



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

“Diseño de una metodología de evaluación preliminar para el manejo del
Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz en el Ecuador”

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previa la obtención del Título de:

INGENIERO AGRÍCOLA Y BIOLÓGICO

Presentado por:

Agni Luzbey Lombeida La Rosa

Eder Wilson Cepeda Landín

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año 2016

AGRADECIMIENTOS

Agni Luzbey Lombeida La Rosa

Al Creador, que con su bondad inmerecida me permitió llegar hasta donde estoy. A mis padres que dedicaron vida, esfuerzo y trabajo para darme la oportunidad de convertirme en lo que soy. A mi pequeña hermana, que me distrajo con sus juegos en momentos de estrés. A mi tutora y amiga Dra. Ma. Isabel Jiménez. A Natalia y Martha por ser como mis hermanas en estos años. A Gabriel, por ser mi mejor amigo a la distancia y haber esperado por casi 6 años para retomar nuestras vidas.

Eder Wilson Cepeda Landín

A Dios, que siempre ha sido mi guía y fortaleza en todo momento. A mis Padres y hermanos que han sabido brindarme todo su apoyo y confianza para culminar mis estudios. A los profesores que con sus conocimientos han podido guiarme durante mis procesos académicos, en especial a la Dra. María Isabel Jiménez que nos ha dado todo su apoyo para cumplir con nuestro proyecto. En fin, agradezco a todas las personas que colaboraron decididamente en la realización de este trabajo.

DECLARACIÓN EXPRESA

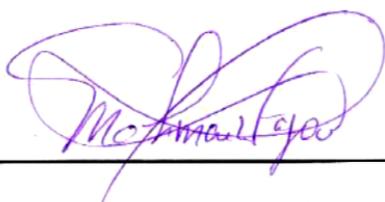
"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, nos corresponde exclusivamente; y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



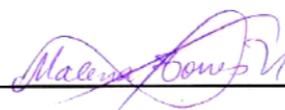
Agni Luzbey Lombeida La Rosa
ESTUDIANTE



Eder Wilson Cepeda Landin
ESTUDIANTE



María Isabel Jiménez Feijoo Ph.D.
TUTOR DE MATERIA
INTEGRADORA



Angélica Malena Torres Ulloa MSc.
CO-TUTOR DE MATERIA
INTEGRADORA

RESUMEN

En Ecuador el manchado y vaneamiento del grano de arroz es considerado actualmente un problema fitosanitario de importancia. Los síntomas de esta enfermedad se presentan en etapas fenológicas donde el grano está formado, resultando difícil identificar la presencia del patógeno en las fases tempranas del cultivo para realizar el control. El objetivo de este trabajo fue diseñar una metodología de evaluación preliminar, en las tres primeras etapas de formación del grano, para el manejo de la enfermedad, Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz, dado que sus síntomas no se observan en estas etapas. La metodología del trabajo se ejecutó en dos fases: 1) Fase de campo, en donde se realizó un muestreo aleatorio de tallos de arroz en las etapas de desarrollo primordio floral, embuchamiento y floración, en lotes de cultivos del cantón Montalvo; se registró la información del área de estudio con respecto al número y superficie del lote, la variedad y etapa del arroz; y 2) Fase de laboratorio, en donde se aisló el complejo bacteriano procedente del tejido de arroz sembrado en medio de cultivo selectivo; posteriormente, se realizó una caracterización morfológica y bioquímica, con las que se identificaron las bacterias causantes de la enfermedad. Los resultados indicaron que, en la primera etapa de formación del grano, se encontraron 8 tipos de bacterias, de las cuales, 2 fueron identificadas como *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*; en la segunda y tercera etapa se obtuvieron 3 y 2 tipos de bacterias respectivamente, en las cuales se identificó a *B. gladioli*. En base a la información obtenida, se esquematizó un protocolo para la toma de muestras y el análisis de laboratorio, con el cual los productores contarán con una herramienta para identificar la presencia temprana del patógeno causante del Añublo Bacterial de la Panícula y realizar un manejo preventivo.

Palabras clave: Añublo Bacterial, *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli*, arroz, muestreo.

ABSTRACT

*In Ecuador, stained and blight grain rice is currently considered a phytosanitary problem of importance. The symptoms of this disease are presented in phenological stages where the grain is formed, making it difficult to identify the presence of the pathogen in the early stages of cultivation in order to carry out control. The aim of this study was to design a methodology for preliminary assessment, in the first three stages of grain formation, for disease management Bacterial Panicle Blight of Rice in Ecuador, because its symptoms are not observed in these stages. The methodology of work was made in two phases: 1) Field phase, which consisted of a random sampling of rice stems in the stages of floral primordia development, booting stage and flowering, in batches of crops in the canton Montalvo, for this it was necessary to record the information of the study area regarding the number and size of the batch, variety and stage of rice; and 2) laboratory phase, where the bacterial complex was isolated from tissue rice sown in selective culture medium; subsequently, a morphological characterization and biochemical tests was made, with which the bacteria causing the disease are identified. The results indicated that, in the first stage of grain formation, 8 types of bacteria were found, of which two were identified as *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli*; in the second and third stages 3 and 2 types of bacteria respectively were obtained, in which *B. gladioli* was identified. Finally, based on the information obtained, a protocol for sampling and laboratory analysis was schematized, with which rice producers will have a tool to check the presence of the pathogen causing the Bacterial Panicle Blight and carry out preventive management.*

Keywords: *Bacterial Panicle Blight, Burkholderia glumae, Burkholderia gladioli, rice, sampling.*

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
DECLARACIÓN EXPRESA.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ABREVIATURAS.....	viii
SIMBOLOGÍA.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FOTOS.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	2
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivo específicos	2
1.2 Marco teórico	3
1.2.1 Generalidades del arroz.....	3
1.2.2 Principales patógenos y enfermedades del arroz.....	4
1.2.3 <i>Burkholderia glumae</i>	5
1.2.4 Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz.....	5
1.2.5 Arroz en el Ecuador	6
1.2.6 Variedades y semillas de arroz	7
CAPÍTULO 2.....	9
2. METODOLOGÍA DE DISEÑO	9
2.1 FASE DE CAMPO.....	9
2.1.1 Área de muestreo.....	9
2.1.2 Muestreo de arroz	10
2.2 FASE DE LABORATORIO	12
2.2.1 Preparación de las muestras.....	12
2.2.2 Aislamiento bacteriano	13
2.2.3 Identificación del patógeno.....	13
CAPÍTULO 3.....	15
3. RESULTADOS.....	15
3.1 Establecimiento de las primeras etapas fenológicas de formación del grano y muestreo de tallos de arroz.....	15

3.2	Bacterias del género Burkholderia causantes de la enfermedad.	16
3.3	Diseño del protocolo de evaluación preliminar para el Añúblo Bacterial de la Panícula del Arroz.	17
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	19
	BIBLIOGRAFÍA	20
	APÉNDICE A	23
	APÉNDICE B	24

ABREVIATURAS

INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censo
ABPA	Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz
ANAR	Asociación Nicaragüense de Arroceros
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
SNI	Sistema Nacional de Información
UTM	Universal Transversal Mercator
GPS	Global Position System
SIG	Sistemas de Información Geográfica
SAGARPA	Secretaría de Agricultura Ganaderías, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

SIMBOLOGÍA

<i>cm</i>	Centímetros
<i>μm</i>	Micrómetros
<i>T</i>	Toneladas
<i>Ha</i>	Hectáreas
<i>%</i>	Porcentaje
<i>Km²</i>	Kilómetros Cuadrados
<i>°C</i>	Grados Centígrados

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Rendimiento nacional de arroz en cáscara durante el año 2002 a 2014	7
Figura 2.1: Esquema de la metodología del trabajo	9
Figura 2.2: Ubicación del cantón Montalvo	10
Figura 2.3: Esquema de los cinco puntos de muestreo dentro del área.	11
Figura 2.4: Ubicación de los lotes muestreados en Montalvo.	12
Figura 3.1. Primeras etapas de formación del grano de arroz muestreadas a) E1, b) E2 y c) E3.	15
Figura 3.2: Complejo bacteriano en las tres primeras etapas de formación del grano de Montalvo	16
Figura 3.3: Presencia de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> en E1, E2 y E3 de Montalvo	17
Figura 3.4: Protocolo de evaluación preliminar para el Añúblo Bacterial de la Panícula del Arroz.	18

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas fenológicas del arroz.	4
Tabla 2. Principales características de las variedades cultivadas en el Ecuador.	8
Tabla 3. Etiquetado de las muestras.	12
Tabla 4. Características macroscópicas de las colonias de <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i>	13
Tabla 5. Resultados esperados de las pruebas bioquímicas en <i>B. glumae</i> y <i>B. gladioli</i> .	14
Tabla 6. Código de bacterias aisladas de las tres etapas de formación del grano.	16

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Muestreo de tallos de arroz en Montalvo.	23
Foto 2. Muestras de tallos de arroz en E1, E2 y E3.	23
Foto 3. Preparación y selección del material a sembrar de las tres etapas de formación del grano.	24
Foto 4. Panículas y granos de arroz en las tres primeras etapas de formación del grano.	24
Foto 5. Lavado y desinfección del tejido.	24
Foto 6. Macerado del tejido.	25
Foto 7. Siembra del tejido en medio de cultivo selectivo.	25
Foto 8. Crecimiento de colonias bacterianas.	25
Foto 9. Purificación de colonias bacterianas.	26
Foto 10. Prueba bioquímica: Tinción de Gram.	26
Foto 11. Prueba bioquímica: Hidrólisis del almidón.	26

INTRODUCCIÓN

El cultivo arroz (*Oryza sativa* L.) constituye uno de los principales cereales en el mundo, siendo considerado como un recurso primario de alimentación [1]. Es el alimento primordial de dos mil millones de personas, con una producción a nivel mundial de 618 millones de toneladas [2]. En Ecuador, el arroz ostenta una importante posición dentro de los cultivos del país, con una superficie sembrada para el año 2012 de 411.459 hectáreas y un rendimiento de 4,22 Tm/Ha. [3]

El arroz, es un cultivo al que afectan problemas abióticos como: humedad, temperatura, velocidad del viento, radiación solar, tipos de suelo, escases de agua, entre otras; y bióticos como es el caso de las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos. Referente a las de origen bacteriano, como es el caso del Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz (ABPA), también conocida como manchado y vaneamiento del grano, se atribuye a bacterias del género *Pseudomonas* y actualmente del género *Burkholderia* [4].

A este respecto, de las cinco especies pertenecientes a este género que atacan a plantas, se reporta que *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli* son las causantes de la enfermedad. En Colombia, se registra la presencia de ambas bacterias; sin embargo, es la primera la que aparece con mayor intensidad [5].

Los síntomas de la enfermedad se presentan como un vaneamiento de la panícula, las espiguillas son de color pajizo con una decoloración en el grano, manteniéndose erecta y la hoja bandera es de color verde. En dependencia de la severidad con que esté presente la enfermedad, la afectación se puede dar en algunas o en todas las espigas. Además, se la puede encontrar con asociación a hongos que causan manchado del grano [6].

En Ecuador, para el año 2013, se han reportado síntomas similares de la enfermedad Añublo Bacterial de la Panícula, cuyos agentes causales son las bacterias *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*, presenciándose panículas erectas con granos manchados y vanos en plantaciones de arroz de Palestina, provincia del Guayas. Investigaciones realizadas utilizando técnicas moleculares en aislados bacterianos de muestras de arroz de esta zona, evidenciaron la existencia del patógeno [7].

La enfermedad tiene una importancia relevante en las variedades de semillas de arroz, las cuales constituyen la base de la producción del cereal, dado a las afectaciones que causa en la calidad del material a sembrar; no obstante, esta importancia no debe ser un impedimento para una evaluación precisa de las características que tenga cada variedad [8].

CAPÍTULO 1

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En Ecuador, el manchado y vaneamiento del grano de arroz ha causado pérdidas en el cultivo de este cereal, reportándose desde hace seis años en diferentes zonas del país [9]. Los síntomas de esta enfermedad se presentan en etapas fenológicas donde el grano está formado, resultando difícil observar la presencia del patógeno en las primeras etapas. Este problema ha ocasionado que se desconozca la etapa crítica inicial de aparición del agente causal, permitiendo que la panícula se desarrolle conjuntamente con la enfermedad en su interior, impidiendo que se realice un manejo preventivo para el control del patógeno en las primeras etapas de formación del grano.

El presente trabajo establece una metodología de evaluación preliminar que permita a los productores de semillas de arroz, determinar la etapa crítica de formación del grano en la cual se evidencia la presencia del agente causal de la enfermedad y poder realizar el control. Este procedimiento implica un beneficio en la producción y calidad de la semilla, así como en los rendimientos del cultivo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Diseñar una metodología de evaluación preliminar, mediante el muestreo y análisis en laboratorio de panículas de arroz en las primeras etapas de formación del grano, para el manejo del Añublo Bacterial de la Panícula de Arroz en el Ecuador.

1.1.2 Objetivos específicos

- Establecer las etapas fenológicas de formación del grano a coleccionar utilizando un sistema de muestreo aleatorio simple de tallos de arroz.
- Identificar mediante caracterización morfológica y pruebas bioquímicas bacterias del género *Burkholderia* causantes del Añublo Bacterial de la Panícula.
- Estructurar el diseño de una metodología de evaluación preliminar para el manejo de la enfermedad.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Generalidades del arroz

La planta de arroz es una especie semi-acuática, de tipo transitorio con un ciclo promedio de 120 días [10].

Los órganos de la planta de arroz se han clasificado en dos grupos: órganos vegetativos y órganos reproductivos.

De acuerdo al desarrollo de la planta, el arroz tiene etapas fenológicas bien marcadas y están definidas por los cambios fisiológicos que se producen durante el crecimiento del cultivo [10]. Las principales fases del cultivo son:

Fase vegetativa: esta fase comprende desde la germinación hasta la diferenciación del primordio floral; siendo la única que posee una duración variable, la cual depende básicamente de la variedad que se siembre; por ejemplo, si se cultiva una planta con un ciclo de 120 días, esta etapa dura 55 días; pero si el ciclo es de 130 días, la etapa dura 65 días [10].

Fase reproductiva: esta etapa abarca desde el inicio de formación de la panícula hasta la floración, se caracteriza por la aparición de los órganos reproductivos de la planta. La duración de esta etapa es la misma en todas las variedades y en promedio dura 35 días. En esta fase se determina el número de espiguillas y granos que tendrá la planta de arroz [10].

Fase de maduración: comprende desde la floración hasta la madurez fisiológica de los granos. Se caracteriza por la formación y el llenado total de los granos; la duración de esta fase también es constante con un ciclo promedio de 30 días [10].

A lo largo de estas 3 fases, está implícito el desarrollo de 10 etapas del crecimiento de la planta de arroz, que son fácilmente identificables (Tabla 1). Dentro de ellas ocurren fenómenos que son de mucha importancia; y las labores que se realizan en cada una influyen directamente en el rendimiento del cultivo [10].

Tabla 1. Etapas fenológicas del arroz.

Fase	Etapas	Estado	Días después de germinadas
Vegetativa	Germinación a emergencia	0	0-5
	Plántula	1	6-12
	Macollamiento	2	13-18
	Máximo Macollamiento	2 a	19-30
	Elongación del tallo	3	30-40
	Máxima elongación del tallo	3 a	41-60
Reproductiva	Iniciación de la panícula	4	61-70
	Desarrollo de la panícula	5	71-93
	Floración	6	94-100
Madurez	Estado lechoso del grano	7	101-118
	Estado pastoso del grano	8	108-118
	Madurez fisiológica del grano	9	119-135

Fuente: [11].

1.2.2 Principales patógenos y enfermedades del arroz

Las enfermedades, al igual que las malezas, causan pérdidas en el rendimiento del cultivo; sin embargo, los patógenos y enfermedades atacan de forma directa a los órganos de la planta de arroz, estos ataques se presentan durante cualquier etapa de desarrollo del cultivo, siendo el monitoreo continuo de la plantación, una actividad necesaria durante todo el ciclo (Moquete, 2010). En este sentido, las principales enfermedades provocadas por patógenos como hongos son: quemazón o piricularia, causada por el hongo *Pyricularia oryzae* Calv., Mancha parda o helmintosporiosis causado por el hongo *Helminthosporium oryzae*, mancha lineal o cercosporiosis cuyo agente causal es *Cercospora oryzae*, añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* [10].

Por otra parte, dentro de las enfermedades ocasionadas por bacterias, se encuentra el complejo de manchado del grano, causado por colonias bacterianas del género *Burkholderia*, siendo las más comunes *B. glumae*, *B. avenae*, *B. syringae* [10].

1.2.3 *Burkholderia glumae*

Esta bacteria es considerada el patógeno más importante en el cultivo de arroz, está asociada a pérdidas de rendimiento mayores al 75% de la producción del cultivo. Fue descubierta en el distrito de Kiushu en Japón, en el año de 1950, descrita inicialmente como el agente causal de la pudrición de la vaina bajo el nombre de *Pseudomonas glumae* Kurita & Tabei [12].

En la década de los 90's se registraron pérdidas del 40% en el estado de Luisiana en USA, y es desde esa época que se han registrado daños causados por este patógeno en países de Centro y Sur América, aunque en estos países se habla de un complejo Hongo-Acaro-Bacteria, los cuales han mermado considerablemente las producciones de la gramínea [12].

Esta bacteria se caracteriza por presentar flagelos Gramnegativos con 1 a 7 flagelos polares, sin esporas, mide 1.5 a 2.5 μm de largo por 0.5 a 0.7 μm de diámetro; entre las características bioquímicas más importantes están: su capacidad de reducir el nitrato, hidrolizar la gelatina, degradar el almidón y degradar la pectina, además no produce pigmento fluorescente sobre el medio de cultivo King B. Las colonias son de crecimientos lento, circulares, elevadas y con márgenes liso [13].

La enfermedad del añublo bacterial de la panícula de arroz causado por *Burkholderia glumae*, es favorecida por temperatura y humedad relativa alta, principalmente en las noches. Temperaturas por encima de la del aire, por cinco días, durante la etapa de embuchamiento, sumado de precipitaciones, aumenta la probabilidad de que se manifieste la enfermedad. Se considera que los períodos más susceptibles para la inoculación del patógeno son cuando emerge la panícula y empieza a florecer. Además en floración es donde se registra una tasa más alta de infección [12].

1.2.4 Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz

El machado del grano es una enfermedad distribuida ampliamente a nivel mundial, causando grandes pérdidas económicas en países productores de la gramínea. En nuestro país, durante los últimos años esta enfermedad ha causado pérdidas de hasta un 30% en la producción [14].

Los daños que causa la enfermedad son: deterioro de la calidad del grano, desmejoramiento del aspecto del grano, bajo índice molinero, pérdida de vigor germinativo, menor número de granos por espigas, entre otros [15].

Durante la emergencia de la panícula no se observa síntoma alguno, después de 48 horas de haber emergido la espiga se observan los primeros síntomas. En el grano, el manchado se inicia en el ápice, generalmente en el lemma y en la parte media de las glumas. La mancha inicial es irregular de color pardo imperceptible, que con el pasar de los días se va tornando más oscura. En el interior del grano los órganos florales se necrosan por una pudrición acuosa [15].

El principal agente causal del añublo bacteria de la panícula de arroz es la bacteria *Burkholderia glumae*, con una alta importancia debido a que presenta mayor virulencia en este cultivo [16]; sin embargo, otra de las especies del género *Burkholderia* se reportan como responsable de la enfermedad, es el caso de *B. gladioli*, que en comparación con *B. glumae*, es aislada con menos frecuencia en el arroz infectado y con menor grado de virulencia [17], [18]. En Ecuador, se reporta la presencia de esta bacteria en plantaciones de arroz a partir del año 2013 [19].

1.2.5 Arroz en el Ecuador

En Ecuador, el arroz constituye uno de los cultivos con mayor importancia tanto en área sembrada, como en producción. Durante los últimos años el arroz se a posesionado como uno de los cultivos con mayor superficie cosechada después del cacao, y cuarto producto con mayor producción después de la caña de azúcar, banano y palma africana [9].

Adicionalmente el arroz constituye uno de los alimentos de la dieta básica de los ecuatorianos con un consumo anual de aproximadamente 50 kg por persona [20].

Anualmente se siembran alrededor de 400 mil hectáreas lo que registra una producción de 1.448.392 toneladas métricas de arroz [9].

En Ecuador se reporta la presencia del patógeno causante del vaneamiento del arroz o añublo bacterial en el año 2014, vinculada con una disminución en los rendimientos del cultivo, de acuerdo con información de producciones anuales de la gramínea (Figura 1.1) [9].

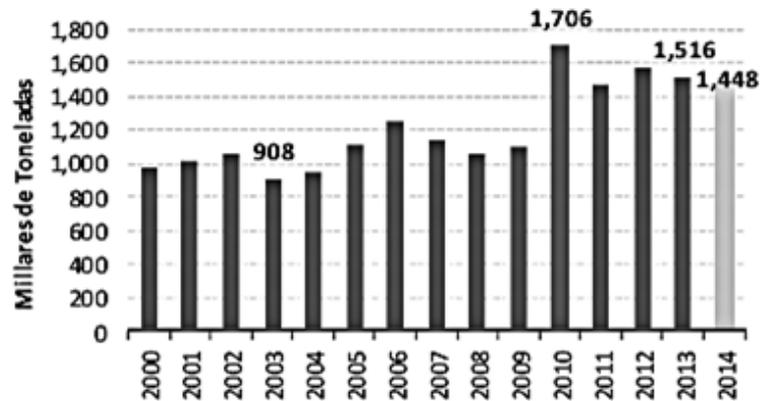


Figura 1.1: Rendimiento nacional de arroz en cáscara durante el período 2002 a 2014.

Fuente: [9].

Uno de los problemas para enfrentar esta nueva enfermedad es que en el país aún no existe información necesaria para poder realizar medidas de control; las casas comerciales de productos agroquímicos están probando cuál de sus productos podría controlar la enfermedad [14].

1.2.6 Variedades y semillas de arroz

En el cultivo de arroz, una variedad constituye un conjunto de individuos genótipicamente estables, que presentan características de interés tanto para productores e industrializadores de la gramínea. Las semillas representan la parte fundamental de cualquier producción agrícola, debido a que con semillas de buena calidad y de la mano con un adecuado manejo del cultivo se obtienen buenos rendimientos [21].

Una semilla de arroz de buena calidad debe poseer un alto porcentaje de germinación, excelente vigor en las plántulas, que se representa con una resistencia al acame, tolerancia a plagas y enfermedades, resistente al desgrane y buena calidad de molienda [21].

La tecnología de multiplicación de semilla de arroz tiene como objetivo producir semillas que expresen todo su potencial genético en el campo, que estén libres de patógenos e impurezas [21].

Actualmente en Ecuador se cultivan aproximadamente 400 mil hectáreas de arroz, pero tan solo el 30% de esta área se siembra con semilla certificada. En el resto de área se utiliza semilla reciclada, lo que representa un problema que incide directamente en la productividad de los campos [22].

En Ecuador, las variedades de arroz que se encuentran disponibles para los agricultores son generadas tanto por centros de investigación públicos como también empresas privadas[22] [24]. Las variedades que se encuentran presentes y sus características se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales características de las variedades cultivadas en el Ecuador.

	INIAP 14	INIAP 15	INIAP-FL-01	SFL-09	SFL-11	SFL-12
Rendimiento en Riego (t/ha) 1/	5.8-11	5.1-9.0	6.0-10.5	6.0-8.0	6.0-8.0	6.0-8.0
Rendimiento en seco (t/ha) 1/	4.8-6	4.5-5.9	5.8-9.4			
Ciclo vegetativo (Días)	113-117	117-128	120-140	115-125	127-131	126-135
Altura de plantas (cm)	99-107	89-108	94-115	125	126	124
Longitud de granos 2/	Largo	Extra largo	Extra Largo	Largo	Largo	Largo
Índice depilado % 3/	66	67	64	62	67	62
Desgrane	Intermedio	Intermedio	Intermedio	Intermedio	Intermedio	Intermedio

Fuente: [24]; [25].

^{1/} Rendimiento de arroz en cascara con 14% de humedad y 0% de impureza

^{2/} Grano largo de 6.6 a 7.5mm y extra largo > 7.5 mm

^{3/} Comprende granos enteros más $\frac{3}{4}$

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA DE DISEÑO

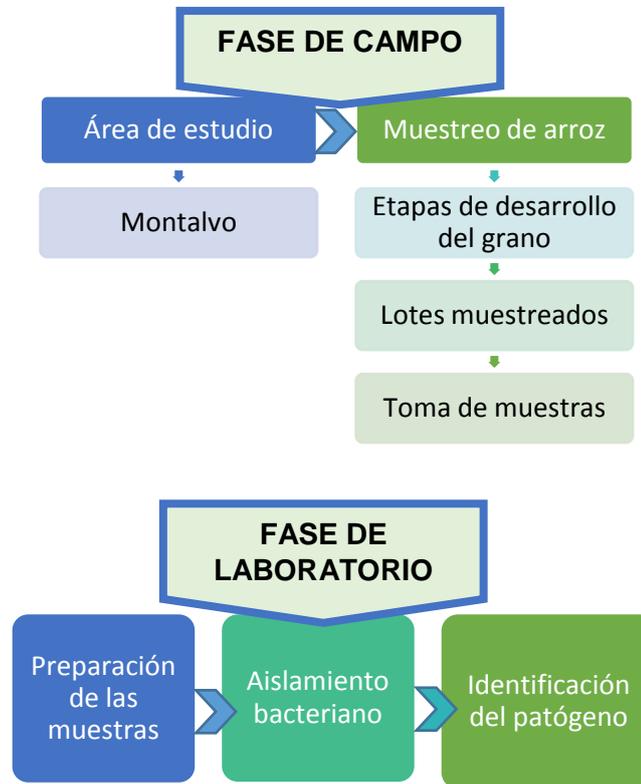


Figura 2.1: Esquema de la metodología del trabajo.

Fuente: Elaboración propia.

2.1 FASE DE CAMPO

2.1.1 Área de muestreo

El área de muestreo seleccionada fue el cantón Montalvo, conocida por ser una de las zonas de producción arroceras del país, en la cual se llevó a cabo la recolección de muestras de arroz.

El cantón Montalvo se encuentra localizado en la provincia de Los Ríos (Figura 2.2), con una extensión total de 362 Km², se encuentra a una altitud de 72 msnm; en una zona de producción agrícola donde sobresalen los cultivos de cacao, arroz, soja entre otros [26].

Los suelos de Montalvo son de depósitos aluviales, profundos, arcillosos, de bacines, meandros y causes abandonados, con problemas de hidromorfología, inundados parte o todo el año; la mayoría de llanura plana con pendiente entre 0-2%. De la superficie total del cantón Montalvo, el 44% corresponde a suelos de producción agropecuaria [26].

De acuerdo a la clasificación climática de Koppen, el Cantón Montalvo se encuentra dentro del clima tropical Monzon. Con una precipitación media anual de 1250 mm, el periodo de lluvias comprende desde diciembre a mayo, y la época seca de junio a noviembre. Con una temperatura promedio de 25 °C [26].

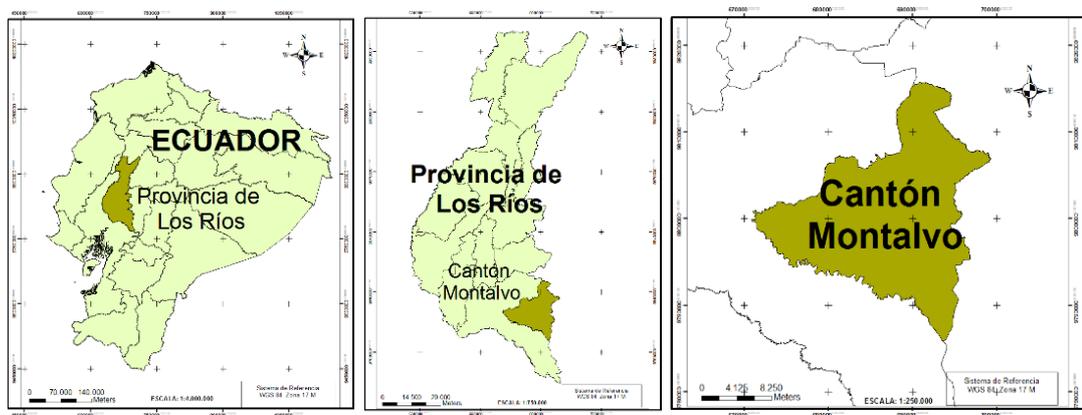


Figura 2.2: Ubicación del cantón Montalvo.

Fuente: Elaboración propia.

2.1.2 Muestreo de arroz

Etapas de formación del grano

Las actividades iniciaron realizando un reconocimiento y diferenciación de los estados fenológicos de formación del grano de arroz [10], con lo cual se establecieron las etapas de interés a muestrear dentro de este estudio. Para la selección de las etapas se consideraron criterios como por ejemplo la dificultad de observación de los síntomas de la enfermedad en los primeros estados de formación del grano y las ventajas de realizar un diagnóstico en fases tempranas para realizar un manejo preventivo.

Lotes muestreados

Dentro del área de muestreo se seleccionaron lotes individuales de cultivo de arroz para cada una de las etapas de desarrollo del grano establecidas, con una superficie de aproximadamente 3 hectáreas, los cuales fueron identificados como: L1, L2 y L3. La variedad de arroz muestreada en cada lote para las tres etapas fue SFL 011, siendo ésta la más sembrada en el área de muestreo (Figura 2.4).

Toma de muestras

Para cada lote, se tomaron cinco muestras compuestas por dos tallos de arroz cada una, utilizando la metodología de muestreo aleatorio simple (Figura 2.3). Para el muestreo se debe considerar que cada lote debe tener una superficie menor o igual a 10 hectáreas, para que las muestras sean representativas [27].

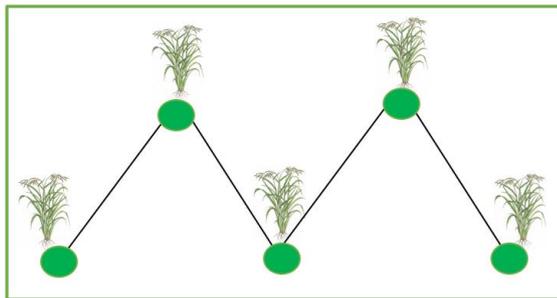


Figura 2.3: Esquema de los cinco puntos de muestreo dentro del área.

Fuente: Elaboración propia.

Los materiales utilizados durante el procedimiento fueron: GPS, tijeras, guantes, fundas de polietileno herméticas (25 cm x 35 cm), alcohol al 70% y marcadores. Fue necesario lavar y desinfectar las manos previamente a la toma de muestras, además se utilizaron guantes durante el proceso de muestreo [28].

Se cortaron los tallos con tijeras desinfectadas con alcohol y entre cada corte evitando una posible contaminación de las muestras, las cuales se almacenaron en las fundas etiquetándolas [28] y llevando un registro de acuerdo a la codificación de la Tabla 3:

Tabla 3. Etiquetado de las muestras.

Área de estudio	M: Montalvo		
Lote	L1	L2	L3
Superficie del lote	3 Ha	3 Ha	3 Ha
Etapa	E1: Primordio floral	E2: Embuchamiento	E3: Floración
Variedad	SFL 011	SFL 011	SFL 011
Muestra	M1 -M2 - M3 - M4 - M5	M1 -M2 - M3 - M4 - M5	M1 -M2 - M3 - M4 - M5

Fuente: Elaboración propia.

Se registraron las coordenadas UTM de cada lote muestreado utilizando un GPS (Global Positioning System, siglas en inglés), las cuales se procesaron en un software SIG de acceso libre para representar la ubicación de los lotes dentro del área muestreada (Figura 2.4) [28].



Figura 2.4: Ubicación de los lotes muestreados en Montalvo.

Fuente: Elaboración propia.

Las fundas con las muestras colectadas se almacenaron en refrigeración a temperatura de 4°C, hasta ser trasladadas al laboratorio para su procesamiento [28].

2.2 FASE DE LABORATORIO

2.2.1 Preparación de las muestras

Las cinco muestras de tallos de arroz colectadas en campo fueron llevadas al laboratorio para su procesamiento. El procedimiento se realizó en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar. Se seleccionaron tres muestras según las etapas de desarrollo del grano,

etiquetándolas como M1, M2 y M3, de las cuales se escogieron de tres a cuatro panículas de arroz para la etapa uno, una panícula para la etapa dos, cortándolas en segmentos pequeños con bisturí estéril, y 20 granos de arroz para la etapa tres, luego se realizó una desinfección del tejido con hipoclorito de sodio, alcohol y lavados con agua destilada estéril. Se dejó secar el tejido a temperatura ambiente [4].

2.2.2 Aislamiento bacteriano

Para el aislamiento de las bacterias, los tejidos desinfectados fueron macerados en un mortero con agua destilada estéril, hasta obtener un extracto homogéneo. Se sembraron tres réplicas de cada tejido macerado en cajas Petri con medio de cultivo Agar Nutritivo mediante el método de rayado con asa bacteriológica. Las cajas se dejaron incubar durante 3 días a una temperatura de 30°C [4].

2.2.3 Identificación del patógeno

Luego del período de incubación, se realizaron la caracterización morfológica junto con la purificación de las colonias bacterianas que crecieron en el medio de cultivo y una serie de pruebas bioquímicas [29], con el objetivo de identificar bacterias del género *Burkholderia*, consideradas como agente causal de la enfermedad, en las tres primeras etapas de desarrollo del grano muestreadas. Se utilizó una hoja de cálculo para tabular los datos obtenidos con respecto a los tipos de bacterias en las tres etapas y la presencia de las bacterias causantes de la enfermedad.

La caracterización morfológica de las colonias bacterianas en estudio consistió en identificar y comparar las características macroscópicas que presentaron en el medio de cultivo, mediante observaciones en el estereoscopio, con las reportadas en otros estudios [2], [30], [13], [31], como se indica en la Tabla 4:

Tabla 4. Características macroscópicas de las colonias de *B. glumae* y *B. gladioli*

Tamaño	Forma	Elevación	Borde	Pigmento*
Grande	Circular	Convexa	Continuo	Amarillo Blanco

*Pigmentación amarilla por la presencia de la toxoflavina que las vuelve virulentas, o blancas por ausencia de la toxina siendo no virulentas.

Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, las pruebas bioquímicas realizadas fueron Tinción de Gram, prueba KOH, catalasa, hidrólisis del almidón, dihidrólisis de la arginina e hidrólisis de la gelatina [32], los resultados esperados para estas pruebas se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados esperados de las pruebas bioquímicas en *B. glumae* y *B. gladioli*.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS						
BACTERIAS	Tinción Gram	KOH	Catalasa	Almidón	Arginina	Gelatina
<i>Burkholderia glumae</i>	-	+	+	-	+	+
<i>Burkholderia gladioli</i>	-	+	+	-	-	V

+, 80% o más cepas positivas; V, entre 21-79% de cepas positivas; -, 80% o más de cepas negativas

Fuente: Adaptado de Shaad, Jones, & Chun (2013).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1 Establecimiento de las primeras etapas fenológicas de formación del grano y muestreo de tallos de arroz.

Se establecieron las etapas fenológicas de formación del grano como se describe a continuación (Figura 3.1):

Etapa de primordio floral E1: la panícula está en formación, es un botón minúsculo de unos 2 mm que se puede observar haciendo un corte longitudinal en el tallo.

Etapa de embuchamiento E2: se caracteriza por el ensanchamiento del tallo, la espiga se encuentra completamente formada en el interior de éste y se nota la presencia de la hoja bandera.

Etapa de floración E3: la panícula se observa en el exterior, en esta etapa ocurre la polinización.

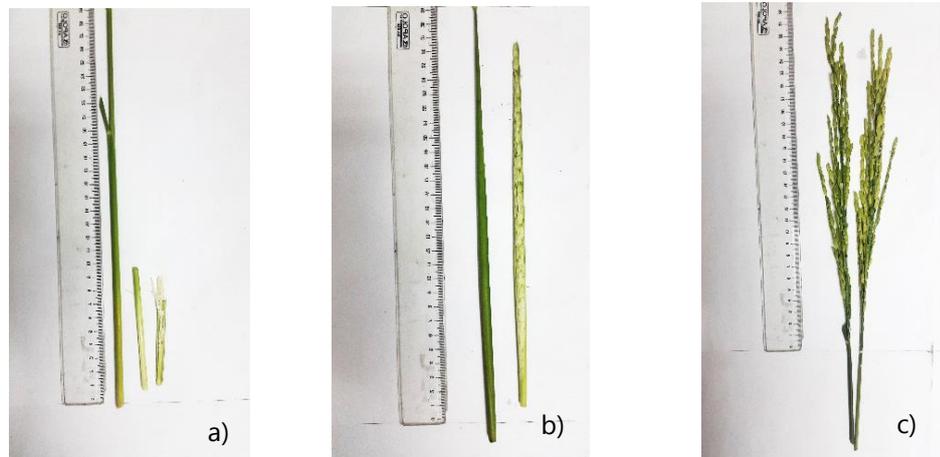


Figura 3.1. Primeras etapas de formación del grano de arroz muestreadas a) E1, b) E2 y c) E3.

Se obtuvieron 15 muestras de tallos de arroz de la variedad SFL 011, provenientes de los tres lotes de muestreados que corresponden a cada etapa de formación del grano.

3.2 Bacterias del género *Burkholderia* causantes de la enfermedad.

Las pruebas bioquímicas y caracterización morfológica de las colonias bacterianas dieron como resultado un total de diez tipos de bacterias para las tres etapas de formación del grano, dos bacterias aparecieron repetidas en las dos primeras etapas (B1 y B4) y una se repitió en todas las etapas (B4) (Tabla 6). En E1 se obtuvieron ocho tipos de bacterias, en E2 tres tipos y en E3 dos tipos de bacterias (Figura 3.2).

Tabla 6. Código de bacterias aisladas de las tres etapas de formación del grano.

Etapas	Código de bacterias
E1	B1
	B2
	B3
	B4
	B5
	B6
	B8
	B9
	E2
B4	
B10	
E3	B4
	B11

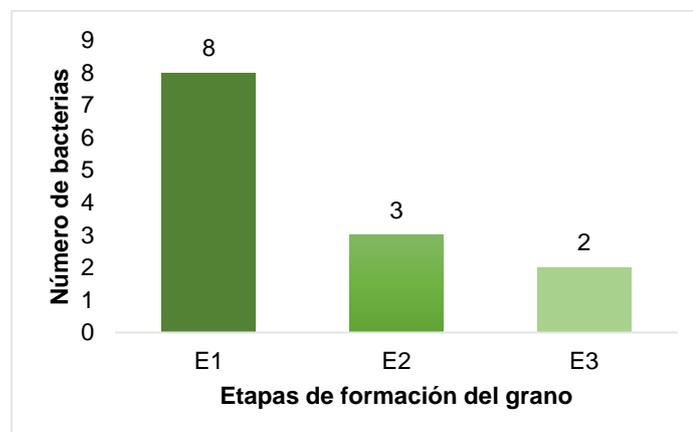


Figura 3.2: Complejo bacteriano en las tres primeras etapas de formación del grano de Montalvo.

La identificación de las bacterias pertenecientes al género *Burkholderia sp.* causantes de la enfermedad, mostró que *B. glumae* apareció en E1 y *B. gladioli* en las tres etapas. Se identificaron bacterias de otros géneros en todas las etapas, las cuales pueden ser endófitas del arroz u otras bacterias patógenas (Figura 3.3) [33].

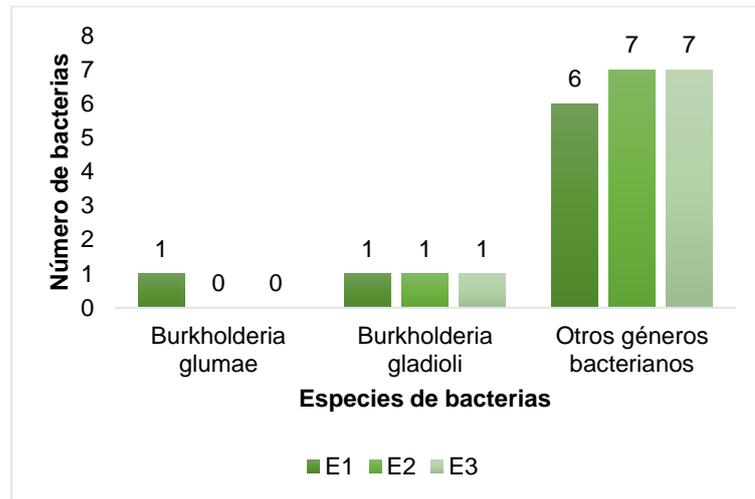


Figura 3.3: Presencia de *B. glumae* y *B. gladioli* en E1, E2 y E3 de Montalvo.

3.3 Diseño del protocolo de evaluación preliminar para el Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz.

Se obtuvo un protocolo que permita a productores de semillas de arroz, detectar el agente causal de la enfermedad en etapas tempranas de formación del grano (Figura 3.4). El protocolo consta de dos fases:

Fase de campo: en donde se establecen los pasos para realizar el muestreo de tallos de arroz. El primer paso consiste en la selección del lote a muestrear, considerando los siguientes criterios: la fecha de siembra, que permite identificar la etapa en la que se encuentra el arroz según la variedad y la superficie del lote, la cual no debe sobrepasar las 10 hectáreas. A continuación, el paso dos describe el método de muestreo aleatorio simple que se debe aplicar en los lotes para coleccionar los tallos de arroz. El paso tres contiene los ítems de etiquetado que deben llevar cada una de las muestras una vez coleccionadas. El cuarto y último paso de esta fase indica las condiciones en las que se deben almacenar las muestras hasta ser ingresadas al laboratorio, en donde comienza la segunda fase.

Fase de laboratorio: que consta de cuatro pasos que se deben realizar en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar. El paso uno describe el procedimiento de preparación

de las muestras realizando una selección y limpieza del tejido vegetal. En el paso dos se lleva a cabo la siembra del tejido en medio de cultivo específico para el aislamiento de colonias bacterianas. En el paso tres se realiza la determinación de la presencia del agente causal de la enfermedad mediante la caracterización morfológica y pruebas bioquímicas mencionadas en este estudio. El cuarto paso hace referencia a la entrega de resultados emitida por el laboratorio en un tiempo máximo de diez días, lo que permite al productor realizar los controles preventivos.



Figura 3.4: Protocolo de evaluación preliminar para el Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Se establecieron las tres etapas fenológicas de formación del grano de arroz, de interés para este estudio, con lo cual se consiguió coleccionar muestras de tallos para cada fase utilizando un sistema de muestreo aleatorio simple.
2. Se aislaron e identificaron las dos bacterias causantes de la enfermedad *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*, en las tres primeras etapas de formación del grano.
3. Se estructuró el diseño de una metodología de evaluación preliminar para el manejo de la enfermedad, en forma de protocolo sistematizado.

Recomendaciones

1. Se recomienda realizar muestreos en las dos primeras etapas de formación del grano para determinar la presencia del agente causal de la enfermedad, debido a que es necesario realizar los controles cuando la panícula aún no esté emergida, como es el caso de la etapa de floración, en la cual se comienzan a notar los síntomas de la enfermedad, en donde los controles no ayudarían a contrarrestar el daño.
2. Es necesario realizar desinfecciones en las semillas al momento de la siembra para eliminar al patógeno. La siembra de material contaminado es una de las vías más conocidas de transmisión a nuevas áreas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Savary, A. Mila, L. Willocquet, P. Esker, O. Carisse, y N. McRoberts, "The American Phytopathological Society", *Risk Factors Crop Health Glob. Change Agric. Shifts Framew. Anal. Using Rice Trop. Subtrop. Asia Model*, vol. 101, núm. 6, pp. 696–709, 2011.
- [2] F. Galvis y M. Carrillo, "Información Tecnológica", *Identificación Caracterización Mol. Aisl. Burkholderia Glumae Agente Causante Añublo Bact. En El Cultivo Arroz*, vol. 26, núm. 3, pp. 33–40, 2015.
- [3] INEC, "Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua-ESPAC". 2014.
- [4] F. Ross, "Identificación de microorganismos asociados al manchado y vaneamiento de la panícula del arroz en zonas productoras de Guayas y Los Ríos.", Pregrado, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayas-Ecuador, 2014.
- [5] ANAR, "Colombia: Producto biológico controla enfermedad que afecta al arroz". 2013.
- [6] I. Callejas, "Situación actual de Burkholderia glumae causante del añublo bacterial de la panícula del arroz en San Marcos Sucre.", 2011.
- [7] C. Riera-Ruiz, J. Varga, C. Cedeño, P. Quirola, M. Escobar, J. Cevallos-Cevallos, E. Peralta, y M. Ratti, "The American Phytopathological Society", *First Rep. Burkholderia Glumae Causing Bact. Panicle Blight Rice Ecuad.*, vol. 98, núm. 7, p. 988, 2014.
- [8] FAO, *Semillas de calidad declarada: Directrices técnicas sobre normas y procedimientos*. Roma, 1995.
- [9] B. Moreno, "Rendimientos del arroz en el Ecuador primer cuatrimestre del 2014 (Marzo - Junio)". MAGAP, 2014.
- [10] C. Moquete, *Guía Técnica El Cultivo de Arroz*. Santo Domingo, República Dominicana: CEDAF, 2010.
- [11] INTA, "¿Cuáles son las fases y/o etapas fenológicas de las variedades utilizadas para autoconsumo?", *Plataforma de Tecnología, Información y Comunicación Agropecuaria y Rural-PLATICAR*, 2014. [En línea]. Disponible en: <http://www.platicar.go.cr/preguntas-frecuentes/cultivos/28-arroz/223-icuales-son-las-fases-yo-etapas-fenologicas-de-las-variedades-utilizadas-para-autoconsumo>.
- [12] M. Andrade, "Efecto de la aplicación de Manganeso y Boro sobre la severidad del ataque del ácaro (*Steneotarsonemus spinki* Smiley) y la bacteria (*Burkholderia glumae*) en el cultivo del arroz", Pregrado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Bogotá, 2011.
- [13] L. Gañán, "Revista Agronomía", *Manejo Integrado Añublo Bact. Panícula Arroz Oryza Sativa Causado Por Burkholderia Glumae Kurita Tabei Una Revisión*, vol. 19, núm. 2, pp. 79–90, 2011.
- [14] El Universo, "Enfermedades en arroz afectan hasta 26% de producción." diciembre-2014.

- [15] M. Intriago, B. García, y G. Peláez, "Principales enfermedades del cultivo de arroz en el Ecuador y su manejo". Ministerio de Agricultura y Ganadería-CIAT-INIAP-PROTECNA-PNAR, 1991.
- [16] R. Ferrucho, A. González, H. Ortiz, V. Rodríguez, N. López, M. Rivero, J. Alarcón, y L. Castañeda, "Pathogens Associated to Rice in Colombia". ICA, 2015.
- [17] D. Pedraza, "Estado del arte *Burkholderia glumae* como patógeno de cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.)", Pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2012.
- [18] R. Nandakumar, A. Shahjahan, X. Yuan, E. Dickstein, D. Groth, C. Clark, R. Cartwright, y M. Rush, "The American Phytopathological Society", *Burkholderia Glumae B Gladioli Cause Bact. Panicle Blight Rice South. U. S.*, vol. 93, núm. 9, pp. 896–905, 2009.
- [19] C. Riera-Ruiz, J. Vargas, J. Cevallos-Cevallos, M. Ratti, y E. Peralta, "The American Phytopathological Society", *First Rep. Bact. Panicle Blight Rice Caused Burkholderia Gladioli Ecuad.*, vol. 98, núm. 11, p. 1577, 2014.
- [20] MAGAP, "Boletín situacional del arroz 2013". 2013.
- [21] R. Ortega, *Manual para la producción de semillas de arroz.*, Primera. México: SAGARPA INIFAP-CIRPAC, 2014.
- [22] Marcelo Castro, "Rendimientos de arroz en cáscara primer cuatrimestre 2016". MAGAP, 2016.
- [23] Álvaro Cevallos, "COMPORTAMIENTO DE CINCO GENOTIPOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EN COMPARACIÓN CON SEIS VARIEDADES COMERCIALES EN LA ZONA DE TAURA, CANTON NARANJAL, PROVINCIA DEL GUAYAS", Pregrado, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, 2016.
- [24] A. Cevallos, "Comportamiento de cinco genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) en comparación con seis variedades comerciales en la zona de Taura, cantón Naranjal, provincia del Guayas.", Pregrado, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, 2016.
- [25] INDIA-PRONACA, "Semillas de Arroz". 2013.
- [26] SNI, "Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Montalvo.", *Sistema Nacional de Información*, 2014. [En línea]. Disponible en: http://app.sni.gob.ec/visorseguimiento/DescargaGAD/data/sigadplusdiagnostico/1260000490001_PDYOT%20MONTALVO%20CONSOLIDADO%202014_16-03-2015_18-16-06.pdf.
- [27] SAGARPA, "Manual técnico de muestreo de productos agrícolas y fuentes de agua para la detección de organismos patógenos.", *Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Jalisco A.C.*, 2014. [En línea]. Disponible en: <http://www.cesavejal.org.mx/divulgacion/Manual%20Digital%202014/17%20MANUALTECNICODEMUESTREODEPRODUCTOSAGRICOLASYFUENTESDEAGUA.pdf>.

- [28] C. Sotelo, "Identificación molecular de *Burkholderia glumae*, causante del añublo bacterial, en cinco zonas arroceras de Nicaragua", Pregrado, Universidad Nacional Agraria, Managua-Nicaragua, 2014.
- [29] A. Rojas-Triviño, "Conceptos y práctica de microbiología general". Universidad Nacional De Colombia, 2011.
- [30] A. Quesada y F. García, "Agronomía Mesoamericana", *Burkholderia Glumae En El Cultivo Arroz En Costa Rica*, vol. 25, núm. 2, pp. 371–338, 2014.
- [31] J. Ham, R. Melanson, y M. Rush, "Molecular Plant Patology", *Burkholderia Glumae Major Pathog. Rice*, vol. 12, núm. 4, pp. 329–339, 2011.
- [32] N. Shaad, J. Jones, y W. Chun, *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3a ed. Minnesota: APS PRESS, 2013.
- [33] A. Perez, C. Perez, y L. Chamorro, "Revista Colombiana de Ciencia Animal", *Divers. Bact. Endófitas Asoc. Cultivo Arroz En El Dep. Córdoba-Colomb. Estud. Prelim.*, vol. 5, núm. 1, pp. 89–92, 2013.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Fase de campo



Foto 1. Muestreo de tallos de arroz en Montalvo



Foto 2. Muestras de tallos de arroz en E1, E2 y E3.

APÉNDICE B

Fase de laboratorio



Foto 3. Preparación y selección del material a sembrar de las tres etapas de formación del grano.

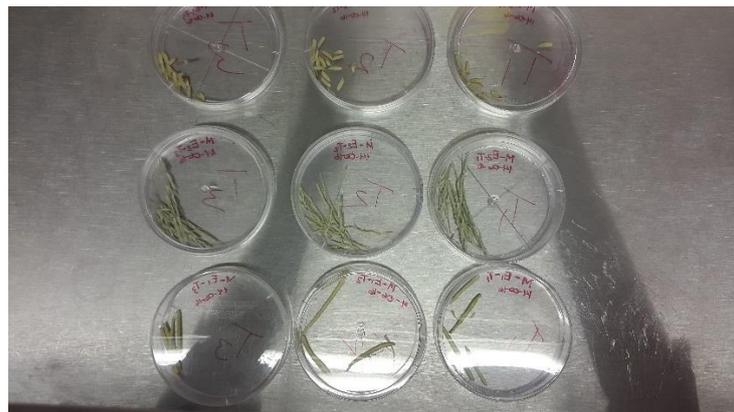


Foto 4. Panículas y granos de arroz en las tres etapas de formación del grano.

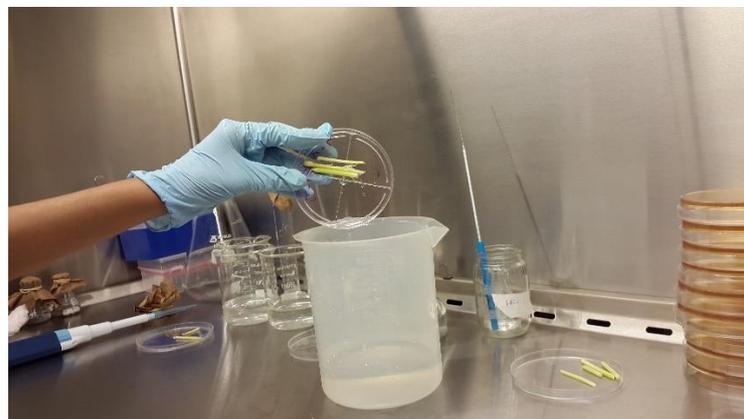


Foto 5. Lavado y desinfección del tejido.



Foto 6. Macerado del tejido.



Foto 7. Siembra del tejido en medio de cultivo selectivo.

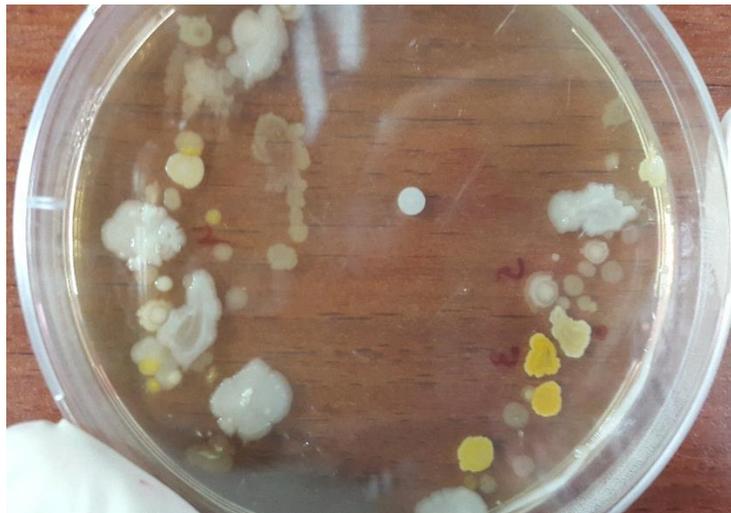


Foto 8. Crecimiento de colonias bacterianas



Foto 9. Purificación de colonias bacterianas



Foto 10. Prueba bioquímica: Tinción de Gram



Foto 11. Prueba bioquímica: Hidrólisis del almidón