

ASOCIO DEL ÁCIDO OXÁLICO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN EL PROCESO INFECTIVO DE LA BACTERIA *Burkholderia glumae* EN EL CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*)

Ing. Luis Vargas Cartagena¹

RESUMEN

Asocio del ácido oxálico y peróxido de hidrógeno en el proceso infectivo de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*). El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitoprotección del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) entre los meses de abril y septiembre del año 2018. El objetivo fue determinar la importancia del ácido oxálico y el peróxido de hidrógeno en el proceso infectivo de *Burkholderia glumae* en la fase vegetativa (follaje) y reproductiva (panículas) del arroz. Los resultados obtenidos evidenciaron que se logró determinar en forma indirecta, mediante la inoculación de varias cepas de *B. glumae* en hojas de café, el rompimiento del tejido celular del follaje debido a la liberación de ácido oxálico. La incidencia en el daño mecánico osciló entre 50% y 100% por el envés de la hoja y de 6.25% a 56.25% por el haz de la hoja. Los análisis de refracción de rayos X elaborados a través de microscopía electrónica de barrido identificaron la presencia de cristales de calcio, con valores obtenidos entre 3.8 y 4 KeV (Electronvoltios) los cuales provenían del asocio del ácido oxálico liberado por la bacteria en adición con las moléculas de calcio del sustrato artificial empleado. Se obtuvo una modificación del sustrato artificial tradicional empleado para el crecimiento de bacterias del género *Pseudomonas* spp, el cual consistió en la adición de peptona a base de sólidos de leche (10g / 500ml de agua destilada estéril), a fin de proporcionar el elemento calcio e inducir a la bacteria a la producción de cristales de oxalato de calcio. Los tratamientos con aplicaciones individualizadas de ácido oxálico sintético y peróxido de hidrógeno sintético al 2% mostraron síntomas coincidentes con los daños inducidos por la bacteria en condiciones naturales. La mezcla de ambas sustancias (ácido oxálico + peróxido de hidrógeno) evidenció aún más la similitud con los síntomas que desarrolla la bacteria en condiciones naturales. Los resultados logrados evidencian la importancia que tienen ambas toxinas en el proceso de patogénesis de *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz y la necesidad de realizar estudios para la búsqueda de sustancias supresoras o inhibidoras de estas toxinas en pro de su empleo en planes de manejo integrado de esta bacteria.

Palabras clave: Patogenicidad, ácido oxálico, peróxido de hidrógeno, concentraciones, *Burkholderia glumae*

Keywords: Pathogenicity, oxalic acid, hydrogen peroxide, concentrations, *Burkholderia glumae*

¹ Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA - Costa Rica. lvargasc@inta.go.cr. Sede de Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur, San José.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del añublo bacterial de la panícula del arroz es inducida por la bacteria *Burkholderia glumae* y se caracteriza por afectar severamente el llenado del grano. Se reportó por primera vez en Japón en la década de los 50, luego fue diseminada entre los años 1995 y 1996 en China, Taiwán, Corea, India, Filipinas y Tailandia. En Colombia se identificó en el año 1987 con bajos niveles de incidencia, en el año 1996 se reportó en los arrozales de Luisiana en los Estados Unidos y en Panamá en el año 2006 (Prado, 2010). La bacteria no produce pigmento fluorescente en el medio de cultivo BDKing, es gram negativa y posee entre uno a tres flagelos. En orden de importancia y bajo las condiciones agroclimáticas de Costa Rica, dentro de los síntomas que provoca en el cultivo del arroz se destacan los siguientes: 1- Panícula erecta, 2- Decoloración, manchado y vaneamiento de la panícula, 3- Manchado de las espiguillas de color cafezusco a pajizo, 4- En planta adulta, decoloración de la vaina de la hoja bandera, 5- En el follaje, lesiones ligeramente irregulares de color pajizo y rodeadas de un borde café, del borde de la hoja hacia adentro, esto en condiciones de alta incidencia y 6- En la plántula, pudrición de aspecto acuoso en el tallo y la hoja.

La presencia de la enfermedad se ve favorecida por altas temperaturas nocturnas (28°C), altas temperaturas diurnas (32-38°C) y alta humedad relativa (> 80%) (Mew, 1992). La enfermedad se ve favorecida por el uso de altas concentraciones de nitrógeno y se disemina por salpique de lluvia con vientos fuertes y contacto de planta a planta. La bacteria infecta la semilla y puede crecer epifítica en el tejido de las plantas a bajas concentraciones hasta la emergencia de la panícula, en donde invade los espacios entre las células de la epidermis externa y el parénquima esponjoso del lema, caracterizado por tener paredes celulares delgadas (Mew, 1992).

Los factores de virulencia que destacan a este patógeno son: la producción de la toxina toxoflavina, producción de enzimas lipasas y catalasas y la formación de flagelos (Rush, *et al.* 2010). Muchos autores mencionan la importancia de la toxina toxoflavina como un agente crítico en la infección de la bacteria (Sato *et al.* 1989;

Ham *et al.* 2011; Jeong *et al.* 2003; Florez y Uribe 2011; Latuasan y Berends 1961; Matsuda y Sato 1988; Shingu y Yoneyama 2004; Suzuki *et al.* 2004 y Iiyama *et al.* 1995). Pocos autores hacen mención del ácido oxálico en la bacteria *Burkholderia glumae* (Nakata y He 2010; Kato, *et al.* 2013; Kato, *et al.* 2014 y Oh, *et al.* 2014).

Otros autores hacen mención de la presencia de oxalatos (ácido oxálico) en microorganismos en general; tales como hongos y bacterias, interviniendo en factores relacionados con la protección hacia ambientes alcalinos (Dutton y Evans 1996, Sayer y Gadd 1997, Appanna y Hamel 1999; Green y Clausen 2003), como factor de virulencia (Duttons y Evans 1996; Hegedus y Rimmer 2005) en la viabilidad de las células (Lambert y Nakata 2016) y obtención de nutrientes (Shimada *et al.* 1994; Dutton y Evans 1996; Ghariieb, 2000 y Munir *et al.* 2001).

En este estudio se realizaron una serie de pruebas en orden cronológico con la finalidad de responder a los siguientes objetivos: 1- Determinar si *Burkholderia glumae* induce lesiones en hojas de café (*Coffea arabica*) producto de la liberación de ácido oxálico, 2- Determinar si hay formación de cationes de calcio asociados a la producción de ácido oxálico, 3- Desarrollar un sustrato artificial para favorecer la producción de ácido oxálico en la bacteria *Burkholderia glumae*, 4- Evaluar diferentes concentraciones de ácido oxálico y peróxido de hidrógeno y su efecto sobre espigas y follaje de arroz y 5- Evaluar el efecto solo y combinado de una concentración determinada de ácido oxálico y peróxido de hidrógeno sobre las panículas de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inoculación de la bacteria *B. glumae* en hojas de café para determinar su efecto

Se estableció un ensayo en hojas de café (*Coffea arabica*) sobre las cuales se inoculó una masa compacta o “moquillo” de la bacteria *Burkholderia glumae* a una concentración aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc) / ml. Se depositó el moquillo en ocho puntos de inoculación tanto en el haz como en el envés de la hoja de café y el control fue hojas con solo el depósito de agua destilada estéril (figura 1). Se emplearon en forma aleatoria cinco cepas de la bacteria provenientes del Banco de Microorganismos del Laboratorio de Fitoprotección del INTA (INTA B3, INTA B19, INTA B20, INTA B21 e INTA B47). Las hojas se depositaron dentro de platos petri de vidrio grandes

(14,5 cm diámetro x 3 cm alto) con papel toalla, debidamente esterilizados. Luego se dejaron en condiciones semi-controladas en un área ventilada, con luz indirecta sobre mesas de laboratorio a una temperatura promedio de 24°C. Se empleó un diseño irrestricto al azar para cada punto de la hoja inoculada (haz y envés), compuesto por seis tratamientos y dos repeticiones. Se determinó la incidencia de daño mecánico sobre la epidermis de la hoja a los 4, 8 y 12 días después de la inoculación (ddi). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias según prueba DMS al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2002).

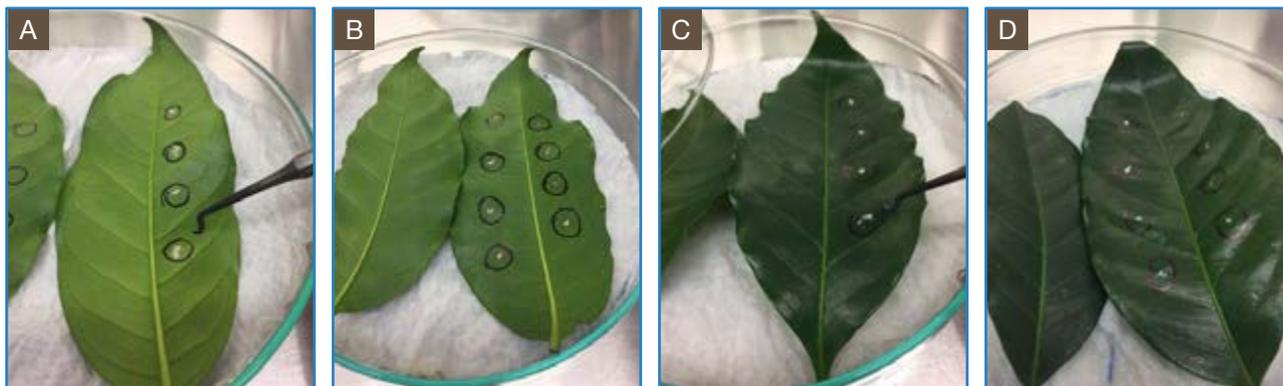


Figura 1. Proceso de inoculación del moquillo de la bacteria *Burkholderia glumae* sobre hojas de café. (A-B): envés de la hoja, (C-D): haz de la hoja. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Determinación de cristales de oxalato de calcio producidos por *B. glumae*

Para el crecimiento de *Burkholderia glumae* se implementó el sustrato artificial BDK a base de peptona, pero proveniente de sólidos de leche, el cual suministra calcio dentro de su composición (cuadro 1). Para el crecimiento exponencial de la bacteria se utilizó este medio, pero sin agar (medio líquido) en un volumen de 30 ml y se sometió durante 48 horas en agitación a 115 rpm en un agitador horizontal modelo SI-1600

Orbital Genie. Luego, a fin de obtener un sedimento de posibles cristales de oxalato de calcio se procedió a un centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm con la adición de ácido acético al 5%; volviendo a centrifugar por duplicado el sedimento con agua destilada estéril a 3500 rpm. La determinación de calcio se realizó mediante la técnica de análisis elemental por energía dispersiva de rayos X (EDX), con un detector de la marca IXRF

Systems, acoplado a un microscopio electrónico de barrido Hitachi S3700N del Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica (UCR). Se determinó los picos de calcio utilizando el software Iridium Ultra, basado en el valor de energía en kilo electrón voltio (KeV), el cual es específico para cada elemento y está representado en el eje X del espectrograma.

Cuadro 1. Sustrato artificial BDK con peptona de sólidos de leche para el crecimiento de *Burkholderia glumae*. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Componente	Cantidad en 500 ml de agua destilada estéril
Peptona de sólidos de leche (Ca) CAS: 73049-73-7	10g
Agar	8g
Glicerol o glicerina (C ₃ H ₈ O ₃)	8ml
Fosfato ácido dipotásico (K ₂ HPO ₄)	0.75g
Sulfato de magnesio heptahidratado (Mg SO ₄ 7H ₂ O)	0.75g



Figura 2. Sustrato líquido BDK con peptona de sólidos de leche y suspensión de posibles cristales de oxalato de calcio. Laboratorio de Fitoprotección / INTA, San José, Costa Rica. 2018.

Prueba de inoculación con ácido oxálico

Para esta prueba se tomaron secciones de lámina foliar, espiguillas y panículas de arroz de la variedad INTA PUITÁ y se utilizaron cuatro concentraciones de ácido oxálico (1%, 1.5%, 2.0% y 2.5%). Para el caso del follaje se depositaron 10 gotas / lámina foliar y para las espiguillas, una gota / espiguilla. Cada gota estuvo compuesta de 0.1 ml de ácido oxálico, en ambos casos la inoculación se realizó con la ayuda de un inyector (jeringa de insulina). Para el control se realizó el mismo procedimiento con agua destilada estéril. (figuras 3 y 4). La inoculación del ácido oxálico en las panículas se realizó mediante frotación con pinceles previamente esterilizados, de manera que quedara adherido en la superficie de las espiguillas. El material inoculado se dejó en un área ventilada, con luz indirecta sobre mesas de laboratorio a una temperatura promedio de 24°C.

Para cada uno de los sistemas de inoculación se empleó un diseño irrestricto al azar compuesto por cinco tratamientos y dos repeticiones. Se determinó la incidencia de daño mecánico ejercido por el ácido oxálico sobre las hojas y espiguillas y la severidad para el caso de las panículas. Para la evaluación de la severidad en la panícula se empleó la escala que se describe en el Cuadro 2. Las evaluaciones se realizaron 1 y 4 días después de la inoculación (ddi).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias según prueba DMS al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2002).

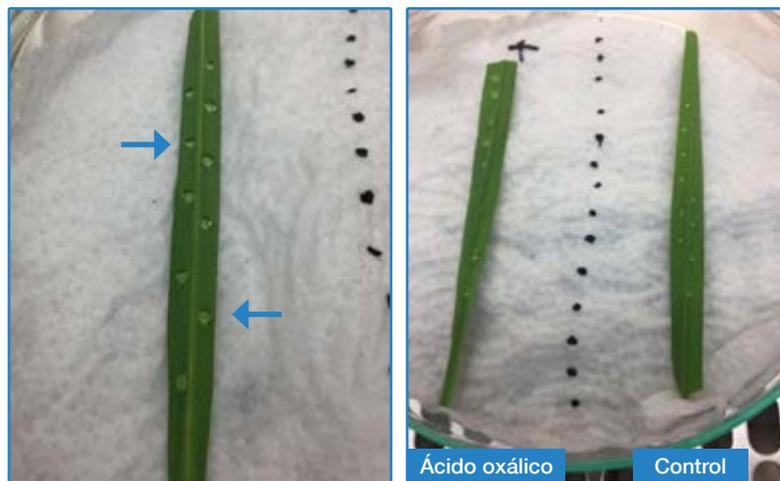


Figura 3. Depósito de gotas de ácido oxálico (flechas) sobre el follaje de arroz. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

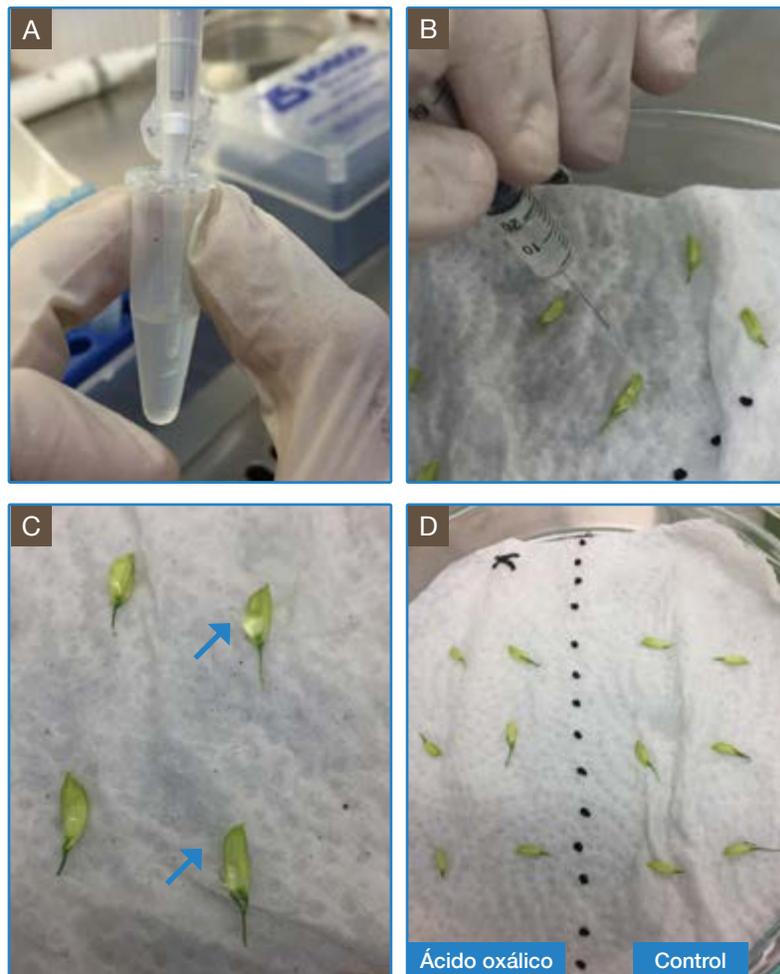


Figura 4. Ácido oxálico sobre las espiguillas de arroz. (A): Elaboración de la concentración. (B-D): Depósito del ácido oxálico sobre las espiguillas (flechas). Laboratorio de Fitoprotección. San José, Costa Rica. 2018.

Prueba de inoculación con peróxido de hidrógeno

Para esta prueba se utilizaron seis concentraciones de peróxido de hidrógeno (0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% y 3,0%). Se empleó la misma técnica de inoculación para el follaje indicada en la prueba anterior con el ácido oxálico. También se procedió a inocular panículas por medio de pinceles previamente esterilizados, el procedimiento fue el de frotar uniformemente las espiguillas de las panículas con el peróxido de hidrógeno. Las muestras inoculadas se colocaron en un área ventilada, con luz indirecta sobre mesas de laboratorio a una temperatura promedio de 24°C.

Se empleó un diseño irrestricto al azar compuesto por siete tratamientos dos repeticiones para cada método de inoculación. Dos días después de la inoculación (ddi), se determinó la incidencia de daño mecánico ejercido por el peróxido de hidrógeno sobre las hojas y la severidad ejercida en las panículas. Para la evaluación de la severidad en la panícula se empleó la escala que se describe en el Cuadro 2.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias según prueba DMS al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2002).

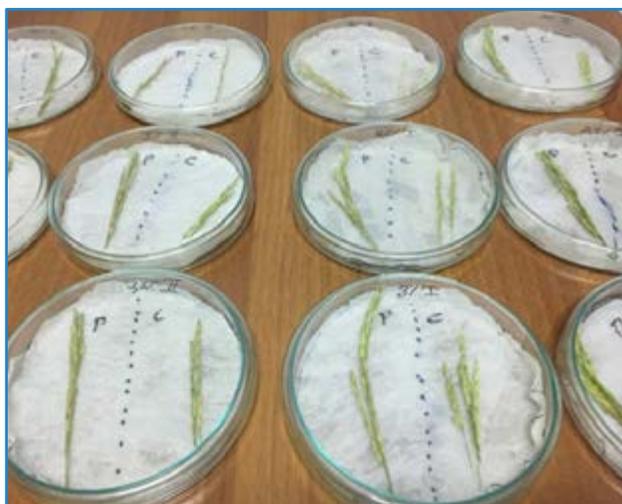
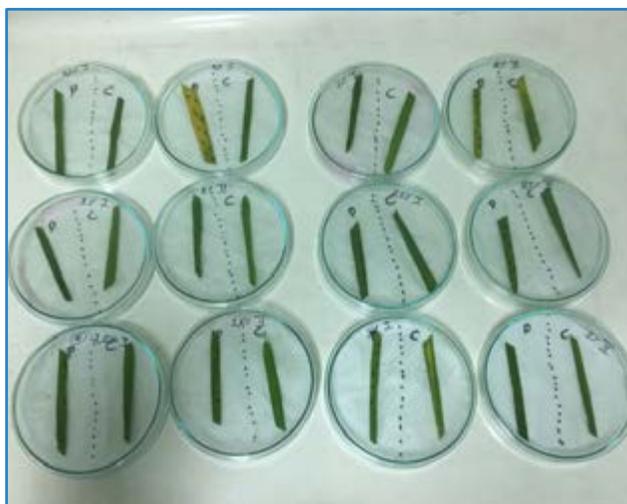


Figura 5. Panorámica del montaje de la prueba con las concentraciones de peróxido de hidrógeno en hojas y panículas. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Prueba de inoculación con ácido oxálico + peróxido de hidrógeno + *Burkholderia glumae*

En esta prueba se inoculó sobre panículas de arroz previo a la antesis, el ácido oxálico al 2%, el peróxido de hidrógeno al 2%, la mezcla de ácido oxálico + peróxido de hidrógeno (ambos al 2%), la bacteria *Burkholderia glumae* a una concentración de 1.0×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y el control constituido por agua destilada estéril. Para la aplicación se empleó un aerógrafo marca Master Airbrush modelo VC16-W22 y se atomizó 1 ml / panícula. El material inoculado con el ácido oxálico y el peróxido de hidrógeno se

colocó bajo condiciones de laboratorio en un área ventilada con luz indirecta y a una temperatura promedio de 24°C. Las muestras inoculadas con la bacteria *B. glumae* se incubaron por 48 horas a 40 °C en una incubadora Isotemp 1601D (Fisher Scientific).

Se empleó un diseño irrestricto al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Se determinó la severidad a 2 y 48 horas después de la inoculación (hdi) por medio de una escala de evaluación.

Cuadro 2. Escala de Evaluación del Añublo Bacterial de la Panícula (*Burkholderia glumae*). Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

GRADO	DESCRIPCIÓN
0	Ausencia de enfermedad
1	1% - 10% de área afectada en panícula
2	11% - 25% de área afectada en panícula
3	26 - 50 % de área afectada en panícula
4	51% - 75% de área afectada
5	76% - 100% de área afectada

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias según prueba MS al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2002).

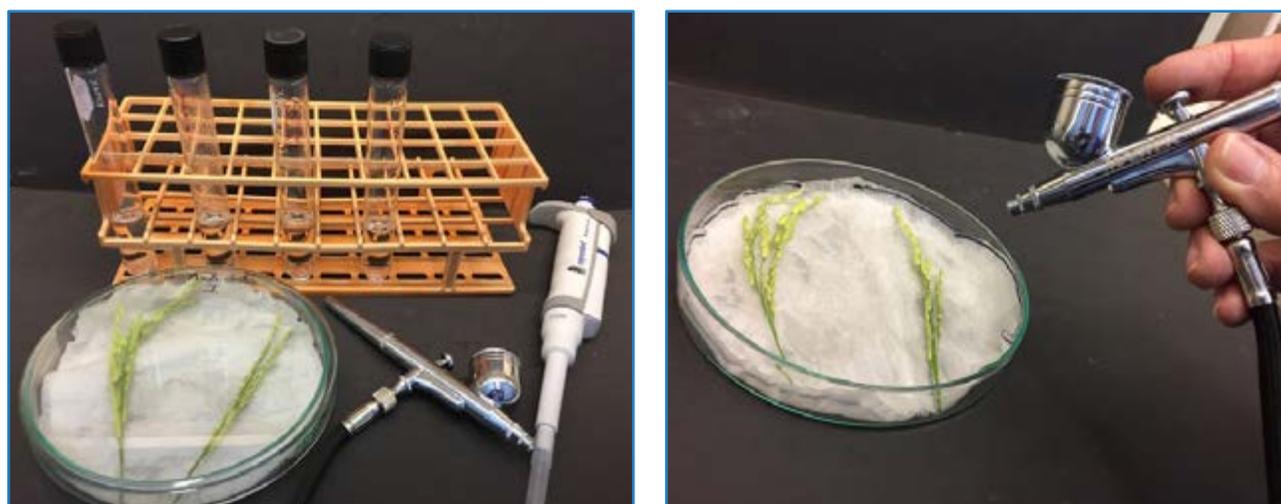


Figura 6. Materiales empleados y atomizo mediante el uso del aerógrafo. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inoculación de *Burkholderia glumae* en hojas de café para determinar su efecto

Los resultados obtenidos evidenciaron que el depósito del “moquillo” de la bacteria sobre las hojas de café degradó en forma parcial el tejido o pared celular de la hoja de café. Dicho efecto fue más notorio por el envés de la hoja, debido a la carencia de cera epicuticular en esta zona y a la presencia de más estomas, en comparación con el haz de la hoja (cuadro 3).

Respecto de las evaluaciones, se observó que doce días después de la inoculación las cepas identificadas como INTA B-3 e INTA B-19 afectaron en un 100% el tejido de las hojas por el envés, mientras que con las otras tres cepas de la bacteria la incidencia del daño osciló entre 50% y 87,5%. En el testigo con agua el tejido no presentó ningún tipo de daño. En cuanto a las

inoculaciones por el haz de las hojas, los resultados obtenidos mostraron que las incidencias de los daños por cada una de las cepas a los 12 ddi fueron más bajas que las presentadas en el envés y oscilaron entre 6,25% y 56,25%. Tampoco se presentó daño alguno en el tejido en las inoculaciones del testigo con agua.

Haciendo una comparación entre cepas y aunque no es del interés de este trabajo, es importante recalcar que la cepa INTA B-3 presentó el mayor efecto patogénico sobre las hojas de café, puesto que a partir de los 4 ddi tanto por el haz como por el envés ya se presentaban grados de afectación en el los puntos inoculados.

El objetivo de haber realizado estas inoculaciones es atribuido a la presencia de cristales de forma variada (bipiramidales y amorfos) sobre el tejido afectado de arroz (espiguillas), pero fundamentalmente su formación en sustratos artificiales de crecimiento para bacterias enriquecidos con calcio. Esto sugiere que probablemente esta bacteria produzca una toxina conocida como ácido oxálico (oxalato), tal como lo han reportado varios autores en trabajos realizados con otros microorganismos. Esta sustancia o toxina les sirve a ciertos microorganismos como medio de protección hacia ambientes alcalinos, como factor de virulencia, le da viabilidad a las células y les ayuda en la obtención de nutrientes (Rao y Tewari 1987;

Rao y Tewari 1988; Nakata y He 2010; Lambert y Nakata 2016). Para el caso del estudio, el interés es dilucidar si esta toxina es producida por la bacteria *B. glumae* como factor de virulencia.

En la enfermedad del café (*Coffea arabica*) conocida como “ojo de gallo” e inducida por el hongo *Mycena citricolor*, se ha identificado el ácido oxálico como una toxina no específica, la cual inicia el proceso infectivo y de penetración en el tejido foliar, por medio del rompimiento y degradación de la cera epicuticular, el hongo secuestra el calcio de los pectatos de la pared celular, lo cual facilita el ingreso del patógeno en el tejido del hospedero (Tewari 1990).

Para el caso del presente trabajo el moquillo depositado sobre las hojas de café estaba conformado por millones colonias bacterianas de *B. glumae*, las cuales en conjunto liberan el ácido oxálico y rompen el tejido foliar de la hoja de café. En algunas lesiones inducidas se formaron masas blanquecinas alrededor de la lesión y fueron identificadas como masas de cristales. En este caso en particular, el ácido oxálico producido y liberado logró entrar en contacto con el calcio interno de la hoja de café, formando cristales de oxalato de calcio (figura 7). Lo cual fue corroborado mediante la observación directa de dichos cristales en un microscopio de luz y coincidente con los resultados obtenidos por Rao y Tewari (1987).

Cuadro 3. Incidencia en la formación de daño tisular en hoja de café inducido por la liberación de ácido oxálico de *Burkholderia glumae*. Laboratorio de Fitoprotección. San José, Costa Rica. 2018

CEPA DE BACTERIA	INCIDENCIA DE DAÑO MECÁNICO EN HOJA DE CAFÉ*					
	HAZ			ENVÉS		
	4 ddi	8 ddi	12 ddi	4 ddi	8 ddi	12 ddi
INTA B3	31.25 (a)	43.75 (a)	56.25 (a)	87.50 (a)	100 (a)	100 (a)
INTA B19	0.00 (b)	0.00 (b)	25.00 (ab)	75.00 (ab)	93.75 (ab)	100 (a)
INTA B20	0.00 (b)	0.00 (b)	12.50 (b)	68.75 (abc)	68.75 (ab)	87.50 (ab)
INTA B21	0.00 (b)	0.00 (b)	12.50 (b)	31.25 (cd)	31.25 (cd)	50.00 (b)
INTA B47	0.00 (b)	0.00 (b)	6.25 (b)	43.75 (bc)	62.50 (bc)	62.50 (ab)
Control	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (d)	0.00 (d)	0.00 (c)

*= Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según prueba DMS 5%



Figura 7. Incidencia de daño tisular en hoja de café (haz y envés) inducido por la liberación de ácido oxálico de *Burkholderia glumae*. (A-B): Haz, (C-D): Envés, (E-F): Formación de conglomerados de cristales (flechas). Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Formación de cristales de oxalato de calcio por la bacteria *B. glumae*

El crecimiento exponencial de *B. glumae* favorecido mediante agitación horizontal del medio líquido junto con el sustrato de peptona de sólidos de leche, indujo a altas concentraciones de la bacteria a liberar de igual manera altas concentraciones de ácido oxálico, el cual al combinarse con el elemento calcio proporcionado en el medio, desencadenó en la formación de abundantes cristales de oxalato de calcio. Este comportamiento también se vio reflejado en el sustrato artificial sólido (figura 8). El análisis por Refracción de Rayos X en la determinación de cationes de calcio reveló que la suspensión de cristales previamente

obtenida efectivamente correspondió a cationes de Calcio (figura 9). Kim *et al.* (2010), en un estudio sobre la participación y ocurrencia de *B. glumae* en Korea, mencionan que la colonia bacteriana se cubría completamente de cristales, los cuales definieron, erróneamente como “cristales de toxoflavina”. Estos resultados evidencian la presencia de la toxina ácido oxálico en esta bacteria fitopatógena del cultivo del arroz, además de su otra toxina, la toxoflavina. Cada una por separado o en conjunto, podrían estar tomando acción como dos importantes factores de virulencia de la bacteria.

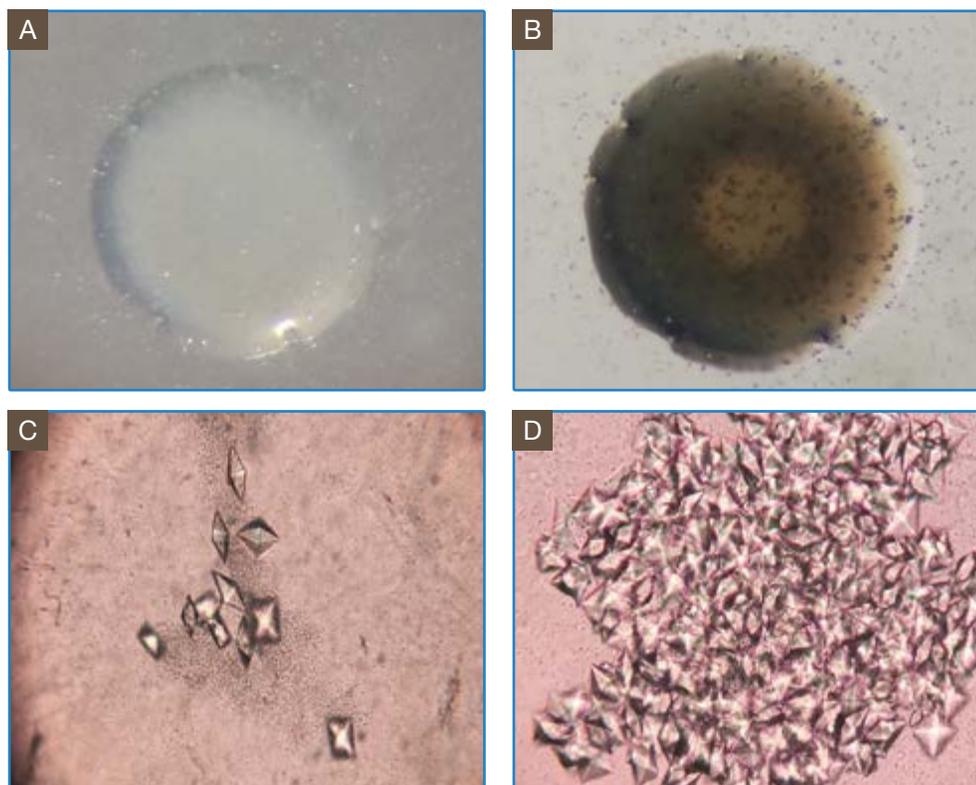


Figura 8. (A): Colonia de *B. glumae* vista con luz reflejada, (B): Misma colonia vista con luz transmitida, obsérvese la formación de cristales de oxalato de calcio dentro y fuera de la colonia, (C-D): Cristales y células bacterianas en el medio líquido a base de peptona de sólidos de leche. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

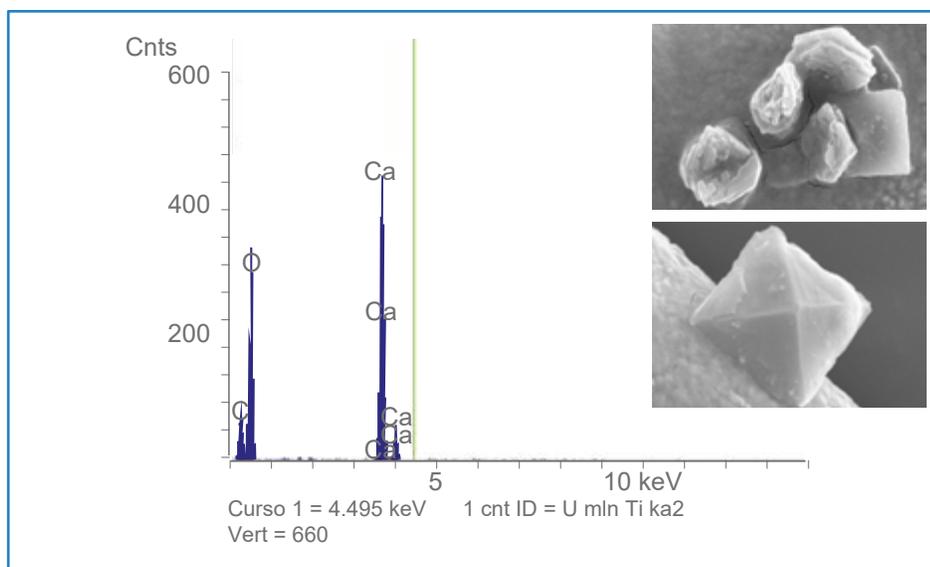


Figura 9. Espectrograma con la emisión del pico de calcio por medio de análisis de energía dispersiva de rayos X y microfotografías de los cristales bipiramidales y amorfos por microscopía electrónica de barrido.

Inoculación con ácido oxálico en tejidos de plantas de arroz

La valoración sobre el efecto ejercido de las diferentes concentraciones de ácido oxálico en tejidos de plantas de arroz, determinó que la incidencia de daño mecánico se manifestó mayormente en las concentraciones del 2% y 2,5%, tanto en espiga como en hoja (cuadro 4). En ambos casos la sintomatología consistió en una decoloración del tejido verde a un tono más claro y rodeado de un borde de color café. En condiciones naturales muchas espiguillas y el follaje, presentan una sintomatología muy similar a la obtenida con las aplicaciones dirigidas del ácido oxálico en esta prueba realizada bajo condiciones controladas (figuras 10 y 11).

De igual manera, la aplicación realizada con pinceles sobre las panículas mostró síntomas similares o coincidentes con los presentados en condiciones naturales (figura 12) y su manifestación en severidad fue en orden creciente de acuerdo a la concentración de ácido oxálico aplicada (cuadro 4). Todas las dosis aplicadas difirieron estadísticamente con el control (agua destilada estéril).

Por ejemplo, estudios realizados con diferentes concentraciones de esta sustancia en hojas de café, han demostrado que la lesión inducida es muy similar a la que provoca en estado natural el hongo causante de la enfermedad Ojo de Gallo (*Mycena citricolor*) en el cultivo de café (Rao y Tewari 1987).

En estudios de laboratorio realizados en Japón, se ha logrado determinar la presencia de cristales de oxalato de calcio y de esta manera la producción de ácido oxálico por colonias de *Burkholderia glumae* en estado salvaje o natural y su diferenciación con la aparición de colonias mutantes. Adicionalmente, las colonias salvajes lograron regular y bajar el pH del medio en que crecían con el fin de poder aprovechar aminoácidos y fuente de carbono. Los mismos autores indican que la producción de ácido oxálico se podría considerar como un factor más de virulencia en la bacteria *Burkholderia glumae* (Kato, et al. 2013, Kato et al. 2014).

Cuadro 4. Incidencia y severidad del daño tisular en diferentes tejidos de plantas de arroz, según concentración de ácido oxálico inoculada. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO OXÁLICO	INCIDENCIA DE DAÑO MECÁNICO*				SEVERIDAD*
	ESPIGA		HOJA		PANÍCULA
	1 ddi	4 ddi	1 ddi	4 ddi	4 ddi
Acido oxálico 1.0%	0.00 (a)	0.00 (b)	5.00 (b)	64.00 (a)	62.50 (b)
Acido oxálico 1.5%	0.00 (a)	0.00 (b)	30.50 (b)	78.00 (a)	75.00 (ab)
Acido oxálico 2.0%	25.00 (a)	67.00 (a)	100 (a)	100 (a)	92.50 (a)
Acido oxálico 2.5%	33.00 (a)	74.50 (a)	100 (a)	100 (a)	92.50 (a)
Control	0.00 (a)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (b)	0.00 (c)

*= Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según prueba DMS 5%



Figura 10. (A, B y C): Daño inducido por la aplicación de ácido oxálico al 2% sobre la espiga de arroz, (D): Control aplicado con agua destilada estéril, (E-F): Síntoma en condiciones naturales inducido por *Burkholderia glumae*. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

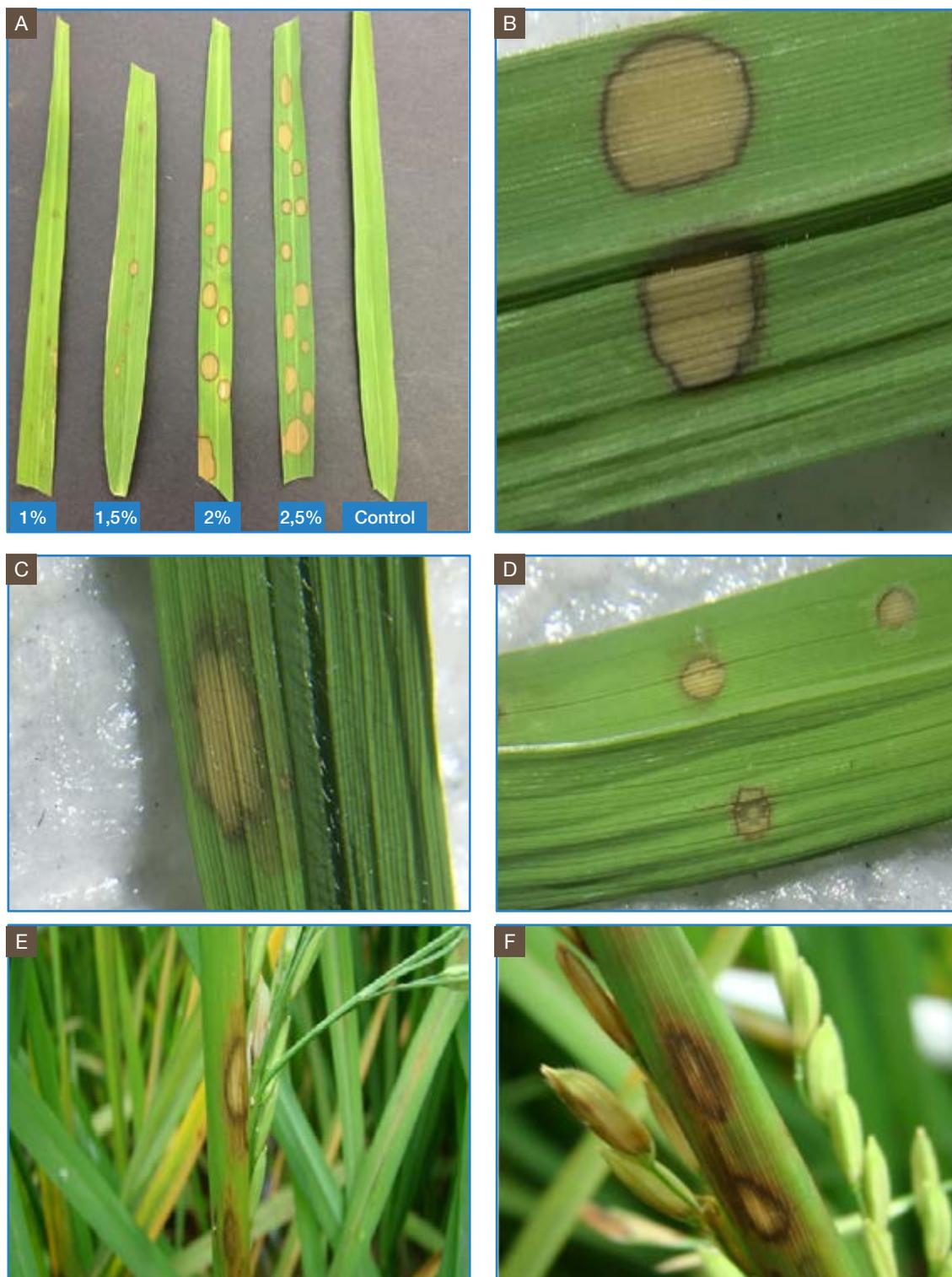


Figura 11. (A): Daño inducido por la aplicación de diferentes concentraciones de ácido oxálico (1%, 1,5%, 2%, 2,5% y Control), (B, C y D): ácido oxálico al 2%, (E-F): Síntoma en condiciones naturales inducido por *Burkholderia glumae*. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.



Figura 12. Daño inducido por la aplicación con pincel de ácido oxálico al 2% en panícula de arroz. El control es agua destilada estéril. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Inoculación con peróxido de hidrógeno

Dos días después de la inoculación de las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno hubo manifestación del daño mecánico. Todas las concentraciones mostraron diferencia estadística con el control (agua destilada estéril) con respecto a las variables de incidencia del daño mecánico en hoja y severidad en la panícula (cuadro 5).

La toxina conocida como “toxoflavina” es uno de los factores de virulencia reportados para esta bacteria, la cual fue aislada de tejidos con manifestación de síntomas similares a los provocados por *B. glumae* en condiciones naturales (Iiyama *et al.* 1995). Esta toxina dentro de su proceso infectivo libera peróxido de hidrógeno (Latusan

y Berends 1961), el cual es catalogado como un compuesto altamente tóxico para diversos tipos de células, provocando daño tisular y también con efecto antimicrobiano (Suzuki *et al.* 2004).

Al igual que las inoculaciones con ácido oxálico, el daño mecánico generado por el peróxido de hidrógeno mostró en alguna medida similitud con las lesiones del follaje causados por la bacteria bajo condiciones naturales (figuras 13 y 14). Es importante mencionar que las lesiones en el follaje tienen menor ocurrencia y se pueden presentar cuando la incidencia y severidad de este patógeno alcanzan niveles de daño inmanejables dentro de las plantaciones de arroz.

Cuadro 5. Incidencia en la formación de daño tisular en hoja y severidad en panícula de arroz dos días después de la inoculación con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

CONCENTRACIÓN DE PEROXIDO DE HIDRÓGENO	INCIDENCIA DE DAÑO MECANICO EN HOJA*	SEVERIDAD EN PANÍCULA*
	2 ddi	2 ddi
Peróxido hidrógeno 0,5%	70.00 (a)	45.00 (b)
Peróxido hidrógeno 1,0%	85.00 (a)	87.50 (a)
Peróxido hidrógeno 1,5%	100.00 (a)	85.00 (a)
Peróxido hidrógeno 2,0%	100.00 (a)	90.00 (a)
Peróxido hidrógeno 2,5%	90.00 (a)	90.00 (a)
Peróxido hidrógeno 3,0%	95.00 (a)	90.00 (a)
Control	0.00 (b)	0.00 (c)

*= Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según prueba DMS 5%

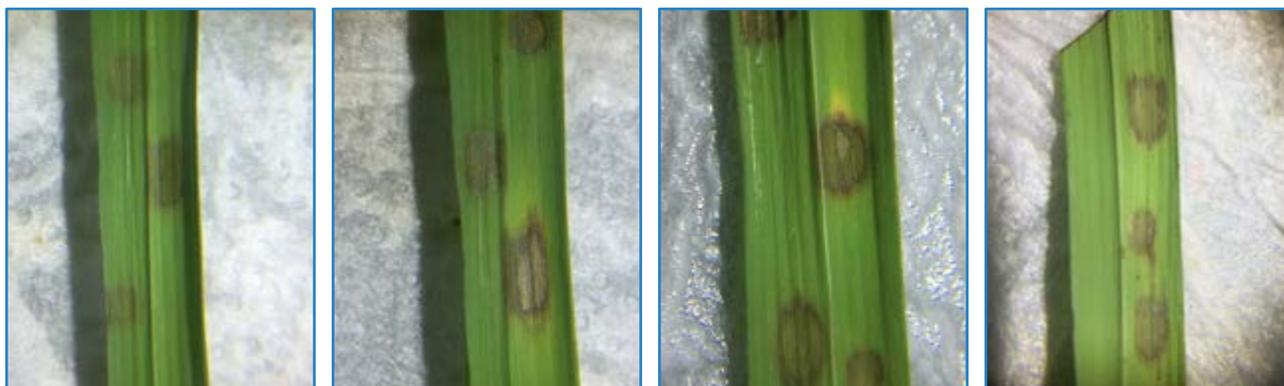


Figura 13. Daño inducido por la aplicación de peróxido de hidrógeno al 2% sobre el follaje de arroz. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.



Figura 14. Daño inducido por la aplicación de peróxido de hidrógeno al 2% sobre la panícula de arroz. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.

Inoculación con ácido oxálico + peróxido de hidrógeno + *Burkholderia glumae*

Dado que en los estudios anteriores se logró determinar mayormente daño tisular en follaje y panícula en la concentración del 2% con la aplicación de ácido oxálico y peróxido de hidrógeno; y con síntomas similares a los presentados en condiciones naturales asociados a *B. glumae*; se estableció la siguiente prueba con la inclusión de la inoculación de la mezcla de estas dos sustancias y compararlo con la inoculación de la bacteria.

Los síntomas se empezaron a observar a partir de las 2 horas luego de la inoculación con la mezcla de ácido oxálico y peróxido de hidrógeno

al 2% cada uno, mientras que para empezar a observar síntomas en la inoculación con la bacteria fue necesario esperar 48 horas. Para esta evaluación todos los tratamientos aplicados mostraron diferencias estadísticas frente al control (agua destilada estéril) y el nivel de daño fue bastante similar en el resto de los tratamientos, el cual osciló entre 82,50% y 88,75% (cuadro 6).

Es importante destacar que la sintomatología obtenida con las aplicaciones por separado del ácido oxálico y el peróxido de hidrógeno es similar a la presentada por la inoculación con *Burkholderia glumae*; de igual manera, la inoculación con la

mezcla de estas dos sustancias evidenció una gran similitud de los síntomas causados por esta bacteria en las panículas de arroz (figuras 15 y 16). En condiciones naturales el proceso de infección de la bacteria tiene ocurrencia en horas, pero la manifestación de los síntomas oscila entre 3 a 5 días. En este caso se dieron condiciones de alta temperatura (40°C) a fin de obtener los síntomas evidentes inducidos por la bacteria y estimular a las células bacterianas a su multiplicación y liberación de las toxinas en un periodo de 48 horas. En contraste, los síntomas obtenidos con el accionar del ácido oxálico y del peróxido de hidrógeno, solos o combinados, fue más rápido debido a la pureza química sintética de estas sustancias.

Los resultados obtenidos en estas pruebas demuestran la importancia que tienen estas sustancias como factores de virulencia de la bacteria y probablemente su accionar sea combinado. No obstante, podría darse el hecho de que la presencia de estas sustancias sea co-dependientes de algunos factores que estimulen su ocurrencia. Por ejemplo, Matsuda y Sato (1988) mencionan que la biosíntesis de toxoflavina depende de la temperatura, la cual oscila entre 30°C y 37°C. En el mismo sentido Kato, *et al.*, (2013) en un estudio sobre las características fenotípicas de *B. glumae* indican que la presencia de ácido oxálico se asoció a la existencia de cristales de oxalato de calcio en el sustrato, los cuales se

desarrollaron dentro y fuera de la colonia, tanto a 30°C como a 37°C y concluyen que la bacteria *B. glumae* tiene la capacidad de disminuir el pH del medio o sustrato debido a una alta producción de ácidos y crear condiciones también ácidas en un entorno donde los aminoácidos están presentes como principal fuente de carbono.

Mahenthalingam *et al.*, (2005) indican que altas densidades de la bacteria producen toxoflavina y mediante generación de peróxido de hidrógeno provocan daño tisular y obstrucción de los haces vasculares de las plantas de arroz.

Está documentado que *B. glumae* produce autoinducción, proceso denominado “Quorum Sensing” el cual es un mecanismo de regulación de la “expresión genética” en respuesta a la densidad de población celular. Las células involucradas producen y excretan sustancias, llamadas autoinductoras (acil-homoserina / AHL), que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva. Es una forma de comunicación celular que genera una modificación genética que controla la liberación de toxinas, la producción de flagelos, enzimas y hormonas (Kim *et al.* 2010, Fuqua y Greenberg 2002, Rush *et al.* 2010). El quorum sensing es esencial para la producción de toxoflavina, oxalato (ácido oxálico) y la motilidad de la bacteria (Kato *et al.* 2014).

Cuadro 6. Severidad en panícula de arroz a las 2 y 48 horas después de la inoculación (hdi), según tratamiento aplicado. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018

TRATAMIENTO	SEVERIDAD	
	2 hdi	48 hdi
Acido oxálico (2%)	70.00 (a)	82.50 (a)
Peróxido hidrógeno (2%)	70.00 (a)	86.25 (a)
Acido oxálico + peróxido de hidrógeno (2%+2%)	72.50 (a)	88.75 (a)
<i>Burkholderia glumae</i> (1.0X10 ⁸ ufc)	0.00 (b)	87.50 (a)
Control	0.00 (b)	0.00 (b)

*= Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según prueba DMS 5%



Figura 15. Severidad en panícula con la aplicación de (A): Ácido oxálico 2% vs *Burkholderia glumae*, (B): Peróxido de hidrógeno al 2% vs *Burkholderia glumae* y (C): ácido oxálico 2% + peróxido de hidrógeno 2% vs *Burkholderia glumae*. (D): Control. Laboratorio de Fitoprotección / INTA. San José, Costa Rica. 2018.



Figura 16. Severidad en panícula de arroz 48 horas después de la inoculación, según tratamiento aplicado. Laboratorio de Fitoprotección. San José, Costa Rica. 2018.

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Ing. Daniel Vargas Valverde e Ing. Katherine Bonilla Mora por el apoyo brindado

en los procesos de extracción de los cristales de calcio e inoculación de la bacteria en estudio.

LITERATURA CITADA

- Appanna, V; Hamel, R. 1999. Metal stress and adaptation in *Pseudomonas fluorescens*: new perspectives. *Recent Res Dev Microbiol* 3: 615–663.
- Dutton, M V; EVANS, C S. 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal Microbiol* 42: 881–895.
- Florez, Z N; Urube, D. 2011. Determination of the Infection of *Burkholderia glumae* in Comercial Colombian Rice Varieties. *Rev.Fac.Nal.Agr. Medellín* 64(2): 6093-6104.
- Fuqua, C; Greenberg, E. 2002. Listening in on bacteria: acyl homo serine lactona signalling. *Nav. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:685-695.
- Gharieb, M. 2000. Nutritional effects on oxalic acid production and solubilization of gypsum by *Aspergillus niger*. *Mycol Res* 104: 550–556.
- Green, F; Clausen, C. 2003. Copper tolerance of brown-rot fungi: time course of oxalic acid production. *Int Biodeter Biodegr* 51: 145–149.
- Ham, J H; Melanson, R A; Rush, M C. 2011. *B. glumae*: next major pathogen of rice? *Mol. Plant. Pathol.* 12:329-339.
- Hegedus, D; Rimmer, S. 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: when 'to be or not to be' a pathogen? *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Lett* 251: 177–184.
- Iiyama, K; Furuya, N; Takanami, Y; Matsuyama, N. 1995. A role of phytotoxin invirulence of *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 61:470-476.
- Jeong, Y; Kim, J; Kim, S; Kang, Y; Nagamatsu, T; Hwang, I. 2003. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis.* 87:890-895.
- Kato, T; Morohoshi, T; Tsushima, S; Ikeda, T. 2014. Characterization of Three Types of Quorum-Sensing Mutants in *Burkholderia glumae* Strains Isolated in Japan. *Journal of Agricultural Science.* 6 (7): 16-26.
- Kato, T; Morohoshi, T; Tsushima, S; Ikeda, T. 2013. Phenotypic characterization of colony morphological mutants of *Burkholderia glumae* that emerged during subculture. *Journal of General Plant Pathology* vol 79, 249-259.
- Kim, J; Kang, Y; Kim, J; Choi, O; Hwang, I. 2010. Occurrence of *Burkholderia glumae* on Rice and Field Crops in Korea. *Plant Pathol. J.* 26(3): 271-272.
- Lambert, P M; Nakata, P A. 2016. Determining the Biochemical Properties of the Oxalate Biosynthetic Component (Obc)1 from *Burkholderia mallei*. En línea. *PLOS ONE* 11(9): 13p. Consultado el día 27 mayo 2020. Disponible en e0163294. doi:10.1371/journal.pone.0163294
- Latuasan, H E; Berends, W. 1961. On the origin of toxicity of toxoflavin. *Biochim Biophys Acta* 52:502-508.
- Mahenthiralingam, E; Urban N T; Goldberg, J. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex". *Nat. Rev. Microbiol.* 3:144-156.
- Matsuda, I; Sato, Z. 1988. Relation between pathogenicity and pigment productivity in the causal agent of bacterial grain rot of rice. *Ann. Pytopathol. Soc. Jpn.* 54:478.

- Mew, T W. 1992. Compendium of Rice Diseases: Grain Rot. American Phytopathological Society (APS). USA. p. 9
- Munir, E; Yoon, J; Tokimatsu, T; Hattori, T; Shimada, M. 2001. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. P Natl Acad Sci USA 98: 11126–11130.
- Nakata, P; He, C. 2010. Oxalic acid biosynthesis is encoded by an operon in *Burkholderia glumae*. Department of Pediatrics, USDA/ARS Children's Nutrition Research Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA. Federation of European Microbiological Societies 304 (2010) 177–182
- Oh, J; Goo, E; Hwang, I; Rhee, S. 2014. Structural Basis for Bacterial Quorum Sensing-mediated Oxalogenesis. Department of Agricultural Biotechnology and the Center for Fungal Pathogenesis, Seoul National University, Korea. The Journal of Biological Chemistry. 289 (16): 11465–11475.
- Prado, G. 2010. Añublo Bacterial de la Panícula del Arroz (*B. glumae*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) / Diapositivas. Colombia. 30 Diap.
- Rao, D V; Tewari, J P. 1987. Production of Oxalic Acid by *Mycena citricolor*, Causal Agent of the American Leaf Spot of Coffee. Phytopathology (EE.UU.) 77(6): 780-785.
- Rao, D V; Tewari, J P. 1988. Suppression of the symptoms of American leaf spot of coffee with calcium hydroxide. Plant Diseases (EE.UU.) 72 (8):688-690.
- Rush, M; Groth D; Ham J; Nandakumar, R. 2010. Bacterial Panicle Blight: causes and suggested control measures. (Diapositivas). Louisiana State University, USA. 52 Diap.
- SAS Institute INC. 2002. Statistical Analysis Systems. Carolina del Norte. Estados Unidos. Versión 9.00.
- Sato, Z; Koiso, Y; Iwasaki, S; Matsuda, I; Shirata, A. 1989. Toxins produced by *P. glumae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55:353-356.
- Sayer, J; Gadd, G M. 1997. Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. Mycol Res 101: 653–661.
- Shimada, M; Akamatsu, Y; Hattori, T. 1994. A proposed role of oxalic acid in wood decay systems of wood-rotting basidiomycetes. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Rev 13: 285–296.
- Shingu, Y; Yoneyama, K. 2004. Essential regulator gene *toxR* for toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. J. Gen Plant Pathol. 70:108-114.
- Suzuki, F; Sawada H; Azegami K; Tsuchiya, K. 2004. Molecular characterization of the *tox* operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. J. Gen. Plant Pathology. 70: 97-107
- Tewari, J P. 1990. Mecanismo de patogénesis del ojo de gallo del cafeto causado por *Mycena citricolor*. Taller Regional sobre roya, ojo de gallo y otras enfermedades del cafeto. Resúmenes. IICA-PROMECAFE, Costa Rica. 48p.