



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

*“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”*

TRABAJO DE GRADUACIÓN

**Identificación molecular de
Burkholderia glumae, causante del
añublo bacterial, en cinco zonas
arroceras de Nicaragua**

Autor

Br. Cairo José Sotelo Niño

Asesores

Dr. Jorge A. Huete Pérez

Dr. Guillermo Reyes Castro

Managua, Nicaragua

Agosto 2014

ÍNDICE DE CONTENIDO

| SECCIÓN | PÁGINA |
|--|--------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| ÍNDICE DE CUADROS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| ÍNDICE DE ANEXOS | v |
| RESUMEN | vi |
| ABSTRACT | vii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. OBJETIVOS | 3 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 4 |
| 3.1. Localización del estudio | 5 |
| 3.2. Muestreo y traslado de muestras al laboratorio | 5 |
| 3.3. Fase de laboratorio | 6 |
| 3.3.1. Extracción de ADN genómico de panículas de plantas de arroz | 6 |
| 3.3.2. Amplificación por la técnica de PCR convencional | 7 |
| 3.3.3. Amplificación mediante PCR Tiempo Real | 8 |
| 3.4. Aislamiento de colonias bacterianas seleccionadas | 8 |
| 3.4.1. Colonias bacterianas y condiciones de crecimiento | 8 |
| 3.4.2. Selección y aislamiento de colonias bacterianas | 9 |
| 3.4.3. Extracción de ADN de las colonias aisladas | 9 |
| 3.4.4. Amplificación por PCR de colonias aisladas | 10 |
| 3.5. Almacenamiento de colonias bacterianas | 10 |
| 3.6. Secuenciación | 10 |
| 3.6.1. Purificación del producto de PCR | 11 |
| 3.6.2. Ciclo de secuenciación | 11 |
| 3.6.3. Análisis de las secuencias | 11 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 12 |
| V. CONCLUSIONES | 19 |
| VI. RECOMENDACIONES | 20 |
| VII. LITERATURA CITADA | 21 |
| VIII. ANEXOS | 23 |

DEDICATORIA

A mis padres, por ser los principales autores de mi formación como persona y como profesional, gracias a su apoyo incondicional he logrado las metas propuestas.

A mis hermanos, quienes me han ayudado en todos los momentos a lo largo de mi vida.

A mi hijo, por ser la motivación de cada día a seguir adelante y ser mejor en todos los aspectos.

A todas las personas que de una u otra forma han sido parte de mi vida y me han enseñado a valorar todas las cosas.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Jorge A. Huete Pérez**, director del Centro de Biología Molecular, por su apoyo y recomendaciones, las cuales hicieron posible esta investigación.

Al **Dr. Guillermo Reyes Castro**, por ser mi profesor, tutor de tesis y estar siempre apoyándome y aconsejándome en la elaboración de este trabajo.

A mis padres, **Asdrúbal Sotelo** y **Mirna Niño** por ser los tutores de mi vida y enseñarme a alcanzar las metas por muy difíciles que sean.

A la **Universidad Nacional Agraria** por ser mí segundo hogar en esos cinco años de formación profesional.

A mis colegas del **CBM-UCA**, **Julio**, **Suyen**, **Lucía** y **Ana**, por apoyarme y darme ánimos siempre en momentos de dificultades.

A **FORMUNICA**, por su aporte económico para la realización de esta investigación.

Al **Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA)** por su apoyo logístico en los muestreos de las zonas de estudio.

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Contenido | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Nombre y secuencia de cebadores específicos de <i>Burkholderia glumae</i> | 7 |
| 2 | Concentraciones y volúmenes requeridos para la preparación de solución madre de PCR | 7 |
| 3 | Cantidades necesarias para preparar 250 ml de medio de cultivo | 9 |
| 4 | Total de muestras colectadas por variedad en las principales zonas arroceras de Nicaragua. | 12 |
| 5 | Resultados positivos obtenidos por cada zona de muestreo. | 14 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Contenido | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Esquema de trabajo con metodología empleada | 4 |
| 2 | Muestras etiquetadas y almacenadas en el laboratorio | 6 |
| 3 | Colonias de <i>Burkholderia glumae</i> aisladas, tomado de manual de diagnóstico convencional de <i>Burkholderia glumae</i> (CIAT, 2010) | 9 |
| 4 | Muestras geoposicionadas utilizando software ArcGIS 10.1. | 12 |
| 5 | Revisión de ADN genómico aislado de panículas de arroz del muestreo en Sébaco. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. | 13 |
| 6 | PCR utilizando cebadores 2BglF y 2BglR en gel de agarosa al 1%. | 13 |
| 7 | Resultados por variedad muestreada. | 14 |
| 8 | Curvas de amplificación en tiempo real de muestras de Boaco. | 15 |
| 9 | Colonias características de <i>Burkholderia glumae</i> en medio LB. | 15 |
| 10 | PCR de colonias aisladas de <i>Burkholderia glumae</i> en gel de agarosa al 1%. | 16 |
| 11 | Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml con 300 µl de glicerol y cepas de <i>Burkholderia glumae</i> . | 16 |
| 12 | Fragmento de aproximadamente 100 bases obtenidas del secuenciador genético ABI 3130. | 17 |
| 13 | BLAST de secuencia donde nos presenta la similitud de la secuencia obtenida anteriormente con una identidad del 98% con la cepa BGR1. | 18 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| Anexo | Contenido | Página |
|--------------|---|---------------|
| 1 | Descripción de variedades muestreadas. | 23 |
| 2 | Amplificación de 282 pb de muestras recolectadas en las zonas de León y Chinandega. | 23 |
| 3 | Marcador 100 pares de bases visualizado por tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1.3%. | 23 |
| 4 | Amplificación de 282 pb de muestras 1-38 recolectadas en Sébaco, en geles de agarosa al 1%. | 24 |

RESUMEN

De octubre-diciembre 2012 se realizó el diagnóstico molecular de la bacteria causante del añublo bacterial (*Burkholderia glumae*) en cinco zonas arroceras de Nicaragua: Sébaco, Malacatoya, Boaco, León y Chinandega. Se colectaron 133 muestras en las zonas de estudio, con el fin de aislar e identificar las cepas de *Burkholderia glumae*. Todas las muestras fueron procesadas en el Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana. Se estandarizó y optimizó la prueba de PCR, para la identificación de la bacteria se amplificó un fragmento de 282 pares de bases de la región 16S de ADN ribosomal. 74% de las muestras resultaron positivas. La bacteria está presente en las zonas de estudio. Se realizaron aislamientos de colonias para su posterior identificación mediante la técnica de secuenciación. La cepa BGR1 está presente en las zonas evaluadas. Se requiere monitorear *Burkholderia glumae* en ambas épocas de siembra para llevar un registro de daños y la identificación de diferentes cepas.

Palabras clave: *Burkholderia glumae*, ADN, PCR, diagnóstico, arroz, *Oryza sativa*.

ABSTRACT

From October to December 2012 the molecular diagnosis of the bacterium that causes bacterial blight (*Burkholderia glumae*) was performed in five rice-growing areas of Nicaragua: Sébaco Malacatoya Boaco, Leon and Chinandega. 133 samples were collected in the study areas, in order to isolate and identify strains of *Burkholderia glumae*. All samples were processed at the Center for Molecular Biology of the Universidad Centroamericana (CBM-UCA). Standardization and optimization of PCR test for identification of bacteria was done. A fragment 282 bp region of the 16S ribosomal DNA was amplified. A total of 74% of the samples were positive. The bacterium is present in the study areas. Colony isolations were performed for identification by sequencing technique. The BGR1 strain is present in the areas evaluated. *Burkholderia glumae* oversight is required in both planting dates to keep track of damage and identification of different strains. PCR technique allows a rapid and safe analysis of the samples, which facilitates decision-making for the control of bacteria. It is the first time to do a sampling in Nicaragua on molecular identification of the bacterial panicle blight in rice growing areas.

Keywords: *Burkholderia glumae*, DNA, PCR, diagnostic, rice, *Oryza sativa*.

I. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa*) es el principal cereal utilizado como fuente de alimentación, más del 50% de la población a nivel mundial se beneficia de este producto. Centroamérica produce 0.45% de la producción mundial de arroz (2.7 millones de toneladas en 2004), este nivel ha sido estable desde 1996. Los principales productores son Costa Rica (27% de la producción de la región), Nicaragua (29.4%) y Panamá (31.0%) (Rivas, 2008).

Las enfermedades constituyen una limitante en el cultivo de arroz. Las más relevantes son las causadas por bacterias que hasta hace un tiempo presentaban poca importancia. El añublo bacteriano de la panícula del arroz, causada por *Burkholderia glumae*, ha aumentado su incidencia en los últimos años (Pérez y Saavedra, 2011).

El género *Burkholderia* es un importante componente de la comunidad microbiana. Se reportan más de 30 especies ocupando diferentes nichos ecológicos, que se pueden presentar en el suelo, agua, plantas, animales y humanos. Este género es de amplia distribución y se registran especies patogénicas en control biológico de hongos, biorremediación y promotoras del desarrollo de plantas (FLAR, 2010).

Cinco especies de este género han sido reportadas como bacterias patogénicas en plantas de importancia económica: *Burkholderia caryophylli* (Yabuuchi *et al.*, 1992); *Burkholderia plantarii* (Urakami *et al.*, 1994); *Burkholderia andropogonis* (Gillis *et al.*, 1995); *Burkholderia gladioli* (Yabuuchi *et al.*, 1992) y *Burkholderia glumae* (Urakami *et al.*, 1994). Se han formulado hipótesis sobre el brote de la bacteria en muchos países de Centroamérica y del Caribe, como reciente aparición de cepas agresivas, y la presencia de condiciones para el desarrollo de la enfermedad debidas al cambio climático. *Burkholderia glumae* es una bacteria gram negativa, aeróbica y mesófila. Los aislamientos de la bacteria no son fluorescentes pero producen pigmentación sobre el medio de cultivo. Las colonias bacterianas son de crecimiento lento, circulares, elevadas y con márgenes lisos. La bacteria es productora de una fitotoxina llamada toxoflavina, que causa taponamiento de los haces vasculares de la planta y es sintetizada por la bacteria a temperaturas de 30 a 37°C.

Según el CIAT (2010) el añublo bacteriano de la panícula del arroz es una enfermedad que causa pudrición en granos y panículas de arroz. Los síntomas de la enfermedad se pueden presentar en las plántulas, la vaina de la hoja bandera y en las panículas. Las espiguillas afectadas tienen color marrón, de grano vano y causan decoloración y pudrición. La enfermedad se puede transmitir de forma directa a través de semillas, lotes infectados y malezas hospederas. La bacteria puede entrar

a la planta a través de los estomas y empieza a multiplicarse en los espacios intermoleculares del parénquima.

Esta enfermedad es considerada la de mayor importancia, no sólo por las pérdidas económicas ocasionadas en el cultivo, sino también, por su difícil control y manejo en campo (Pérez y Saavedra, 2011). Se han reportado daños causados por la bacteria en el sureste asiático, especialmente en Japón, Corea y Taiwán. Desde 1995, se ha registrado presencia de la bacteria en el estado de Louisiana y en otros lugares donde se produce arroz en los Estados Unidos de América (Pérez *et al.*, 2008; Callejas, 2011).

En 2005 la bacteria se reportó en Panamá, Cuba, República Dominicana, luego en 2007 en Colombia y en 2009 en Nicaragua (Correa, *et al.*, 2007). En 2010 la Asociación Nacional de Arroceros de Nicaragua (ANAR), advirtió la presencia de la bacteria en sus campos arroceros y expresaron su preocupación por los bajos rendimientos reportados en algunas zonas arroceras.

La identificación adecuada de microorganismos patógenos asociada al cultivo de arroz es importante en la implementación de estrategias para el manejo y el control de enfermedades, se requiere entonces, la caracterización fenotípica y genética de los patógenos de plantas persistentes en un área determinada. El método tradicional de identificación de bacterias se basa en características fenotípicas (pruebas bioquímicas, producción de pigmento, fisiología y morfología de las colonias), cuya determinación requiere un tiempo considerable, además, la interpretación de los resultados exige experiencia y está limitada por la baja especificidad y los riesgos de la subjetividad.

Por consiguiente, se hace necesario el desarrollo de una prueba rápida, sensible y específica para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Para este estudio se estandarizó y optimizó la técnica Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) para la identificación de *Burkholderia glumae* en arroz, usando los cebadores específicos, lo cual permite una alta sensibilidad y especificidad contribuyendo así a determinar medidas de manejo más adecuadas que contrarresten esta enfermedad.

En Nicaragua se conoce de afectaciones causadas por la bacteria, sin embargo no se ha estudiado su distribución y pérdidas económicas. Tampoco existen reportes de las cepas que atacan las diferentes zonas arroceras. En el presente estudio se desarrolla el procedimiento para el diagnóstico molecular y la identificación específica de las cepas que causan la enfermedad, todo con el propósito de facilitar la toma medidas de control que disminuyan la diseminación de la bacteria.

II. OBJETIVOS

General

Identificar molecularmente *Burkholderia glumae*, causante del añublo bacterial, en una finca en cada zona de los municipios de Malacatoya, Sébaco, Boaco, León y Chinandega.

Específicos

- Determinar la presencia o ausencia de la bacteria en panículas de plantas de arroz a nivel molecular.
- Aislar e identificar la bacteria de las muestras obtenidas para contar con material de referencia.
- Identificar las cepas de *Burkholderia glumae* que se encuentren en las zonas muestreadas a través de la secuenciación del gen 16S.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso general de trabajo que se realizó en el estudio se esquematiza en la Figura 1.

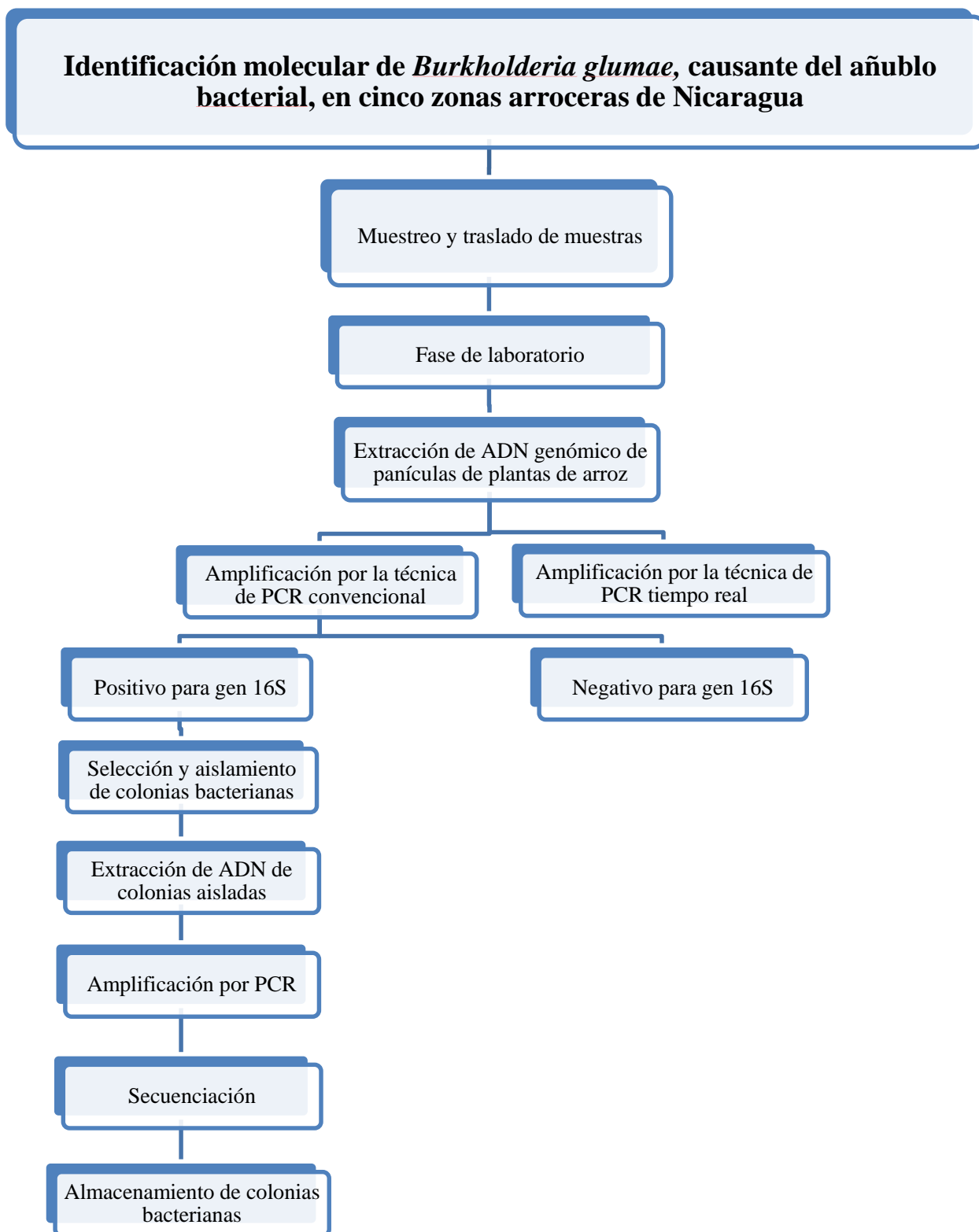


Figura 1. Esquema de trabajo con metodología empleada.

3.1. Localización del estudio.

El presente estudio se realizó en dos etapas: a) la recolección de muestras en las áreas de estudio; y b) trabajo de laboratorio en el Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana (CBM-UCA).

Los muestreos de campo se realizaron en conjunto con autoridades del Ministerio de Agricultura (MAG), en una finca en cada una de las siguientes localidades:

- Municipio de Malacatoya, departamento de Granada. Ubicado en las coordenadas 12° 09' latitud norte y 85° 50' longitud oeste, con una altitud aproximada de 80 msnm (NGA, 2013).
- Municipio de Sébaco, departamento de Matagalpa. Ubicado en las coordenadas 12° 51' latitud norte y 86° 06' de longitud oeste, con una altitud aproximada de 460 msnm (INIFOM, 2001).
- Municipio de Boaco. Departamento de Boaco. Ubicado en las coordenadas 12° 28' latitud norte y 85° 39' longitud oeste, con una altitud aproximada de 360 msnm (INIFOM, 2001).
- Municipio de León, Departamento de León. Ubicado en las coordenadas 12° 26' latitud norte y 86° 53' longitud oeste, con una altitud aproximada de 110 msnm (INIFOM, 2001).
- Municipio de Chinandega, Departamento de Chinandega. Ubicado en las coordenadas 12° 37' de latitud norte y 87° 07' de longitud oeste, con una altitud aproximada de 71 msnm (INIFOM, 2001).

3.2. Muestreo y traslado de muestras al laboratorio.

Se realizaron colectas de muestras en el periodo de octubre-diciembre del 2012. Se llevó un registro de muestras por cada área de estudio y con la ayuda de GPS (siglas en inglés de Global Positioning System) se anotaron las coordenadas UTM, para luego ser procesadas mediante el programa ArcGIS 10.1.

Se colectaron panículas de arroz de inundación en fase vegetativa de 100 a 120 días en plantas que presentaban los síntomas del ataque de la bacteria. Se cortaron con tijeras de jardinería, previamente desinfectadas con alcohol 70% y luego de cada corte para evitar contaminación entre las muestras. El 88 % de las muestras están distribuidas entre las variedades de INTA Dorado, ANAR 97 y Palo 2. Las muestras fueron almacenadas en bolsas de polietileno de 1 galón (26.8 cm x 27.3 cm), etiquetadas de acuerdo a la localidad y posteriormente trasladadas al laboratorio y almacenadas en refrigerador a temperatura de 4°C (Figura 2).



Figura 2. Muestras etiquetadas y almacenadas en el laboratorio.

3.3. Fase de laboratorio.

La bacteria se aisló partir de semillas de panículas con síntomas de la enfermedad. Se extrajo ADN ribosomal a partir de colonias bacterianas y de las semillas de panículas. Se realizó PCR convencional con el ADN de las 133 muestras y PCR Tiempo real de la zona de Boaco. Se seleccionaron 8 muestras distribuidas en las cinco zonas de estudio para secuenciación de un fragmento del gen 16S.

3.3.1. Extracción de ADN genómico de panículas de plantas de arroz.

Para la extracción de ADN de semillas de las panículas de plantas de arroz se siguió el protocolo de extracción sugerido por PROMEGA, utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification, con algunas modificaciones.

1. Macerar con mortero y pistilo la muestra a procesar hasta que la semilla este finamente macerada.
2. Depositar en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, 20 mg del tejido macerado.
3. Agregar 300 μ l del buffer de lisis (Nuclei lysis) y mezclar mediante vortex aproximadamente 5 segundos.
4. Incubar a 65 °C por 15 minutos en baño maría.
5. Dejar enfriar la muestra por cinco minutos a temperatura ambiente y adicionar 100 μ l de solución para precipitación de proteínas (Protein precipitation solution) y homogenizar la muestra mediante vortex por 20 segundos.
6. Centrifugar por 3 minutos a 13,000 rpm.
7. Trasladar aproximadamente el 70% del sobrenadante a un tubo nuevo que contenga 300 μ l de isopropanol.

8. Cuidadosamente mezclar la solución invirtiendo los tubos, centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto.
9. Descartar el sobrenadante cuidadosamente y agregar 300 µl de etanol a temperatura ambiente, centrifugar a 13,000 rpm por un minuto.
10. Descartar el etanol con mucho cuidado de no desechar el pellet de ADN e invertir los tubos en papel absorbente y dejar secar por aproximadamente 15 minutos.
11. Agregar 50 µl de solución de rehidratación de ADN e incubar en baño maría por una hora.
12. Almacenar el ADN a temperatura de 2-8 °C.

Para comprobar la calidad del ADN obtenido se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M). El ADN se tiñó con bromuro de etidio. Como referencia se utilizó un marcador molecular de 100 pb (NEB), luego el gel se visualizó y fotografió en un transluminador de luz ultravioleta.

3.3.2. Amplificación por la técnica de PCR convencional.

Para la detección específica de *Burkholderia glumae* mediante PCR se usan cebadores específicos de las regiones espaciadoras 16S-23S del ADN ribosomal. Los cebadores específicos diseñados por Saylor *et al.* (2006), amplifican una banda de 286 pares de bases (Cuadro 1 y Cuadro 2).

Cuadro 1. Nombre y secuencia de cebadores específicos de *Burkholderia glumae*.

| Nombre | Secuencia | Producto esperado (pares de bases) | Patógeno |
|--------|------------------------------|------------------------------------|------------------|
| 2BglF | 5'-ACGTTTCAGGGATRCTGAGCAG-3' | 286 | <i>B. glumae</i> |
| 2BglR | 5'-AGTCTGTCTCGCTCTCCCGA-3' | 286 | <i>B. glumae</i> |

Cuadro 2. Concentraciones y volúmenes requeridos para la preparación de solución madre de PCR.

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Reacción x 1 muestra (20 µl) |
|------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|
| 2 BglF | 10 µM | 0.5 µM | 1 |
| 2BglR | 10 µM | 0.5 µM | 1 |
| Phusion Master Mix | 2x | 1x | 10 |
| Agua destilada estéril | - | - | 7 |
| ADN | - | - | 1 |

Para la amplificación se utilizó un termociclador ABI 2720, programado para desnaturalización inicial a 98 °C por 30 segundos, seguido de 25 ciclos que comprenden:

- Desnaturalización a 98 °C por 5 segundos.
- Hibridación a 65 °C por 15 segundos.

- Elongación a 72 °C por 30 segundos, con una extensión final de 72 °C por 3 minutos.

Los productos de PCR se revisaron en geles de agarosa al 1.2% en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X y luego se tiñeron con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de 100 pb (NEB) para comparar el tamaño del producto esperado, luego se visualizó en transluminador de luz ultravioleta y fueron fotografiados los resultados de todas las muestras.

3.3.3. Amplificación mediante PCR tiempo real.

La identificación específica de *Burkholderia glumae* mediante PCR tiempo real está basada en el uso de los primers específicos 2BglF y 2BglR diseñados por *Sayler et., al* (2006). Debido al alto costo de los reactivos para la amplificación mediante PCR tiempo real, se decidió emplear esta técnica solamente para las muestras de Boaco.

Para la amplificación de los fragmentos se utilizó un termociclador MJ Mini de BIO-RAD, siguiendo el protocolo de *Sayler et al.,* (2006). Con algunas modificaciones. 95 °C desnaturalización inicial por 15 minutos, seguido de 40 ciclos que comprenden.

- Desnaturalización a 95 °C por 15 segundos
- Hibridación a 60 °C por 30 segundos.
- Elongación a 72 °C por 15 segundos.

La mezcla madre de PCR consistía de 12.5 µL iQ™ SYBR® Green Supermix 2x, 1 µL de 2BglF (5 µM), 1 µL de 2BglR (5 µM), 1µL de ADN y 4.5 µL de agua destilada estéril. Los productos de PCR fueron analizados con el programa Bio-Rad CFX Manager 2.1 (Bio-Rad laboratories, 2008).

3.4. Aislamientos de colonias bacterianas seleccionadas.

Para el aislamiento de colonias se siguieron los pasos del manual de diagnóstico convencional de *Burkholderia glumae* del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 2010).

- Se seleccionaron semillas de muestras que presentaban los síntomas de la bacteria.
- Se trasladaron a mortero para macerar con agua estéril
- Se trasladó el macerado a tubos de 15 ml para realizar diluciones a partir de 10⁻¹⁰, el volumen inicial que se utilizó fue de 9 ml para 10⁻¹⁰ y luego se trasladó 1 ml para las demás diluciones.

3.4.1. Colonias bacterianas y condiciones de crecimiento.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las colonias bacterianas de *Burkholderia glumae* fue el LB agar Miller (cloruro de sodio 10 g, triptona de soya 10 g y extracto de levadura 5 g, por litro de medio preparado) (SIGMA, Estados Unidos). Como agente gelificante se usó Select Agar (Gibco BRL, Escocia) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cantidades necesarias para preparar 250 ml de medio de cultivo.

| Componente | Cantidad |
|-------------------------------|-----------------|
| LB agar | 6.25 (g) |
| Agar-agar | 5 (g) |
| Agua destilada o des ionizada | Hasta 250 ml |
| Total | 250 ml |

A partir de la solución de 250 ml se sembraron 25 µl de las diluciones en platos Petri y se homogenizó usando un rotor y asas de Drigalski, se incubó a 27 °C por 48 horas.

3.4.2. Selección y aislamiento de colonias bacterianas.

Se seleccionaron siete colonias en base a las descripciones morfológicas descritas en el manual de identificación de *Burkholderia glumae* realizado por el CIAT. Posteriormente se realizó extracción de ADN seguido de PCR (Figura 3).

Se seleccionaron las colonias con las siguientes características:

- a. Cremas pigmentadas.
- b. Cremas translucidas con o sin halo.
- c. Cremas opacas con y sin halo.

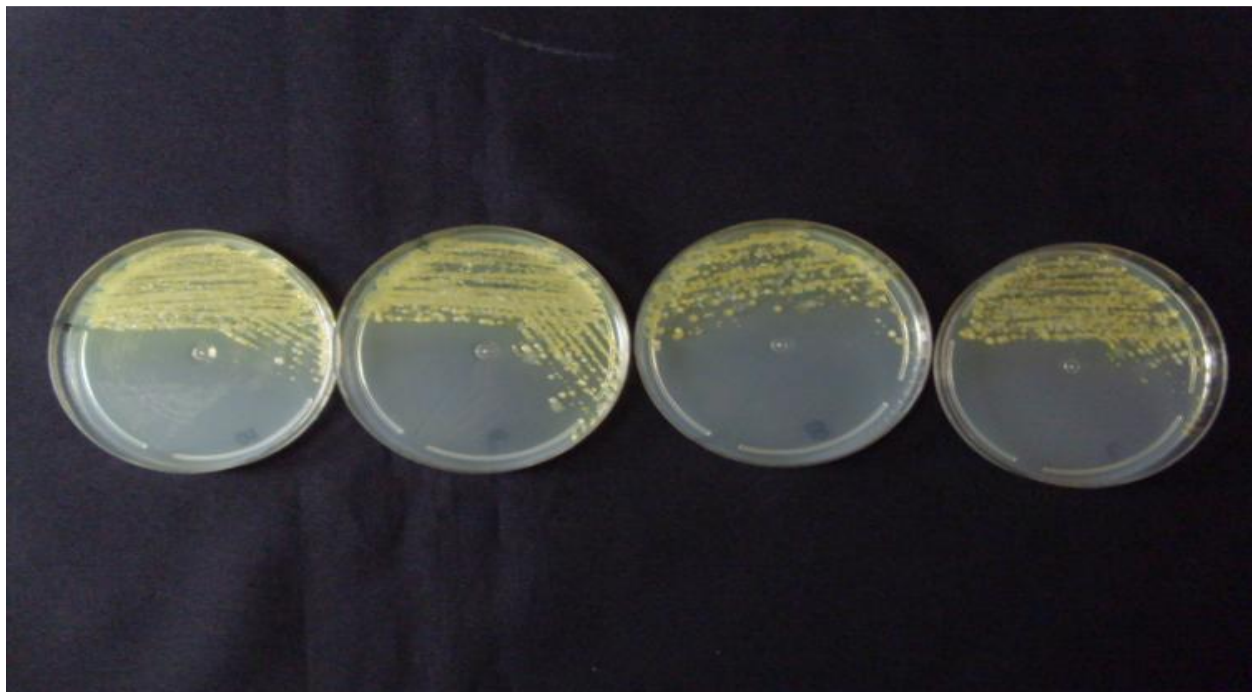


Figura 3. Colonias de *Burkholderia glumae* aisladas, tomado de manual de diagnóstico convencional de *Burkholderia glumae* (CIAT, 2010).

3.4.3. Extracción de ADN de las colonias aisladas

Luego de seleccionar las colonias bacterianas se realizó extracción de ADN utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de PROMEGA, se siguieron los siguientes pasos para la extracción de ADN:

- Se seleccionaron cinco colonias por cada plato Petri que tuvieran las mismas características a las publicadas por el manual de diagnóstico convencional del CIAT.
- Con una punta de pipeta estéril se colocaron estas colonias en un tubo de 1.5 ml.
- Se agregó 300 µl de solución de lisis a cada uno de los tubos de 1.5 ml.
- Se incubó en baño maría por 15 minutos a 65 °C.
- Se agregó 100 µl de solución de precipitación y se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos.
- Con una pipeta se trasladó el sobrenadante a tubos nuevos de 1.5 ml, conteniendo 300 µl de isopropanol.
- Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto.
- Se desechó el sobrenadante y se agregó 300 µl de etanol a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto.
- Se desechó el sobrenadante con cuidado de no perder pellet de ADN.
- Se invirtieron los tubos en papel absorbente y se dejaron secar por 15 minutos.
- Se agregó 50 µl de solución de rehidratación de ADN y se incubó en baño maría a 65 °C por una hora.
- Se almacenó ADN a temperatura de 2-8 °C.

3.4.4. Amplificación por PCR de colonias aisladas.

La amplificación de ADN extraído de las colonias aisladas se realizó mediante los mismos procedimientos de amplificación y chequeo de ADN a partir de las panículas de arroz mencionadas anteriormente.

3.5. Almacenamiento de colonias bacterianas.

Las colonias bacterianas aisladas fueron almacenadas con el propósito de futuros usos, las bacterias fueron cultivadas en medio sólido por 24 horas. Luego se re-suspendieron en 1 ml de medio LB líquido estéril y se transfirió a un tubo de microcentrifugación de 1.5 ml, a esto se le agregó 300 µL de glicerol estéril y se mezcló en vórtex por 1 minuto para homogenizar la solución, luego fueron rotuladas y almacenadas a -80 °C.

3.6. Secuenciación

Debido a los altos costos de la técnica de secuenciación, se seleccionaron ocho muestras de las cuatro zonas de estudio se seleccionaron para la secuenciación. Las muestras fueron secuenciadas

a partir del producto de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el kit Big Dye Terminator 3.1 (ABI), con algunas modificaciones.

3.6.1. Purificación del producto PCR.

Para la purificación, se agregó de 4 μL de ExoAP a 10 μL de producto de PCR, para la preparación de 50 μL de mezcla ExoAP se utilizó: 34 μL de agua destilada, 5 μL de buffer ExoAP, 1 μL de Exonucleasa I (New England Biolabs), 10 μL de fosfatasa antártica (New England Biolabs). Luego se preparó un programa en el termociclador a 37 °C por una hora, seguido de 15 minutos a 85 °C.

3.6.2. Ciclos de secuenciación

A las muestras producto de PCR se les realizó varios ciclos de secuenciación siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: 3 μL de Big Dye Terminator (mezcla de polimerasa y dideoxinucleótidos fluorescentes), 0.8 μL de primer (40 Mm), 3.7 μL de agua destilada, a estos 7.5 μL de mezcla se les agregó 2.5 μL del producto purificado y se preparó en el termociclador un programa con las siguientes condiciones de temperatura: desnaturalización inicial 96 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C por 10 segundos, hibridación a 50 °C por 5 segundos, elongación a 60 °C por 2 minutos, a una temperatura de almacenaje de 4°C.

Las reacciones producto de los ciclos de secuenciación se purificaron utilizando un protocolo estándar Etanol/Acetato de amonio que consiste en añadir al producto 60 μL de acetato de amonio 7.5 M con etanol al 70 %. Se centrifugó durante 15 minutos a 11,000 rpm y se descartó el sobrenadante, luego se añadieron 500 μL de etanol al 70 %, se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm y nuevamente se descartó el sobrenadante, y se dejó secar el tubo.

Luego se re-suspendió el ADN en 10 μL de formamida y se colocó en una placa de secuenciación, se desnaturalizó por 5 minutos a 95 °C para luego ser cargadas en un analizador genético ABI 3130 siguiendo las instrucciones del fabricante.

Al igual que los reactivos para PCR tiempo real, los reactivos que involucra la técnica de secuenciación son de alto costo, para abarcar todas las localidades muestreadas se seleccionó una muestra por cada región.

3.6.3. Análisis de las secuencias

Los resultados obtenidos de secuenciación se analizaron con la herramienta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponible en el sitio web de NCBI (National Center for Biotechnology Information). El BLAST encuentra las regiones de similitudes entre las secuencias locales y las compara con secuencias existentes en bases de datos y calcula estadísticamente la significancia de las similitudes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron 133 muestras de panículas de arroz de las variedades INTA Dorado, Palo 2 y ANAR 97 provenientes de los cinco sitios de muestreo: Sébaco, Boaco, Malacatoya, León y Chinandega (Figura 4).

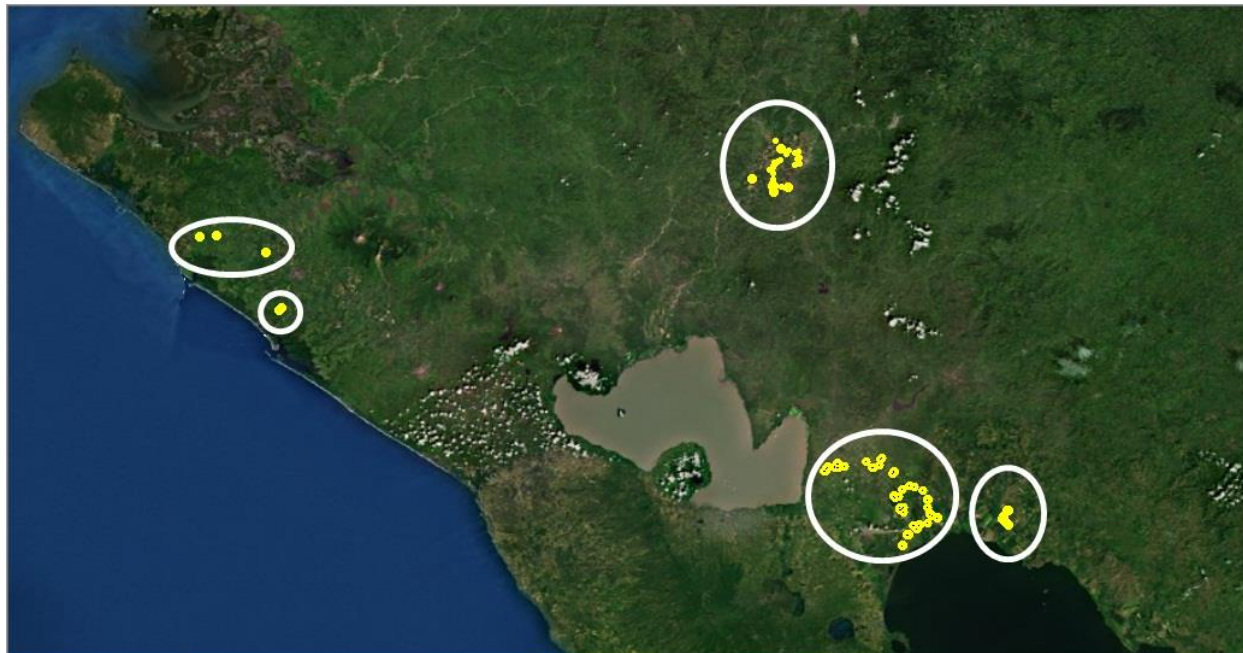


Figura 4. Muestras geoposicionadas utilizando software ArcGIS 10.1.

Se priorizaron las zonas de Sébaco y Malacatoya debido a que son las zonas con más extensión de cultivos de arroz. En el resto de las zonas de muestreo hubo menor cantidad de muestras debido a problemas logísticos y el difícil acceso en la época de invierno.

Las muestras fueron recolectadas en base a registros de pérdidas de producción de los productores en las zonas antes mencionadas.

Cuadro 4. Total de muestras colectadas por variedad en fincas de las localidades evaluadas.

| Variedad | Malacatoya | Sébaco | León | Chinandega | Boaco | Total |
|--|------------|-----------|----------|------------|----------|------------|
| ANAR 97 | 30 | 12 | 0 | 0 | 2 | 44 |
| Palo 2 | 13 | 12 | 0 | 0 | 1 | 26 |
| INTA Dorado | 10 | 17 | 1 | 0 | 0 | 28 |
| Otras (Línea 256, ANAR 2012, Línea 85, CFX 18) | 7 | 9 | 5 | 9 | 5 | 35 |
| Total | 60 | 50 | 6 | 9 | 8 | 133 |

Extracción de ADN

El ADN extraído fue de buena calidad, sin embargo en algunas muestras hubo degradación de ADN por el barrido presente en los agares. Esto pudo deberse al tiempo de almacenamiento de las muestras antes de la extracción de ADN o a la presencia de ARN después de la extracción. La calidad del ADN fue observada en geles de agarosa al 1% (Figura 5).

Se extrajo ADN a partir de las panículas de plantas con síntomas y de las colonias bacterianas. Cuando se extrae ADN genómico de la planta, también se extrae el ADN de la bacteria. El uso de oligonucleótidos específicos para la región 16S permite detectar la presencia de la bacteria mediante PCR.

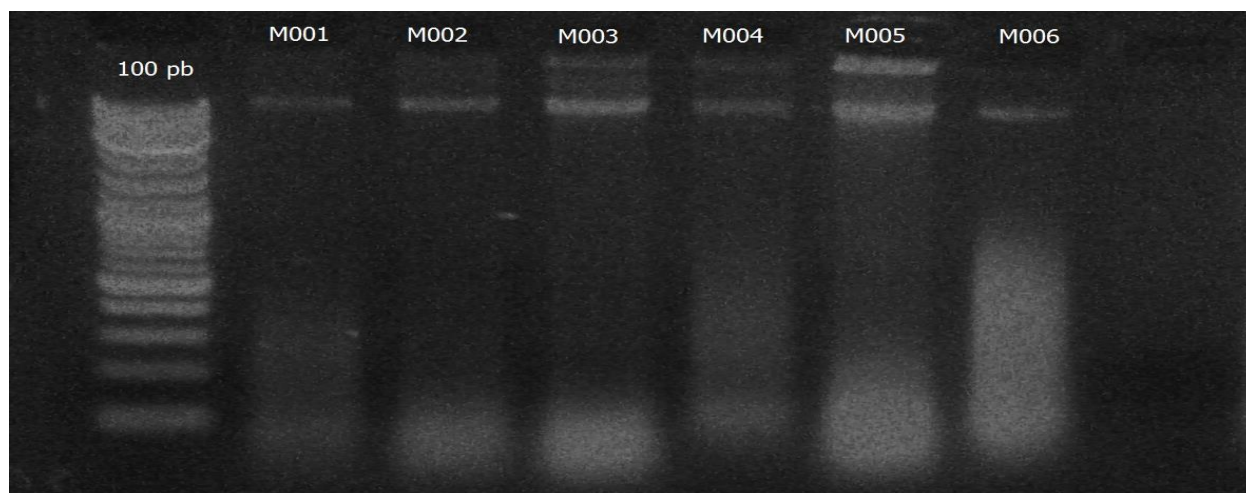


Figura 5. Revisión de ADN genómico aislado de panículas de arroz del muestreo en Sébaco. Gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio. Marcador utilizado es 100 pares de bases (ver en anexos).

Amplificación por PCR

Se obtuvo una banda de 286 pares de bases que coincide con los resultados obtenidos por Saylor *et al.* (2006) (Figura 6).

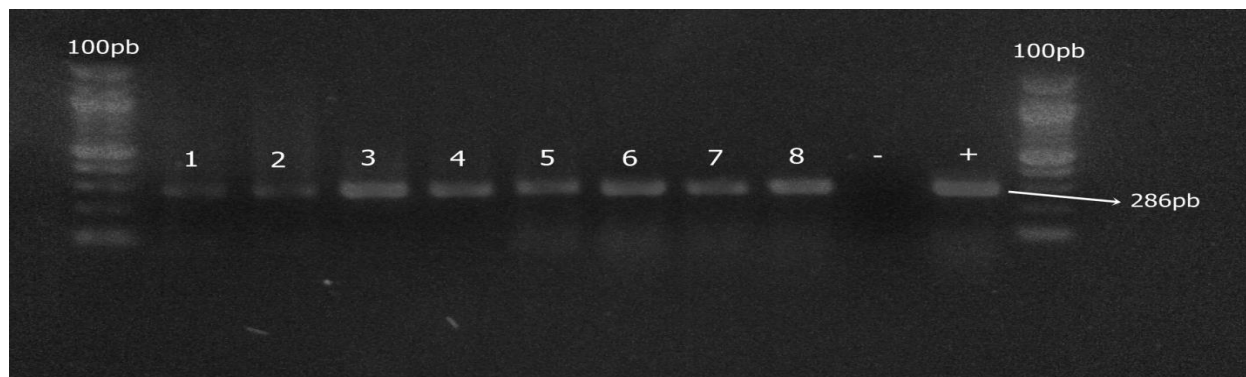


Figura 6. PCR utilizando cebadores 2BglF y 2BglR en gel de agarosa al 1 %, Líneas 1-8: Muestras ADN de plantas seleccionadas en Boaco, control negativo y control positivo. Marcador utilizado es 100 pares de bases (ver en anexos).

A continuación se muestra un cuadro resumen con los resultados obtenido a partir del muestreo.

Cuadro 5. Resultados positivos obtenidos por zonas de muestreo.

| Zona de muestreo | INTA Dorado | Palo 2 | ANAR 97 | Otras | Resultados positivos |
|------------------|-------------|--------|---------|-------|----------------------|
| Malacatoya | 5 | 10 | 24 | 1 | 40 |
| Sébaco | 12 | 12 | 9 | 9 | 42 |
| Boaco | 0 | 1 | 2 | 5 | 8 |
| León | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Chinandega | 1 | 0 | 0 | 5 | 6 |
| Total | 19 | 23 | 35 | 21 | 98 |

De las 133 muestras colectadas, el 74 % resultaron positivas.

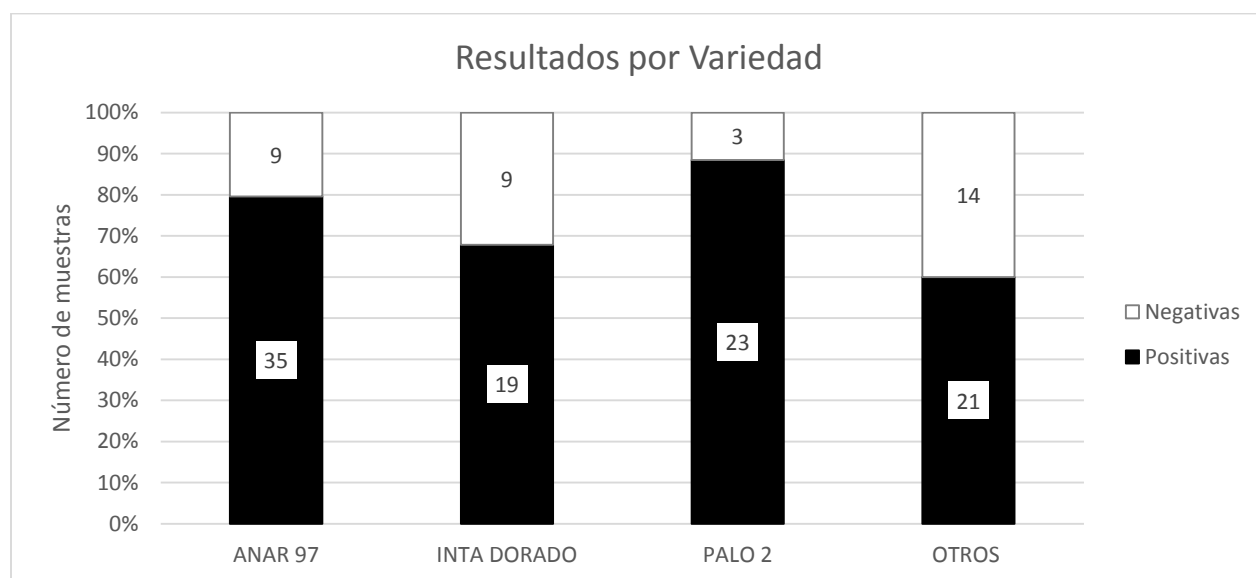


Figura 7. Resultados por variedad muestreada.

La Figura 7 muestra los resultados obtenidos por variedad, sin considerar la zona de muestreo. La variedad más afectada fue Palo 2 (88%). La variedad INTA Dorado y los otros genotipos registraron los menores porcentajes (19 y 21%, respectivamente).

Amplificación por PCR Tiempo Real

Se confirmaron los resultados obtenidos mediante PCR convencional y observando altas concentraciones de ADN de *Burkholderia glumae*, debido a la amplificación de las muestras por debajo de los quince ciclos, se observó la fase de meseta a partir del ciclo veintinueve debido al desgaste de reactivos en el programa de PCR.

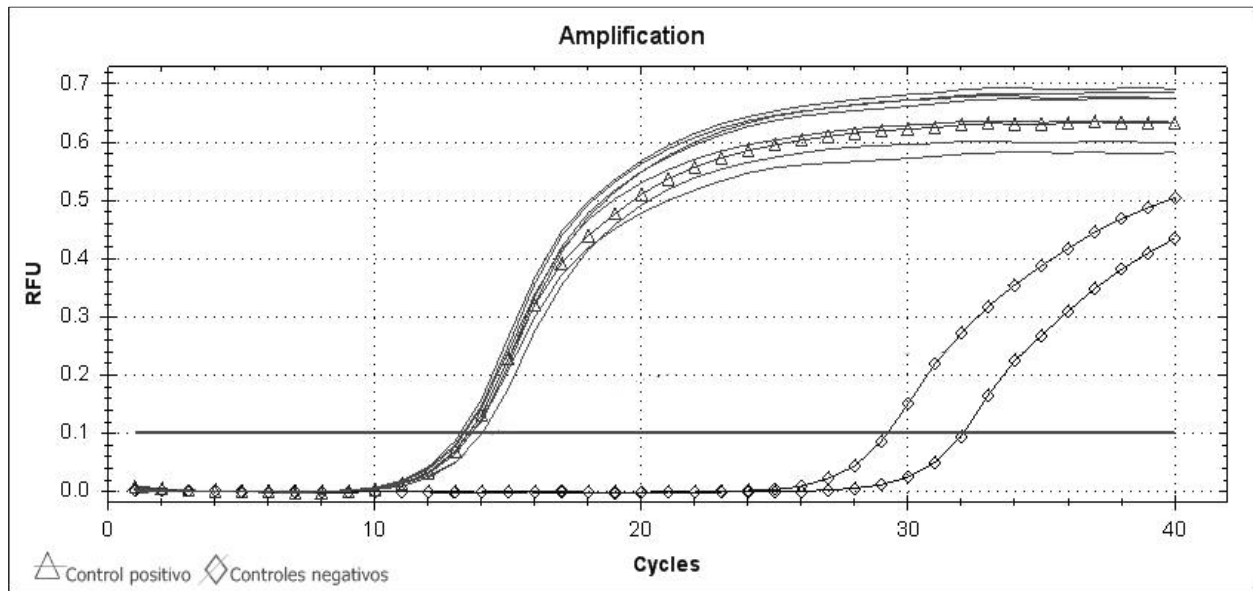


Figura 8. Curvas de amplificación en tiempo real de muestras de Boaco.

Aislamiento de colonias bacterianas.

Las colonias de *Burkholderia glumae* crecidas en medio LB Agar Miller presentaron coloración blanco-cremosa (Figura 7). Las colonias se hacen visible a partir de las 48 horas de inoculación a 27 °C. Coincidiendo con los resultados obtenidos por Mosquera (2010).

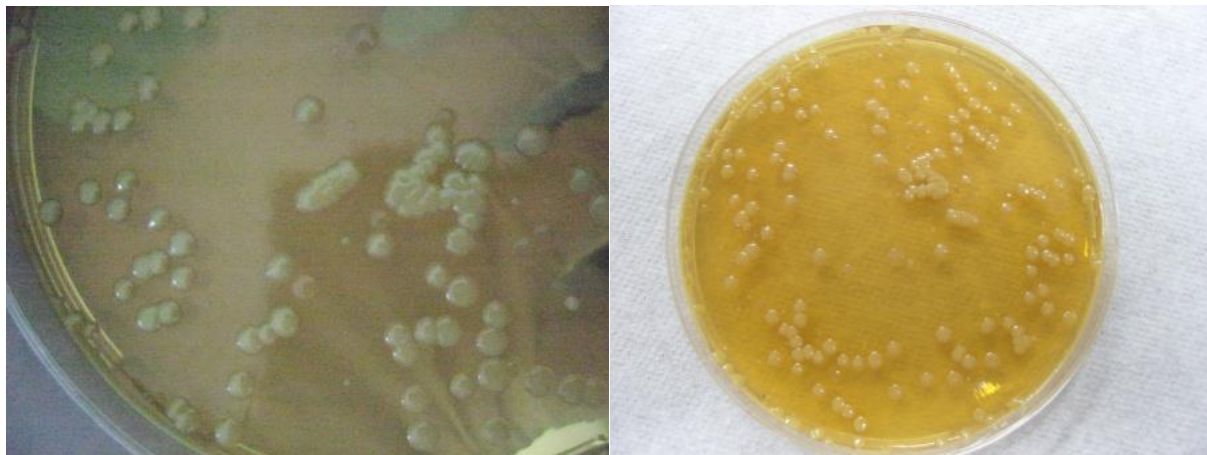


Figura 9. Colonias características de *Burkholderia glumae* en medio LB.

Amplificación por PCR de colonias aisladas.

Las siete muestras amplificaron una banda de 286 pares de bases (Figura 10), coincidiendo con los resultados obtenidos a partir de las panículas con síntomas amplificadas anteriormente.

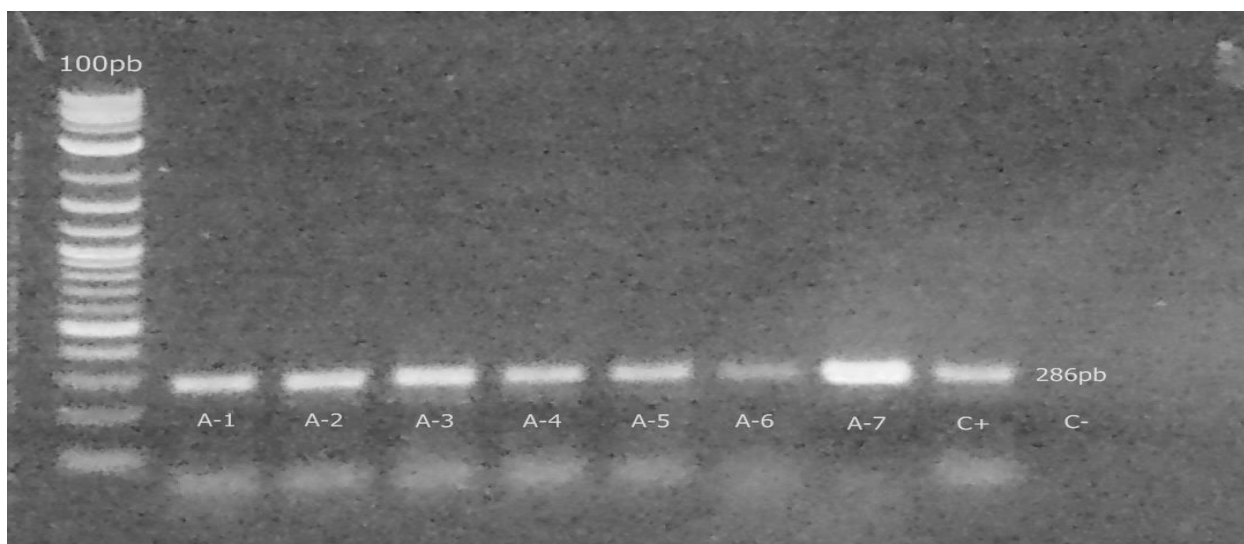


Figura 10. PCR de colonias aisladas de *Burkholderia glumae* en gel de agarosa al 1%, usando un marcador de 100 pares de bases (ver anexos).

Almacenamiento de colonias bacterianas.

Se aislaron 4 colonias puras de *Burkholderia glumae* y fueron almacenadas en 300 μ l de glicerol en un freezer a -80°C , para futuros estudios y contar con material de referencia.

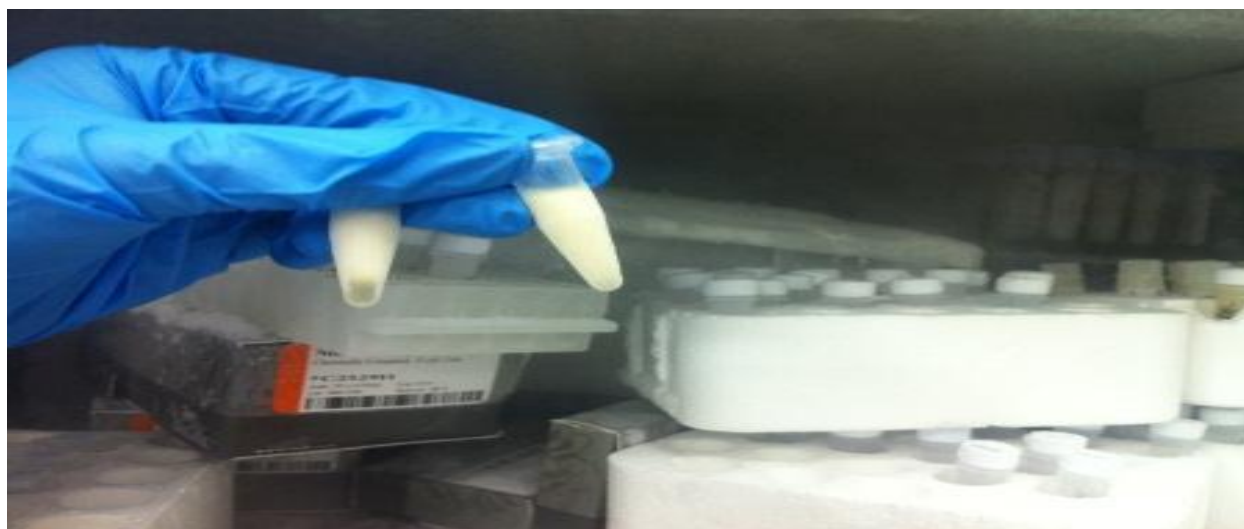


Figura 11. Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml con 300 μ l de glicerol y cepas de *Burkholderia glumae*.

Secuenciación.

Se obtuvieron secuencias de aproximadamente 300 pares de bases. Los archivos se visualizaron en forma de cromatograma utilizando el programa BioEdit para poder observar la calidad de las secuencias (Figura 12).

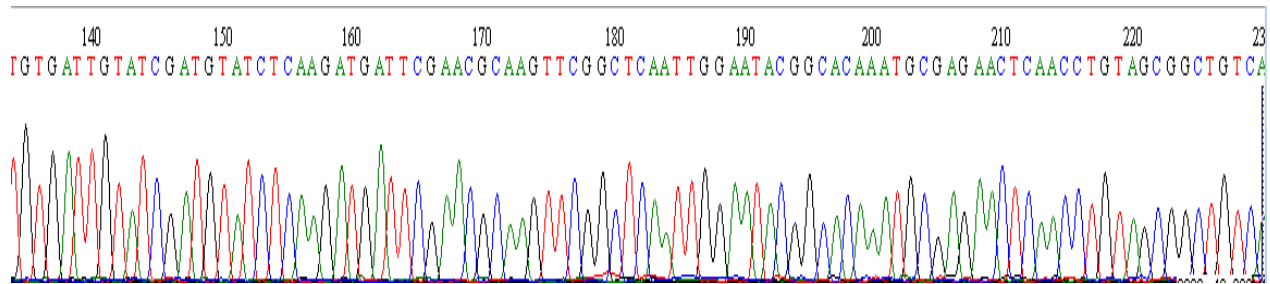


Figura 12. Fragmento de aproximadamente 100 pares de bases obtenidas del secuenciador genético ABI 3130.

Análisis de las secuencias.

Para cada una de las secuencias se realizó BLAST, para comprobar que se estaba secuenciando el segmento adecuado del gen 16S. Las ocho muestras coincidieron con secuencias reportadas de *Burkholderia glumae*, específicamente para la cepa BGR1 (Figura 13).

El genoma de la cepa BGR1 fue secuenciado por primera vez por el departamento de biotecnología agrícola de la Universidad Nacional de Seúl, Corea del Sur. Estudios realizados por Kim y Jeong (2003, 2004) reportan cuatro fenotipos de la cepa BGR1, los cuales han sido caracterizados como virulentos y sin presencia de pigmentación.

Los únicos reportes de cepas de *Burkholderia glumae* se han realizado en las zonas de mayor producción de arroz en Estados Unidos (Luisiana, Arkansas y Texas). En América Latina solamente se ha detectado la presencia de la bacteria, sin embargo no hay reportes que indiquen a qué tipo de cepa pertenecen.

En Nicaragua este es el primer estudio a nivel molecular con propósitos de identificar la bacteria. Trabajos anteriores dieron a conocer la presencia de la bacteria a partir de síntomas presentados en campo.

La identificación de las cepas de *Burkholderia glumae* mediante la secuenciación del gen 16S es muy importante para la determinación del grado de virulencia, ya que no es el mismo para todas las cepas según estudios de Karki y otros (2012). La identificación de las cepas encontradas en Nicaragua serviría para la realización de pruebas de inducción en variedades locales de arroz. Estas pruebas determinarían el grado de susceptibilidad o resistencia a las cepas encontradas.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Max ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-----------|----------------------------|
| Burkholderia glumae BGR1 chromosome 2, complete sequence | 401 | 797 | 91% | 1e-108 | 98% | CP001504.2 |

Figura 13. BLAST de secuencia donde nos presenta la similitud de la secuencia obtenida anteriormente con una identidad del 98% con la cepa BGR1.

V. CONCLUSIONES

1. En todas las zonas y variedades se confirma la presencia de la bacteria.
2. En las cinco zonas muestreadas el agente causal del añublo bacterial es la cepa BGR1 de *Burkholderia glumae*.
3. La extracción de ADN genómico directamente a las panículas de plantas con síntomas dio igual resultados a la extracción de ADN de las colonias bacterianas.
4. La secuenciación del gen 16S del agente causal fortalece la identificación molecular dando un diagnóstico más completo del patógeno.
5. El 74 % de las muestras colectadas entre los tres cultivares (ANAR 97, INTA Dorado y Palo 2) resultaron positivas. Se necesitan pruebas de inducción para determinar resistencia varietal en condiciones controladas.

VI. RECOMENDACIONES

- En futuros trabajos de identificación de la bacteria a través de análisis molecular se sugiere realizar la extracción de ADN y su análisis a partir de las semillas de la panícula para ahorrar tiempo en el procesamiento de muestras.
- Monitorear la incidencia de *Burkholderia glumae* en ambas épocas de siembra para llevar un registro de daños y determinar variedades a sembrar en cada ciclo.
- Realizar talleres de capacitación para los agricultores en temas de desinfección de semilla y aspectos agronómicos básicos que ayuden a evitar la diseminación de la bacteria.

VII. LITERATURA CITADA

- Callejas, I. 2011. Situación actual de (*Burkholderia glumae*) causante del añublo bacterial de la panícula del arroz en San Marcos, Sucre. Tesis Ing. Magdalena, Co. Universidad del Magdalena. 16 p.
- ANAR, Asociación Nicaragüense de Arroceros. 2010. Charla técnica sobre *Burkholderia glumae* en el cultivo del arroz. Boletín Informativo. No. 10.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Diagnóstico molecular de *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli* en semillas de arroz. Laboratorio de Patología de Arroz CIAT. 11 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2010. Curso de capacitación en la identificación de *B. glumae* en semillas de arroz: Diagnóstico convencional y molecular. Colombia. 37 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2010. Complejo Acaro Hongo Bacteria nuevo reto para arroceros centroamericanos. Informe técnico, CIAT. Co.
- Correa, F; Pérez, C; Saavedra, E. 2007. Añublo bacterial de la panícula del arroz. Revista Arroz 57(468): 26-32.
- FLAR, Fondo latinoamericano para arroz de riego. 2010. Patólogo colombiano sugiere medidas para manejo bacteria en arroz. Consultado 12 Oct. 2013. Disponible en <http://www.flar.org/index.php/es/noticias/131-republica-dominicana-patologo-colombiano-sugiere-medidas-para-manejo-de-bacteria-en-arroz>.
- Flórez, N., Uribe, D. 2011. Determinación de la infección de *Burkholderia glumae* en semillas de variedades comerciales colombianas de arroz. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 64(2): 6093-6104.
- Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N,-fixing isolates from rice in Vietnam. Int J Syst Bacterio 145, 274-289.
- Hikichi, Y; Tsujiguchi, K; Maeda, Y; Okuno, T. 2001. Development of increased oxolinic acid-resistance in *Burkholderia glumae*. J. Gen. Plant. Pathol. 67: 58-62.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2011. Guía Tecnológica del Cultivo del arroz. (5). 13 p.
- Jeong, Y; Kim, J; Kim, S; Kang, Y. 2003. Toxoflavin Produced by *Burkholderia glumae* Causing Rice Grain Rot is Responsible for Inducing Bacterial Wilt in Many Field Crops. Plant disease. 87(8): 890-896.

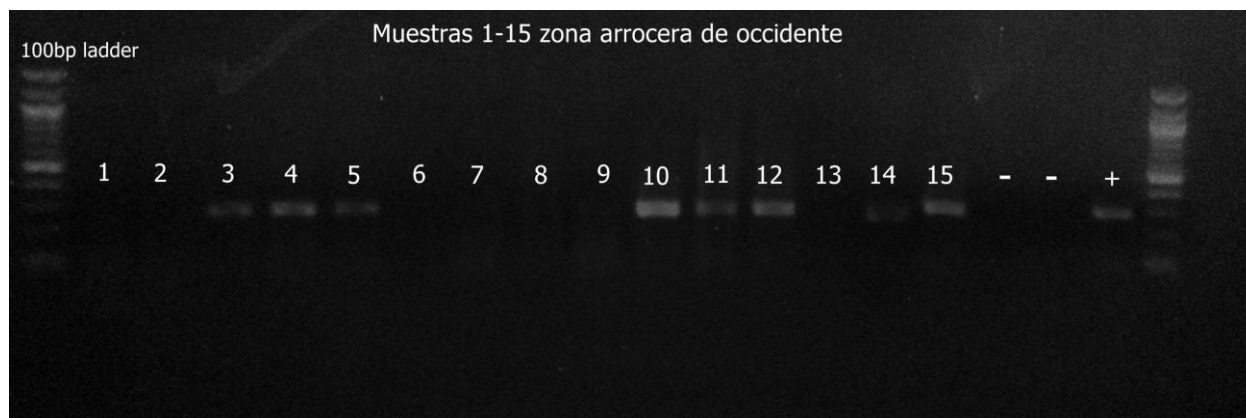
- Karki, H; Shrestha, B; Han, J; Groth, D; Barphagha, IK. 2012. Diversities in Virulence, Antifungal Activity, Pigmentation and DNA Fingerprint among Strains of *Burkholderia glumae*. PLoS ONE 7(9): e45376. doi:10.1371/journal.pone.0045376.
- Kawaradani, M; Okada, K; Kusakari, S. 2000. New selective medium for isolation of *Burkholderia glumae* rice seeds. J. Gen. Plant Pathol. 66: 234-237.
- Kim, J; Kang, Y; Kim, JG; Choi, O; Hwang, I. 2010, Occurrence of *Burkholderia glumae* on rice and field crops in Korea. J. Plant Pathol. 26(3): 271-272.
- Lim, JY; Lee, Tae-Ho; Nahm, B; Choi, Y; Kim, M; Hwang, I. 2009. Complete genome sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. J. Bacteriol. 191(11):3758.
- Nandakumar, R; Shahjahan, A; Yuan, X; Groth, D; Dickstein, E; Clark, CA; Cartwright, R. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. Plant Disease. 93(9): 896-905
- Pérez, C; Saavedra, E. 2011. Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el caribe colombiano. Rev. Colombiana Cienc. Anim. 3(1): 111-124.
- Rivas, C. 2008. Análisis y descripción: El arroz en Nicaragua. Managua, Ni. 52 p.
- Salazar, J. Complejo patológico del grano de arroz: Un enfoque global del problema en Costa Rica. INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. CR. 23 p.
- Sayler, R; Cartwright, R; Yang, Y. 2006. Genetic characterization and Real-Time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. Plant Disease. 90(5): 603-610.
- Sativa, O. 2009. Cultivo del arroz: guía tecnológica para la producción de arroz. INTA: Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. Managua, NI. 26 p.
- Urakami, T., Ito-Yoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K., Komagata, K. 1994. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 44,235-245.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T.; Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol Immunol 36, 1251-1275.
- Yuan, X. 2004. Identification of bacterial pathogens causing panicle blight of rice in Louisiana. Thesis Msc. Louisiana, USA. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 102 p.

VIII. ANEXOS

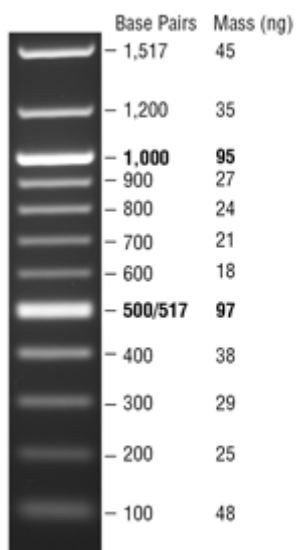
1. Descripción de variedades muestreadas.

| Características | INTA Dorado | ANAR 97 | Palo 2 |
|--------------------------|-------------|---------|---------|
| Altura de la planta (cm) | 92 | 95 | 95 |
| Longitud del grano | 8 | 8 | 8 |
| Días de cosecha | 120-125 | 120 | 120 |
| Potencial de producción | 140 | 120-140 | 120-140 |
| Origen | CIAT | CIAT | CIAT |

2. Amplificación de 282 pb de muestras recolectadas en las zonas de León y Chinandega.



3. Marcador 100 pares de bases visualizado por tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1.3%.



4. Amplificación del segmento de 282 pb de muestras 1-38 recolectadas en Sábaco, en geles de agarosa al 1%

