

DIAGNÓSTICO PRELIMINAR DE BACTERIAS CORYNEFORMES ASOCIADAS CON GERMOPLASMA DE *Zornia* spp.

María del Socorro Balcázar y Benjamín Pineda-L

Laboratorio de Sanidad de Germoplasma, Unidad de Recursos Genéticos, CIAT
E-mail: bpineda@cgiar.org

107008

RESUMEN

En el CIAT, Centro Experimental, Estación de Santander de Quilichao, (Cauca, Colombia) durante 1980 y 1981 se observó la presencia de marchitez en plantas de *Zornia* spp., asociada a *Corynebacterium flaccumfaciens*. En razón de ese registro y del riesgo que implicaba su presencia en uno de los sitios de multiplicación de leguminosas forrajeras libres de patógenos de interés cuarentenario, se adelantó el presente estudio por parte del Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (LSG) de la Unidad de Recursos Genéticos (URG) durante el año 2000. Se buscaba verificar si aún estaba presente *Curtobacterium flaccumfaciens* para tomar las precauciones del caso. Para la investigación se utilizaron semillas de 37 accesiones de *Zornia* spp. procedentes del Banco de Germoplasma cosechadas en las Estaciones del CIAT en Santander de Quilichao y Palmira desde 1979 hasta el primer semestre de 2000, además de plantas de *Zornia* spp. en los lotes de multiplicación. Se realizaron los aislamientos según los procedimientos establecidos, tanto de semillas como de tejidos. A las colonias bacteriales obtenidas se les realizaron las tinciones y pruebas bioquímicas recomendadas. Solamente cuatro de las 37 accesiones mostraron en los análisis de semillas aislamientos bacteriales Gram-positivos y crecimiento a 37 °C. Dichas accesiones fueron: *Zornia brasiliensis* 8025 cosecha de Palmira 1983A, *Z. brasiliensis* 8849 cosecha en Palmira 1983A, *Zornia glabra* 286 de Santander de Quilichao 1982 A y *Z. glabra* 14263 de Palmira 2000 A. Las otras 33 no mostraron aislamientos bacteriales Gram-positivos. En conclusión los resultados preliminares de esta investigación muestran que asociados a las semillas de *Zornia* spp. se encontraron aislamientos bacteriales Gram-positivos similares a los del grupo Coryneforme pero no afines con la especie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, objeto de cuarentena.

Palabras claves : forrajes, leguminosas, pasturas, sanidad de semillas

SUMMARY

Some wilted plants of *Zornia* sp. have been observed in CIAT experimental station of Quilichao, Cauca, Colombia, in 1980 and 1981. Bacteria later identified as *Corynebacterium flaccumfaciens* were isolated from these plants. This record and subsequent risk for disease free multiplication plots incited the Germplasm Health Laboratory of CIAT Genetic Resources Unit to undertake this study. The purpose of this research was to verify whether *Corynebacterium flaccumfaciens* was still present or not. Two kinds of plant material were investigated: seeds of 37 *Zornia* accessions of the GRU harvested in the CIAT stations at Quilichao and Palmira in the period 1979-2000, and plants from the multiplication plots. Isolation, staining and biochemical testing for seed and plant tissues were done according to standard procedures. Only four out of the 37 accessions showed seed Gram positive bacterial isolates that grew at 37°C. These accessions were *Zornia brasiliensis* 8025 harvest Palmira 1983A, *Z. brasiliensis* 8849 harvest Palmira 1983A, *Zornia glabra* 286 harvest Santander de Quilichao 1982 A and *Z. glabra* 14263 harvest Palmira 2000 A. The remaining 33 accessions did not show Gram positive bacterial isolates. In conclusion the preliminary results show that Gram positive bacterial isolates possibly of the Coryneform group can be found associated with seeds of *Zornia*, but without affinity with *Corynebacterium flaccumfaciens* subject to quarantine restrictions.

Keywords: forages, legumes, seed health, seed-borne bacteria

INTRODUCCIÓN

La colección, conservación y utilización de los recursos genéticos de plantas y su distribución global son componentes esenciales de los programas internacionales de mejoramiento de cultivos, actividades en las cuales la Unidad de Recursos Genéticos (URG) del CIAT juega un papel muy importante. En el Banco de germoplasma existen en fideicomiso 31.400 accesiones de frijol (*Phaseolus* spp.) y unas 24.130 accesiones de forrajes (Koo, et al 2002), muchas de las cuales pertenecen a los países que han facilitado la obtención de los materiales de acuerdo con los convenios internacionales y los Acuerdos de Transferencia de Material vigentes (ATM).

Para efectos de distribución y conservación es esencial que dichos materiales cumplan con ciertas normas (FAO/IPGRI, 1994), incluyendo las exigencias de calidad fitosanitaria requeridas para conservación y distribución segura del germoplasma. En razón de esta exigencia dentro de los procesos de control de calidad el Laboratorio de Sanidad de Germoplasma adscrito a la URG practica inspecciones en los sitios de incremento del germoplasma y realiza análisis de semillas en el laboratorio para verificar que los materiales estén libres de patógenos de interés cuarentenario, entre las cuales están las bacterias coryneformes. Las bacterias fitopatógenas coryneformes causan gran variedad de enfermedades con síntomas que incluyen aga-

llas, gomosis y marchitamientos (Vidaver, 1982), muchas de las cuales estaban agrupadas en el género *Corynebacterium* Lehmann & Neumann 1896 que comprendía diversos organismos Gram-positivos; sin embargo ahora a este género pertenecen solo aquellas bacterias estrechamente relacionadas con la especie tipo *Corynebacterium diphtheriae* y excluye todas las especies fitopatógenas anteriormente conocidas, redistribuidas hacia los géneros *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* y *Rhodococcus* (ISPP, s.f.; Pineda, 1999).

Algunas especies de los géneros *Clavibacter* y *Curtobacterium* incluyen especies transmisibles por semillas (Agarwal y Sinclair, 1987; Saettler et al, 1989), considerándose

por ende de interés cuarentenario toda vez que impiden el movimiento seguro de germoplasma. Entre ellas se incluyen *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* y *Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosum* asociadas a leguminosas (COSAVE, 2001; OEMPV, 1989a; OEMPV, 1989b).

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* no es de amplia distribución mundial y figura en las fichas de muchos sistemas de protección vegetal y prevención de riesgos en el mundo (CMI, 1975; COSAVE, 2001; OEMPV, 1989a; OEMPV, 1989b). Ha sido registrada en Australia, Europa (Hungría, Bélgica, Grecia, Rumania, Yugoslavia), Unión Soviética, Túnez, Turquía, Norte América (Canadá, USA, México). En Francia, Alemania y Suiza no ha sido bien documentada (Commonwealth Mycological Institute, 1975; Hayward y Waterston, 1965). En América del norte fue reportada por primera vez en EEUU en 1920, común en el Noroeste y ocasionalmente se encuentra en el oeste; también en Canadá (Ontario) y Méjico (COSAVE, 2001).

La bacteria se conoce principalmente por su efecto en *Phaseolus* spp. (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, y *P. lunatus*) (Dinesen, 1979; Mohan, S. K. y Hagedorn, 1994.), pero también afecta *Glycine max* (Dunleavy, 1963; Sinclair y Shurtleff, 1975), *Pisum sativum*, *Vigna angularis*, *V. mungo*, *V. radiata*, *V. unguiculata*, *Lablab purpureus* y *Zea mays* (Hayward y Waterston, 1965; Miller y Pollard, 1976).

En Colombia (CIAT, Centro Experimental, Estación de Santander de Quilichao, Cauca) durante 1980 y 1981 se observó la presencia de marchitez en plantas de *Zornia* sp. número CIAT 7847 en lotes experimentales del entonces programa de Fitopatología de Pastos Tropicales, cuya causa, después de investigarla, resultó ser una bacteria que se identificó como *Corynebacterium flaccumfaciens* (Torres et al, 1981). Caracterizada por ser un bacilo con un rango de tamaño de 0,6 – 0,3 x 0,3 – 0,5 μ Gram positivo con colonias en agar nutriente después de 24 horas a 27 °C circulares, convexas, enteras y butirosas o sobre YDC de color amarillo crema (Torres et al, 1981). Se consideró como el primer registro local de ocurrencia de la enfermedad en Colombia y América Latina y Tropical, ningún otro caso ha sido registrado desde entonces. Los síntomas en esta especie se caracterizaron por clorosis, marchitez, muerte descendente, en algunos casos, muerte de plántulas. Produjo en las pruebas de patogenicidad marchitez similar a la descrita para otras leguminosas, adicionalmente se observó una decoloración marrón del sistema vascular similar al registrado en alfalfa (Chavarro et al, 1985).

La bacteria fue fácilmente aislada de las semillas de *Zornia* sp. CIAT 7847 con porcentajes de transmisión del 75 al 100%. Más tarde se confirmó que el aislamiento de *Zornia* también afectaba experimentalmente al

frijol y era muy similar a un aislamiento obtenido del American Type Culture collection, aislado de *Phaseolus vulgaris* en los EEUU e identificado como *C. flaccumfaciens* (Hedges) Dowson, demostrando también transmisión por semilla en porcentajes del 52,5 % para frijol y 88,8 % para *Zornia* (Chavarro et al, 1985).

En razón de ese registro de la presencia de la bacteria afectando *Zornia* sp., en Santander de Quilichao, uno de los sitios de multiplicación de germoplasma de la URG, y del riesgo que implicaba su presencia en la multiplicación de leguminosas forrajeras libres de patógenos de interés cuarentenario se adelantó durante el año 2000 el presente estudio con el propósito de verificar si aún estaba presente *Curtobacterium flaccumfaciens* para tomar las precauciones del caso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma utilizado

Para el estudio se utilizaron semillas de 37 accesiones de *Zornia* spp. procedentes del Banco de Germoplasma de leguminosas forrajeras de la Unidad de Recursos Genéticos (URG) cosechadas en las Estaciones del CIAT en Santander de Quilichao y Palmira desde 1979 hasta el Semestre A de 2000 (Tabla 1), y se colectaron plantas de *Zornia* spp. en los lotes de multiplicación de germoplasma.

Análisis fitosanitario y caracterización de aislamientos bacterianos

Para el análisis de los materiales de cada accesión se remojaron durante la noche a 40°C un mínimo de cien semillas por muestra en solución salina estéril (Cloruro de sodio 0,85%), luego se tomaron alícuotas de las solución de remojo y se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 para sembrarlas en platos de petri conteniendo NBYA (Nutrient Broth Yeast Extract Agar) o YDCA (Yeast extract, dextrose, CaCO₃) esterilizados. Luego se incubaron los platos a 27°C, durante 48 horas, periodo después del cual se examinaron las colonias bacteriales y se procedió a seleccionar aquellas con morfología similar a la descrita para *Corynebacterias*, en especial *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, se transfirieron a medio de cultivo. A las 24-48 horas se tomaron muestras de los cultivos bacteriales para realizar frotis y aplicar la coloración de Gram modificada por Hucker (Lelliot y Stead, 1987) y realizar las observaciones microscópicas respectivas respecto a la reacción de color y a la morfología característica consistente en bacilos cortos. Cuando las muestras resultaban Gram-positivas, se procedió a realizar las pruebas de oxidasa empleando tiras de papel impregnadas con reactivo (Roche, Test Oxidase Art 07-3032-7 y de catalasa con Perhydrol (Peróxido de hidrógeno 30%, Merck Ref 7210). Si las reacciones resultaban negativas para oxidasa y positivas para catalasa se continuaba el proceso de identificación mediante otras pruebas.

Se utilizó la prueba de temperatura máxima de crecimiento a 37 °C; para lo cual se utilizaron cultivos bacteriales en NBYA incubados a la temperatura indicada durante

Tabla 1. Procedencia de las accesiones de *Zornia* spp. utilizadas para verificar la presencia de *Corynebacterias* en las semillas.

Especie	Accesiones	Procedencia ¹
<i>Zornia brasiliensis</i>	7485	QUI 1979A
<i>Zornia brasiliensis</i>	9472	QUI 2000A
<i>Zornia brasiliensis</i>	7214, 8032, 8327, 14080	QUI 2001A
<i>Zornia brasiliensis</i>	298, 8023, 8025, 8849, 9473	PAL 1983A
<i>Zornia brasiliensis</i>	14287	PAL 1989A
<i>Zornia glabra</i>	7847	QUI 1980A
<i>Zornia glabra</i>	8278, 8286	QUI 1981A
<i>Zornia glabra</i>	283, 286, 8276, 8283, 8284, 8297, 8345, 8346	QUI 1982A
<i>Zornia glabra</i>	8273, 8308, 8343	QUI 1983A
<i>Zornia glabra</i>	8279	QUI 1984A
<i>Zornia glabra</i>	278, 280, 281, 8307	PAL 1983A
<i>Zornia glabra</i>	8858	PAL 1984A
<i>Zornia glabra</i>	7847	PAL 1987A
<i>Zornia glabra</i>	14257, 14270	PAL 1988A
<i>Zornia glabra</i>	255	PAL 1993A
<i>Zornia glabra</i>	14263	PAL 2000A

¹ Lugar donde se produjo la semilla QUI = Santander de Quilichao PAL = Palmira y semestre de producción

24-48 horas, periodo después del cual se verificaba si había o no desarrollo de las colonias.

La motilidad se determinó inoculando la muestra bacteriana con una asa recta más o menos a 2,5 cm de profundidad en tubos de ensayo con medio de motilidad (extracto de carne, 3 g; peptona, 10g; NaCl, 5 g; agar, 4 g; agua destilada 1 litro, ajuste de pH a 7,4) (Sánchez, 1986), que se incubaron durante 18-24 horas a 35-37°C, para realizar las observaciones según lo descrito por Sánchez (1986).

En relación a las determinación de las propiedades bioquímicas (Tabla 2) se utilizaron algunas de las pruebas incluidas en el sistema Vitek (Bio Mérieux Vitec, INC, Hazelwood MO63042) y en el BBL (BBL Cristal™ Identification Systems Gram Positive ID Kit Becton Dickinson BBL Crystal™, Nippon Becton Dickinson Company Ltd) diseñados para detección de bacterias Gram positivas frecuentes en salud humana, aprovechando los componentes comunes a las corynebacterias fitopatógenas.

35-37 °C, se leyeron las respectivas reacciones de color, bajo luz blanca para substratos no fluorescentes y ultravioleta para los fluorescentes. La información del color se tomó por comparación con la tabla provista por el fabricante (BBL Cristal Gram-Positive identification color chart), y se tabularon los resultados para obtener la información respectiva.

Para el estudio en plantas de *Zornia* spp. se visitaron los lotes de multiplicación de Germoplasma de la URG en la estación de Santander de Quilichao y se colectaron 25 muestras de plantas (hojas, tallos y raíces) de *Zornia glabra* y *Z. brasiliensis*; cada muestra se lavó con agua destilada estéril; la mitad de la muestra se cortó con bisturí en pequeños trozos de más o menos medio centímetro y la otra mitad se maceró en mortero con 10 mL de solución salina estéril. Los trozos se sembraron directamente sobre agar nutriente, 10 cajas por muestra y con el macerado se hicieron diluciones 1/10 y 1/100 para luego sembrar con rastrillo en agar nutriente a razón de 6 cajas por muestra. Las cajas sembradas se

2001) y se tuvo en cuenta la experiencia de Gitaitis, (1990) de la Universidad de Georgia quien utilizó la planta *Mirabilis jalapa*, más conocida como "cuatro en punto", en pruebas de hipersensibilidad para estudios con la bacteria *Clavibacter michiganense* (Gitaitis, 1990) del grupo de las Corynebacterias, se seleccionaron plantas de *M. jalapa* de dos meses de edad en cuyas hojas se infiltraron en el envés, mediante una jeringa para insulina de 1mL (Rymco Colombia), alícuotas con una concentración de 10⁸ cfc/mL de los aislamientos que resultaron Gram-positivos y que por morfología de la colonia y de las células presentaban alguna similaridad con las corynebacterias.

Como testigos de la prueba se infiltraron hojas de la ornamental utilizando agua destilada estéril. Adicionalmente se dejaron algunas plantas sin infiltración. Después de la inoculación las plantas se incubaron a 28-32°C de temperatura durante 2-4 días, periodo después del cual se verificaba si presentaban reacción de hipersensibilidad en los tejidos. Las observaciones se continuaron durante ocho días, periodo después del cual se descartaron.

Tabla 2. Pruebas utilizadas para la determinación de las propiedades de aislamientos bacteriales Gram positivos obtenidos de semillas de *Zornia* spp.

Prueba	Método	
Motilidad	Agar motilidad (Sánchez, 1986)	
Crecimiento a 37°C	Incubación	
Catalasa	Peroxido de hidrógeno 30% , Merck Ref 7210	
Oxidasa	Roche, Test Oxidase Art 07-3032-7	
Producción de ácidos de	Ribosa	Vitek
	Melezitosa	Vitek
	Inulina	Vitek
	Sorbitol	Vitek
Utilización de	Arabinosa	BBL Crystal
	Glycerol	BBL Crystal
	Lactosa	BBL Crystal
	Manitol	BBL Crystal
	Maltotriosa	BBL Crystal
	Metil a y b glucósido	BBL Crystal
	Sacarosa	BBL Crystal
	Trehalosa	BBL Crystal
	Hidrólisis enzimática de	Esculina
p-nitrophenyl -b-D-celobiosido		BBL Crystal
p-n-fenil maltósido		BBL Crystal

Reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa*

Los aislamientos bacteriales Gram positivos obtenidos de las muestras se sembraron en medio de cultivo NBYA para obtener colonias individuales, a partir de las cuales se preparó una suspensión bacteriana de 15 x 10⁸ cfc /mL (equivalente a un patrón No. 0.5 de McFarland) en tubos BBL cristal de fluido de inóculo por cada muestra y se procedió a distribuirla en la bandeja base, luego se colocó la tapa que contenía los substratos de manera que quedara bien ajustada en la bandeja. Después del periodo de incubación recomendado (18-24h) a un temperatura de

incubaron por 48 horas a 27°C. Con las colonias aisladas de estas cajas por posteriores repiques y diluciones se hizo coloración de Gram y posteriormente siembra utilizando el sistema de diagnóstico BBL Crystal.

Prueba de hipersensibilidad

Para realización de la prueba se siguió el esquema recomendado por Mortensen, del "Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing countries" (C. N. Mortensen, Información personal Marzo 8,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solamente cuatro de las 37 accesiones mostraron en los análisis de semillas aislamientos bacteriales Gram-positivos y crecimiento a 37 °C. Dichas accesiones fueron: *Zornia brasiliensis* 8025 cosecha de Palmira 1983A, *Z. brasiliensis* 8849 cosecha en Palmira 1983A, *Zornia glabra* 286 de Santander de Quilichao 1982 A y *Z. glabra* 14263 de Palmira 2000 A. Las otras 33 no mostraron aislamientos bacteriales Gram-positivos (Tabla 3).

Los aislamientos bacteriales obtenidos durante la investigación resultaron Gram-positivos y consistían de bacilos cortos con extremos redondeados, con rangos de tamaño entre 0,4-0,6 µ x 0,6-3 µ. Colonias en NBYA circulares, convexas, enteras y butirosas y pigmentadas, características estas que las hacen semejantes a las bacterias coryneformes descritas por Vidaver y Davis (1988).

Todos los aislamientos fueron catalasa positivos y oxidasa negativos de manera similar a las bacterias referenciadas *Curvobacterium flaccumfaciens* y *Clavibacter michiganense* (*Corynebacterium michiganense*). Con respecto a la motilidad, solamente el aislamiento obtenido de *Zornia* 8849 mostró reacción similar a la de *C. flaccumfaciens*. Con respecto a las otras características la afinidad fue baja (Tabla 4).

Las pruebas preliminares de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa* no mostraron reacciones positivas para los cuatro aislamientos consistentes en necrosis en las áreas infiltradas de acuerdo a lo esperado, según las observaciones de Mortensen (C. N. Mortensen, Información personal Marzo 8, 2001). Sin embargo todas las plantas antes de descartarlas se mantuvieron en observación

Tabla 3. Procedencia de las accesiones de *Zornia* spp. utilizadas para verificar la presencia de *Corynebacterias* en las semillas.

Especie	Accesiones	Procedencia	Aislamientos Bacterianos	
			Gram-Positivos ¹	
<i>Zornia brasiliensis</i>	7485	QUI1979A	N	
<i>Zornia brasiliensis</i>	9472	QUI2000A	N	
<i>Zornia brasiliensis</i>	7214, 8032, 8327, 14080	QUI2001A	N, N, N, N	
<i>Zornia brasiliensis</i>	298, 8023, 8025, 8849, 9473	PAL1983A	N, N, GP, GP, N	
<i>Zornia brasiliensis</i>	14287	PAL1989A	N	
<i>Zornia glabra</i>	7847	QUI1980A	N	
<i>Zornia glabra</i>	8278, 8286	QUI1981A	N, N	
<i>Zornia glabra</i>	283, 286, 8276, 8283, 8284, 8297, 8345, 8346	QUI1982A	N, GP, N, N, N, N, N, N	
<i>Zornia glabra</i>	8273, 8308, 8343	QUI1983A	N, N, N	
<i>Zornia glabra</i>	8279	QUI1984A	N	
<i>Zornia glabra</i>	278, 280, 281, 8307	PAL1983A	N, N, N, N	
<i>Zornia glabra</i>	8858	PAL1984A	N	
<i>Zornia glabra</i>	7847	PAL1987A	N	
<i>Zornia glabra</i>	14257, 14270	PAL1988A	N	
<i>Zornia glabra</i>	255	PAL1993A	N	
<i>Zornia glabra</i>	14263	PAL2000A	GP	

¹ N = no se obtuvieron colonias de bacterias Gram-positivas GP = Se obtuvieron colonias de bacterias Gram-positivas

durante tres semanas, para verificar posibles reacciones de hipersensibilidad tardía o desarrollo de síntomas sistémicos, eventos que no ocurrieron.

No obstante no haber obtenido reacción de hipersensibilidad, considerada por algu-

nos autores como una forma de determinar fitopatogenicidad (Gitaitis, 1990) quedaron pendientes las pruebas de patogenicidad según los postulados de Koch en *Zornia* 8025, *Zornia* 8849, *Zornia* 14263 y *Zornia* 286 para verificar si los aislamientos bacte-

riales obtenidos inducen o no los síntomas descritos para la enfermedad, según las investigaciones de Torres et al (1981) y de Charvarro et al (1985).

Respecto de la frecuencia de distribución de los aislamientos Gram-positivos, teniendo en cuenta la procedencia de semillas (Tabla 3), estos se distribuyeron así: uno obtenido de Santander de Quilichao (*Zornia glabra* 286, cosecha 1982 A) y tres de Palmira: (*Zornia brasiliensis* 8025 y 8849 cosecha de Palmira 1983 A y *Z. glabra* 14263 de Palmira 2000).

La accesión de *Z. glabra* 7847, cosecha Quilichao 1980 A, registrada por Torres et al (1981) como afectada por la enfermedad en este caso no contenía bacterias Gram-positivas (Tabla 3).

Estos hechos permiten tener más claridad en cuanto a la calidad fitosanitaria respecto a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, pero sugieren que es necesario continuar con un estudio más detallado, respecto a las características patogénicas de los aislamientos obtenidos y de sus características. Es muy importante determinar, su rango de hospedantes, su potencial de transmisión por semilla y demás información útil para prevenir riesgos que impidan la producción de germoplasma con calidad fitosanitaria para conservación, distribución y caracterización.

En conclusión los resultados preliminares de esta investigación muestran que asociados a las semillas de *Zornia* spp. se encon-

Tabla 4 Características de cuatro aislamientos de bacterias Gram-positivas obtenidas de muestras de semillas de *Zornia* spp.

Prueba	Método	Aislamiento Número (Accesión de <i>Zornia</i> spp.)				Características de especies según Referencias**	
		8025	8849	14263	286	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	<i>Clavibacter michiganense</i>
Motilidad	Agar motilidad (Sánchez, 1986)	V	+	-	-	+	-
Crecimiento a 37°C	Incubación	+	+	+	+	35-37°C	29-35°C
Catalasa	Peroxido de hidrógeno 30%, Merck Ref 7210	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	Roche, Test Oxidase Art 07-3032-7	-	-	-	-	-	-
Producción de ácidos de	Ribosa	Vitek	-	-	-	+	-
	Melezitosa	Vitek	-	-	-	+	-
	Inulina	Vitek	-	-	-	-	-
	Sorbitol	Vitek	-	-	-	-	-
Utilización de	Arabinosa	BBL Crystal	-	+	+	-	NA
	Glycerol	BBL Crystal	-	-	+	-	NA
	Lactosa	BBL Crystal	-	-	-	-	NA
	Manitol	BBL Crystal	-	-	+	-	-
	Maltotriosa	BBL Crystal	-	+	+	-	V
	Metil a y b glucósido	BBL Crystal	-	-	+	-	NA
	Sacarosa	BBL Crystal	-	-	-	-	V
	Trehalosa	BBL Crystal	-	-	+	-	NA
Hidrólisis enzimática de	Esculina	BBL Crystal	-	+	+	-	NA
	p-nitrophenyl -β-D-celobiosido	BBL Crystal	-	+	+	+	V
	p-n-fenil maltósido	BBL Crystal	-	+	+	+	NA
Reacción de hipersensibilidad en <i>Mirabilis jalapa</i>		-	-	-	-	-	+

+ = Resultados positivos para la prueba - = Resultados negativos V = Resultados variables NA = No aplica **Collins y Bradbury, 1986; Komagata, K y Susuki, K-I, 1986)

traron aislamientos bacteriales Gram- positivos similares a los del grupo *Coryneforme* (Vidaver y Davis, 1988; Bradbury, 1986; Dye y Kemp, 1977) teniendo en cuenta la morfología, crecimiento de las colonias, temperatura de crecimiento máxima y otras características. Con respecto a especie a pesar de que los resultados son preliminares, permiten sugerir que los aislamientos encontrados no son afines con la especie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, objeto de cuarentena.

Los resultados obtenidos del análisis fitosanitario de plantas de *Zornia glabra* y *Z. brasiliensis* (hojas, tallos y raíces) obtenidas en los lotes de multiplicación de Germoplasma de la URG no mostraron presencia de bacterias Gram- positivas. Las colonias bacteriales obtenidas eran de color amarillo, brillantes, pequeñas, de bordes regulares. Su morfología correspondía a bacilos y la tinción de Gram fue negativa. Los análisis con el sistema de diagnóstico BBL Crystal para bacterias no fermentadores, determinaron la presencia de una bacteria del género *Burkholderia*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar sus agradecimientos al Dr. Daniel Debouck por su apoyo durante la realización del trabajo y por la revisión del manuscrito; a las Bacteriólogas Ana Milena Barona y Lorna Lorna Paz por su asesoría, a Luz Edith Tabárez y José Luis Ramírez por su apoyo en el LSG.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, V. K. y Sinclair, J. B. 1987. Principles of Seed Pathology (Vol. 1). CRC Press, Boca Raton, Florida. p 35-39

Bradbury, J. F., 1986. Guide to Plant Pathogenic bacteria. CAB International Mycological, England. 332p

Collins, M. D. y Bradbury, J. F. 1986. Plant Pathogenic species of *Corynebacterium*. In: Sneath, H. A., Mair, N. S. Sharpe, E. (Eds). 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volumen 2. Williams y Wilkins, Baltimore. p 1278-1283.

Commonwealth mycological Institute. 1975. Distrib. Maps P1. Dis. N°370, ed. 3.

COSAVE. 2001. Hojas de datos sobre organismos cuarentenarios para los países miembros del COSAVE, Ficha cuarentenaria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones. <http://www.cosave.org.py/lpccurtobacteriumflaccumfacienspvflaccumfaciens.htm>

COSAVE. 2001. Hojas de datos sobre organismos cuarentenarios para los países miembros del COSAVE, Ficha cuarentenaria *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *Insidiosus* (McCulloch) Davis et al. <http://www.cosave.org.py/lpcclavibactermichiganensisinsidiosus.htm>

Chavarro, A., López C. G. y Lenné, J. M. 1985. Características y patogenicidad de *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows agente causal del marchitamiento bacteriano de *Zornia* spp. y su efecto en el rendimiento de *Z. glabra* CIAT 7847 y *Phaseolus vulgaris*. Acta Agronómica 35(2): 64-79.

Dinesen, Ib. G. 1979. Bacterial wilt of Beans (*Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dowson). Danish Research Service for Plant and Soil Science Report No 1517. p 361-370

Dunleavy, J. M. 1963. A vascular disease of soybeans caused by *Corynebacterium* sp. Pl. Dis. Reprtr 47: 612-613.

Dye, D. W. y Kemp, W. J. 1977. A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. N. Z. Journal of Agricultural Research 20: 563-582

FAO/IPGRI. 1994. Normas para Bancos de genes FAO/IPGRI. 1994. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma. 51 p

Gitaitis, R. D. 1990. Induction of a hypersensitive reaction in four- o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Dis. 74:58-60

Hayward, A. C. y J. M. Waterston. 1965. CMI Descriptions of Pathogenic, Fungi and Bacteria No 43.

ISPP. s.f. Names of Plant Pathogenic Bacteria, 1864-1995. Subcommittee on Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria, International Society for Plant Pathology. <http://www.bspp.org.uk/ispp/npp.html>

Komagata, K y Susuki, K-I, 1986. Genus *Curtobacterium* Yamada & Komagata 1972 425^{AL}. In: Sneath, H. A., Mair, N. S. Sharpe, E. (Eds). 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volumen 2. Williams y Wilkins, Baltimore. p 1331-1317

Koo, B., Pardey, P. G. y Wright, B. D. 2002. Endowing Future Harvests: The Long-Term Costs of Conserving Genetic Resources at the CGIAR Centers. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. p 13.

Lelliott, R. A. y Stead, D.E. 1987. Methods

for the Diagnosis of Bacterial diseases of Plants. Methods in plant Pathology Vol 2. Blackwell Scientific Publications INC, Palo Alto California. p 170.

Miller, P. R. y Pollard. H. L. 1976. Multilingual Compendium of Plant Diseases. Am. Phytopath. Soc., Minnesota: 183.

Mohan, S. K. y Hagedorn, D. J. 1994. Enfermedades bacterianas adicionales. In: Pastor Corrales, M. y Schwartz H. F. (eds). 1994. Problemas de Producción del Frijol en los Trópicos. CIAT. Cali (Colombia). p 351-355

OEMPV. 1989a. Hoja de Datos sobre Organismos Cuarentenarios N° 48 (Marzo 1980; 1989) de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal.

OEMPV. 1989b. Hoja de Datos sobre Organismos Cuarentenarios N° 49 (Marzo 1980; 1989) de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal.

Pineda-L., Benjamín. 1999. Actualización de algunos nombres de las bacterias fitopatógenas (géneros: *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Rathayibacter*, *Rhizobacter*, *Rhizomonas* y *Rhodococcus*). Ascolfi Informa 25(5): 50-51

Saettler, A. W., Schaad y Roth, D. A. (Eds) 1989. Detection of Bacteria in seed and Other Planting Material. APS Press., The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 122p

Sánchez de Forero, Piedad. 1986. Manual de Procedimientos en bacteriología Clínica. Publímars Carrion limitada, Bogotá p 161

Sinclair, J. B. y Shurtleff. M. C. 1975. A Compendium of Soybean Diseases. Am. Phytopath. Soc., Minnesota: 41.

Torres G., C, Lenné, J. M y Victoria, J. I. 1981. Bacterial Wilt of *Zornia* spp. Caused by *Corynebacterium flaccumfaciens*. In: Lozano, J. C. (Ed). 1981. Proc. 5th. Int. Conf. Plant. Path. Bact. Cali (Colombia) p74-79

Unidad de Recursos Genéticos, Informe Annual, año 1989, Seed Health Laboratory: 66-80.

Vidaver, A. K. y Davis, M. J. 1988. Coryneform plant pathogens. In. Schaad, N. W. (ed) 1988. Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd Edition APS Press., The American phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 104p.

Vidaver, A. K. 1982. The plant pathogenic corynebacteria. Ann. Rev. Microbiol. 36:495-517

Reprinted with permission from Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI. Originally published in Fitopatología Colombiana 26(1-2): 27-31, Copyright 2002.