde se realizó el corte y la inyección de la suspensión bacteriana.

Si la planta presentaba alguna lesión, se realizaba la medición de la zona de avance, con la ayuda de una regla y tomando como punto de inicio el sitio donde se realizó el corte (Fig. 12).

Para darle seguimiento a las lesiones, se realizó una segunda evaluación a los 30 días, para determinar su avance o si habían desarrollado otros síntomas. Este procedimiento se realizó con todas las plantas que se inocularon con los aislamientos bacterianos.



Figura 12. Medición de la zona de avance de las lesiones causadas por las bacterias inoculadas en las hojas de arroz de la variedad Aztecas.

3.2 Extracción de DNA de los cultivos bacterianos

Se realizó la extracción de DNA por el método de Doyle y Doyle (1990), modificado en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Con una asa bacteriológica se tomó una porción de las bacterias con crecimiento de 24 a 72 h a 28°C en cajas de Petri con AN, se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, se les agregó 1000 μ L de buffer CTAB [Tris base a 100 mM (JT Baker), EDTA a 20 mM (JT Baker), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) al 2% (JT Baker) y cloruro de sodio al 1.4 M (JT Baker)], se agitó con un vórtex por 10 segundos y se colocaron 1 h en baño maría (Thermo Scientific) a 80 °C con agitación cada 10 min en vórtex (Agitador Genie 2T). , a 4°C. Enseguida se centrifugaron (Thermo Scientific) a 10 000 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y

se colocó en tubos estériles de 1.5 mL, a éstos últimos se les agregó 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (JT Baker). Los tubos se mezclaron por inversión a temperatura ambiente durante 10 min, se centrifugaron a 10, 000 rpm durante 10 min, nuevamente se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos limpios de 1.5 mL, agregando 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se mezclaron inversión por a temperatura ambiente durante 5 min, y se centrifugaron a 10, 000 rpm durante 10 min.

En tubos nuevos de 1.5 mL se adicionaron 600 µL de etanol 100% (JT Baker) frío y se colocaron a -20 °C. De las muestras centrifugadas se recuperó el sobrenadante y se agregó a los tubos que contenían el etanol 100% frío, mezclando por inversión a temperatura ambiente, enseguida se colocaron a -20 °C por lo menos dos horas. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 min, se decantaron y se les adicionaron 500 µL de isopropanol al 70% (JT Baker). Enseguida se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente aproximadamente una hora.

Dependiendo del tamaño de la pastilla, ésta se disolvió adicionando 50-100 µL de H₂O HPLC; en caso de que no se disolviera se colocó durante 3 min en baño maría a 60 °C.

Después de homogenizar la muestra, se tomó 1µL de la parte superior para cuantificar el DNA en suspensión mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Al finalizar las cuantificaciones las muestras de ADN se conservaron a -20 °C, hasta su utilización.

3.2.1 Amplificación por PCR del DNA ribosómico 16S

Se amplificó el gen 16S rDNA por medio de la PCR con los iniciadores universales para

procariotas, 8F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'- GGTTACCTTGTACGACTT-3'), los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 1,500 pares de bases (bp) (Janda and Abbott, 2007).

La mezcla de reacción para PCR se preparó para un volumen final de 15 μ L conteniendo 0.3 unidades de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA), 0.8 mM deoxinucleótido trifosfatos, 20 ng DNA, 20 pmol de cada iniciador y 5X Green Go*Taq*[®] Reaction Buffer (Promega, USA).

Las amplificaciones se realizaron en un Thermal Cycler DNA Engine[®] (BioRad), con un ciclo inicial de pre-desnaturalización a 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de: 2 min para desnaturalización a 95°C, un alineamiento a 59°C por 1 min, y una extensión a 72°C por 1.5 min, y una extensión final a 72°C por 5 min. La verificación de los productos de PCR se realizó por medio de electroforesis horizontal a 110 volts, en gel de agarosa al 1.5% preparado con 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) durante 1.5 h, utilizando el marcador de tamaño molecular de 1kb (Promega, USA). El gel se tiñó con gel red (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX (Vilber Lourmat, Alemania).

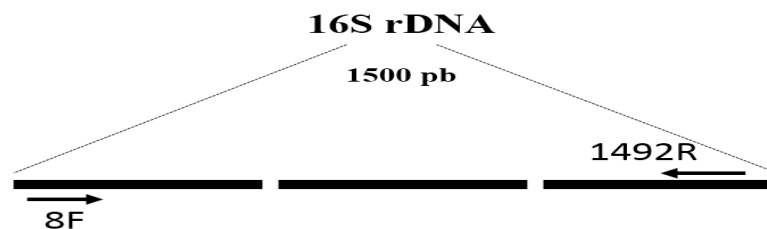


Figura 13. Esquema que muestra los iniciadores 8F y 1492R utilizados para la amplificación del gen 16S rDNA

3.2.2 Secuenciación y análisis de secuencias

Los productos de PCR del 16S rDNA amplificados se limpiaron con la enzima ExoSap-IT (Affimetrix, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente para conocer la secuencia de bases de los productos de PCR, estos se secuenciaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador modelo 3130 Genetic Analyser[®] (Applied Biosystem, USA) del Laboratorio de Biotecnología y Semillas del Colegio de Postgraduados, con los iniciadores internos 514F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT-3'), y el kit de secuenciación Big Dye[®] Terminator V.3.7 Cycle Sequencing kit standard (Applied Biosystem, USA).

La mezcla de secuenciación se preparó a un volumen final de 20 µL, conteniendo 2.5X del Ready Reaction Premix, 5X del Big Dye Sequencing Buffer, 4 pmol de cada iniciador y 40 ng del DNA molde. El PCR se realizó en un Thermal Cycler DNA Engine[®] (BioRad, México), bajo las condiciones de amplificación siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de 10 s para desnaturalización a 96 °C, un alineamiento a 50 °C por 5 s, una extensión a 60 °C por 4 min, y una extensión final a 60 °C por 4 min.

Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3.0 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

4. RESULTADOS

4.1 Aislamientos bacterianos

Los extractos que se obtuvieron de las plantas con síntomas del tizón foliar se sembraron en cajas de Petri con medio AN. Se observó el crecimiento de colonias bacterianas con distinta morfología y coloración, de las cuales se aislaron y purificaron 45 bacterias. Alrededor del 75%, presentaron una coloración de amarillo a amarillo pálido y el 25% restante de los aislamientos tenían una tonalidad entre crema y blanco (Fig.14), revelando 14 morfotipos diferentes (cuadro 6). El morfotipo dominante fue el de colonias circulares, con bordes enteros, de elevación plana, superficie lisa, de aspecto mucoide y de coloración amarillo brillante (Cuadro 6).

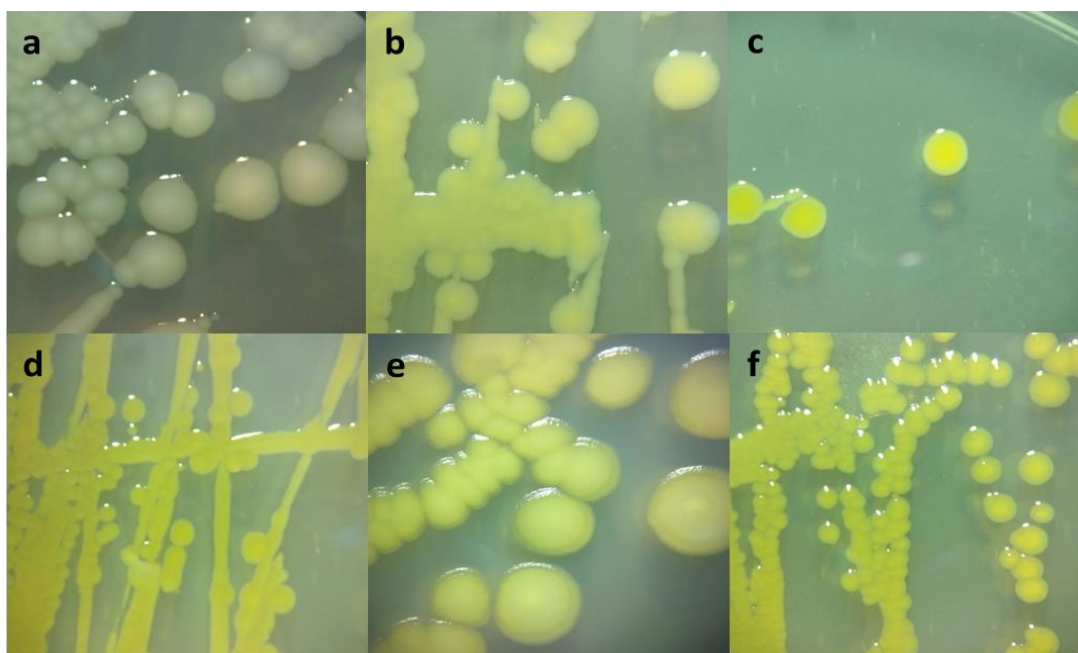


Figura 14. Bacterias aisladas y purificadas de hojas de arroz enfermas. Se ilustran distintas morfologías y coloración de colonias crecidas en medio agar-nutritivo: a) aislamiento L2-17 b) aislamiento L1-27, c) aislamiento L2-5, d) aislamiento L2-6, e) aislamiento L1-48 y f) aislamiento L2-7

Cuadro 6. Características morfológicas de las cepas aisladas de las hojas enfermas de arroz (*Oryza sativa* L.).

Aislamiento	Prueba de Gram	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Luz transmitida	luz reflejada
L1-2	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	crema	opaca	brillante
L1-5	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	crema	opaca	brillante
L1-6	+	circular	Entero	convexa	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L1-9	-	circular	Entero	convexa	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L1-13	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L1-15	-	circular	Irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L1-20	+	circular	Entero	convexa	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L1-21	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	crema	opaca	brillante
L1-22	+	circular	lobulado	plana	lisa	Butirosa	crema	opaca	opaca
L1-25	+	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L1-26	+	circular	lobulado	plana	lisa	Butirosa	crema	opaca	opaca
L1-27	-	circular	Entero	convexa	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L1-28	+	circular	lobulado	convexa	rugosa	Butirosa	crema	opaca	opaca
L1-48	-	circular	Entero	plana	rugosa	Butirosa	amarilla	opaca	opaca
L2-1	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	crema	opaca	brillante

Continuación

Cuadro 6. Características morfológicas de las cepas aisladas de las hojas enfermas de arroz (*Oryza sativa* L.)

Aislamiento	Prueba De Gram	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Luz transmitida	luz reflejada
L2-2	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	amarilla	opaca	brillante
L2-3	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L2-4	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	amarilla	opaca	brillante
L2-5	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L2-6	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L2-7	-	circular	Entero	convexa	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L2-8	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	amarilla	opaca	brillante
L2-9	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L2-10	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	crema	opaca	brillante
L2-11	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L2-12	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	crema	opaca	brillante
L2-13	+	circular	Entero	convexa	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L2-14	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	crema	opaca	brillante
L2-15	+	circular	Entero	convexa	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L2-16	-	circular	Entero	plana	lisa	Cremosa	crema	opaca	brillante

Continuación

Cuadro 6. Características morfológicas de las cepas aisladas de las hojas enfermas de arroz (*Oryza sativa* L.)

Aislamiento	Prueba de Gram	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Luz transmitida	luz reflejada
L2-17	-	circular	Entero	convexa	lisa	Cremosa	crema	opaca	brillante
L19-1	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-2	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-3	-	circular	Entero	convexa	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-4	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-5	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-6	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-7	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-8	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-9	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-10	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-11	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-12	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-13	-	circular	Entero	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante
L19-16	-	circular	irregular	plana	lisa	Mucoide	amarilla	opaca	brillante

Como resultados de las pruebas de Gram se encontró que de los 45 aislamientos 38 bacterias son Gram-negativas (82.6%) y 8 bacterias Gram-positivas (17.4%).

4.1.1 Asepsia y germinación de las semillas de arroz de la variedad Aztecas

Se evaluaron 500 semillas por tratamiento. El porcentaje de semillas contaminadas por hongos en los tratamientos de desinfección evaluados fueron del 8.2% para el tratamiento 1; el tratamiento 2 presentó el 1.2%, el tratamiento 3 el 0%, el tratamiento 4 el 0.66%, y el tratamiento 5 el 0%.

La contaminación por bacterias en las semillas, únicamente se presentó en los tratamientos 1 y 4 con el 0.66% de contaminación en ambos casos.

Como se muestra en el Cuadro 7, el porcentaje de germinación de las semillas fue de entre el 91.3 y 97 % por lo tanto los mejores métodos de asepsia fue el número 3 y 5.

Cuadro 7. Porcentaje de germinación, contaminación por hongos y bacterias en semillas de arroz de la variedad Aztecas, sometidas a diferentes tratamientos de desinfección.

Tratamientos	Germinación (%)	Contaminación por hongos (%)	Contaminación por bacterias (%)
Tratamiento 1	92.2	8.2	0.66
Tratamiento 2	93.4	1.2	0
Tratamiento 3	91.3	0	0
Tratamiento 4	95.3	0.66	0.66
Tratamiento 5	93	0	0

Los dos mejores tratamientos fueron el T3 y el T5, el cual consistió para el tratamiento 3: poner las semillas de la variedad Aztecas, en agua a una temperatura de 37 °C por 20 minutos, 50 minutos a 50 °C y 15 minutos a 28°C. Posteriormente las semillas se transfirieron a un vaso de precipitado estéril con hipoclorito de sodio al 5% 1h, al término de este paso se lavaron con agua destilada estéril 5 veces, durante 5 minutos por cada lavado. Nuevamente las semillas se transfirieron a un vaso de precipitado que contenía alcohol al 95% por 5 minutos en agitación, las semillas se enjuagaron nuevamente con agua destilada estéril 5 veces, durante 5 minutos por cada lavado. Para finalizar las semillas se transfirieron a un vaso de precipitado que contenía el antibiótico Agrimy CU 500 al 0.06% por 15 minutos en agitación. Se enjuagaron con agua

destilada estéril 5 veces, durante 5 minutos por cada lavado y se dejaron secar dentro de la campana de flujo laminar para su germinación.

Para el tratamiento 5 las semillas de la variedad Aztecas igual se pusieron en agua a una temperatura de 37 °C por 20 minutos, 1h a 55 °C y 20 minutos a 28°C. Posteriormente las semillas se transfirieron a un vaso de precipitado estéril con hipoclorito de sodio al 5% y Tween 20 al 2% durante 1h, enseguida se lavaron con agua destilada estéril 5 veces, durante 5 minutos por cada lavado. Las semillas se transfirieron a un vaso de precipitado que contenía el antibiótico Agrimy CU 500 al 0.06% y el fungicida Previcur por 30 minutos en agitación. Las semillas se enjuagaron nuevamente con agua destilada estéril 5 veces, durante 5 minutos por cada lavado, posteriormente las semillas se dejaron secar dentro de la campana de flujo laminar para su germinación.



Figura 15. Plántulas de arroz de la variedad Aztecas, de 20 días de crecimiento mantenidas en invernadero.

El desarrollo y crecimiento de las plantas de arroz de la variedad Aztecas se realizó de manera normal hasta los 30 días de crecimiento (Fig. 15), sin embargo, al llegar a los 45 días todas las plantas comenzaron a enfermarse. Las hojas se pusieron de color amarillo pálido, posteriormente se tornaron de color marrón con lesiones longitudinales que iniciaban del ápice hacia la base de la hoja, cubriendo toda la lámina foliar y finalmente las hojas terminaban por secarse (Fig.16).

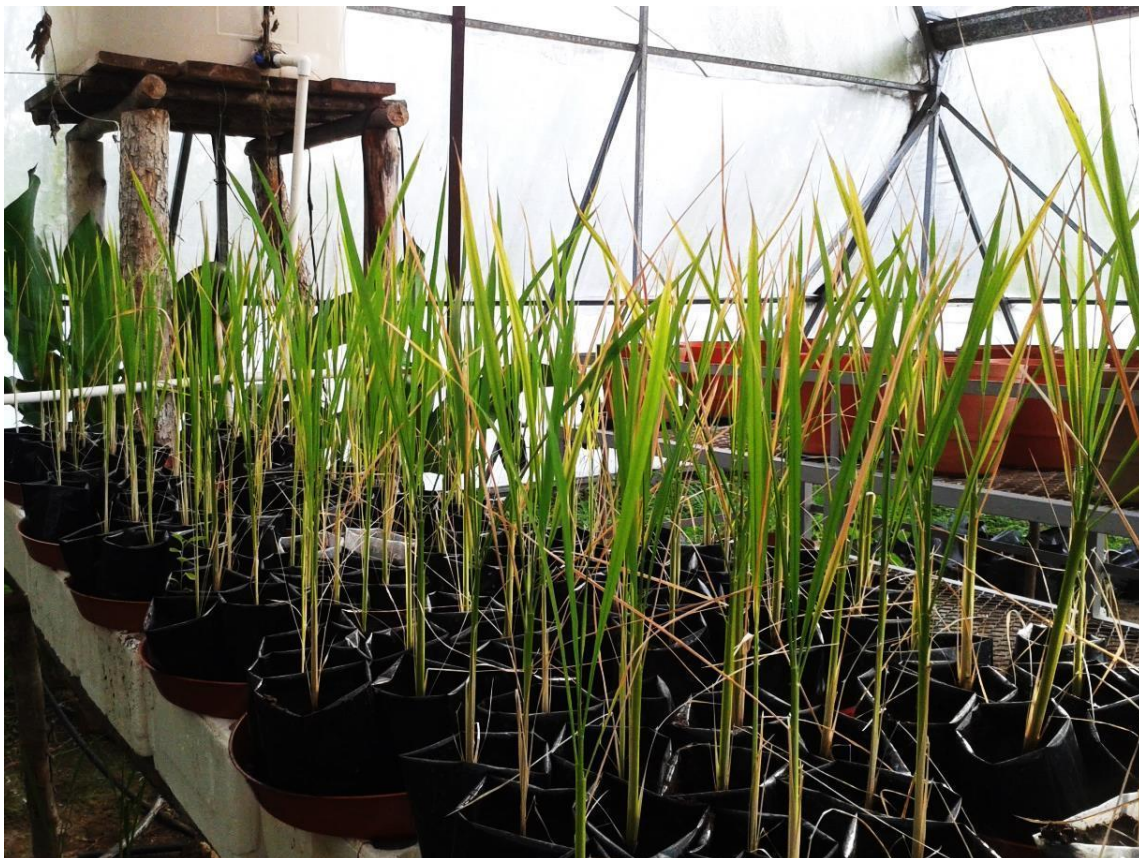


Figura 16. Plantas de arroz de la variedad Aztecas con presencia de tizón después de 45 días de crecimiento, mantenidas en invernadero.

Los síntomas se presentaron en todas las plantas provenientes de las semillas, sin importar el tratamiento utilizado para su desinfección.

4.1.2 Pruebas de Patogenicidad

Las pruebas preliminares de patogenicidad resultaron positivas para los aislamientos L1-1, L1-2, L1-3, L1-4, L1-12, L1-14, L1-19, L1-27, L1-43, L1-48, L1-50, L2-5, L2-6, L2-7, L2-14, L2-15, L2-16, L2-17, L19-7, L19-8 Y L19-16.

De acuerdo a los síntomas presentados en los ensayos de patogenicidad, los aislamientos se dividieron en dos grupos.

Síntomas de desarrollo rápido al inicio: Las plantas inoculadas con los aislamientos L1-2, L1-3, L19-7, L19-8, L19-16, L1-27 presentaron pérdida de turgencia, marchitamiento, lesiones longitudinales a lo largo de las hojas y secamiento con avance descendente muy rápido en la parte aérea de la planta, al tercer día de la inoculación, sin embargo, parte del tallo y de la vaina de la hoja aún tenían partes verdes (Fig. 17); el aislamiento L1-48 afecto por completo a la planta causando secamiento en toda la planta al tercer día de la inoculación. Ninguna de las plantas que presentaron sintomatología se recuperó debido a los daños ocasionados. En este grupo de plantas el avance de los síntomas fue de 9.73 cm (Cuadro 8) al tercer día después de la inoculación (DDI) y no presentó ningún avance a los 30 (DDI).

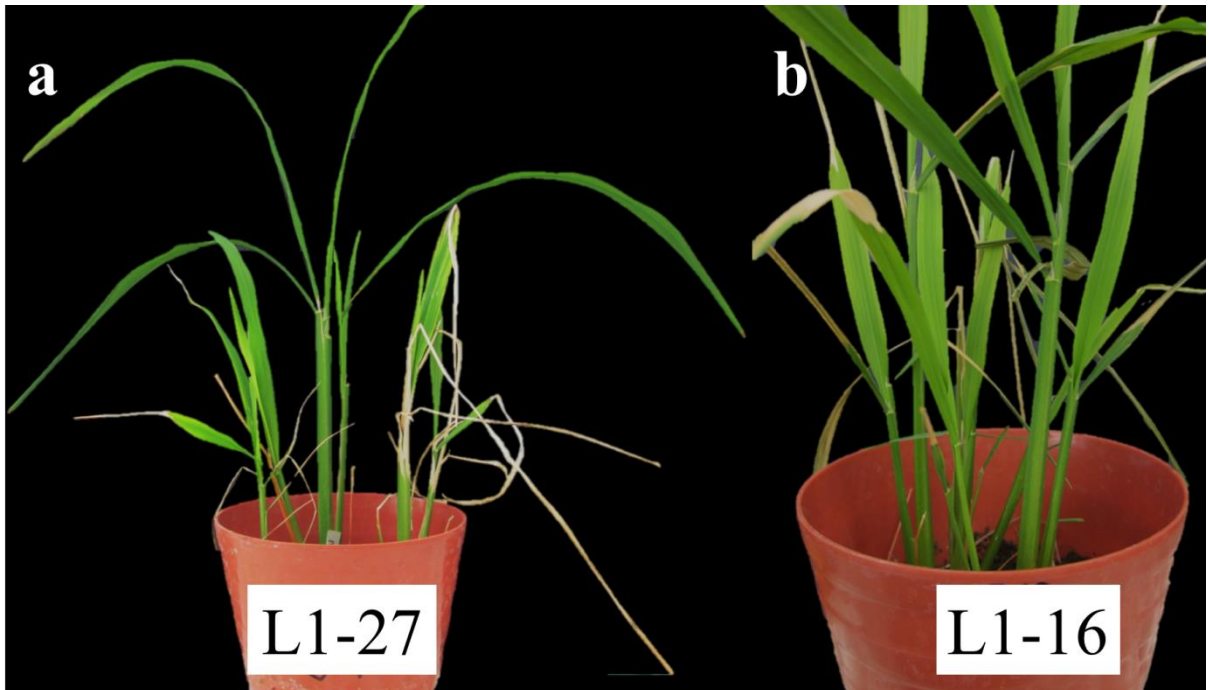


Figura 17. Plantas de arroz de la variedad Aztecas a los 75 días después de la siembra, a) Planta inoculada con el aislamiento L1-27, con desarrollo rápido de síntomas, b) Planta inoculada con el aislamiento L1-16, que presentó avance lento de síntomas.

Cuadro 8. Promedios de la zona de avance de la enfermedad en las hojas, a los 7 y 30 días después de la inoculación.

Aislamiento bacteriano	Zona de Avance en cm	
	7 días	30 días
L1-2	8.8 cm	8.8 cm
L19-7	8.9 cm	8.9 cm
L19-8	9.2 cm	9.2 cm
L19-16	7.7 cm	7.7 cm
L1-27	12 cm	12 cm
L1-48	planta seca	Planta seca
L2-5	4.7 cm	37.5 cm
L2-6	4.4 cm	33.7 cm
L2-7	3.8 cm	31 cm
L2-14	3.1 cm	35.8 cm
L2-15	3.5 cm	38.6 cm
L2-16	5.1 cm	40.4 cm
L2-17	4.1 cm	41.1 cm

Síntomas de desarrollo lento al inicio: Por el contrario las plantas que se inocularon con los aislamientos L1-1, L1-4, L1-12, L1-14, L1-19, L1-43, L1-50, L2-5, L2-6, L2-7, L2-14, L2-15, L2-16 y L2-17, se pusieron de color amarillo y cloróticas, posteriormente se tornaron de color marrón con lesiones longitudinales a lo largo de las hojas, extendiéndose hacia los bordes y finalmente las hojas se comenzaron a secar de la punta hacia la base de la hoja de forma gradual

hasta que la hoja se secó (Fig.18). En este grupo de plantas el avance de los síntomas fue de 3.95 cm (Cuadro 8) al tercer día después de la inoculación (DDI) y 36.87 cm de avance a los 30 (DDI).

Es decir se presentaron dos grupos de bacterias que ocasionaron dos tipos de síntomas, las que causaron síntomas con un avance más rápido al tercer día y después el avance del síntoma se detuvo y el otro grupo con un desarrollo de síntomas más lento al tercer día, pero con síntomas mayores a los 30 ddi.

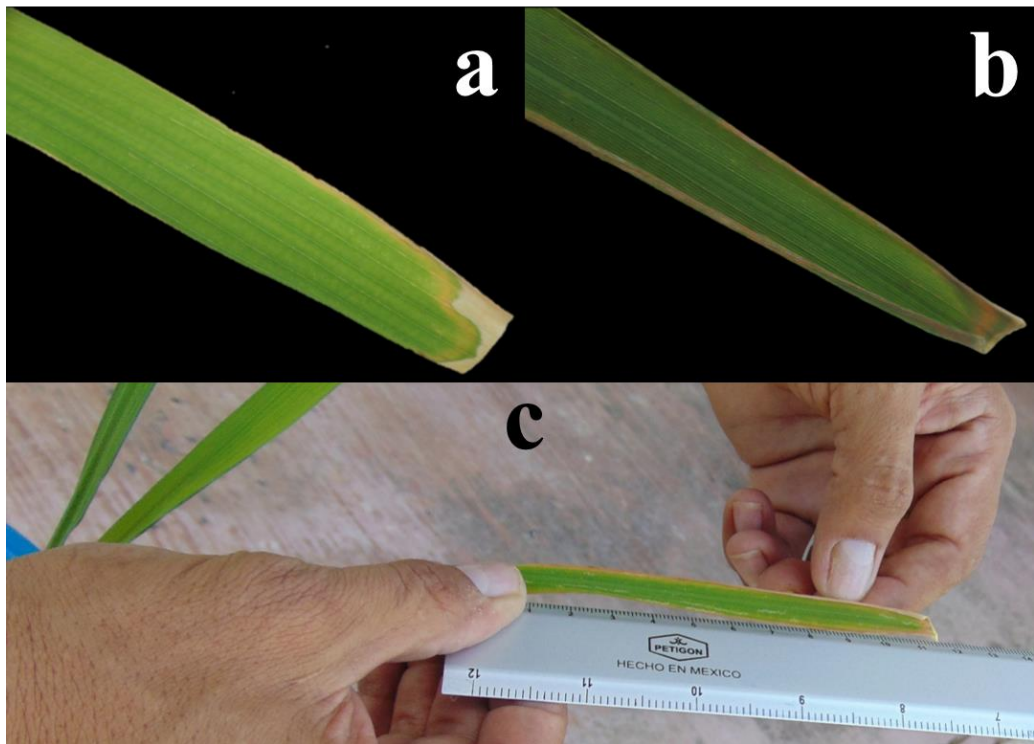


Figura 18. Hojas de arroz de la variedad Aztecas con síntomas de tizón a) hoja inoculada con el aislamiento L2-7, b) hoja inoculada con el aislamiento L2-16, c) medición de la zona de avance de los síntomas en hojas de arroz.

De los 21 aislamientos positivos en las pruebas de patogenicidad, solo se presentaron síntomas en plantas de 75 dds. Las plantas inoculadas a la edad de 15 y 30, no presentaron sintomatología alguna, con ninguno de los dos métodos de inoculación utilizados.

El experimento se repitió en 3 ocasiones más, sin embargo las plantas mostraron síntomas antes de la inoculación, por lo que los experimentos se desecharon.

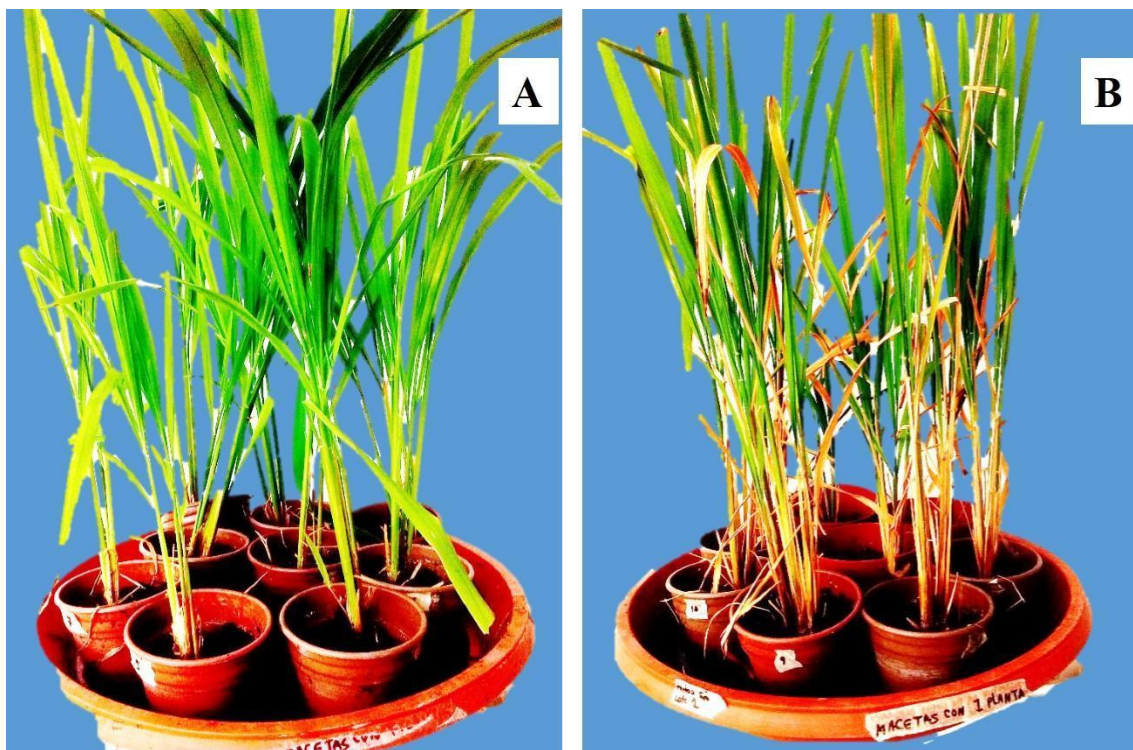


Figura 19. Plantas de arroz de la variedad Aztecas de 75 dds. (A) plantas testigo, inoculadas únicamente con agua, (B) plantas inoculadas con las cepas bacterianas aisladas.

4.1.3 Extracción de DNA

Para la identificación molecular, se realizó la extracción de DNA genómico de las 46 bacterias, aisladas a partir de los extractos de las hoja de arroz con síntomas de tizón foliar. Todas las muestras de DNA que se cuantificaron por espectrofotometría, tuvieron una concentración que osciló de 400 ng/uL a 800 ng/uL; las relaciones $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ estuvieron entre 2.0 y 2.30, los valores de estas relaciones son importantes para determinar la pureza del DNA para la secuenciación. A manera de ejemplo se presentan los valores de algunas muestras en el cuadro 9.

Cuadro 9. Cuantificación de DNA total por espectrofotometría.

N° de muestra	Concentración ng/μL	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
2	783.2	2.08	2.30
5	789.3	2.05	2.30
6	464.3	2.10	2.30
9	647.2	2.07	2.29
15	722.5	2.02	2.29
20	711.7	2.11	2.27
27	663.5	2.02	2.27
28	499.9	2.11	2.38
30	823.0	2.09	2.32

4.1.4 Amplificación por PCR del gen 16S rDNA

Después de la extracción y cuantificación del DNA total, se procedió a la amplificación del gen 16S rDNA.

La Fig. 20, se presenta como ejemplo, un gel de agarosa con el producto del PCR de la amplificación del gen 16S rDNA; en todos los carriles hay una banda, a la altura de la banda de con un peso molecular de 1,500 bp, con el uso del marcador Promega. Estas bandas corresponden al tamaño del producto de amplificación esperado para los 16S rDNA bacterianos.

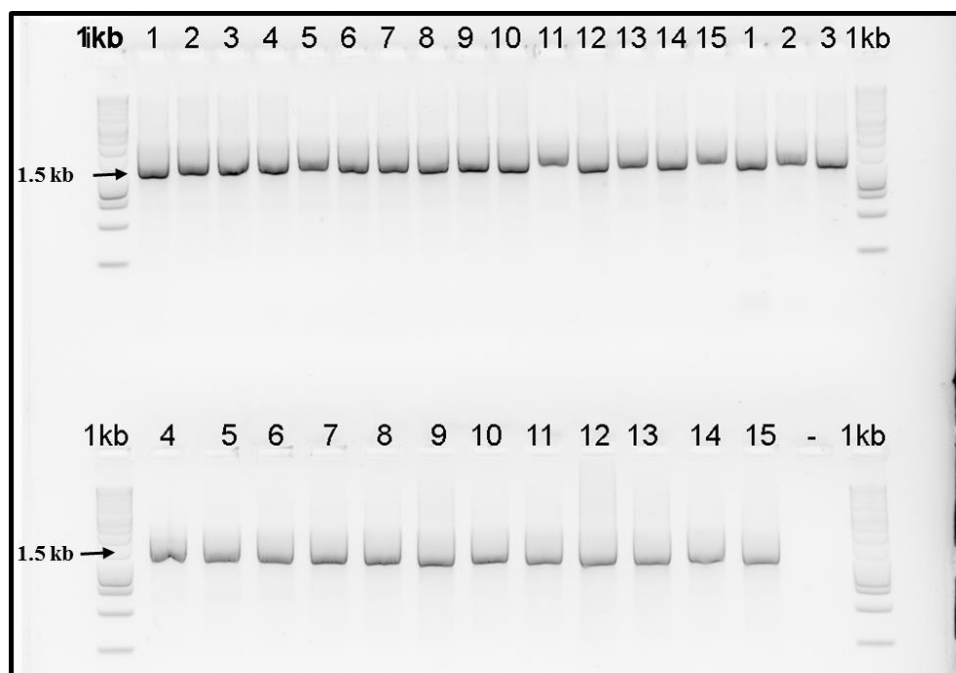


Figura 20. Gel de agarosa con el producto del PCR de la amplificación del gen 16S rDNA, de bacterias aisladas de hojas de arroz con síntomas tizón.

4.1.5 Secuenciación e identificación de los aislamientos bacterianos

Los productos de PCR del gen 16S rDNA se secuenciaron para conocer la identidad de los aislamientos (Fig.20).

Como se muestra en el Cuadro 10, los productos de PCR secuenciados corresponden a 21 diferentes especies y 9 géneros que incluyen a *Pseudomonas* como el género más abundante con 28.8%, dentro los cuales se encuentran las especies de *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. parafulva*, *P. putida*, *P. taiwanensis* y *Pseudomonas* sp. En segundo término el género *Pantoea* con 26.6% de abundancia, que incluyen a las especies *P. ananatis*, *P. dispersa* y *Pantoea* sp.; mientras que el género *Enterobacter* con el 15.5%, incluye a las especies *E. cancerogenus* y *Enterobacter* sp. Finalmente el género *Bacillus*, con 11.1%, con especies como *B. megaterium*, *B. pumilus* y *Bacillus* sp. y el género *Leclercia*, con el 6.6% con una única especie. Otras bacterias presentes fueron *Exiguobacterium acetylicum*, *E. indicum*, *Escherichia hermanni*, *Microbacterium* sp. y *Serratia nematodiphila*, conformando el 8.8% restante.

Cuadro 10. Bacterias asociadas a hojas de arroz con síntomas de tizón, identificadas por secuenciación del 16S rDNA.

Aislamiento	Descripción	Total de bases comparadas	% de cobertura	Máxima identidad %
L1-6	<i>Bacillus megaterium</i>	1398	100	100
L1-20	<i>Bacillus megaterium</i>	646	100	100
L1-28	<i>Bacillus pumilus</i>	1292	100	100
L1-22	<i>Bacillus</i> sp.	1422	100	100
L1-26	<i>Bacillus</i> sp.	1418	100	100
L2-12	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1401	100	100
L1-2	<i>Enterobacter</i> sp.	1359	100	100
L1-5	<i>Enterobacter</i> sp.	1271	100	100
L2-1	<i>Enterobacter</i> sp.	1393	100	100
L2-10	<i>Enterobacter</i> sp.	1387	100	100
L2-14	<i>Enterobacter</i> sp.	1364	100	100
L2-16	<i>Enterobacter</i> sp.	1365	100	100
L1-13	<i>Escherichia hermannii</i>	1048	100	99
L2-13	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	1470	100	100
L2-15	<i>Exiguobacterium indicum</i>	1379	100	100
L2-2	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1438	100	100
L2-4	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1436	100	100
L2-8	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1414	100	100
L1-25	<i>Microbacterium</i> sp.	1306	100	100
L1-9	<i>Pantoea ananatis</i>	1498	100	100
L2-7	<i>Pantoea ananatis</i>	1302	100	100
L1-27	<i>Pantoea dispersa</i>	1392	100	100

Continuación

Cuadro 10. Bacterias asociadas a hojas de arroz con síntomas de tizón, identificadas por secuenciación del 16S rDNA.

L19-3	<i>Pantoea dispersa</i>	1427	100	100
L2-5	<i>Pantoea</i> sp.	1110	100	100
L2-3	<i>Pantoea</i> sp.	1110	100	100
L2-6	<i>Pantoea</i> sp.	1245	100	100
L2-9	<i>Pantoea</i> sp.	1389	100	100
L19-6	<i>Pantoea</i> sp.	1372	100	100
L19-9	<i>Pantoea</i> sp.	1457	100	100
L19-12	<i>Pantoea</i> sp.	1462	100	100
L19-13	<i>Pantoea</i> sp.	1432	100	100
L19-11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1396	100	100
L1-15	<i>Pseudomonas fulva</i>	1431	100	100
L19-2	<i>Pseudomonas fulva</i>	1431	100	100
L1-48	<i>Flavidomonas horyzihabitans</i>	1340	100	100
L19-7	<i>Pseudomonas parafulva</i>	1390	100	100
L19-1	<i>Pseudomonas parafulva</i>	1397	100	100
L19-5	<i>Pseudomonas parafulva</i>	1401	100	100
L19-16	<i>Pseudomonas parafulva</i>	1364	100	100
L1-21	<i>Pseudomonas putida</i>	1376	100	100
L19-4	<i>Pseudomonas putida</i>	1487	100	100
L2-11	<i>Pseudomonas</i> sp	1527	100	100
L19-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	1451	100	100
L19-8	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	1489	100	100
L2-17	<i>Serratia nematodiphila</i>	1385	100	100

De acuerdo con las tinciones de Gram de los 45 aislamientos, 37 bacterias fueron Gram-negativas (82.6%) y 8 bacterias Gram-positivas (17.4%) ver cuadro 11. Con la identidad de las secuencias, se puede concluir que el 50% de las bacterias Gram-negativas están representadas por el grupo de las *Enterobacteriaceae* y el otro 50% por el grupo de las *Pseudomonadaceae*.

Cuadro 11. Bacterias Gram-negativas aisladas de hojas de arroz con síntomas de tizón, del municipio de Escárcega Campeche.

Identificación	Frecuencia	Familia
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	
<i>Enterobacter</i> sp.	6	
<i>Escherichia hermannii</i>	1	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	3	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Pantoea ananatis</i>	2	
<i>Pantoea dispersa</i>	2	
<i>Pantoea</i> sp.	8	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	
<i>Pseudomonas fulva</i>	2	
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1	
<i>Pseudomonas parafulva</i>	4	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	2	
<i>Pseudomonas</i> sp.	2	
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	1	
<i>Serratia nematodiphila</i>	1	

Por otra parte, el 87.5% de las bacterias Gram-positivas están representadas por el grupo de las *Bacillaceae* y el 12.5% restante por el grupo de las *Microbacteriaceae* (cuadro 12).

Cuadro 12. Bacterias Gram-positivas aisladas de hojas de arroz con síntomas de tizón, del municipio de Escárcega Campeche.

Identificación	Frecuencia	Familia
<i>Bacillus megaterium</i>	2	<i>Bacillaceae</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	1	
<i>Bacillus</i> sp.	2	
<i>Exiguobacterium</i>	1	
<i>acetylicum</i>	1	
<i>Exiguobacterium indicum</i>	1	<i>Microbacteriaceae</i>
<i>Microbacterium</i> sp.	1	

Por lo tanto existen diferencias entre las poblaciones bacterianas cultivables asociadas a la hoja de arroz con síntomas de tizón, en los tres lotes (L1, L2 y L19), sin embargo, la presencia de poblaciones comunes entre las muestras sugiere que dentro de las bacterias en común, podrían encontrarse las patogénicas (Cuadro 10).

Las especies *Bacillus megaterium*, *B. pumilus*, *Bacillus* sp., *Escherichia hermanni* y *Microbacterium* sp. únicamente estuvieron presentes en el lote 1; mientras que *Enterobacter cancerogenus*, *Exiguobacterium acetylicum*, *E. indicum* y *Leclercia adecarboxylata* se presentaron exclusivamente en el lote 2; *Serratia nematodiphila* sólo se presentó en el lote 3. Por último, las diferentes especies de *Pantoea* y *Pseudomonas* estuvieron

presentes en los tres lotes. Siendo estos dos últimos géneros los que se aislaron con mayor frecuencia de las hojas de arroz con síntomas de tizón (Cuadro 13).

Cuadro 13. Poblaciones bacterianas comunes encontradas en los diferentes lotes muestreados en el Municipio de Escárcega, Campeche.

Lote 1	Lote 2	Lote 19
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Pantoea dispersa</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Pantoea sp.</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Pantoea sp.</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Pantoea sp.</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Pantoea sp.</i>
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Exiguobacterium indicum</i>	<i>Pseudomonas fulva</i>
<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i>
<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i>
<i>Pantoea ananatis</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i>
<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Pantoea ananatis</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i>
<i>Pseudomonas fulva</i>	<i>Pantoea sp.</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Flavidomonas horyzihabitans</i>	<i>Pantoea sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pantoea sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>Pantoea sp.</i>	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>
		<i>Serratia nematodiphila</i>

5. DISCUSIÓN

La composición de la diversidad bacteriana asociada a las hojas de arroz de la variedad Aztecas, colectada en los campos de la empresa arrocera Tolloacan, ubicada en el municipio de Escárcega Campeche, se evaluó mediante la caracterización morfológica de las bacterias y mediante su identificación a nivel molecular.

Es importante mencionar que aunque sólo se evaluó una variedad de arroz, la investigación, dejó al descubierto una alta diversidad de bacterias asociadas a sus hojas.

La caracterización morfológica reveló 14 morfotipos diferentes, basados principalmente en las diferencias de la morfología, la coloración y la apariencia de las colonias (Cuadro 6, Fig.14).

Cottyn et al., (2009), evaluaron por clasificación fenotípica y análisis genómico del DNA, la microbiota asociada a las semillas de arroz, basándose principalmente en las características celulares de las bacterias, la composición de sus ácidos grasos y la apariencia de las colonias de 498 aislamientos, identificando 101 grupos de morfotipos en un solo genotipo de arroz.

A pesar de que en nuestra investigación no se realizó el perfil de ácidos grasos de las células en el análisis de la diversidad bacteriana, en estudios anteriores Cottyn et al., (2001), reportaron que el análisis de ácidos grasos no proporcionó en todos los casos una distinción clara entre especies de *Gammaproteobacterias*. Además hubo morfotipos que presentaron colonias muy similares y que solo mostraron ser distintos en el análisis molecular Cottyn et al. (2009).

Nuestros resultados concuerdan con lo publicado por Cottyn et al. (2009), ya que algunas colonias de *Pantoea* sp. y *Pantoea ananatis* perteneciente a *Gammaproteobacterias* presentaron

morfología, coloración y consistencia similar, por lo que la secuenciación del 16S rDNA fue esencial para dilucidar entre estos dos aislamientos.

En nuestro estudio también encontramos que las especies de los géneros, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* perteneciente a las *Gammaproteobacterias*, son la población bacteriana más abundantemente, con una proporción del 82,6% de la comunidad bacteriana asociada a las hojas (Cuadro 10).

La presencia de estas bacterias en las hojas del arroz de la presente investigación, coincide con los resultados de un estudio reportado por Ferrando et al. (2012), quien mediante un análisis de la diversidad dependiente del cultivo, encontró que los miembros de del grupo *Gammaproteobacteria Pantoea* spp. y *Pseudomonas* spp., constituyeron el 51% de las comunidades bacterianas endofíticas de las hojas de tres variedades de arroz. En nuestro estudio estos dos géneros constituyeron el 55.4% de la comunidad bacteriana aisladas de las plantas de la variedad Aztecas.

De igual forma concuerda con los resultados de los estudios reportados por Ren et al. (2015) sobre las comunidades bacterianas del suelo, la endosfera de las hojas y de la filosfera, en un cultivo de arroz, en donde el 95.5% de la comunidad bacteriana asociada a las hojas de arroz, son poblaciones del grupo *Gammaproteobacterias*.

Por lo tanto observamos que estos microorganismos pueden formar comunidades o microbiomas que se conserva no sólo en las diferentes especies de plantas donde las semillas podrían ser un medio de transmisión como endófitos, si no que su capacidad de colonización les permite permanecer en diferentes ambientes, ya sea como plantas cultivadas en suelos utilizados

para la fitoremediación (Compant *et al.*, 2005), las plantas de arroz cultivadas en suelos con pH neutro o con altos contenidos de K que son ampliamente colonizadas por bacterias del género *Pseudomonas* y *Rhizobium*; mientras que las plantas cultivadas en suelo ácidos, favorecen el crecimiento de bacterias del género *Enterobacter* (Hardoim *et al.*, 2012).

Correlacionando lo anterior con el presente estudio, las *Enterobacteriaceae*: *Pantoea ananatis*, *P. dispersa* y *Pantoea* sp., así como algunas *Pseudomonadaceae* como *P. fluorescens*, *P. putida*, y *P. taiwanensis*, además de otras como *P. fulva* y *P. parafulva* (Cottyn *et al.*, 2001) se encontraron en los tres lotes de la variedad Aztecas utilizados para este estudio (Cuadro 13). Por lo que al parecer estas poblaciones bacterianas, podrían estar comúnmente asociadas a las hojas de arroz o en general al cultivo de arroz. Estas mismas poblaciones de *Gammaproteobacterias*, también han sido recuperadas como endófitas o epífitas de semillas y raíces (Elbeltagy *et al.*, 2000; Hardoim *et al.*, Mano y Morisaki, Mano *et al.*, 2006, 2007, Xiong *et al.* 2014).

Los resultados del presente estudio contrastan con los realizados por Knore *et al.* (2012) y Vorholt (2012), quienes encontraron que las *Alphaproteobacterias* predominaron con el 70% de toda la comunidad bacteriana de las hojas de arroz. Finkel *et al.* (2011) sugiere que esta discrepancia puede deberse a diferencias en el contexto ambiental en el que se cultivaron las plantas de arroz, así como las características geográficas y climáticas.

Por su parte las bacterias Gram positivas representaron el 17.4 % del número total de aislamientos de las plantas de arroz con síntomas de tizón, de los cuales el 87.5% de las bacterias Gram-positivas estuvieron representadas por el grupo de las *Bacillaceae* que incluyen *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus* sp., el 12.5% restante por el grupo de las

Microbacteriaceas que incluye a *Exiguobacterium acetilum*, *Exiguobacterium indicum* y a *Microbacterium* sp (cuadro 12).

B. megaterium, *B. pumilus* fueron las bacterias formadoras de esporas predominantes en este trabajo, estas especies han sido reportadas como endófitos del arroz (Mukhopadhyay et al., 1996; Stoltzfus et al., 1997; Mano and Morisaki 2008). *Bacillus pumilus* y *B. subtilis* se han encontrado comúnmente en muestras de semillas de arroz, provenientes de ambientes en condiciones de inundación (Cottyn et al, 2001).

Otro género asociado al cultivo de arroz y que se identificó en las muestras es *Microbacterium* sp., se ha reportado en la filósfera de la remolacha azucarera, el trigo y como endófito en el algodón (Thompson *et al.*, 1993; Legard *et al.*, 1994; McInroy y Kloepper, 1995); además se encuentra en diversos ambientes, incluyendo suelo, insectos, mar, muestras clínicas humanas, productos lácteos y composta (Cottyn *et al.*, 2009; Anand *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013).

Cottyn et al. (2009) menciona que la elección del método de inoculación puede influir en la expresión de la patogenicidad de los aislamientos, o que pueden mostrar solamente el potencial de la enfermedad cuando están presentes en una alta concentración de inóculo. También indica que el método de inyección de plantas con suspensión bacteriana es rápido y agresivo al mismo tiempo. Por lo tanto, se podría argumentar que la inyección de plantas cultivadas en el invernadero, no siempre es un buen indicador del potencial patogénica de una cepa debido a que las reacciones de las plantas pueden no ser similares a las encontradas en el campo.

Por otra parte se sabe que las bacterias son capaces de causar un incremento en la

densidad de su población y pueden responder con una coordinada regulación de la expresión de cierto juego de genes en la población total bacteriana. Este modo específico de regulación es conocido como Quorum Sensing (QS), es un tipo especial de regulación de la expresión genética en bacterias, usualmente activo en condiciones de una alta densidad poblacional de células bacterianas (Yu et al., 2014). Este sistema está involucrado en la interacción de bacterias con organismos superiores (animales y plantas), en la regulación de la virulencia bacteriana, la regulación de la expresión de genes asociados con la síntesis de varias exoenzimas, toxinas, antibióticos, etc., así como en el control de la formación de biofilm. De tal manera que los procesos de infección ocurren cuando la población de bacterias patogénicas es suficientemente grande. En este caso, el incremento en la concentración de moléculas de señalización como la *N*-acil-homoserina lactona que permite sincronizar el incremento de la síntesis de factores de virulencia, que causan la enfermedad en las plantas.

En nuestra investigación utilizamos el método de inoculación por inyección de la suspensión bacteriana y por corte de la punta, para potenciar la expresión de la patogenicidad del inóculo, sin embargo, cuando repetimos los experimentos, las plantas enfermaron antes de la inoculación, por lo que la semilla estaba contaminada o de alguna otra forma se infectaron.

Los ensayos para determinar la patogenicidad de los aislamientos se realizaron previo a la identificación de los aislamientos bacterianos, por lo que al desconocer su identidad no se podían relacionar a los géneros o especies que se sabe que son patógenos de arroz y seleccionarlos para iniciar con estos las inoculaciones de las plantas.

Mediante la secuenciación se identificaron las bacterias, que causaron síntomas en las

plantas inoculadas artificialmente, representaron el 22% de los aislamientos totales y de este el 99% está representado por *Gammaproteobacterias*. Lo interesante fue que los síntomas presentes en las plantas inoculadas, dividió en dos grupos a las bacterias, el grupo 1 que tuvo un modo acción lento en el avance de los síntomas, estuvo conformado por *Enterobacter* sp., *Exiguobacterium indicum*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea* sp. y *Serratia nematodiphila*.. Las hojas de las plantas que se inocularon con estas cepas se comenzaron a poner de color amarillo y cloróticas, posteriormente la parte donde se realizó el corte se tornó de color marrón con un borde amarillo, conforme pasaban los días, aparecieron lesiones longitudinales a lo largo de las hojas, que se fueron extendiendo del borde hacia al centro de la hoja y finalmente a los 30 días posteriores a la inoculación se comenzaron a secar de la punta hacia la base de la hoja de forma gradual hasta que la hoja terminó por secarse.

En contraste, el grupo 2 que tuvo un modo de acción rápido estaba conformado por *Enterobacter* sp., *Pantoea dispersa*, *Flavimonas oryzihabitans*, *P. parafulva*, y *P. taiwanensis* (Cuadro 11). Las plantas inoculadas con estas cepas presentaron pérdida de turgencia, marchitamiento, lesiones longitudinales a lo largo de las hojas y secamiento con avance descendente muy rápido en la parte aérea de la planta, de hecho fue tan rápido que los signos aparecieron al tercer día de la inoculación, sin embargo, algunas parte del tallo y de las vainas de la hojas aún tenían partes verdes (Fig. 17). El aislamiento L1-48 (*Flavidomonas horyzihabitans*), causó muerte por secamiento de la planta al tercer día de la inoculación.

A pesar de que estas cepas tuvieron un modo de acción muy rápido, algo interesante es que la sintomatología no continuó desarrollándose en las hojas de las plantas, es decir el

marchitamiento o secamiento se detuvo y no siguió avanzando en el resto de la hoja o a otras partes de la planta.

Cabe mencionar que este grupo de bacterias con efecto rápido en las plantas fueron las únicas que afectaron partes de los tallos de las plantas de arroz y no así las bacterias que tuvieron una acción lenta.

Por lo que posiblemente se trate de un complejo de bacterias que pueden causar el tizón de manera aislada o en conjunto.

Los aislamientos positivos en las pruebas de patogenicidad, solo desarrollaron sintomatología en plantas de 75 después de la siembra (dds). Las plantas de 15 y 30 días de edad, no presentaron sintomatología alguna, con ninguno de los dos métodos de inoculación utilizados. Por lo que la planta cuenta con mecanismos de defensa en las primeras etapas de su desarrollo.

Por lo tanto existe discrepancia entre algunos de nuestros resultados de las pruebas de patogenicidad, con la de otros autores como Cottyn *et al.* (2001 y 2009) que utilizaron aislamientos bacterianos de *Burkholderia glumae*, *B. gladioli* y *Acidovorax avenae* para sus pruebas de patogenicidad en semillas y plantas de arroz, con la finalidad de corroborar que estas bacterias son patógenos prevalentes del cultivo de arroz en ambientes de riego tropical y riego de secano en Filipinas, se sabe que estas bacterias no causan tizón de la hoja, sino tizón bacterial de la panícula (*B. glumae* y *B. gladioli*) y pudrición de plántulas (*Burkholderia glumae*), raya roja (*Acidovorax avenae*). Sin embargo, también hubo coincidencia con nuestros resultados, ya que reportaron que algunas de las cepas del género *Pantoea* sp. y *Pseudomonas* sp. mostraron patogenicidad bajo ciertas condiciones. En estudios más recientes realizados por Kini *et al.*

(2011, 2016 y 2017) reportan el nuevo tizón bacteriano de la hoja en arroz causado por *Pantoea ananatis* y a *P. stewartii* en Togo, Benin y la India, lo cual coincide con nuestro estudio donde se encontraron varias cepas de *P. ananatis* y aunque no se encontró *P. stewartii*, si se encontraron varias cepas de *Pantoea* sp., donde debido a la secuencia no fue posible llegar a identificar la especie.

En estudios han reportado la presencia de *Enterobacter* sp. como patógeno en la pudrición de bulbos de cebolla (Ann *et al.*, 2016), así como el marchitamiento de hojas en morera (Zhu *et al.*, 2010). No se ha encontrado reportada como patógeno de plantas de arroz.

En nuestros estudios las especies de *Bacillus megaterium* y *B. pumilus* no presentaron algún tipo de patogenicidad, en las plantas de arroz inoculadas bajo las condiciones en las que se realizaron las pruebas, no obstante *B. pumilus* han sido reportados con baja patogenicidad en arroz (Cottyn *et al.* 2009), como patógeno del jengibre causando pudrición (Pen *et al.*, 2013) y *B. megaterium* causando manchas en las hojas de albahaca japonesa (Chen *et al.*, 2016).

Además, varios miembros, tales como *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp. *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas campestris* en la filósfera (Lindow y Brandl 2003; Rasche *et al.*, 2006) o endósfera de plantas (Kim *et al.*, 2012; Madhaiyan *et al.*, 2013; Taghavi *et al.* 2009, Witzel *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012) han sido reportados como capaces de promover el crecimiento de plantas, así como de suprimir la colonización e infección de tejidos por patógenos de plantas.

6. CONCLUSIONES

En conclusión, la caracterización morfológica y la identificación de bacterias mediante la secuenciación parcial del gen 16S rDNA ponen de manifiesto la existencia una alta diversidad morfológica entre las bacterias presentes en la variedad de arroz Aztecas (*Oryza sativa* L).

El análisis de las secuencias del gen 16S rDNA mostró, que existen dos familias bacterianas dominantes, las *Enterobactereaceas* conformado por el género *Pantoea* que incluyen a las especies *Pantoea ananatis*, *P. dispersa*, y *Pantoea* sp. y las *Pseudomonadaceaes*, con el género *Pseudomonas* que incluye a las especies *Pseudomonas fluorescens*, *P. fulva*, *P. parafulva*, *P. putida*, *Pseudomonas* sp. y *P. taiwanensis*, por lo que estas bacterias podrían constituir poblaciones bacterianas asociadas y bien adaptadas al cultivo de arroz.

El 22% de los aislamientos totales presentaron actividad patogénica, divididos en dos grupos, los que tuvieron un modo acción lento para el avance de los síntomas, conformado por *Enterobacter* sp., *Exiguobacterium indicum*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea* sp. y *Serratia nematodiphila*. Y los que tuvieron un modo de acción rápido en el avance de los síntomas conformado por *Enterobacter* sp., *Pantoea dispersa*, *Flavimonas oryzihabitans*, *P. parafulva* y *P. taiwanensis*.

Aunque en el presente trabajo se encontraron otros géneros, los cuales a pesar de no haber provocado ningún síntoma de enfermedad, pudieran estar vinculados con los agentes causales directos de la sintomatología del tizón, como comunidades que aumentan o disminuyen cuando éstos enferman a la planta de arroz.

El presente trabajo contribuye a una mejor comprensión de la diversidad bacteriana

asociada a las hojas de arroz. Además de que muestra el potencial activo que representan estas bacterias ya sea como saprófito o como patógenos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Afolabi, O. B., Milan, R., Amoussa, R., Koebnik, L. Poulin and B. Szurek. (2014). First report of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* causing bacterial leaf streak of rice in Burundi (abstr.) Plant disease 98:1426.
- Ali, A., Khan, M. H., Bano, R., Rashid, H., Raja, N. I. and Chaudhry, Z. (2009). Screening of Pakistani rice (*Oryzae sativa*) cultivars against *Xanthomonas oryza* pv *oryzae*. Pakistan Journal of Botany, 41(5):2595-2604.
- Amann, R. and Kühn, M. (1998). *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. Current Opinion Microbiology, 1:352-358.
- Ann J. E., J. M. y Beer, S. V. (2016). PCR Primers for Detection of *Pantoea ananatis*, *Burkholderia* spp., and *Enterobacter* sp. from Onion. Section of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca NY 14853.
- Anand, S., Bala, K., Saxena, A., Schumann, P. and Lal, R. (2012). *Microbacterium amylolyticum* sp. nov., isolated from soil from an industrial waste site. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(9):2114-2120.
- Annual progress report (2013). CGIAR Research Program on Rice (GRiSP).

- Babalola, O. O. (2003). Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 2(12):710-713.
- Baravidan, M. R., Mew, T. W., and Aballa, T. (1982). Some studies on bacterial stripe of rice. (Abstr.) *Philipp. Phytopathol.* 18:9.
- Barnes, W. M. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6):2216-2220.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8):601-608.
- Chang, T.T. (1976) The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rices. *Euphytica* 25:435–444.
- Chen, C. Q., Pan, L., Li, J., Gao, J., Jiang and Liu, S. L. (2016). First Report of Bacterial Leaf Spot on Green Perilla (*Perilla frutescens*) Caused by *Bacillus megaterium* in China. (Abstr.) *Plant Diseases* 2016.
- Chen, X. L., Yan, Q., Li, R. F., Li, K. H., and Gao, L. J. (2016). First Report of a New and Highly Virulent Race of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the Causal Agent of Bacterial Leaf Blight of Rice in Guangxi Province, China (Abstr.). *Plant Diseases* 2016

- Chien, C. C., and Chang, Y. C. (1987). The susceptibility of rice plants at different growth stages and of 21 commercial rice varieties to *Pseudomonas glumae*. J. Agric. Res. China 36:302-310.
- Choi, S.H.; Vera-Cruz, C.M. and Leach J.E. (1998). Distribution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* DNA modification systems in Asia. Applied and Environmental Microbiology, 64(5):1663-1668.
- Claverie, M. F., Ramos, T. E. y González, P. F. J. (2008). Técnicas para el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias. Boletín de Pediatría, 48:235-241.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Karka, E. A. (2005). Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology, 71(9):4951-4959.
- Cother E. J., Noble D. H., Van De Ven R. J., Lanoiselet V., Ash G., Vuthy N., et al. (2010). Bacterial pathogens of rice in the Kingdom of Cambodia and description of a new pathogen causing a serious sheath rot disease. *Plant Pathol.* 59 944–953.
- Cottyn, B., Debode, J., Regalado, E., Mew, T.W. and Swings, J. (2009). Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3):885-897.
- Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T.W. and Swings, J. (2001). Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment.

Phytopathology, 91:282-292.

De Kievit, T.R. and Iglewski, B.H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships, *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, pp. 4839–4849.

Díaz, R. G. y Wachter, R. C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 45(1-2):30-40.

Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y-I, Morisaki H., Mitsui, H., Minamisawa, K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci Plant Nutr* 46:617–629.

FAOSTAT. (2017). Food and Agriculture Organization on the United Nations. (Disponible en línea): <http://faostat.fao.org>.

Ferrando, L., Manay, J. F. y Scavino, F. A. (2012). Molecular and culture-dependent analyses revealed similarities in the endophytic bacterial community composition of leaves from three rice (*Oryza sativa*) varieties. *FEMS Microbiol Ecol* 80 (2012) 696–708.

Finkel, O. M., Burch, A. Y., Lindow, S. E., Post, A. F. and Belkin, S. (2011). Geographical location determines the population structure in phyllosphere microbial communities of a salt excreting desert tree. *Appl Environ Microbiol* 77:7647–7655.

- Fox, R. T. V. (1993). Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology. CAB International. Oxon. U.K. 213 p.
- Hardoim, P. R., Hardoim, C. C. P., van Overbeek, L. S. and van Elsas, J. D. (2012). Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. PLoS One 7, e30438, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030438>.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology, 45(9):2761-2764.
- Janse, J.D. (2005). Phytobacteriology and diagnosis of bacterial diseases of plants, CABI Publishing (Ed.), Phytobacteriology: principles and practice. (pp. 43-65) Wallingford, UK. 2005.
- Kim, H. J., Lee, J. H., Kang, B. R., Rong, X., Gardener, B. B. M., Ji, H. J., Park, C-S. and Kim, Y.C. (2012). Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* B1-9, a nonpathogenic plant growth-promoting bacterium. J Bacteriol 194:729
- Kini, K., Agnimonhan, R., Afolabi, O., Soglonou, B., Silué1, D. and Koebnik, R. (2016). First report of a new bacterial leaf blight of rice caused by *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii* in Togo (Abstr.) plant diseases 2016.
- Kini, K., Agnimonhan, R., Afolabi, O., Milan, B., Soglonou, B., Gbogbo, V., Koebnik, R. and Silué, D. (2016). First Report of a New Bacterial Leaf Blight of Rice Caused by *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii* in Benin (Abstr.) Plant Diseases 2016.

- Kang, M. J., Shim, J. K., Cho, M.S., Seol, Y. J., Hahn, J. H., Hwang, D. J. and Park, D.S. (2008). Specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in infected rice plant by use of PCR assay targeting a membrane fusion protein gene. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 18(9):1492-1495.
- Khush, G.S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol Biol* 35:25–34.
- Krishnam Raju, k., Vijay Krishna Kumar, K., Raju, M. R. B. and Sudini, H. (2008). Red Stripe disease in rice (*Oryza sativa* L.) and overview, *J. Res. ANGRAU* 36(4)5-13, 2008.
- Lee, H. B., Hong, J. P. and Kim, S. B. (2010). First report of leaf blight caused by *Pantoea agglomerans* on rice in Korea. *Plant Dis.* 94:1372.
- Legard, D.E.; McQuilken, M.P.; Whipps, J.M.; Fenlon, J.S.; Fermor, T.R.; Thompson, I.P.; Bailey, M.J. and Lynch, J.M. (1994). Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 50(2):87-101.
- Li, B., Liu, B., Yu, R., Tao, Z., Wang, Y., Xie, G., Li, H. (2010). Bacterial brown stripe of rice in soil-less culture system caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in China. *J Gen Plant Pathol* (2011) 77:64–6.
- Lindow, S. E. and Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ*

Microbiol 69, 1875–1883.

Wang, M. P., Wei, M., Cao, L., Zhu and Lu .(2016). First Report of Rice Seedling Blight Caused by *Burkholderia plantarii* in North and Southeast China (Abstr.) Plant Diseases 2106.

Madhaiyan, M., Peng, N. and Ji, LH. (2013). Complete genome sequence of *Enterobacter* sp. strain R4 368, an endophytic N-fixing Gammaproteobacterium isolated from surface-sterilized roots of *Jatropha curcas* L. Genome Announc 1:e00544-13

Mano, H., Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes Environ 23:109 117

Mano H, Tanaka F, Nakamura C, Kaga H, and Morisaki H. (2007). Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. Microbes Environ 22:175–185.

Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaga, H., Okunishi, S. and Morisaki, H. (2006). Culturable surface and endophytic bacterial flora of thematuring seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. Microbes Environ 21:86–100.

McInroy, J. A. and Kloepper, J. W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant and Soil, 173(2):337-342.

Medina, M. L., Medina, M. G. y Merino, L. A. (2010). Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 30(3):83-90.

- Mew, T.W. (1987). Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Annual Review of Phytopathology*, 25:359-382.
- Mew, T. W. and Rosales, A. M. (1986). Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76, 1260–1264.
- Mew, T. W., Alvarez, A. M., Leach, J. E. and Swings, J. (1993). Focus on bacterial blight of rice. *Plant Disease*, 77(1):5-12.
- Mew, T. W., Leung, H., Savary, S., Vera Cruz, C. M. and Leach, J. E. (2004). Looking ahead in rice disease research and management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2):103-127.
- Miyajima, K., Tanii, A., Akita, T. (1983). *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33 656–657. 10.1099/00207713-33-3-656.
- Mizukami, T. and Wakimoto, S. (1969). Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. *Annual Reviews Phytopathology*, 7:51-72.
- Molan, Y. and Ibrahim, Y. (2007) First Report of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Pith Necrosis Caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia, *Plant Dis.* 91:110, 2007.
- Mondal, K. K., *et al.* (2011). *Plant Dis.* 95:1582. 10.1094/PDIS-06-11-0533 [Abstract] [ISI].
- Mukhopadhyay, K., Garrison, N. K., Hinton, D. M., Bacon, C. W., Khush, G. S., Peck, H.

- D. and Datta, N. (1996). Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathologia* 134, 151–159.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:355-350, 1987
- Nandakumar, R., Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E. Clark, C. A., *et al.* (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the Southern United States. *Plant Dis.* 93, 896–905. doi: 10.1094/PDIS-93-9-0896.
- NCBI. 2017. National Center for Biotechnology Information. (Disponible en línea): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Niño-Liu, D. O., Ronald, P. C. and Bogdanove, A. J. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology*, 7(5):303-324.
- Nyström, T. (2003). Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door *BioEssays*, 25:204-211.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144, 31–43.
- Ou, S. H. 1977. Possible presence of bacterial blight in Latin America. *International Rice Research Newsl*, 2(2):5-6.
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in

gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, pp. 8789–8793.

Powledge, T. M. (2004). The polymerase chain reaction. *Advances Physiology Education*, 28:44-50.

Prasanta, K. Subudhi, T. Sasaki, G.S. Khush. 2006. Rice. C. Kole (Ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. (pp. 1–8.) , Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2006).

Peng, Qin., Yuan, Y. y Meiyang Gao. (2013). *Bacillus pumilus*, a Novel Ginger Rhizome Rot Pathogen in China (Abstr.) *Plant Diseases* 2013.

Rasche, F., Marco-Noales, E., Velvis, H., van Overbeek, L. S., López, M. M., van Elsas, J. D., Sessitsch, A. (2006). Structural characteristics and plant-beneficial effects of bacteria colonizing the shoots of field grown conventional and genetically modified T4-lysozyme producing potatoes. *Plant Soil* 289:123–140

Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J. J., Suslow, T. V., Coaker, G. L, Leveau, J. H. J. (2012) Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on fieldgrown lettuce. *ISME J* 6:1812–1822.

Reddy, P. R., and Mohanty, S. K. (1981). Epidemiology of the kresek phase of bacterial blight of rice. *Plant Dis.* 65:578-580.

Redford, A. J., Bowers, R.M., Knight, R., Linhart, Y., Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of

- bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol* 12:2885–2893.
- Reischl, U. 1996. Applications of molecular biology-based methods to the diagnosis of infectious diseases. *Frontiers in Bioscience*, 1(1):72-77.
- Ren, G. D., Zhang, H. Y., Lin X. G., Zhu J. G. and Jia Z. J. (2014a) Response of phyllosphere bacterial communities to elevated CO₂ during rice growing season. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9459–9471
- Ren, G. D., Zhu J. G. and Jia Z. J. (2014b) Contrasting response patterns of rice phyllosphere bacterial taxa to elevated CO₂. *Pedosphere* 24:544–552.
- Ren, G. *et al.*, (2015). Response of soil, leaf endosphere and phyllosphere bacterial communities to elevated CO₂ and soil temperature in a rice paddy. *Plant Soil* (2015) 392:27–44.
- Rodríguez, R.M.A. (2004). Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (ELISA), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en FOIEGRAS. (PhD. Disertación. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria, 336 pp).
- Rosales, A. M., Vantomme, R., Swings, J., De Ley, J. and Mew, T.W. (1993) Identification of some bacteria from paddy antagonistic to several rice fungal pathogens. *J Phytopathol* 138, 189–208.
- Roschevitz R. J. (1931) A contribution to the knowledge of rice. *Bull Appl Bot Genet Plant Breed (Leningrad)* 27 (4):1–133 (Russian with English Summary).

- Sakthivel, N. and Gnanamanickam, S.S. (1987). Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.). *Appl Environ Microbiol* 53, 2056–2059.
- Shakya, D. D. and Chung, H. S. (1983). Detection of *Pseudomonas avenae* in rice seed. *Seed Science and Technology*, 11:583-587.
- Shakya, D. D., Chung, H. S., Vinther, F. (1986). Transmission of *Pseudomonas avenae*, the cause of bacterial stripe of rice. *Journal of Phytopathology*, 116(1):92-96.
- Shen, Y. and Ronald, P. (2002). Molecular determinants of disease and resistance in interaction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *Microbes and Infection*, 4(13):1361-1367.
- SIAP. (2016). Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (Disponible en línea): <http://www.siap.gob.mx>
- SIAP. (2017). Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (Disponible en línea): <http://www.siap.gob.mx>
- Soriano, B. J. (2006). Determinación de la incidencia de bacterias patógenas en semillas de arroz, (categorías básica, registrada y certificada) y evaluación de alternativas químicas para su control. Panamá, República de Panamá, 98 pp. (M.Sc. Disertación. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias).

- Stoltzfus, J. R., So, R., Malarvizhi, P. P., Ladha, J. K. and de Bruijn, F. J. (1997). Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* 194, 25–36.
- Swings, J., VanDen Mooter, M., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., Mew, T.W. and Kersters, K. (1990). Reclassification 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 1922) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3):309-311.
- Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., Barac, T., Vangronsveld, J. and van der Lelie, D. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75:748–757
- Thompson, I. P., Bailey, M. J., Fenlon, J. S., Fermor, T. R., Lilley, A. K., Lynch, J. M., McCormack, P. J., McQuilken, M. P., Purdy, K. J. and Rainey, P. B. (1993). Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil*, 150(2):177-191.
- Torres, A.G. y Baca, B.E. (1995). Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*, 23(3):16-21.
- Vorholt, J. A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10:828–840.

- Whyte, R.O. (1972) The Gramineae: Wild and cultivated plants of monsoonal and equatorial Asia, I. Southeast Asia. *Asian Perspect* 15:127–151.
- Williams, J. A., Luke, J., Johnson, L. And Hodgson, C. (2006) pDNAVACCultra vector family: high throughput intracellular targeting DNA vaccine plasmids. *Vaccine*, 24(21):4671-4676.
- Witzel, K., Gwinn-Giglio, M., Nadendla, S., Shefchek, K. and Ruppel, S. (2012) Genome sequence of *Enterobacter radicincitans* DSM16656T, a plant growth-promoting endophyte. *J Bacteriol* 194:5469.
- Xiao, D.; Li, W.; Ewi, T.; Wu, Z. and Xie, L. 2010. Advances in the studies of rice stripe virus. *Frontier of Agriculture in China*, 4(3):287-292.
- Xiong, X. Q., Liao, H. D., Ma, J. S., Liu, X. M., Zhang, L. Y., Shi, X. W., Yang, X. L., Lu, X. N. and Zhu. Y.H. (2014). Isolation of a rice endophytic bacterium, *Pantoea* sp. Sd-1, with ligninolytic activity and characterization of its rice straw degradation ability. *Lett Appl Microbiol* 58:123 129.
- Y. Molan and Y. Ibrahim. (2007) First Report of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Pith Necrosis Caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia. *Plant Dis.* 91:110, 2007.
- Yang, J. H., Liu, H. X., Zhu, G. M., Pan, Y. L., Xu, L. P. and Guo, J. H. (2008) Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. *J Appl Microbiol* 104, 91–104.

- Yu, L., Lai, Q., Yi, Z., Zhang, L., Huang, Y., Gu, L. and Tang, X. (2013). *Microbacterium sediminis* sp. nov., a psychrotolerant, thermotolerant, halotolerant, alkalitolerant actinomycete isolated from deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(1):25-30.
- Yu, V. Z., Popova, A. A. and Khmel, I. A. (2014). Quorum Sensing Regulation in Bacteria of the Family Enterobacteriaceae *Russian Journal of Genetics*, 2014, Vol. 50.
- Zeigler, R. S. and Alvarez, E. (1987). Bacterial sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America. *Plant Disease*, 71(7):592-597.
- Zeigler, R. S. and Alvarez, E. 1990. Characteristics of *Pseudomonas* spp. causing grain discolouration and sheath rot of rice, and associated pseudomonad epiphytes. *Plant Disease*, 74(11):917-922.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(2):203-214.
- Zhu, B., Chen, M., Lin, L., Yang, L., Li, Y. and An, Q. (2012) Genome sequence of *Enterobacter* sp. Strain SP1, an endophytic nitrogen-fixing bacterium isolated from sugarcane. *J Bacteriol* 194:6963–6964.