



Artículo Científico

Caracterización e identificación de *Burkholderia glumae* en semillas de variedades de arroz (*Oryza sativa*) cultivadas en México

Gabriel Alejandro Hernández-Nava¹, Sergio Aranda-Ocampo^{1*}, Guadalupe Valdovinos-Ponce¹, Obdulia Segura-León¹, Mónica Osnaya-González², Eridani García-Vázquez¹, Sergio Ramírez-Rojas³, Leonardo Hernández-Aragón³.
¹Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56264, México, Campus Montecillo. ²Colegio de Postgraduados, BIOSAT, Carretera Haltunchén-Edzná, Km 17.5, Sihochac, municipio de Champotón, Campeche, CP 24450, México. ³Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícolas y Pecuaria (INIFAP), Km. 0.5 Carretera Zácatepec Galeana s/n, Centro, CP 62780, Zácatepec de Hidalgo, Morelos, México.

*Autor de correspondencia:

Sergio Aranda-Ocampo
arandasergio63@gmail.com

Sección:
Edición periódica

Recibido:
19 Agosto, 2024

Aceptado:
07 Abril, 2025

Publicado:
21 Abril, 2025

Cita:
Hernández-Nava GA,
Aranda-Ocampo S,
Valdovinos-Ponce G,
Segura-León O, et al., 2025.

Caracterización e
identificación de
Burkholderia glumae en
semillas de variedades de
arroz (*Oryza sativa*)
cultivadas en México.
Revista Mexicana de
Fitopatología 43(2): 65.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2408-3>

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. *Burkholderia glumae* es el patógeno transmitido por semilla más importante que disminuye el rendimiento de arroz (*Oryza sativa*). En 2022, se observaron semillas con síntomas de manchado de glumas en México. El objetivo de esta investigación fue caracterizar e identificar el agente causal de los síntomas de manchado de glumas de 11 variedades de arroz cultivadas en México.

Materiales y Métodos. Se analizaron 37 muestras de semillas. De cada muestra se desinfestó 1 g de semilla con hipoclorito de sodio y se maceraron en amortiguador PBS; de aquí, se sembraron en los medios de cultivo SPG, B de King y Wilbrinks. Las cepas bacterianas aisladas se caracterizaron mediante API20 y se identificaron por amplificación y secuenciación parcial de genes universales y específicos. La patogenicidad se evaluó por inoculación de una suspensión de 3.5×10^8 UFC mL⁻¹ en semillas y plántulas de arroz de las variedades Milagro Filipino e INIFLAR-R.

Resultados. De 37 muestras, en nueve (24.3 %) se obtuvieron 11 aislados con la morfología descrita para *B. glumae*. La caracterización mediante API20 identificó dos grupos con perfil metabólico diferente entre las 11 cepas. Por PCR, las 11 cepas se identificaron con 100% de cobertura como *B. glumae* con los iniciadores universales 8F-1492R, y específicos a *B. glumae* Bglu3F-Bglu3R y OgF-OgR. La patogenicidad de *B. glumae* se confirmó en semillas y plántulas de arroz de las variedades Milagro Filipino e INIFLAR-R.

Conclusión. *B. glumae* es el agente causal de los síntomas de manchado de glumas de semillas de arroz y se detectó en semillas de siete variedades (63.6 %): GOLFO FL-16, INIFLAR-R, INIFLAR-RT, IRGA, Milagro Filipino, Morelos A-98 y PACÍFICO FL-15 de 11 variedades de arroz cultivadas en México.



Palabras clave: Tizón bacteriano panícula, Aislamiento, Variedades, Patogenicidad

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial, debido a que es un alimento básico para más de 3.5 billones de personas (Faizal-Azizi y Lau, 2022). Los principales países productores de este cereal son China Continental, India, Indonesia, Vietnam y Tailandia (FAOSTAT, 2023). En México, el arroz se encuentra entre los cuatro principales cultivos básicos en la dieta de la población. A nivel nacional, se cultivan aproximadamente 40 mil ha con más de 17 variedades de arroz en diversas condiciones agroecológicas, especialmente en los estados de Campeche, Jalisco, Morelos, Nayarit y Tamaulipas, con una producción de 246 mil t, fortaleciendo la economía agroindustrial del país (SIAP, 2023).

A nivel mundial, el cultivo de arroz es afectado por diferentes patógenos; sin embargo, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Burkholderia glumae* y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* se ubican entre los principales patógenos bacterianos que se transmiten por semilla (Kang *et al.*, 2016). No obstante, *B. glumae*, agente causal del tizón bacteriano de la panícula (TBP), se destaca por su distribución mundial e importancia económica (Cui *et al.*, 2016).

B. glumae se ha reportado en más de 18 países como un patógeno altamente destructivo en el cultivo de arroz (Zhou, 2019). Durante la última década, el TBP se ha considerado una enfermedad emergente que ha aumentado su incidencia y severidad en países que cultivan arroz, debido al cambio climático, provocando pérdidas de hasta 75 % en el rendimiento y calidad del grano en climas tropicales y subtropicales, especialmente en regiones con alta temperatura y humedad relativa (Abhishek-Gowda *et al.*, 2022; Mizobuchi *et al.*, 2018). En el continente americano, la presencia de *B. glumae* se ha reportado en Colombia, Estados Unidos de América, Panamá, Venezuela, Nicaragua, Ecuador, Costa Rica, República Dominicana y Puerto Rico (CABI, 2021).

B. glumae puede sobrevivir en semillas, proliferar en tejidos vegetales, colonizar diferentes microambientes en la planta y causar severas epidemias en el cultivo de arroz, debido a su alta eficiencia de transmisión y diseminación por semillas (Ortega y Rojas, 2021). En consecuencia, la enfermedad de TBP inicia a partir de la semilla infectada, como inoculo primario. Posteriormente, el patógeno se disemina por salpique del agua de riego y por contacto físico entre panículas sanas y enfermas (Ham *et al.*, 2011; Hasegawa, 2012; Zhou, 2019). A nivel mundial, los síntomas del TBP que se reportan con mayor frecuencia son manchado de glumas, ausencia o escaso desarrollo de grano, pudrición de semillas, desarrollo anormal de raíces y pudrición de plántulas (Sayler *et al.*, 2006), así como tizón de plántulas y panículas (Faizal-Azizi y Lau, 2022; Zhou-qí *et al.*, 2016).

Investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental Zacatepec, Morelos, son líderes nacionales en el mejoramiento genético de arroz contra diversos agentes patógenos bióticos y abióticos. Desde el 2016, en experimentos de campo en el INIFAP, Zacatepec, Morelos, se han observado semillas de diferentes variedades de arroz con manchas en las glumas. En esta investigación, se asume que estos síntomas son causados por *Burkholderia glumae*, por

la similitud con las manchas en glumas de semilla de arroz reportados para este patógeno como agente causal de la enfermedad del TBP (Ramachandran *et al.*, 2021).

El objetivo de esta investigación fue caracterizar e identificar el agente causal de los síntomas de manchado de glumas de variedades de arroz cultivadas en México. La identificación del agente causal de estos síntomas en glumas en semillas de arroz es fundamental para desarrollar futuras estrategias de prevención, manejo y mejoramiento genético en el cultivo de arroz en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. En 2022, se analizaron 37 muestras de semillas con diferente porcentaje de daño de manchado y necrosis de glumas de 11 variedades de arroz cultivadas en México (Cuadro 1, Figura 1), proporcionadas por el INIFAP-Campo experimental Zacatepec, Morelos.

Cuadro 1. Variedades de arroz analizadas para la identificación del agente causal del manchado de glumas en semillas.

Variedad de arroz	Número de muestras
Azteca	4
Azteca 84	1
GOLFO FL-16	1
INIFLAR R	2
INIFLAR RT	2
IRGA	13
Milagro Filipino	7
Morelos A-98	2
Pacífico B1	1
PACÍFICO FL-15	3
Sauta	1
TOTAL	37



Figura 1. Síntomas de manchado de glumas en panículas y semillas en las variedades de arroz, **A.** MILAGRO FILIPINO, **B.** MORELOS A-98, **C.** PACÍFICO FL-15, **D.** IRGA. Síntomas de manchado de semillas en las variedades de arroz, **E.** MILAGRO FILIPINO, **F.** MORELOS A-98.

Aislamiento de bacterias. De cada muestra, se desinfestó 1 g de semilla con hipoclorito de sodio (0.5 % v/v) por 5 min y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en matraces con 5 mL de amortiguador PBS (Buffer salino de Fosfato) (pH 7.2) y se mantuvieron en agitación a 125 rpm (ORBIT 1900, Labnet) durante 1 h. Posteriormente, se maceraron en un mortero estéril con 5 mL de amortiguador PBS y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-2} . De cada dilución, se sembraron 20 μ L con un asa Digralsky en placas Petri con medio de cultivo sacarosa-fosfato-glutamato (S-PG) semi-selectivo para *B. glumae* (Quesada-González y García-Santamaría, 2014). Las placas se incubaron a 30 °C por 48 h. Del crecimiento bacteriano, se transfirieron colonias individuales con fenotipo similar a *B. glumae* (colonias circulares, convexas, con márgenes lisos y centro rojo-púrpura) (Abhishek-Gowda *et al.*, 2022), a los medios de cultivo B de King y Wilbrinks (Koike, 1965) y se incubaron a 30 °C por 48 h. Las colonias con fenotipo similar a *B. glumae* se preservaron en cultivo criogénico (-80 °C) en caldo nutritivo y glicerol (40 %) para estudios posteriores.

Caracterización fisiológica y bioquímica. Los aislados bacterianos se caracterizaron fisiológicamente y bioquímicamente mediante API 20E (Biomerieux, Durhan, NC, U.S.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Así mismo, se evaluó su actividad pectinolítica en papa (*Solanum tuberosum*) y la hipersensibilidad (RH) en tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*) (Goszczynska *et al.*, 2000).

Identificación molecular. El ADN genómico de los aislados bacterianos se obtuvo por el método CTAB 2 % (Doyle y Doyle, 1990) a partir de cultivos puros en medio B de King con 48 h de crecimiento a 28 °C, con modificaciones: Durante el proceso de lisis, se agregaron 300 μ L de CTAB al 2% (1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl pH

8, y 2 g de CTAB por 100 mL de buffer) y 3 μ L de Beta Mercaptoetanol al 10 %, y se incubó a 55 °C por 30 min. En la precipitación se colectó 200 μ L de la fase acuosa y se agregaron 300 μ L de isopropanol (100%) a 4 °C y 30 μ L de acetato de amonio (7.5 M) y se mezcló cuidadosamente por inversión. La concentración y pureza de las muestras de ADN se analizaron por espectrofotometría de luz UV a 260 nm con un NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). La integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen™) al 1 % a 70V por 90 min. La identificación molecular se realizó mediante PCR punto final con 100 ng μ L⁻¹ de ADN de cada aislado bacteriano utilizando iniciadores universales (8F-1492R) y específicos (Bglu3F-BgluR, OgF-OgR) para *B. glumae* (Cuadro 2). Se utilizó el kit PCR GOTaq® Flexi DNA Polymerase (Ref. M8295, Promega) en un termociclador C1000 Touch TM Thermal Cycler (Eppendorf).

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la identificación de bacterias aisladas de semillas con síntomas de manchado en glumas de variedades de arroz cultivadas en México.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia	Temperatura de alineamiento
8F	AGAGTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	1500	Galkiewicz y Kellogg, 2008	57 °C
1492R	GGTTACCTTGTACGACTT				
Bglu3F	GTCACGATCGCTCTGTTGTT	Proteína putativa	174	Lee <i>et al.</i> , 2018	54 °C
Bglu3R	CATGAATCCACGAAGCCGAG				
Og-F	CACCTGGTAGTCTCTGTAGG	Espacio intergénico 16S-23S rRNA	402	Kang <i>et al.</i> , 2016	63 °C
Og-R	ACGAGTCTGTCTCGCTCT				

Las condiciones de PCR para los iniciadores 8F-1492R fueron desnaturización inicial de 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 60 s, 57 °C por 45 s, 72 °C por 60 s y una extensión final de 72 °C por 8 min. Para los iniciadores específicos Bglu3F-Bglu3R, las condiciones de PCR fueron desnaturización inicial de 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 54 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 7 min. Para los iniciadores OgF-OgR, desnaturización inicial de 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 20 s, 63 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y una extensión de 72 °C por 7 min.

Los productos amplificados se detectaron en un gel de agarosa de ácido tris-borato-etileno-diaminotetraacético (EDTA) al 1.5 %, los cuales se purificaron y secuenciaron bidireccionalmente con los tres pares de iniciadores en la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias remitidas se analizaron y se editaron con el programa BioEdit para generar las secuencias consenso de cada cepa. Las secuencias consenso se compararon con las secuencias nucleotídicas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a través del

programa BLASTn 2.2 (Basic Local Alignment Search Tool). Se determinó el polimorfismo de las cepas en la región 16S rRNA por alineación múltiple de las secuencias de México y las disponibles en el NCBI con el programa CLUSTAL W, implementado en el programa MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021). Con base en las secuencias 16S rRNA de las 11 cepas, se generó un árbol filogenético analizado con el método de Máxima verosimilitud (ML) con 500 repeticiones de Bootstrap. Los árboles se generaron utilizando la secuencia de una especie del género *Burkholderia* como grupo externo.

Patogenicidad en semilla de arroz. Se utilizó un cultivo puro de la cepa CPM01 de *B. glumae*, identificada en este estudio, con 48 h de crecimiento en B de King. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en semillas de la variedad Milagro Filipino sin síntomas de manchado de glumas. La inoculación se realizó de acuerdo con los protocolos descritos por Li *et al.* (2016) y Ura *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Quince semillas se desinfestaron con etanol al 70 % (v/v), seguido de hipoclorito de sodio al 0.5 % (v/v) por 5 min y tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se inocularon por inmersión en una suspensión bacteriana con 3.5×10^8 UFC mL⁻¹ durante 1 h y se colocaron en cajas germinadoras (BOX LARGE, THOMAS SCIENTIFIC, USA). Las cajas se mantuvieron en condiciones de laboratorio a una temperatura constante de 30 °C y humedad relativa >70 %. A los 15 días después de la inoculación (ddi), se registraron síntomas en la semilla, raíz y tallo de plántulas. El ensayo se realizó en un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. El tratamiento 1 consistió de semillas inoculadas con la cepa CPM01 de *B. glumae* y el tratamiento 2 de semillas no inoculadas (inmersión de semillas en agua destilada estéril) (testigo).

Patogenicidad en plántulas de arroz. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en plántulas sanas de las variedades Milagro Filipino e INIFLAR-R, las cuales se cultivan extensivamente en México (SIAP, 2023). Las plántulas se obtuvieron a partir de semillas sanas y desinfestadas como se describió previamente. Las semillas se sembraron en vasos de unicel (1 kg) con tierra estéril (NUTRIGARDEN). La inoculación se llevó a cabo cuando las plántulas desarrollaron la cuarta hoja (Flórez-Zapata y Uribe-Vélez, 2011). Con una jeringa estéril se hizo una herida en el tallo de las plántulas y se inocularon por aspersión de 3 mL de una suspensión bacteriana con 3.5×10^8 UFC mL⁻¹ de *B. glumae* (cepa CPM01). Las plántulas se mantuvieron en condiciones de invernadero a 28-30 °C, con humedad relativa >70 %. A los 15 ddi, se registraron síntomas en tallo. El ensayo se realizó en un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. El tratamiento 1 consistió de plántulas de Milagro Filipino inoculadas con la cepa CPM01 de *B. glumae*; el tratamiento 2, de plántulas de INIFLAR-R inoculadas con la cepa CPM01 de *B. glumae*; y los tratamientos 3 y 4 de plántulas de Milagro Filipino e INIFLAR-R no inoculadas (herida en tallo y aspersión con 3 mL de agua destilada estéril) (testigo). De los tejidos (semilla y tallo) en donde se desarrollaron los síntomas, se reaisló la bacteria inoculada en medio de cultivo B de King y se identificó por PCR con los iniciadores específicos (Bglu3 y Og) para *B. glumae*.

RESULTADOS

Aislamiento de *B. glumae*. En nueve (24.3 %) de las 37 muestras de semillas de arroz que se analizaron, se aislaron 11 colonias bacterianas. En el medio sacarosa-fosfato-glutamato (S-PG), las colonias presentaron crecimiento lento, forma circular convexa, con márgenes lisos y centro rojo-púrpura. Estas características fenotípicas se correlacionan con lo que se ha reportado en este mismo medio de cultivo para colonias de *B. glumae* (Ura *et al.*, 2006; Quesada-González y García-Santamaría, 2014). En los medios de cultivo B de King y Wilbrinks, las bacterias formaron colonias amarillas, circulares elevadas, mucoides y con márgenes lisos (Figura 2). En los tres medios se observó una pigmentación amarilla difusible alrededor de las colonias bacterianas.

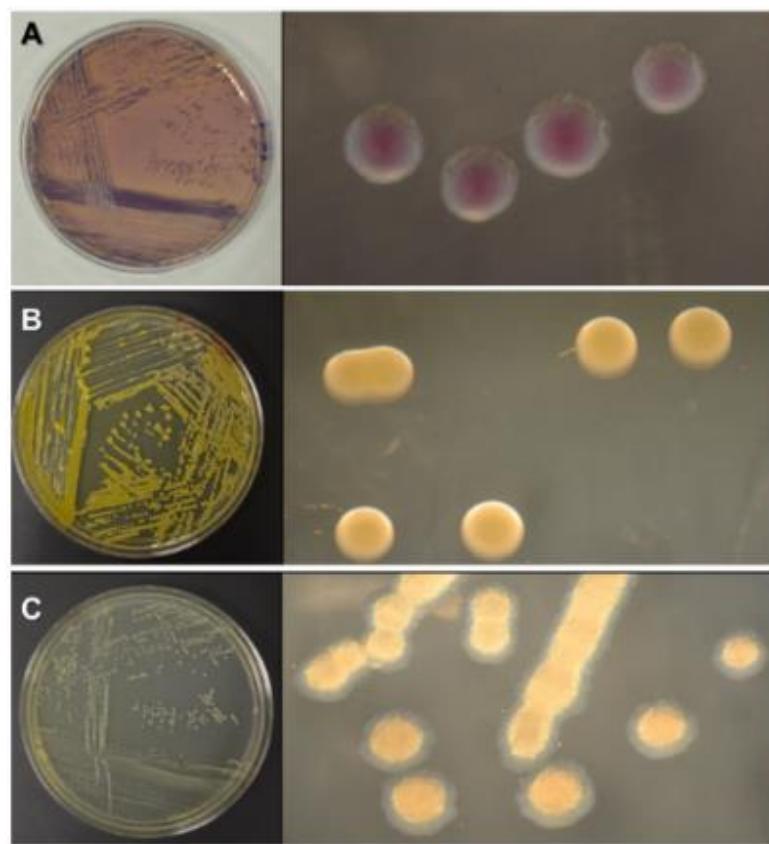


Figura 2. Características morfológicas de las colonias bacterianas aisladas de semillas de arroz con síntomas de manchado de glumas. Cultivo de las colonias a 28 °C por 72 h en medio de cultivo. **A.** Sacarosa-fosfato-glutamato (S-PG), **B.** B de King, **C.** Wilbrinks.

De las 11 variedades de arroz analizadas, las cepas bacterianas con fenotipo similar a *B. glumae* se aislaron de siete (63.6 %) variedades: GOLFO FL-16, INIFLAR R, INIFLAR RT, IRGA, Milagro Filipino, Morelos A-98 y PACÍFICO FL-15. No se aislaron cepas con este fenotipo de cuatro (36.3 %) variedades: Azteca, Azteca 84, Pacífico B1 y Sauta (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cepas bacterianas con fenotipo de *B. glumae* aisladas de semillas con síntomas de manchado de glumas en variedades de arroz cultivadas en México.

Variedad	No. de aislados	ID cepa
Azteca	0	-
Azteca 84	0	-
GOLFO FL-16	1	CPM04
INIFLAR-R	1	CPM01
INIFLAR-RT	2	CPM02, CPM03
IRGA	1	CPJ01
Milagro Filipino	3	CPN01, CPN03, CPJ02
Morelos A-98	1	CPN02
PACÍFICO B1	0	-
PACÍFICO FL-15	2	CPM05, CPM06
Sauta	0	-
TOTAL	11	

Caracterización fisiológica y bioquímica. Las 11 cepas fueron Gram negativas, causaron pudrición blanda en papa e indujeron RH en tabaco. Los resultados de la caracterización mediante API 20E distinguieron dos grupos en función del perfil metabólico. El grupo 1 diferenció las cepas (n= 8) aisladas de las variedades GOLFO FL-16 (CPM04), INIFLAR R (CPM01), INIFLAR-RT (CPM02 y CPM03), Milagro Filipino (CPN01), Morelos A-98 (CPN02) y PACÍFICO FL-15 (CPM05 y CPM06). El grupo 2 diferenció las cepas (n= 3) aisladas de las variedades IRGA (CPJ01) y Milagro Filipino (CPN03 y CPJ02) (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 4. Caracterización fisiológica y bioquímica mediante API 20E de 11 cepas con fenotipo de *B. glumae* aisladas de semilla de arroz con síntomas de necrosis en glumas.

Prueba	Reacción	Cepas grupo 1 ^y (n= 8)	Cepas grupo 2 ^z (n=3)
ONPG	β-Galactosidasa	+	+
ADH	Arginina dihidrolasa	-	+
LDC	Lisina descarboxilasa	-	+
ODC	Ornitina descarboxilasa	-	+
CIT	Utilización de citrato	-	+
H2S	Producción de H ₂ S	-	-
URE	Hidrólisis de urea	-	+
GEL	Hidrólisis de gelatina	+	+
GLU	Fermentación de glucosa	+	+
MAN	Manitol	+	-
INO	Inositol	+	+
SOR	Sorbitol	+	-
RHA	Ramnosa	-	-
SAC	Sacarosa	-	-
MEL	Melibiosa	+	+
AMY	Amigdalina	+	-
ARA	Arabinosa	+	+

^yGrupo 1: Variedades de arroz y cepas (n=8) de *B. glumae*: GOLFO FL-16 (CPM04), INIFLAR-R (CPM01), INIFLAR- RT (CPM02 y CPM03), Milagro Filipino (CPN01), Morelos A-98 (CPN02) y PACÍFICO FL-15 (CPM05 y CPM06).

^zGrupo 2: Variedades de arroz y cepas (n=3) de *B. glumae*: IRGA (CPJ01) y Milagro Filipino (CPN03 y CPJ02).

Las diferencias en el perfil metabólico entre los dos grupos se observan con ADH, LDC, ODC, CIT, URE, MAN, SOR y AMY.

Identificación molecular de *B. glumae*. A partir del ADN de las 11 cepas bacterianas aisladas, se amplificaron fragmentos de 1500, 402 y 174 pb con los iniciadores universales 8F-1492R, y los iniciadores específicos para *B. glumae* Bglu3F-Bglu3R y OgF-OgR, respectivamente (Figura 3).

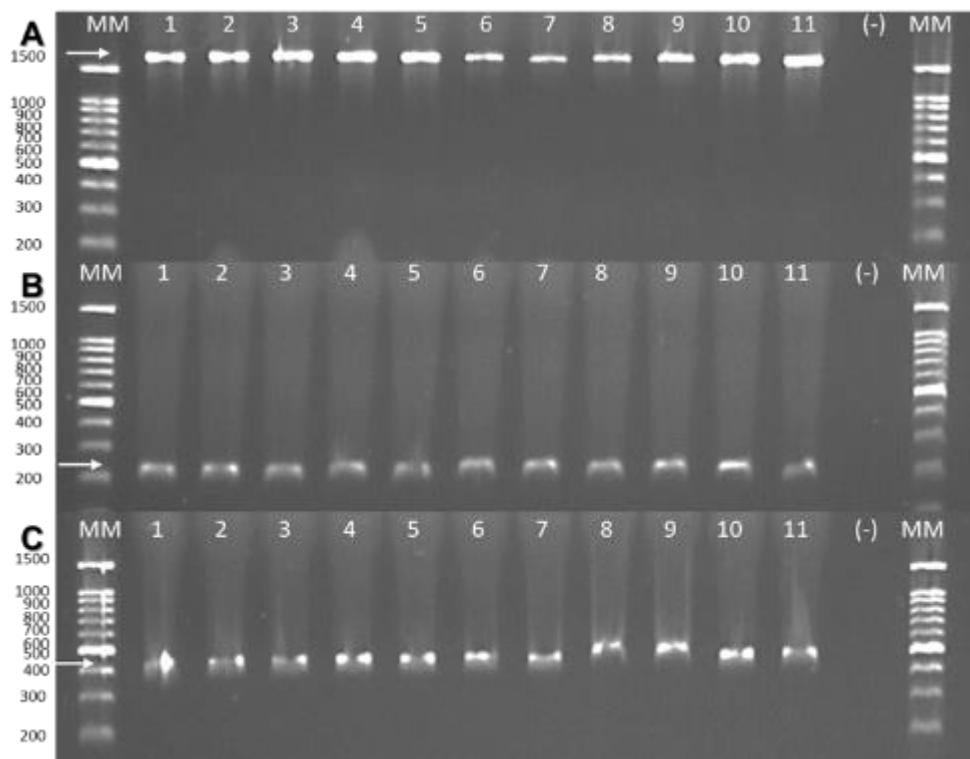


Figura 3. Detección de *B. glumae* mediante PCR punto final. Amplificación parcial de los genes: **A.** 16S rRNA con los iniciadores 8F-1492R (1500 pb). **B.** Proteína putativa con los iniciadores Bglu3 (174 pb). **C.** Espacio intergénico 16S-23S rRNA con los iniciadores Og (402 pb). Carril 1: INIFLAR-R (CPM01); carriles 2-3: INIFLAR-RT (CPM02 y CPM03, respectivamente); Carril 4: GOLFO FL-16 (CPM04); carriles 5-6: PACÍFICO FL-15 (CPM05 y CPM06, respectivamente); carriles 7-9: Milagro Filipino (CPN01, CPN03 y CPJ02, respectivamente); carril 10: IRGA (CPJ01) y carril 11: Morelos A-98 (CPN02). MM: Marcador molecular 100 pb (GOLDBIO); (-): Control negativo (agua destilada estéril).

El análisis bioinformático de los fragmentos de los genes 16S rRNA, proteína putativa y del espacio intergénico 16S-23S rRNA de las 11 cepas indicaron una identidad con valor mayor entre 99-100 % con la secuencia CPO23203.1. de *B. glumae* reportada en el banco de genes del NCBI (Cuadro 5, Figura 4), que corresponde a la secuencia completa del genoma de la cepa 336 gr-1 de *B. glumae*, aislada de *O. sativa* en Luisiana, Estados Unidos de América.

Cuadro 5. Identificación molecular de 11 cepas aisladas de semillas de variedades de arroz cultivadas en México con síntomas de manchado de glumas.

Gen	No. de secuencias	Cobertura (%)	Identidad (%)	Tamaño del amplicón (pb)	Especie	No. de accesión NCBI
16S rRNA	11	100	99-100	1500	<i>B. glumae</i>	CP023203.1
Proteína putativa	11	100	99-100	174	<i>B. glumae</i>	CP023203.1
Espacio intergénico 16S-23S rRNA	11	100	99-100	402	<i>B. glumae</i>	CP023203.1

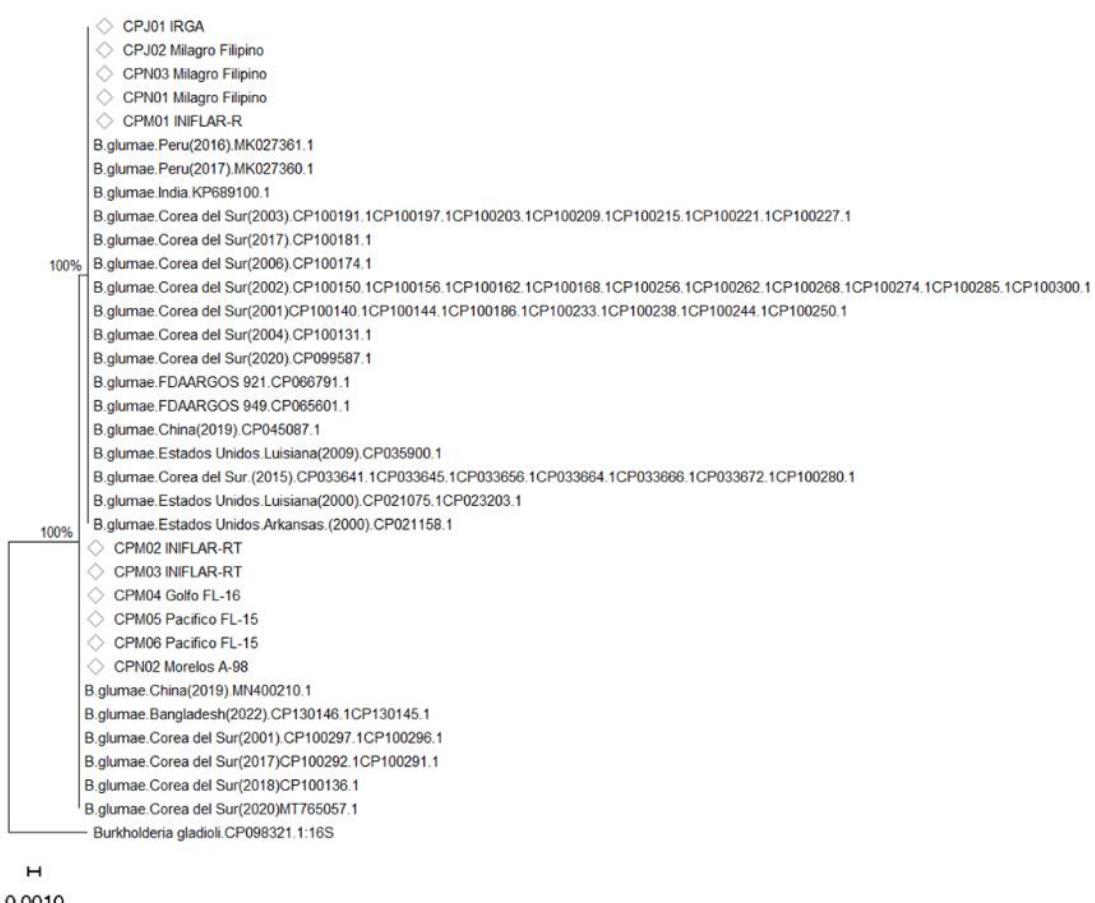


Figura 4. Análisis filogenético del fragmento de la región 16S rRNA de 11 cepas de *B. glumae* aisladas en México. Árbol filogenético consenso inferido por el método Máxima verosimilitud. Modelo GTR+G+I y 500 repeticiones de Bootstrap. La secuencia CP098321.1 de *Burkholderia gladioli* se incluyó como grupo externo. ◇= Cepas de *B. glumae* aisladas de semillas con síntomas de necrosis en glumas de variedades de arroz cultivadas en México.

Las secuencias de nucleótidos 16S rRNA de las 11 cepas de *B. glumae* se registraron en el GenBank del NCBI con los números de acceso: CPM01 (PV435843), CPM02 (PV435844), CPM03 (PV435845), CPM04 (PV435846), CPM05 (PV435847), CPM06

(PV435848), CPN01 (PV435849), CPN02 (PV435850), CPN03 (PV435851), CPJ01 (PV435852), CPJ02 (PV435853).

Patogenicidad de *B. glumae* en semilla y plántulas de arroz. A los 15 ddi, *B. glumae* CPM01 causó necrosis y pudrición en 100 % de semillas, raíces y tallo de plántulas de la variedad Milagro Filipino. Asimismo, la bacteria inoculada en los tallos de las plántulas de las variedades Milagro Filipino e INIFLAR-R, causó necrosis y pudrición de tallo, así como el desarrollo anormal de raíces y disminución del crecimiento de las plántulas. En las semillas y plántulas del tratamiento testigo no se observaron síntomas (Figura 5).

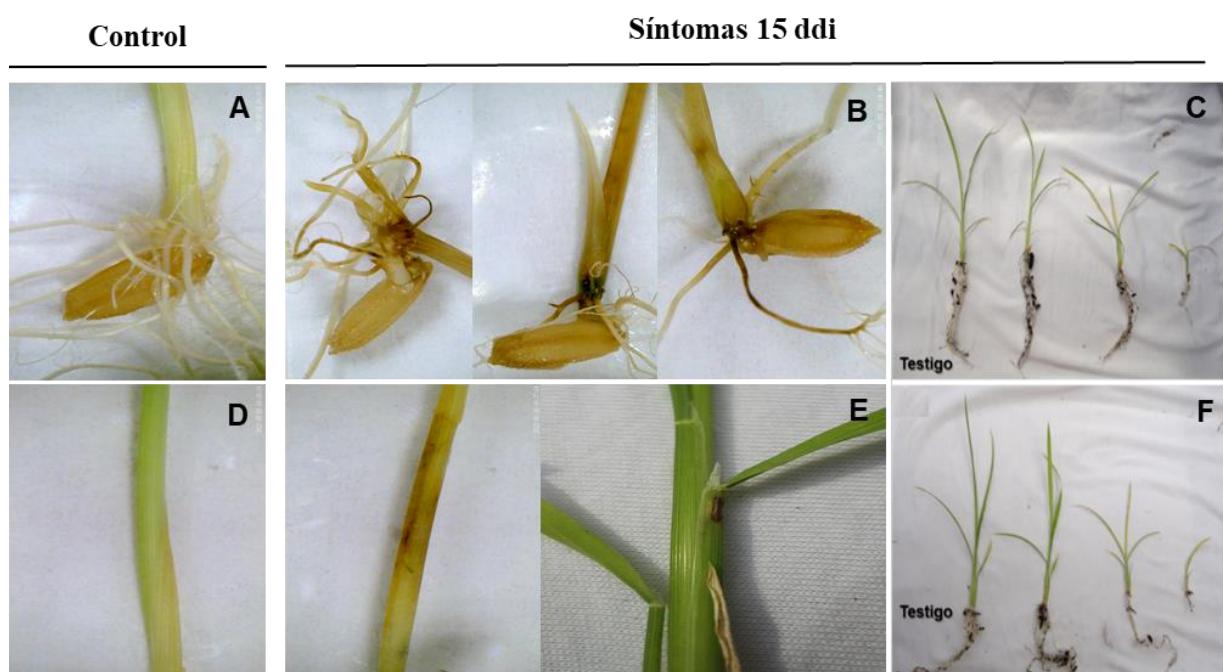


Figura 5. Síntomas inducidos por *B. glumae* CPM01 a los 15 ddi en semillas y plántulas de arroz. Variedad MILAGRO FILIPINO: **A.** Testigo, inmersión de semilla en agua destilada estéril. **B.** Necrosis y pudrición de semillas, raíces y tallo. **C.** Reducción del crecimiento y desarrollo anormal de raíces. Variedad INIFLAR-R: **D.** Testigo, aspersión de agua destilada estéril en tallo. **E.** Necrosis y pudrición de tallo de plántulas. **F.** Reducción del crecimiento y desarrollo anormal de raíces.

Las bacterias inoculadas en semillas y plántulas se reaislaron e identificaron por PCR como *B. glumae* con los iniciadores específicos Bglu3 y Og descritos previamente confirmando la patogenicidad de la bacteria.

DISCUSIÓN

El arroz es un cultivo básico para más del 50 % de la población mundial. En esta investigación, se aisló e identificó a *B. glumae* en semillas de arroz con síntomas de manchado de glumas. De 37 muestras de semillas analizadas, en nueve de ellas (24.3%) se aislaron colonias bacterianas. Las bacterias desarrollaron colonias redondas, convexas,

lisas, de color amarillo y centro rojo-púrpura en el medio semiselectivo S-PG, lo que coincide con la morfología descrita para *B. glumae* en otras investigaciones (Quesada-González y García-Santamaría, 2014; Ramachandran *et al.*, 2021; Tsushima *et al.*, 1986). Así mismo, todas las colonias produjeron un pigmento amarillo difusible en los medios de cultivo B de King y Wilbrinks. Dicho pigmento, conocido como toxoflavina, es una toxina que se considera como un factor de virulencia significativo para la patogenicidad de *B. glumae* en plantas de arroz (Gil *et al.*, 2022; Maurya *et al.*, 2023).

La identificación de *B. glumae* se confirmó por PCR con iniciadores universales y específicos. Con base en las secuencias parciales de los genes 16S rRNA, proteína putativa y espacio intergénico 16S-23S rRNA, las 11 cepas aisladas mostraron 100 % de cobertura e identidad con la cepa CP023203.1 de *B. glumae* depositada en el NCBI. El análisis de secuencias específicas para esta bacteria, como la del gen de proteína putativa (Bglu3), posibilita la identificación precisa de *B. glumae* y su discriminación entre poblaciones de *B. gladioli*, las cuales exhiben una elevada similitud fenotípica con las colonias de *B. glumae*, así como en el mecanismo de biosíntesis de toxoflavina, causando síntomas idénticos a los de *B. glumae* en semillas y panículas de arroz (Lee *et al.*, 2018; Nandakumar *et al.*, 2009). Asimismo, el análisis de la secuencia del espacio intergénico 16S-23S ARNr (Og) permite separar poblaciones de *B. glumae* de otros patógenos transmitidos por semillas de arroz como *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Kang *et al.*, 2016). *Burkholderia glumae* es un patógeno que se transmite por semilla (Cui *et al.*, 2016; Chompa *et al.*, 2022) y se ha evidenciado que la infección de las semillas de arroz es la principal fuente de diseminación de la bacteria dentro de un país (Abhishek-Gowda *et al.*, 2022). Se estima que la presencia de *B. glumae* puede causar pérdidas hasta de 75 % en el rendimiento y calidad del grano, dependiendo de la variedad de arroz en regiones con alta temperatura y humedad relativa (Fory *et al.*, 2014; Shew *et al.*, 2019), como es el caso de las regiones donde se cultiva arroz en México.

En esta investigación, *B. glumae* se aisló de semillas de siete (63.6 %) variedades de arroz: GOLFO FL-16, INIFLAR-R, INIFLAR-RT, IRGA, Milagro Filipino, Morelos A-98 y PACÍFICO FL-15. La bacteria se aisló con mayor frecuencia (43 %) de las semillas de la variedad Milagro Filipino, lo que resulta de gran relevancia, ya que esta variedad actualmente registra el 86.8 % de la superficie sembrada en México y se cultiva en ocho de los 12 estados productores de arroz, seguida de la variedad tipo Morelos, con 7.6 % de la superficie total cultivada a nivel nacional (SIAP, 2023).

Hasta ahora, los métodos de control químico, biológico y prácticas culturales no han sido eficientes para el óptimo manejo del TBP (Mizobuchi *et al.*, 2018; Ortega y Rojas, 2021). La resistencia genética de las plantas se considera una de las principales estrategias de control de las enfermedades bacterianas; sin embargo, a nivel mundial, no se han identificado variedades ni híbridos de arroz con resistencia completa a *B. glumae*. Se han evaluado diversas variedades con el fin de identificar materiales con algún grado de tolerancia o resistencia a la bacteria; pero las variedades cultivadas han mostrado altos niveles de susceptibilidad y niveles moderados de resistencia (Mizobuchi *et al.*, 2018; Shew *et al.*, 2019). No obstante, se consigna que la resistencia a *B. glumae* en el cultivo de arroz es cuantitativa (asociada a múltiples genes), por lo que se ha sugerido el mapeo de Quantitative Trait Locus (locus de rasgos cuantitativos) (QTL) en las variedades de arroz con estos niveles de resistencia (Pilet-Nayel *et al.*, 2017).

La inoculación de la cepa CPM01 de *B. glumae*, identificada en este estudio, confirmó la patogenicidad de la bacteria en semillas y plántulas de arroz de las variedades Milagro Filipino e INIFLAR-R, ambas cultivadas extensivamente en México. Se observó una mayor severidad en semillas, raíces y tallos de la variedad Milagro Filipino, lo que sugiere que podrían existir diferentes respuestas de susceptibilidad a la infección de *B. glumae* en plántulas de las variedades de arroz cultivadas en México.

Hasta la fecha, no existe algún reporte de *B. glumae* causando la enfermedad del TBP en el cultivo de arroz en México. Sin embargo, en este estudio se evidencia la presencia de *B. glumae* en semillas con síntomas de manchado de glumas en siete de las 11 variedades de arroz que se cultivan en México; entre ellas, la variedad Milagro Filipino, la cual registra el 86.8 % de la superficie nacional cultivada (SIAP, 2023). Por lo anterior, es necesario profundizar en el conocimiento acerca del origen y vía de ingreso al país, así como la variabilidad genética y virulencia de las poblaciones de *B. glumae* identificadas en este estudio. En países altamente productores de arroz como Tailandia, Malasia e India, el conocimiento sobre la variabilidad genética y virulencia de *B. glumae* ha sido importante para el desarrollo de estrategias de manejo del TBP (Jungkhun *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2023; Ramachandran *et al.*, 2021; Sreenayana *et al.*, 2024).

En 2016, se evaluaron materiales genéticos de arroz en condiciones del trópico seco y húmedo de México. De esta evaluación, se seleccionaron las variedades INIFLAR- RT, INIFLAR-R, Pacífico FL-15 y Golfo FL-16 al mostrar alto potencial de rendimiento, buena calidad industrial del grano y moderada resistencia a *Magnaporthe oryzae* (sinónimo de *Pyricularia oryzae*), al virus del hongo blanco (RHBV) y a *Bipolaris oryzae*, agentes causales de las enfermedades “quema del arroz”, “hoja blanca del arroz” y “mancha marrón del arroz”, respectivamente (INIFAP-Fondo Sectorial SAGARPA-CONACyT, 2016); no obstante, en esta evaluación no se consideró a *B. glumae*.

La incorporación de la resistencia a *B. glumae* en las variedades de arroz requiere de una evaluación minuciosa de la respuesta de los materiales genéticos disponibles contra el patógeno, con el fin de identificar aquellos con mayor resistencia (Zhou, 2019). Debido a la relevancia que tiene *B. glumae* en el cultivo de arroz a nivel global, en México es fundamental evaluar el nivel de resistencia contra *B. glumae* de las variedades de arroz cultivadas en la actualidad, ya que se desconoce el grado de susceptibilidad a este patógeno bajo las condiciones ambientales que prevalecen en las áreas en las que se cultiva arroz. En consecuencia, los resultados de esta investigación aportan información relevante para el cultivo de arroz en México, ya que la detección temprana y precisa de *B. glumae* en semilla se considera un prerequisito fundamental para el desarrollo de estudios epidemiológicos, limitar su diseminación, así como para la implementación oportuna de estrategias de contención, prevención y mejoramiento genético de variedades de arroz con resistencia a este patógeno (Abhishek-Gowda *et al.*, 2022; Faizal-Azzizi y Lau, 2022; Kumar *et al.*, 2023).

CONCLUSIONES

Burkholderia glumae es el agente causal del manchado de glumas en semillas de arroz, se detectó en siete de las once variedades de arroz que se cultivan en México (GOLFO FL-16, INIFLAR-R, INIFLAR-RT, IRGA, Milagro Filipino, Morelos A-98 y PACÍFICO FL-15 de

11). La bacteria se presentó con mayor prevalencia en la variedad Milagro Filipino, la cual es una de las variedades más extensivamente cultivadas en diferentes regiones del país. En esta investigación se reporta, por primera vez, la presencia de *B. glumae* en México en semillas de arroz con síntomas de manchado de glumas. Estos resultados son de gran importancia para el desarrollo de investigaciones futuras enfocadas en el establecimiento de estrategias de contención y manejo, y en el mejoramiento genético de variedades de arroz cultivadas en México con resistencia a *B. glumae*.

Conflicto de interés

Los autores declaramos que no existe conflicto de interés relacionado con esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero brindado a este trabajo por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), mediante la beca doctoral otorgada al primer autor, y al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Institución en donde se realizó la investigación.

Contribuciones del autor

Gabriel Alejandro Hernández-Nava: Realizó los experimentos, recopiló datos y redactó su tesis doctoral con base en esta investigación. **Sergio Aranda-Ocampo:** Concepción, diseño y conducción de la investigación, redacción, revisión y edición del borrador original. **Guadalupe Valdovinos-Ponce, Obdulia Segura-León, Mónica Osnaya-González, Eridani García-Vázquez, Sergio Ramírez-Rojas y Leonardo Hernández-Aragón:** Investigación, metodología, revisión del borrador original. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

REFERENCIAS

- Abhishek-Gowda HR, Tripathi R, Tewari R and Vishunavat K. 2022. Morphological and molecular characterization of *Burkholderia glumae* causing panicle blight of paddy. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117:101755. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101755>
- CABI. 2021. *Burkholderia glumae* (bacterial grain rot). Consultado en internet el 03 de mayo de 2023. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.44964>
- Chompa SS, Akter A, Sadeq ABM, Rahman ME, Rashid HO, Ibnat N and Hossain MB. 2022. An Overview of Major Bacterial Diseases of Rice and Management Strategies for Their Control in Malaysia. *Global Scientific Journal*, 10(4): 1074-1102.
- Cui Z, Zhu B, Xie G, Li B and Huang S. W. 2016. Research status and prospect of *Burkholderia glumae*, the pathogen causing bacterial panicle blight. *Rice Science* 22: 111-118.
- Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.01.007>
- Faizal-Azizi MM and Lau HY. 2022. Advanced diagnostic approaches developed for the global menace of rice diseases: a Review. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 44(5):627-651. <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2053588>

- FAOSTAT. 2023. Food Agriculture Organization Statistics. URL <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL> [1 September 2023].
- Flórez-Zapata NMV and Uribe-Vélez D. 2011. Determination of the infection of *Burkholderia glumae* in commercial Colombian rice varieties. Revista - Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 64(2): 6093-6104.
- Fory PA, Triplett L, Ballen C, Abello JF, Duitama J, Aricapa MG, Prado GA, Correa F, Hamilton J, Leach, JE, Tohme J and Mosquera GM. 2014. Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. Phytopathology, 104:436-444. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0186-RPMid:24261408>
- Galkiewicz JP and Kellogg CA. 2008. Cross-Kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. Applied Environmental Microbiology, 74(24): 7828-7831. <http://doi.org/10.1128/AEM.01303-08>
- Gil J, Ortega L, Rojas JA and Rojas CM. 2022. Genome Sequence Resource of *Burkholderia glumae* UAPB13. PhytoFrontiers, 2(2):140-142. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-10-21-0070-A>
- Goszczynska T, Serfontein JJ and Serfontein S. 2000. Introduction to practical phytobacteriology: a manual for phytobacteriology by SAFRINET, SDC Switzerland. 83 p. URL https://www.researchgate.net/publication/237021880_Introduction_to_Practical_Phytobacteriology_A_manual_for_phytobacteriology. [1 May 2023].
- Ham JH, Melanson, RA and Rush, MC. 2011 *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? Molecular Plant Pathology, 12:329-339. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00676.x>
- Hasegawa M. 2012 Chemical control of rice plant rot after transplanting caused by *Burkholderia glumae*. Japan Journal Phytopathology, 78:553.
- Jungkhun N, Gomes de Farias AR, Watcharachaiyakup J, Kositcharoenkul N, Ham JH and Patarapuwadol, S. 2021. Phylogenetic characterization and genome sequence analysis of *Burkholderia glumae* strains isolated in Thailand as the causal agent of rice bacterial panicle blight. Pathogens, 11(6): 676. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060676>
- Kang JI, Kang MH, Noh TH, Shim HK, Shin DB and Heu S. 2016. Simultaneous Detection of Three Bacterial Seed-Borne Diseases in Rice Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. Plant Pathology Journal, 32(6): 575-579. [10.5423/PPJ.NT.05.2016.0118](https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.05.2016.0118).
- Koike H. 1965. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. Phytopathology, 55: 317-319.
- Kumar S, Mondal KK, Ghoshal T, Kulshreshtha A, Sreenayana B, Lakshmi MA, Mrutyunjaya S, Rashmi ER, Kalaivanan NS, Kundu A and Mani C. 2023. Phylogenetic analysis, molecular characterization and virulence profiling based on toxoflavin gene of an Indian BG1 strain of *Burkholderia glumae* causing panicle blight of rice. 3 Biotech, 13(7):239. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03660-6>
- Lee C, Lee HH, Manna M, Kim N, Park J, Kim J and Seo YS. 2018. Genomics-based Sensitive and Specific Novel Primers for Simultaneous Detection of *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* in Rice Seeds. The Plant Pathology Journal 34(6): 490-498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2018.0136>
- Li L, Wang L, Liu LM, Hou YX, Li QQ and Huang SW. 2016. Infection Process of *Burkholderia glumae* Before Booting Stage of Rice. Journal Phytopathological, 164:825-832. [10.1111/jph.12502](https://doi.org/10.1111/jph.12502).
- Maurya R, Singh M, Srivastava D and Rathor S. 2023. Insights from the Conventional Breeding and Molecular Approaches for Rice Bacterial Panicle Blight Disease Resistance. In Bacterial Diseases of Rice and Their Management. Apple Academic Press. pp. 129-142. <https://doi.org/10.1201/9781003331629-7>
- Mizobuchi R, Fukuok, S, Tsuiki C, Tsushima S and Sato H. 2018. Evaluation of major rice cultivars for resistance to bacterial seedling rot caused by *Burkholderia glumae* and identification of Japanese standard cultivars for resistance assessments. Breeding Science, 70(2):221-230. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19117>
- Nandakumar R, Shahjahan AKM, Yuan XL, Dickstein ER, Groth DE, Clark CA, Cartwright RD and Rush MC. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. Plant Disease, 93(9):896-905. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0896>
- Ortega L and Rojas CM. 2021. Bacterial Panicle Blight and *Burkholderia glumae*: From pathogen biology to disease control. Phytopathology, 111(5):772-778. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0401-RVW>
- Pilet-Nayel ML, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan MC, Fournet S, Durel CE and Delourme R. 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. Frontiers in Plant Science 8:1838. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01838>

- Quesada-González A and García-Santamaría F. 2014. *Burkholderia glumae* in the rice crop in Costa Rica. Agronomía Mesoamericana. 25(2): 371-381. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15452>
- Ramachandran K, Vijaya SI and Ahmad FN. 2021 Characterization and identification of *Burkholderia glumae* as the causal pathogen of bacterial panicle blight of rice (*Oryza sativa* L.) in Malaysian rice granaries. Journal of General Plant Pathology, 87: 164–169. <https://doi.org/10.1007/s10327-021-00991-1>
- Sayler RJ, Cartwright RD and Yang YN. 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. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0603>
- Shew AM, Durand-Morat A, Nalley LL, Zhou XG, Rojas C and Thoma G. 2019. Warming increases bacterial panicle blight (*Burkholderia glumae*) occurrences and impacts on USA rice production. PLoS ONE, 14: e0219199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219199>
- SIAP. 2023. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. URL <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> [1 August 2023].
- Sreenayana B, Mondal KK, Mathiyalagan N, Shanmugam NK, Kumar S, Reddy SM and Manil C. 2024. Molecular characterization and evaluation of novel management options for *Burkholderia glumae* BG1, the causative agent of panicle blight of rice (*Oryza sativa* L.). Molecular Biology Report, 51:519. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09498-2>
- Tsushima S, Wakimoto S and Mogi S. 1986. Selective medium for detecting *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei, the causal bacterium of grain rot of rice. Japanese Journal of Phytopathology, 52(2): 253-259. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.52.253>
- Ura H, Furuya N, Iiyama K, Hidaka M, Tsuchiya K and Matsuyama N. 2006. *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. Journal of General Plant Pathology, 72: 98-103. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0256-6>
- Zhou XG. 2019. Sustainable strategies for managing bacterial panicle blight in rice. In Protecting rice grains in the post-genomic era. London, UK: IntechOpen. Pp. 67-84. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84882>
- Zhou-qi C, Bo Z, Guan-lin X, Bin L and Shi-wen H. 2016. Research status and prospect of *Burkholderia glumae*, the pathogen causing bacterial panicle blight. Rice Science, 23(3): 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.01.007>