

CENTRO AGRONOMOICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
SUBDIRECCION DE ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE POSGRADO

DIAGNOSTICO DE LA PUDRICION DEL TALLO DE *ZEA MAYS* L. EN  
TURRIALBA COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar el grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Por

**MARIE EUNIDE ALPHONSE**

Turrialba Costa Rica

1989

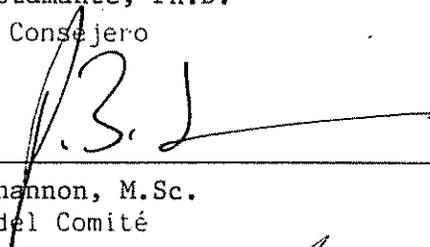
Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

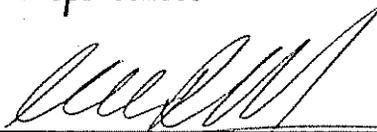
COMITE ASESOR:



Elkin Bustamante, Ph.D.  
Profesor Consejero



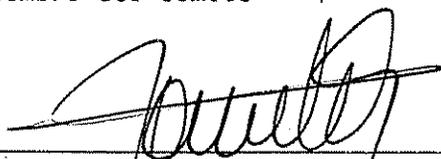
Philip Shannon, M.Sc.  
Miembro del Comité



Carlos Ramírez, Ph.D.  
Miembro del Comité



José Martí Jiménez, M.Sc.  
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.  
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado



Dr. José Luis Parisí  
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



Marie Alphonse  
Candidato

## **DEDICATORIA**

A Dios, mi Eterno apoyo.  
A mi querida Patria, Haití.  
A los campesinos hermanos Haitianos.

**A mis padres**  
Fabien y Agnès Q:D:D:G.

**A mis hermanos**  
Maxan , Wilner,  
Venard, Guirlande,  
Camille, Fleurette,  
por su apoyo fraternal  
en el logro de mis  
estudios.

**A mis sobrinos**  
Lana, Nadège, Dayana,  
Gessica, Jean Marc, por  
darme el tierno cariño de  
sus corazones.

## AGRADECIMIENTO

La autora agradece sinceramente a todas las personas que de una manera o otra que dieron una gota de su ser para el logro de mis estudios y la realización de este trabajo.

A Dr Elkin Bustamante, mi profesor consejero principal por su excelente asesoría en el desarrollo de este trabajo y que nunca se hace suplicar en dar sus distintos consejos pedagógicos dignos de mi formación profesional y técnica durante todo el tiempo de este Estudio.

A los miembros de mi comité:

El M.Sc. Philip Shannon por sus sugerencias tanto en el desarrollo de este trabajo como en los análisis de los datos y la redacción de la tesis.

El M.Sc. José Martí por su asesoría en los trabajos de campos, de laboratorio, y revisiones de la tesis.

El profesor, Dr Carlos Ramirez por su sabia ayuda a la realización de la tesis y sus sugerencias valiosas en el campo de la microbiología relacionada.

Al Ing Arnoldo Barrantes por su ayuda tanto en dar las informaciones esenciales relacionadas sobre la enfermedad como la realización del trabajo de campo.

A los amigos de laboratorio Walter Bermudez y Arturo Gamboa por su colaboración en la recolección de materiales y la participación en los trabajos de inoculación en invernadero.

A los compañeros del MIP, Daniel en el reconocimiento de insectos y el Ing Arnoldo Merayo por la ayuda en la toma de fotografía en campo, laboratorio y invernadero.

A Dr Pedro Ferreira, Gustavo Calvo y Gustavo Lopez por su ayuda en los analisis de Datos en sistema computarizados

A Dr Joseph Saunders por sus sugerencias Valiosas, su participación en la defensa de la tesis y su aporte personal en el campo de capacitación en el area MIP.

A los profesores, Dr Rutilio Quezada, Dr Ramiro De La Cruz, Dr Nahum Marban y Dr Peter Rosset por su amistad y su orientación brindada en mi formación profesional.

Al personal de laboratorio de Microbiologia de la UCR, Dr Franklin Jimenez por la capacitación en el campo de Bacteriologia; Diego y Dagmar por su participación activa en el trabajo de identificación del agente causal.

A la familia Royo y especialmente mi amiga Isabel por su trato en los momentos los más difíciles.

A todo el personal del MIP Ghisselle, Yorlene, Laura, Ricardo, Miguel y su esposa.

A mi amigo y hermano Jean Camille Bissereth que siempre me dió apoyo por sus consejos y amistad desde al inicio hasta el fin de este estudio.

A l'ODVA (Ministerio de Agricultura de Haití) que me dió permiso para realizar este estudio.

Al personal de la IICA en Haití, especialmente el Dr Aitken Soux y el Dr Ariel Azaël quienes me dieron muchas sugerencias al inicio de mis estudios

A todos mis compañeros del grupo litúrgico de NDPS de "Bel Air" por su ayuda espiritual.

A Max quien me dió su amor y la fuerza para seguir adelante en mi vida como persona y como profesional.

A Ketty Paquiot quien siempre me da una emoción especial.

A las Instituciones, ODA quien me financió los estudios y el CATIE que me apoyó para su realización.

A mis compañeros de estudio Helda Morales y su familia, Francisco Merino, Jackson Donis, Roberto Valdivia, Karl Williams y su familia, Alvaro Hernández y Ligia Lacayo.

## CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION .....	1
2. REVISION DE LITERATURA .....	5
2.1 Distribución geográfica de la pudrición suave del tallo del maíz .....	5
2.2 Importancia económica de la enfermedad .....	5
2.3 Agentes causales de la pudrición suave del tallo del maíz .....	6
2.4 Síntomas de la enfermedad .....	7
2.5 Biología del patógeno .....	8
2.5.1 Características morfológicas .....	8
2.5.2 Propiedades fisiológicas .....	9
2.5.3 Propiedades bioquímicas .....	10
2.6 Ecología del patógeno .....	11
2.6.1 Factores bióticos de influencia en la pudrición bacteriana del tallo del maíz .....	11
2.6.1.1 Insectos .....	11
2.6.1.2 Plantas .....	11
2.6.1.2 Semillas .....	13
2.6.1.3 Residuos de cultivos .....	14
2.6.1.4 Otras bacterias que influyen en la pudrición del tallo del maíz .....	14
2.6.2 Factores abióticos importancia de los en la pudrición del tallo del maíz .....	15
2.6.2.1 Agua .....	15
2.6.2.2 Clima .....	16
2.6.3 Otros factores .....	16
2.6.3.1 Manejo del cultivo .....	16
2.6.3.1.1 Densidad de siembra .....	16
2.6.3.1.2 Aplicación de fertilizantes .....	16
2.6.3.1.3 Sistema de riego ..	17

	Página
2.6.4 Control de la pudrición suave del tallo del maíz.....	17
2.6.4.1 Desinfección del agua de riego.....	17
2.6.4.2 Evaluación de germoplasma....	17
2.7 Método de identificación y de caracterización	18
2.7.1 Síntomas característicos de la enfermedad.....	18
2.7.2 Características morfológicas.....	19
2.7.3 Características en medios de cultivos.	19
2.7.4 Tinción de flagelos.....	20
2.7.5 Tinción de gram rápida.....	20
2.7.6 Características fisiológicas y bioquímicas.....	21
2.8 Métodos de aislamiento de la bacteria de la pudrición del tallo del maíz.....	21
2.9 Métodos de inoculación y de evaluación de la pudrición del tallo del maíz.....	22
2.10 Podredumbre causada por hongos.....	22
3. MATERIALES Y METODOS.....	24
3.1 Diagnósis de la pudrición suave del tallo del maíz.....	24
3.1.1 Descripción de los síntomas y colección de materiales infectados....	24
3.1.2 Aislamientos.....	25
3.1.3 Prueba de patogenicidad.....	26
3.1.3.1 Preparación del inóculo.....	27
3.1.3.2 Método de inoculación.....	28
3.1.3.3 Patogenicidad de otras cepas bacterianas con las cepas aisladas de la pudrición del tallo del maíz.....	28
3.1.4 Identificación y caracterización del patógeno.....	29
3.1.4.2.2 Metabolismo de los carbohidratos..	32
3.1.4.2.3 Producción de gas de glucosa.....	33

3.1.4.2.4	Prueba de catalasa y de oxidasa.....	33
3.1.4.2.5	Prueba Voges Proskauer.....	34
3.1.4.2.6	Hidrólisis de la ureasa y producción de indol.....	34
3.1.4.2.7	Licuefacción de la gelatina y reducción de los nitratos.....	36
3.1.4.2.8	La prueba de cultivo en rodajas de papa y pectacto....	36
3.2	Uniformación de las cepas virulentas.....	37
3.3	Calibración de técnicas para evaluación por la resistencia.....	38
3.4	Prueba de resistencia de materiales.....	39
3.5	Comprobación de métodos de inoculación y resistencia de cultivares.....	39
3.6	Campo.....	40
3.6.1	Establecimiento de una parcela en el campo.....	40
3.6.1.2	Inoculación.....	42
3.6.2	Preparación del inóculo.....	42
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
4.1	Diagnosic de la pudrición del tallo del maíz.....	45
4.1.1	Síntomas.....	45
4.1.2	Caracterización preliminar de los aislamientos.....	46
4.1.3	Prueba de patogenicidad.....	48
4.1.4	Identificación de las cepas aisladas a partir de la pudrición del tallo del maíz.....	51
4.2	Resultados de comportamiento de 7 cepas.....	57
4.3	Prueba de estandarización de los factores edad, dosis para evaluación de la resistencia.....	62
4.4	Evaluación de la resistencia de materiales...	67

4.5	Resultados del ensayo preliminar de campo para la observación de la pudrición del tallo del maíz.....	82
4.1.5	Resultados de la inoculación en el campo.....	86
4.1.6	Observación de los insectos.....	87
5.	DISCUSIONES GENERALES Y CONCLUSIONES.....	89
5.1	Diagnóstico de la de la pudrición del tallo del maíz.....	89
5.2	Interacción planta-patógeno.....	91
5.3	Interacción-ambiente-patógeno-planta.....	93
5.4	Conclusiones.....	94
5.5	Recomendaciones.....	95
6.	CITAS BIBLIOGRAFICAS.....	97
	APENDICE.....	107

## RESUMEN

ALPHONSE, M.E. 1989. Diagnóstico de la pudrición del tallo de *ZEA MAYS* L. en Turrialba Costa Rica. Tesis Mg. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 110 p.

Palabras claves: *Zea mays* L., *Erwinia* sp., *Klebsiella* sp., *Capsicum annum*, pudrición del tallo, agentes causales, metodología de inoculación, resistencia, edad de la planta, "La Montaña", CATIE, Turrialba.

## RESUMEN

Este estudio se llevó a cabo con el fin de identificar el o los agentes causales de la pudrición del tallo del maíz, enfermedad de común ocurrencia en la finca experimental del CATIE "La Montaña" en Turrialba. El estudio de los síntomas, la patogenicidad, las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las cepas bacteriales aisladas y reaisladas de tejidos enfermos del tallo y de una muestra de agua de una bomba aspersora, reveló que la pudrición del tallo esta asociada con bacterias del género *Erwinia* especialmente, *E. carotovora*, *E. cyripedii* *E. nigrifluens*, *E. rubrifaciens* y *Erwinia* sp..

Asimismo es de señalar la importancia de *E. rubrifaciens* por su distribución en agua y su alta patogenicidad al maíz. El "Índice de Similitud" indicó que estas bacterias alcanzan un valor de identidad superior a 90 por ciento.

Esta pudrición también se observó al inocular plantas de maíz con cepas bacteriales de *E. carotovora* y *E. chrysanthemi* aisladas de Chile (*Capsicum annum*) procedente de "La Montaña".

En este estudio se demostró que las pudriciones del tallo pueden ser ocasionadas por bacterias del género *Klebsiella* y no únicamente por *Erwinia*.

La metodología de inoculación más apropiada del patógeno consiste en depositar en el cogollo de la planta la suspensión bacterial de  $10^8$  mezclada con tween 20 al 1 %

La evaluación de resistencia en condiciones del invernadero demostró que los cultivares, Tico V7, Tuxpeño Diamantes son los más susceptibles. Asimismo, se ha determinado que las plantas presentan una mayor incidencia

de la pudrición cuando tienen entre 20-40 días de edad bajo condiciones climáticas favorables (alta precipitación, alta humedad y temperatura).

## SUMMARY

ALPHONSE, M.E. 1989. Diagnosis of *ZEA MAYS* L. stalk rot. in Turrialba, Costa Rica. Thesis Mg. Sc. Turrialba Costa Rica, CATIE. 110 p.

Key words: *ZEA MAYS* L., *Erwinia* spp., *Klebsiella* spp., *Capsicum annuum*, stalk rot, causal agent, inoculation technique, Resistance. plant age, La Montaña CATIE, Turrialba.

## SUMMARY

This study was carried out to determine the causal agent of stalk rot in maize, current evident disease in the CATIE experimental station, "La montaña", in Turrialba. The investigation on, symptoms, pathogenicity, Morphological, Physiological and Biochemical characteristics of the isolated and reisolated bacterial strains of the infected stalk or tissues and sample of water taken from sprinkler pump indicated that the stalk rot is associated with bacteria of the genus of *Erwinia* specially *E. carotovora*, *E. cypripedii* *E. nigrifluens*, *E. rubrifaciens* and *Erwinia*. sp.

Likewise; is necessary to point out, the importance of *E. rubrifaciens* for a high distribution in water and high pathogenicity with cultivated maize. The "Similarity Index", indicate that this bacteria results in an identity value greater than 90 percent.

This rot was also observed when maize plants were inoculated with bacterial strains of *E. carotovora* y *E. chrsanthemi* isolated in pepper plants cultivated in "La Montaña".

In this study it was demonstrated that stem rot was associated to bacteria of the *Klebsiella* genera and not only by *erwinia*.

The most appropriate methodology of inoculation of the pathogen consisted of depositing in the whorl of the plants, a suspension of the bacteria of a 10<sup>8</sup> mixture at 1 %.

The evaluation of resistance in greenhouse conditions demonstrated that the cultivars, Tico V7, Tuxpeño and Diamantes were the most susceptible. At the same time it was determined that the rot when they were 20 - 40 days old

with favourable climatic conditions (high precipitation, high humidity and temperature).

## RESUME

ALPHONSE, M.E. 1989. Diagnostic de la pourriture de la tige de *ZEA MAYS* L. à Turrialba, Costa Rica. Thèse Mg. Sc. Turrialba Costa Rica, CATIE. 110 p.

Mots clés: *Zea mays* L., *Erwinia* sp., *Klebsiella* sp., *Capsicum annuum*, pourriture de la tige, agent causal, méthodologie de inoculation, résistance, Age de la plante, "La Montaña", CATIE, Turrialba

## RESUME

Cette étude a pour but d'identifier le ou les agents causaux responsables de la pourriture de la tige du maïs, maladie très courrant à la station expérimental de CATIE "La Montaña", à Turrialba. L'étude des symptômes, de la patogenicité des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches bactériennes isolées et reisolées des tissus affectés de la tige et un échantillon d'eau d'une pompe d'aspersion, révélèrent que cette pourriture est associée aux bactéries du genre *Erwinia* spécialement, *E. carotovora*, *E. cypripedii* *E. nigrifluens*, *E. rubrifaciens* y *Erwinia* sp..

Cependant, c'est nécessaire de signaler l'importance de *E. rubrifaciens*, son mode de distribution et sa haute patogenicité au maïs. Ainsi, "l'Indice de Similitude" montre que ces souches bactériennes atteignent un niveau d'identité supérieur à 90 pourcent

En outre, cette pourriture fut observée quand des plantes de maïs furent inoculées avec des souches de *E. carotovora* y *E. chrysanthemi* isolées de *Capsicum annuum* provenant de "La Montaña". Dans cette étude il a été prouvé que la pourriture de la tige du maïs peut être provoquée par bactéries du genre *Klebsiella* et non uniquement par *Erwinia*.

La méthodologie d'inoculation la plus appropriée du patogène isolé consiste à verser à l'intérieur du verticille 1 ml de la suspension bactérienne de 10<sup>8</sup>/ml mélangée de Tween 20 à 1 %. La évaluation de résistance en serres montre que les cultivars TicoV7, Tuxpeño Diamantes sont les plus susceptibles. De même il a été déterminé que l'incidence est plus élevée quand les plantes ont entre 20 à 40 jours d'âge et placées dans des conditions climatiques favorables de précipitation, température y humidité élevée.

## LISTA DE CUADROS

En el texto	Página
Cuadro 1. Procedencia de las Cepas utilizadas en las pruebas de inoculación de plantas de maíz ( <i>Zea mays</i> ).....	29
Cuadro 2. Cultivares o híbridos de maíz utilizados en la evaluación de resistencia de materiales. CATIE. Julio, 1989.....	40
Cuadro 3. Aislamientos de las bacterias utilizadas en este estudio de acuerdo a su procedencia su fecha de colección, variedad y código asignado al aislamiento.....	47
Cuadro 4. Patogenicidad de doce aislamientos bacteriales en la variedad Tuxpeño y porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz a los 3, 6 y 9 días de la inoculación, en condiciones de cámara húmeda más humidificador.....	49
Cuadro 5. Patogenicidad de doce aislamientos bacteriales en la variedad Diamantes de acuerdo al porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz a los 3, 6 y 9 días de la inoculación.....	50
Cuadro 5a. Presencia de síntomas de pudrición del tallo en plantas de maíz var. Tuxpeño Inoculadas con aislamientos bacteriales procedentes de varios hospederos.....	51
Cuadro 6a. Características de las cepas aisladas de la pudrición del tallo del maíz. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1989.....	52
Cuadro 6b. Caracterización de las cepas reaisladas de la pudrición del tallo del maíz de La Montaña. Turrialba, Costa Rica.....	53
Cuadro 7. Correlación de las cepas reaisladas de la pudrición tallo del maíz con las cepas originales. Turrialba, 1989.....	54

	Página
Cuadro 7a. Identificación de las cepas aisladas de tejidos con pudrición de tallo de maíz y de una muestra de agua de una bomba aspersora de acuerdo a su "Índice de Similitud" .....	55
Cuadro 8. Análisis de varianza del porcentaje de incidencia de pudrición bacteriana del tallo del maíz por cepa. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1989.....	58
Cuadro 9. Diferencias en la prueba de Duncan para el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz de acuerdo a las cepas. CATIE, 1989.....	59
Cuadro 10. Diferencias entre lecturas de la incidencia de la pudrición del tallo del maíz a los 3, 6, 9, 12 días.....	60
Cuadro 11. Análisis de varianza del porcentaje de incidencia de pudrición bacteriana del tallo del maíz según la edad, la cepa y la dosis del patógeno. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 1989.....	63
Cuadro 12. Prueba de Duncan para el efecto de dosis en el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.....	63
Cuadro 13. Prueba de Duncan para el efecto de edades en el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.....	64
Cuadro 14. Análisis de varianza del porcentaje de incidencia de pudrición bacteriana del tallo del maíz según la resistencia de cultivares. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.....	74
Cuadro 15. Prueba de Duncan para el efecto de cultivares en el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.....	74

Cuadro 16.	Prueba de Duncan para el efecto de método de inoculación en el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.....	77
Cuadro 17.	Comprobación de dos métodos de inoculación en la resistencia de nueve cultivares al patógeno de la pudrición del tallo de Zea mays L. a los 3, 6 y 8 días después de la inoculación.....	79
Cuadro 18.	Descripción de los insectos encontrados en el cogollo de las plantas de maíz inoculadas en La Montaña. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.....	88

**En el apéndice**

Cuadro A1.	Promedio de mínimas de temperatura y humedad relativa mensual de La Montaña en 1986, 1988, 1989.....	108
Cuadro A2.	Preparación de medio de cultivo. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1988.....	109

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1.	Arreglo espacial de las parcelas y tratamientos en el experimento de campo. La Montaña, CATIE Turrialba.....	43
Figura 2.	Avance de la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays a los 3, 8, 9 y 12 días de inoculación de acuerdo a la virulencia de las cepas utilizadas. CATIE. 1989.....	61
Figura 3.	Comparación de medias de la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays de acuerdo a la dosis de inóculo. CATIE, 1989.....	65
Figura 4.	Comparación de medias de la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays de acuerdo a la edad de la planta. CATIE, 1989.....	66
Figura 5.	Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Tuxpeño de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 8). CATIE, 1989.....	68
Figura 6.	Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Tuxpeño de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 10). CATIE, 1989.....	69
Figura 7.	Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Tuxpeño de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 9). CATIE, 1989.....	70
Figura 8.	Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Diamantes de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 8). CATIE, 1989.....	71

Figura 9.	Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Diamantes de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 10). CATIE, 1989.....	72
Figura 10.	Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Diamantes de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 9). CATIE, 1988.....	73
Figura 11.	Comparación de medias de la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays de acuerdo a la variedad. CATIE. 1989.....	75
Figura 12.	Diferencia de la incidencia de la pudrición del tallo de Zea maysa de acuerdo a la variedad y al método de inoculación. CATIE. 1989.....	80
Figura 13.	Temperatura promedio mensual de los años 1986, 1988, 1989, registrada en la estación experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	83
Figura 14.	Precipitación promedio mensual de los años 1986, 1988, 1989 registrada en la estación experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba.....	84
Figura 15.	Humedad promedio mensual de los años 1986, 1988, 1989 registrada en la estación experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba.....	85

## 1. INTRODUCCION

El maíz es uno de los tres cereales más utilizados en el mundo, siendo en la actualidad el alimento más importante de los habitantes de México, América central y varios países de América del Sur (INTA, 1980). Alrededor de dos tercios de la producción total mundial se utilizan en la alimentación animal y una cuarta en la alimentación humana (CIMMYT, 1984).

Más de 60 enfermedades causadas por hongos y bacterias limitan la producción de este cultivo (FAO, 1980), de las cuales la pudrición del tallo es una de las más destructivas (Sawar y Ahmad, 1986). En Costa Rica, las plantaciones de maíz se encuentran desde el nivel del mar hasta una altitud de 2000 metros, lo que expone las plantas a varios tipos de insectos plagas y patógenos (Bonilla, 1983; Coen, 1968).

En Costa Rica se han realizado trabajos de investigación sobre patógenos de la pudrición del tallo y de la mazorca tales como (Fusarium moniliforme, Giberella fujikuroi y G. zeae); hasta el momento, sin embargo no se ha investigado sobre los agentes etiológicos de las pudriciones suaves del tallo del maíz (Villalobos, 1985).

En la estación experimental La Montaña del CATIE, en Turrialba, se ha observado en los últimos años, una pudrición suave de la parte superior del tallo de la planta de maíz cuya incidencia ha aumentado aparentemente a partir de 1985. En el transcurso del segundo semestre del año 1988, esta enfermedad ocasionó daños muy severos que afectaron los trabajos de experimentación en este cultivo. Las prácticas de manejo ya sea, químicas (aplicación de agrimicin 500, cada ocho días) o culturales, (barbecho, rotación) han sido ineficaces para su manejo\*.

Hasta el momento no existe información disponible sobre el o los agentes causales asociados, la fuente de inóculo inicial, su modo de distribución y los factores ambientales que favorecen su desarrollo. En el manejo de enfermedades el diagnóstico preciso constituye un primer paso en la solución del problema. Por lo tanto, para poder encontrar posibilidades de manejo, es muy importante considerar los principios de epidemiología definidos por Van Der Plank (1975); Peto (1953); Thyr (1968); Forster y Echandi, (1973); Schaad et al (1973); Ercolani (1984).

La obtención de materiales resistentes constituye una de las medidas más práctica y económica para controlar cualquier enfermedad. Sin embargo, en el país no existe

---

\*Inform personal de Arnoldo Barrantes administrador finca experimental del CATIE "La Montaña", Turrialba, C.R.

en la actualidad información sobre dicha enfermedad y por consiguiente sobre las variedades o los híbridos locales con un alto grado de resistencia.

Para poder establecer un plan de manejo adecuado el presente trabajo se realizó con los objetivos siguientes:

- 1- Identificar y caracterizar el o los agentes causales de la pudrición del tallo del maíz, tal como se presenta en la estación experimental La Montaña, Turrialba, Costa Rica.
- 2- Estudiar su modo de transmisión.
- 3- Determinar la infectividad de los aislamientos.
- 4- Evaluar la respuesta de diferentes cultivares al o los agentes causales que se identifiquen.

De acuerdo a los objetivos se han planteado las hipótesis subsecuentes:

- 1- La enfermedad es causada por bacterias .
- 2- El equipo de aspersion y el agua utilizada en el sistema de manejo constituye un medio eficiente de diseminación de la bacteria.
- 3- El nivel de inóculo es un factor muy importante en el desarrollo de la enfermedad

- 4- Existe diferentes niveles de resistencia y susceptibilidad al agente causal en cultivares de maiz comercial.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Distribución geográfica de la pudrición suave del tallo del maiz

La pudrición del tallo del maiz ha sido reportada en varios sitios y se encuentra distribuida en zonas tropicales, y bajo condiciones especiales en zonas templadas (Mazzuchi, 1972; Rangarajan y Chakravati, 1971). Esta enfermedad del tallo del maiz ha sido observada en India, (Kelman et al, 1957; Payak, 1972; Lal, 1981) Egipto, (Sabet, 1954) Israel, (Volcani, 1961) Grecia, (Zachos et al, 1963) Australia, Africa, Filipinas, Rumania, (APS, 1983; Mc Gee, 1988; Otta y Wood, 1977) Estados Unidos, (Hoppe y Kelman, 1969; Hartman, 1969; Boewe, 1949 López et al 1986) Colombia, (Victoria et al, 1975) Brazil, (Reifschneider y Lopes, 1982) Nicaragua (Tapia y Garcia 1983) y República Dominicana (Montes de Oca, 1985).

### 2.2 Inportancia económica de la enfermedad.

Los daños que causa la pudrición del tallo del maiz son muy severos. Las pérdidas varian de acuerdo a la época y la región y, la incidencia puede variar entre un 5% a 50% de la población de plantas (Saxena y al, 1984; Victoria et

al, 1975; Hingorani, Grant y Singh, 1959; APS, 1983; Hoppe y Kelman, 1969).

Thind y Payak (1985) reportaron que en inoculación artificial la incidencia alcanzó una pérdida de 92% en rendimiento para un 80-85% de incidencia.

### 2.3 Agentes causales de la pudrición suave del tallo del maíz.

El patógeno responsable de la pudrición suave del tallo del maíz observado y reportado en India, Prasad (1930) fue descrito por Sabet en 1954 bajo el nombre de Erwinia carotovora f. sp. zeae de acuerdo a sus características bioquímicas y su habilidad para debilitar el maíz y otras gramíneas (Hingorani et al, 1958).

Kelman et al (1957) probaron que no existen diferencias significativas entre el patógeno que ataca el maíz en Estados Unidos y apoyaron el nombre adoptado por Sabet: Erwinia carotovora f. sp. zeae.

Hingorani, Grant y Singh (1959) por su parte reportaron que el patógeno era Phytomonas dissolvens Rosen Syn de Erwinia dissolvens Rosen Burkholder.

Sabet, Samro y Shafey (1964) al reidentificar el patógeno del maíz lo ratificaron como E. carotovora f. sp.

zeae. Dickey (1979, 1981) incluyó el patógeno responsable de la pudrición del tallo del maíz en el grupo de *E. chrysanthemi* en referencia a los patovares propuestos por Young et al (1978)

Hartman et al (1975) apuntaron que la bacteria del maíz, patótipo *E. chrysanthemi* esta estrechamente relacionada con *E. chrysanthemi* Burkholder et al. Brenner et al (1973) y Mazzuchi (1972) afirmaron que este patógeno también tiene varias características fisiológicas comunes a *E. carotovora* (L.R.Jones) grupo de las bacterias de pudrición suave.

Thind y Payak (1985) hicieron una revisión de los agentes causales de la pudrición del tallo del maíz en la India, y reportaron que los principales son: *Erwinia dissolvens* Rosen, Burkholder (syn) de *Pseudomonas dissolvens* Rosen; *E. chrysanthemi* pv zeae (Sabet) Victoria, Arboleda, Muñoz (syn) de *Erwinia carotovora* var zeae Sabet, *Pseudomonas syringae* pv lapsa (ARK) Young, Dye, Bradbury, Panagopulus y Robbs (syn) de *P. lapsa* Ark Starr y Burkholder.

#### 2.4 Síntomas de la enfermedad

Kelman et al (1957); Hingorani et al (1959); reportaron que la enfermedad se manifiesta por un

resquebramiento característico o un volcamiento de las plantas en la parte superior del tallo correspondiente al cuarto o quinto nudo. Los tejidos del tallo presentan manchas accuosas oscuras ligeramente cafés con una desintegración de la médula en el punto común de unión de la hoja con el tallo. En una etapa más avanzada solamente los haces vasculares quedan intactos y las partes atacadas del tallo presentan una pudrición de olor fétido o desagradable.

Hoppe y Kelman (1969); Victoria et al (1975) describieron que en el desarrollo de la enfermedad los síntomas consisten en una flacidez del cogollo. Luego se produce un marchitamiento de los tejidos foliares y por consiguiente los ápices de las hojas superiores. En el caso de una severidad pronunciada, la parte superior de la planta puede desprenderse fácilmente con una presión hacia arriba.

## 2.5 Biología del patógeno.

### 2.5.1 Características morfológicas.

Rangarajan y Chakravarti (1967) describieron el patógeno responsable de la pudrición del tallo del maíz como una varilla corta de 0.4-0.6 de micras por 1.5-1.7 micras, gram negativa no forma esporas, móvil con flagelos

polares mientras que Hoppe y Kelman (1969); Dickey (1979); Victoria et al (1975) le describieron su movilidad por medio de flagelos peritricos. Además, ellos afirmaron que esas bacterias no se encuentran encapsuladas y se presentan en colonias individuales, pares, circulares y convexas de color cremas a grisáceas en YDC (Yeast Dextrose Calcium Carbonate) y AN (Agar Nutriente).

#### 2.5.2. Propiedades fisiológicas.

Perombolon y Kelman (1980); Koutoujansky (1987); Basham y Bateman (1975); describieron las características fisiológicas de las bacterias de la pudrición suave y afirmaron que ellas producen la maceración de los tejidos de sus hospederos por medio de enzimas extracelulares. La degradación de los componentes de las paredes celulares la realizan enzimas tales como la pectinasa, la celulasa, la hemicelulasa y la proteasa.

Diolez y Coleno (1985); Jingwei et al (1987); Reverhon y Robert-Baudouy (1987) describieron el papel de estas enzimas en la patogenicidad de los patótipos de *E. chrysanthemi* y *E. carotovora*. Payne et al (1987); Daniels et al (1988) consideraron los "pectate lyases" como las sustancias principales responsables de virulencia de esas

bacterias y explicaron sus mecanismos en el proceso de patogenicidad.

### 2.5.3 Propiedades bioquímicas

Dye (1968, 1969); Kelman (1969); Dickey (1979) reportaron que la bacteria de la pudrición del tallo del maíz es un baston fermentador facultativo anaeróbico con catalasa positiva y oxidasa negativa. Estas bacterias producen ácido a partir de  $\beta$ -galactosidasa, L(+) arabinosa D(-) ribosa L(+) ramnosa D(-) fructosa D-galactosa manosa celobiosa glicerol D-manitol salicina y además tienen crecimiento en peptona más bromocresol purpurea.

Kelman (1969) afirmó que el patógeno produce pudrición suave en papa, formación de pigmentos en agar, crece en triptona contenido de más de 5% de NaCl y produce sustancia del gluconato como solo fuente de carbono y no tiene habilidad para utilizar el dulcitol.

## 2.6 Ecología del patógeno

### 2.6.1 Factores bióticos de influencia en la pudrición bacteriana del tallo del maíz.

#### 2.6.1.1 Insectos

En el caso de la pudrición del tallo del maíz transmitida por bacterias del grupo carotovora, no existen todavía muchas pruebas sobre el papel de algunos insectos del maíz en la transmisión del patógeno (Purcell, 1982). Sin embargo, Hingorani et al (1959) simularon la acción del insecto, induciendo los síntomas de la enfermedad por el método de inoculación con jeringa cerca del punto de crecimiento. Thind y Singh (1976) demostraron que el barrenador del maíz Chilo partellus (Swinhoe) era un candidato en la dispersión y la transmisión del agente causal.

#### 2.6.1.2 Plantas

Thind (1970); Rangarajan y Chakravarti (1971); Hingorani (1959) afirmaron que Erwinia carotovora pv zeae patógeno tiene varios hospederos tales como: papa, camote, sorgo, repollo, tomate, zanahoria etc.

Prasad y Sinha (1977) demostraron que en una rotación de distintos cultivos con el maíz la incidencia de la

putrefacción del tallo causada por *E. carotovora*.sp *zeae* era más alta en los sistemas maíz-papa-maíz y maíz-lahi-papa-maíz que en los demás practicados.

Dickey (1979) indicó que *E. chrysanthemi* es un patógeno de un rango muy amplio en plantas tropicales y subtropicales. En zonas templadas se encuentra en cultivos creciendo bajo condiciones del invernadero y en campos de cultivos tales como maíz y piña.

Hepperly et al (1987) notaron la presencia de *E. chrysanthemi* en pudrición de cogollo de sorgo. Kuchareck y Bartz (1984) determinaron su presencia en hortalizas y en tabaco. Hsu y Tsen (1981) indican que el grupo *E. carotovora* pv *carotovora*, (*E. aroidae* y *E. carotovora*) están asociados con la mayoría de las podredumbres que afectan tanto hortalizas como cereales en Taiwan.

Koutoujansky (1987) reportó que dentro de las enterobacteriaceas de pudrición suave las erwinias atacan las plantas en cultivo y en almacenamiento.

Moffet (1983) reportó de los registros de los fitopatólogos de cada estado de Australia las plantas hospederas asociadas al patógeno de la pudrición del tallo del maíz y señaló las plantas que se describen a continuación.

E. carotovora var carotovora: Allium cepa var agregatum, Allium cepa L. var cepa, Apium graveolens L., Beta vulgaris ssp. ciela L., Brassica chinensis L., Capsicum anuum L., Cucurbita maximum Duch., Cucurbita pepo L. s. lat., Cyclamen persicum Mill., Cynara scolimus L., Daucus carota L., Helianthus tuberosum L., Hyacinthus orientalis L., Lactuca sativa L., Lycopersicon esculentum Miller, Musa acuminata Colla., Narcissus sp. Nicotiana tabacum L., Pisum sativum L., Rheum rhabarbarum L., Solanum melongena L., Solanum tuberosum L., Spinacia oleacera L., Vanda sp, Vigna unguiculata ssp sesquipedalis L., Zea mays L., Zea mays L. convar saccharata Koern., Brassica oleracea var capitata (L) Alef, Brassica oleracea var botrytis L., Brassica oleracea var gemnifera DC., Brassica oleracea var italica Plenck.,

Erwinia sp.: Persea americana Miller, Solanum tuberosum L., Zea mays L.

#### 2.6.1.2 Semillas

Agrios (1985) señaló la relación de la supervivencia de las bacterias y las semillas. Rangajaran y Chakravarti (1967, 1970) aislaron y identificaron Pseudomonas lapsa sobre semillas de maíz afectadas con podredumbre de tallo.

Anilkumar y Chakravarti (1971); Saxena y Lal (1982) encontraron que las semillas llevan la bacteria externamente durante un periodo de 45 días. Hayward (1974) comentó que esas bacterias están a menudo en condiciones latentes en varios hospederos aunque esas condiciones todavía no están bien definidas

#### 2.6.1.3 Residuos de cultivos

Agrios (1985) mencionó que algunas bacterias fitopatógenas sobreviven en los residuos en el suelo como saprófitos y la población de otras disminuye rápidamente en estas condiciones. Sin embargo, en el caso de la pudrición del tallo del maíz, Rangajaran y Chakravarti (1970); Anilkumar y Chakravarti (1971); Prasad y Sinha (1977) mencionaron que *E. carotovora* f. sp. zeae Sabet agente causal de dicha enfermedad sobrevive en el suelo en los residuos de las plantas hospederas. Esta supervivencia es mayor cuando los residuos afectados tienen un alto porcentaje de tejidos sanos.

#### 2.6.1.4 Otras bacterias que influyen en la pudrición del tallo del maíz.

El comité de maíz de la American Phytopathological Society (1980) reportó la participación

de Erwinia stewartii y E. aroideae (Town.) Holland.) en la pudrición del tallo del maíz y apuntó que esta bacteria al atacar la planta maíz provoca la debilidad de las plantas por reducción de área foliar que se vuelven más susceptibles a E. carotovora f. sp. zeae.

## 2.6.2 Factores abióticos de importancia en la pudrición del tallo del maíz.

### 2.6.2.1 Agua

Harrison, et al (1987); Maddox y Harrison (1988) estudiando la dinámica de población de Erwinia carotovora en las aguas de superficies libres (lagos, ríos, canales) y las capas subterráneas en Colorado encontraron que de todas las bacterias, E. carotovora se presentó en el 82% de las muestras colectadas.

Lal et al (1970); Thompson (1965); Hoppe y Kelman (1969) destacan la presencia de la bacteria en el agua de riego de las plantaciones afectadas. Lopes, Stall y Bartz (1986) hallaron E. chrysantemi pv zeae. en el agua de riego y definieron su papel en la incidencia de la pudrición del tallo del maíz.

### 2.6.2.2 Clima

Christensen y Wilcoxon (1966); Lal y Saxena (1978); Thind y Payak (1978); Saxena y Lal (1984) han reportado que Erwinia chrysanthemi. pv. zeae es favorecida por la alta temperatura (30 °C) asociada con la alta humedad. Anilkumar y Chakravarti (1971) probaron que para Erwinia carotovora y Pseudomonas lapsa la duración de la supervivencia es mas larga cuando la temperatura es baja (10 °C) y la humedad relativa alta (98 %).

### 2.6.3 Otros factores

#### 2.6.3.1 Manejo del cultivo.

##### 2.6.3.1.1 Densidad de siembra

Ahmad, Ahad, Aslam y Iqbal (1985) afirmaron que la intensidad de la pudrición del tallo del maíz aumenta con la densidad de siembra del cultivo.

##### 2.6.3.1.2 Aplicación de fertilizantes

Mc Goven y Dikey 1985 comprobaron la relación entre la nutrición y crecimiento de E. chrysanthemi. De acuerdo a Quiñones et al (1986) el

desarrollo de las bacterias del género *Erwinia* pudo tener una relación con el nivel de fertilizante aplicado. Saxena y Lal (1981) indican que una tasa alta de nitrógeno favorece el desarrollo de la pudrición del tallo del maíz.

#### 2.6.3.1.3 Sistema de riego

Hartman y Kelman (1973); Kelman et al (1957); Otta y Wood (1977); Hoppe y Kelman (1969) afirmaron que la incidencia de la enfermedad es más alta donde hay riego por aspersión.

#### 2.6.4 Control de la pudrición suave del tallo del maíz.

##### 2.6.4.1 Desinfección del agua de riego.

Thompson (1965); Lal et al (1970); Thind et al (1984) controlaron la pudrición bacteriana del tallo del maíz por cloración del agua del sistema de irrigación por aspersión.

##### 2.6.4.2 Evaluación de germoplasma

La evaluación de materiales resistentes a las bacterias de la pudrición del tallo del

maíz se ha realizado en laboratorio (Thind y Payak, 1976) y en el campo (Thind y Payak, 1978; Victoria, 1977).

La diferencia en resistencia a la pudrición del tallo ha sido detectada y en algunos cultivares del maíz en India parece ser controlada por la presencia de sustancias fenólicas como el "DIMBOA 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2h-1.4-benzoxazin-3-(4H) one" (Lacy et al, 1979; Hartman et al, 1975).

## **2.7 Método de identificación y de caracterización**

Los diferentes procedimientos de identificación y de caracterización sobre las bacterias fitopatogénicas del grupo de pudrición suave fueron definidos desde hace mucho tiempo por Graham (1964); Dye (1969) citado por (Fahy y Persley, 1983; Starr, 1983; Dickey, 1981; Sabet et al, 1964; Bergey'S, 1982). De acuerdo a esos autores los procedimientos utilizados son los siguientes:

### **2.7.1 Síntomas característicos de la enfermedad**

Fahy y Persley (1983) afirmaron que el registro de los síntomas de enfermedades es el punto inicial para un diagnóstico correcto. Por lo tanto es necesario consultar materiales bibliográficos y claves pictóricas que pueden orientar al investigador.

### 2.7.2 Características morfológicas

La forma de la bacteria constituye una característica preliminar muy importante en la descripción y la identificación de una bacteria. Esos caracteres pueden ser conocidos por medio de pruebas de tinción de gram y flagelos (Fahy y persley, 1983).

### 2.7.3 Características en medios de cultivos

Los medios de cultivo constituyen un elemento muy importantes en la identificación y la caracterización de las bacterias. El crecimiento, la forma de las colonias, el olor y el color en medios de cultivo específicos permiten de localizar en el grupo al cual pertenece el organismo en estudio (trazas de indigoidina en YDC, producción de pigmentos insoluble en agua (Cowan, 1974; Cother et al 1980).

Cuppels y Kelman (1974) han desarrollado el medio cristal-violeta-pectato modificado por O`Neill y Logan (1975) por adición de sulfato de manganesio. Este medio modificado permite distinguir las Erwinias de la pudrición suave de otras bacterias pectolíticas y también inhibe el crecimiento de las Pseudomonas pectolíticas.

Kado y Heskett (1970) pueden distinguir *Erwinia* spp. de otras bacterias en el medio D3. Uno de los medios de cultivo de caracterización e identificación de las bacterias de pudrición del tallo del maíz es el uso de tejidos vivos de hospederos (crecimiento de *E. carotovora* pv *carotovora* *E. carotovora* pv *atroseptica* y *E. chrysanthemi* en rodajas de papa.)

#### 2.7.4 Tinción de flagelos

La posición y el número de los flagelos son propiedades que ayudan a la identificación de las bacterias (*Erwinias* tienen flagelos peritricos, y las *pseudomonas* tienen flagelos polares)

#### 2.7.5 Tinción de gran rápida

De acuerdo a Cowan (1974) esta prueba constituye una de las primeras etapas en el diagnóstico de una bacteria desconocida. Este método permite distinguir y separar las bacterias gram positivas de las gram negativas y también ver su forma y su tamaño. La única dificultad de este proceso es la edad de la cepa utilizada porque algunas bacterias corineformes tienen la tendencia de aparecer gram negativa cuando los cultivos tienen más de 48 horas.

### **2.7.6 Características fisiológicas y bioquímicas.**

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas hechos en condiciones adecuadas conducen a la identificación de la bacteria hasta la especie (Brenner, 1977; Dickey, 1979; Sabet et al, 1964); Lelliott, 1974; Dye, 1968, Dickey et al 1987). Las pruebas utilizadas son las siguientes:

Pruebas de KOH 3%, prueba de patogenicidad en hospederos específicos, transformación de los carbohidratos, crecimiento y transformación de los amino ácidos, prueba de catalasa y oxidasa, prueba de metil y Voges Proskauer, producción de gas a partir de la glucosa, producción de H<sub>2</sub>S, licuefacción de la gelatina y reducción de los nitratos y la prueba serológica.

### **2.8 Métodos de aislamiento de la bacteria de la pudrición del tallo del maíz.**

Par el aislamiento para la bacteria de la pudrición suave del tallo del maíz siguen los procedimientos generales descritos para las bacterias de pudrición suave (Starr, 1983; Fahy y Persley, 1983; De Boer y Kelman, 1975).

## 2.9 Métodos de inoculación y de evaluación de la pudrición del tallo del maíz.

Rangarajan y Chakravarti (1971); Thind y Payak (1978) inocularon por metodo de punción dentro de la parte basal del tallo. Hoppe y Kelman (1969); Hartman y Kelman (1973); han provocado la pudrición al derramar la suspensión bacteriana en el cogollo de la planta de maíz. Victoria (1977) desarrollo el sistema de seudotallo e inoculación por micropipetas de Eppendorf.

En el caso de la pudrición bacteriana del tallo del maíz los métodos de evaluación se realizaron sobre la incidencia de la enfermedad (Hoppe y Kelman, 1969; Hartman y Kelman, 1973; Victoria, 1977).

## 2.10 Podredumbre causada por hongos.

Gilbertson, Brown y Ruppel (1985), reportaron que los hongos asociados a la pudrición del tallo del maíz son: Fusarium graminearum Schabe, E. moniliforme Sheld y E. subglutinans. Anderson (1987), publicó que E. moniliforme y Giberella zeae son los fitopatogenos fungosos mas frecuentes de los aislamientos del tallo de maíz en Illinois. Byrnes y Carroll, 1986 apuntaron la presencia de los hongos responsables de la pudrición del tallo de Delaware.

Gonzalez (1972); APS (1980); han mencionado que los principales hongos involucrados en pudrición del tallo del maiz son favorecidos por temperatura alta (32C) y alta humedad, sequia, mal drenaje del suelo. Los patógenos viven en el suelo y penetran en la planta por la vaina foliar.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Diagnósis de la pudrición suave del tallo del maiz.

##### 3.1.1 Descripción de los síntomas y colección de materiales infectados.

La descripción de los síntomas característicos se hizo de acuerdo a la evolución de la enfermedad en el cultivar Tuxpeño, en la estación experimental del CATIE "La Montaña" en Turrialba, Municipalidad de Cartago y donde se ha registrado la enfermedad. Sus coordenadas geográficas son los 9 $\circ$  5' de latitud norte y de 83 $\circ$ 30' de longitud oeste, con una altitud de 590 metros sobre el nivel del mar.

Segun Holdridge (1979) sus características climáticas son del tipo bosque húmedo tropical. La precipitación promedio anual corresponde en unos 2600 mm, la temperatura media 22 $\circ$ C y la humedad relativa media entre un 85-90 %.

Los procedimientos de diagnóstico utilizados fueron similares a los descritos por Dowson (1957), Fahy y Persley (1983) y Agrios, (1985). Se colectaron materiales procedentes de plantas afectadas y partes de plantas sanas para el aislamiento posterior.

### 3.1.2 Aislamientos.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de diagnóstico del CATIE en Turrialba. Los aislamientos se hicieron de muestras con síntomas de la pudrición suave de maíz de las cultivares Diamantes, Tuxpeño, EJN, Tico V7, Tico V6 sembrados en "La Montaña". Los métodos empleados fueron los descritos para bacterias y hongos en los manuales de Fahy y Persley, (1983) y Dhingra, (1986).

Para bacterias, después de un lavado con agua del tubo, se cortaron tres trozos de un tamaño de 3-4 mm luego se colocaron en 10 ml de agua destilada estéril por 3 minutos. Luego se realizaron diluciones hasta  $10^8$  tomando de las dos últimas 0.1 ml y distribuyéndole con una asa en platos Petri que contienen los medios AN, YDC, MG y MS (ver apéndice) seguido de su purificación. A las 48 horas, se caracterizaron las colonias y se volvió a aislar en AN para su purificación. Las cepas aisladas fueron almacenadas en viales de 10 ml con agar nutriente inclinado y el crecimiento bacterial fue cubierto con aceite mineral esterilizado.

En el caso de hongos después de una desinfección de los cortes de tejidos en hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 minutos y un flameado con alcohol se efectuaron

algunos aislamientos en agar agua y PDA para obtención de hongos.

### 3.1.3 Prueba de patogenicidad

Se realizó este trabajo en el invernadero de Fitopatología de la sede central de CATIE en Turrialba; en un ambiente con una temperatura promedio diaria entre 22 y 25 grados centígrados. Las plantas de maíz del cultivar Tuxpeño de 30 días de edad se colocaron en una cámara humedad. Estas plantas sembradas en número de cuatro por maceta, fueron previamente colocadas en condiciones de invernadero. El suelo utilizado para la siembra fue desinfectado con bromuro de metilo una semana antes. Se incorporó en la cámara húmeda, un humidificador para mantener la humedad relativa cercana al 100 % durante todo el ensayo.

La patogenicidad de la bacteria también fue comprobada en condiciones de invernadero. En este caso, los procedimientos de inoculación fueron iguales al experimento anterior, con excepción del cultivar de maíz que fue Diamantes, las condiciones de humedad relativa y de temperatura. Para obtener condiciones similares a las mencionadas anteriormente, cada planta inoculada fue cubierta con una bolsa de plástico en las primeras 24

horas; además se realizaron dos aspersiones diarias a partir del segundo día de la inoculación.

Las pruebas de patogenicidad de las cepas de hongos se llevaron a cabo en condiciones de invernadero, el método de inoculación fue por aspersión en las hojas superiores con una aspersora de Vilbiss N<sup>o</sup> 15.

### 3.1.3.1 Preparación del inóculo

Los inóculos se prepararon a partir de cada uno de 12 aislamientos de bacterias obtenidos de cultivares distintos (Diamantes, Tuxpeño, EJM, Tico V7, Tico V6) afectadas de la pudrición suave del tallo del maíz. Estas bacterias fueron previamente guardadas en viales de AN y aceite mineral en las condiciones de temperatura del cuarto del laboratorio. Antes de la inoculación se les reactivaron primero en AN y después en el medio de cultivo PCG (peptona 1 %, ácido de caseína 0.1 % , glucosa 1 % y agar 20 %) Hartman y Kelman (1973) en cajas de petri durante 48 horas a 27°C. Cada inóculo fue extraído por raspado después de agregar 10 ml agua destilada con Tween 20 al 1 %; y la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de 1000 g. Luego se añadió esta solución para ajustar hasta que la

suspensión llegó a una concentración aproximada de  $10^8$  ufc/ml.

### **3.1.3.2 Método de inoculación**

Para la inoculación se utilizó el método mejorado de Hartman y Kelman (1973) para las Erwinias de pudrición suave que consiste en colocar un mililitro de la suspensión bacteriana en el cogollo de cada planta de maíz. Las observaciones diarias se llevaron a cabo a partir de las 48 horas de la inoculación.

En la preparación del inóculo de las cepas fungosas se utilizó el Tween 80 al 1% y un nivel de inóculo que corresponde en un 10000 conidios contados a partir del método descrito por French, (1982).

### **3.1.3.3 Patogenicidad de otras cepas bacterianas con las cepas aisladas de la pudrición del tallo del maíz.**

Una evaluación complementaria de patogenicidad se llevó a cabo sobre la cultivar Tuxpeño.

Las cepas que se utilizó se ven en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Procedencia de las Cepas utilizadas en las pruebas de inoculación de plantas de maíz (*Zea mays*).**

Cepas	Hospederos	Procedencia
Mezcla de aislamientos* 4,5,6,8,10	Maíz	La Montaña
<i>E. chrysantemi</i>	chile dulce	"
<i>E. carotovora</i>	"	"
<i>Pseudomonas</i> sp.	"	"
<i>P. fluorescens</i>	"	"
<i>Klebsiella</i> spp.	"	UCR Facultad
<i>Escherichia coli</i>	"	" "

La metodología de inoculación utilizada y la preparación del inóculo fueron las mismas que para las pruebas anteriores. Sin embargo, se usó el agar tripticosa soya como medio de cultivo antes de la prueba. Las observaciones de síntomas se dirigieron sobre el comportamiento de las plantas, comparado con los controles, agua destilada estéril y tween 20 al 1%. Este ensayo tuvo tres repeticiones.

#### 3.1.4 Identificación y caracterización del patógeno.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de diagnóstico del proyecto MIP en la sede central CATIE en

\*Bacteria aislada de la cultivar Tuxpeño

Turrialba y el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Microbiología de la UCR (Universidad de Costa Rica).

La identificación y la caracterización se realizaron por medio de pruebas morfológicas, fisiológicas y Bioquímicas según los procedimientos definidos por Dye, (1969) citados por Cuppels y Kelman, (1974), Shaad, (1980) Fahy y Persley (1983), Starr (1983), Saxena y Lal (1984), Leliott y Dickey (1984) Y el manual Bergey's, (1982) para las Enterobacteriaceas en general.

Se consideraron los criterios siguientes:

#### **3.1.4.1 Carácteres morfológicos.**

Las características morfológicas fueron observados en los crecimientos, forma, y color en medios de cultivo generales agar nutriente, YDC, ATS (agar tripticasa soya) y específicos MS y CVP (cristal-violeta-pectato) y por medio de las pruebas de tinción de gram y flagelos.

##### **3.1.4.1.1 Tinción de gram**

El método que se utilizó consistió en preparar un frotis bacteriano delgado, secado al aire y fijado con alcohol en un portaobjetos. Luego, se les adicionó una solución de cristal violeta por un minuto,

después se le escurrió ligeramente agua del tubo durante cinco segundos. después, se le cubrió con una solución de lugol por un minuto, y volvió a lavarlo con agua de tubo. Se decoloró con alcohol etílico de 95 grados por 10 segundos y se aplicó safranina por 30 segundos como colorante de contraste, se lavó con agua del tubo y se dejó secar al aire. Se observó con el objetivo de inmersión.

#### 3.1.4.1.2 Tinción de flagelos

En láminas pretratadas durante una semana en una mezcla sulfocrómicas, se tomó con una asa en punta la bacteria previamente aislada en agar tripticasa soya (ATS) durante un período de 18-24 horas. Con cuidado se depositó ligeramente en una gota de agua destilada estéril sobre los portaobjetos pretratados después de flamearlo. Se dejó secar la preparación al aire. Se les introdujeron en el recipiente del líquido de tinción patentado por la UCR durante 7 minutos y se lavó con agua de tubo y se dejó secar al aire.

### **3.1.4.2 Carácteres fisiológicos y bioquímicos.**

#### **3.1.4.2.1 Oxidación y fermentación de la glucosa.**

Se utilizó el medio de Hugh y Leifson, que consiste en duplicar dos tubos de este medio; uno para la oxidativa y otro para la fermentativa. Después de pasar las bacterias en los dos tubos, Se mantuvo la inoculación fermentativa bajo de una capa de parafina y de vaselina mezclada en una proporción 1:1. Las observaciones se hicieron a partir de las veinte y cuatro horas.

#### **3.1.4.2.2 Metabolismo de los carbohidratos.**

En un medio base estéril constituido por una solución de peptona al 1 % con 0.003 % de de bromotimol azul se adicionó por separado maltosa lactosa sorbitol...etc. Esos medios fueron inoculados con las bacterias en estudio e incubados bajo las condiciones

del cuarto del laboratorio. Se tomaron las observaciones a partir de las 48 horas.

#### 3.1.4.2.3 Producción de gas de glucosa.

A este medio base estéril mencionado anteriormente se le agregó una solución de glucosa al 1 %. Después de repartir este medio en tubo de ensayo de 4 cm de largo se les inocularon y les sellaron con mezcla de vaselina y parafina estéril. Las observaciones se hicieron sobre el cambio de color azul a amarillo y la producción de burbujas en el espacio de la parafina y el líquido.

#### 3.1.4.2.4 Prueba de catalasa y de oxidasa.

##### Catalasa

Por medio de una asa de plátina se depositó, una pequeña porción de suspensión bacteriana un portaobjetos. Luego se le agregó una gota de una solución concentrada de peróxido de hidrógeno al 3 %. La catalasa

positiva produce burbujas al contacto del líquido con la suspensión bacteriana.

### **Oxidasa**

Con una asa de platina se tomó una pequeña porción de secreción bacteriana y se puso sobre un papel filtro. Después se le agregó 3 gotas de la solución de oxalato de p-aminodimetilalanina sobre la secreción; las oxidasas positivas cambian de naranja a marron y de marron a negras a los 10-20 minutos.

#### **3.1.4.2 5 Prueba Voges Proskauer.**

Se inoculó las bacterias en el mismo medio de la prueba de rojo de metilo. Después de incubación durante 48 horas se le agrega en orden 0,2 ml de alfa naftol al 5 % y 0,2 KOH al 40 % y se agitó fuertemente. Las lecturas se hicieron después de 15 minutos de reposo.

#### **3.1.4.2.6 Hidrólisis de la ureasa y producción de indol.**

**Hidrolisis de la ureasa.** A partir de un cultivo joven de 18-24 horas se distribuyó en agar urea de Christensen inclinado las diferentes cepas

bacterianas en estudio. Se observaron las reacciones del medio a los 18-24 horas de incubación a la temperatura de la sala del laboratorio (8 - 20°).

**Producción de indol.** A partir de un cultivo puro de 18-24 horas de edad se inculó colonias puras de bacterias en el caldo triptona. Después de una incubación a 35°C por 48 horas se les agregó 1 ml de xilol e se agitó vigorosamente para extraer y concentrar el indol. Se dejó estratificar en la superficie durante 15 minutos. Cuidadosamente se agregó 10 gotas del reactivo de Ehrlich

por la pared del tubo. Se lee el interfase del solvente después de añadir el reactivo.

#### 3.1.4.2.7 Licuefacción de la gelatina y reducción de los nitratos.

**Licuefacción de la gelatina.** Con una asa en punta se inoculó a una profundidad de una pulgada cultivos jóvenes de 18-24 horas picando las bacterias en un tubo que contiene el medio cultivos

**Reducción de los nitratos.** En tubo de caldo de nitratos con una campana de Durham se inoculó una cantidad de secreción bacteriana joven de 18-24 horas incubada a la temperatura del cuarto del laboratorio. A los 18-24 horas de incubación se les añadió 5 gotas de Alfa-Naftilamina al 0.5%. 5 gotas de ácido sulfanílico, si no hay desarrollo de color rojo se agregó una pequeña cantidad de zinc para la reducción de nitrato a nitrito.

#### 3.1.4.2.8 La prueba de cultivo en rodajas de papa y pectacto.

Se utilizó en esta prueba la metodología desarrollada por De Boer y Kelman, (1974).

Con papas previamente lavadas con agua y jabón, se flamearon durante 5 segundos después de pasar las en alcohol. Con un bisturi previamente esterilizado y flameado con alcohol, se cortó la papa en rodajas dejando las extremidades. Las rodajas de papa fueron colocadas en platos de petri esterilizados con 1 ml de agua destilada estéril. La inoculación se hace poniendo una gota de una suspensión bacteriana en el centro de la papa. Las observaciones se llevaron en los 48 horas de incubación.

#### **Prueba de pectato**

Esta prueba se realizó a partir del medio desarrollado por Cuppels y Kelman, (1974). Las observaciones se llevaron a cabo a los 48 horas después de pasar las bacterias en el medio. Las cepas controles utilizadas fueron *E. carotovora* pv *carotovora* 15713 y *E. chrysanthemi* pv. *zeae* de la ATCC.

### **3.2 Tipificación de las cepas virulentas**

Para obtener una evaluación de las seis cepas 6, 8, 9, 10, 11 y 7 del patógeno consideradas las más virulentas se inocularon plantas de 30 días de edad de dos cultivares Tuxpeño y los Diamantes. Se utilizó un diseño completo al azar con tres repeticiones (2x6x3) más un testigo con Tween 20 al 1 %. Se utilizó el método mejorado de Hartman y

Kelman (1973). Para tener un nivel de humedad similar al de las condiciones ambientales de la pudrición del tallo del maiz, se regaron por aspersion dos veces al dia las plantas inoculadas. Las observaciones fueron efectuadas a los 3, 6, 9 y 12 dias despues de la inoculacion.

La informacion fue tomada con base en el promedio del porcentaje de plantas que presentan sintomas de pudrición por repeticion.

### 3.3 Calibracion de tecnicas para evaluacion por la resistencia.

Este ensayo se llevo a cabo en el invernadero del proyecto MIP de CATIE. EL experimento utilizo un diseno factorial completo al azar (2x3x3x3x3) donde los parametros fueron:

2 = dos cultivares B833 y Tuxpeño.

3 = tres cepas 8, 9 y 10.

3= tres edades distintas 25, 40 y 50 dias.

3 = tres dosis  $10^7$ ,  $10^8$   $10^5$

3 = tres repeticiones

En esta prueba la metodologia utilizada para proporcionar la humedad y la toma de datos son similares a los considerados en 3.2. las lecturas de los porcentajes

de pudrición se tomaron a los 7 y 12 días después de la inoculación.

### **3.4 Prueba de resistencia de materiales**

De acuerdo a los resultados anteriores de la prueba de calibración de materiales, fueron inoculadas 10 cultivares y/o cultivares de maíz (cuadro 2) con un promedio de 10 plantas por cultivar, según los métodos de pipeteo (Hartman y Kelman, 1973) y de punción (Victoria, 1977). Se utilizó un inóculo hecha de una mezcla de tres cepas (8, 9 Y 10). El diseño utilizado fue en un completo al azar con tres repeticiones llevando como testigos para pipeteo Tween 20 al 1% y agua destilada estéril para punción.

La metodología seguida para las observaciones fue similar a las pruebas anteriores.

### **3.5 Comprobación de métodos de inoculación y resistencia de cultivares.**

De los resultados obtenidos en el ensayo anterior se propuso la comprobación del método de punción comparado al del pipeteo en 9 de las mismas cultivares mencionadas anteriores a excepción de X3214. El inóculo utilizado fue una mezcla de 5 de las cepas originales almacenadas en aceite mineral donde se observaron 10 plantas por cultivar

**Cuadro 2. Cultivares o híbridos de maíz utilizados en la evaluación de resistencia de materiales. CATIE. Julio, 1989.**

Nombre	Materiales	Procedencia
Ticov6	Cultivar	CYMMYT*
Diamantes	Cultivar	Guápiles
Tuxpeño	Cultivar	CYMMYT
EJN-2	Cultivar	Guanacaste
Guanani	cultivar	Guayabo
V833	Híbrido	CNP
Maicillo	Cultivar	Salvador
Across 7728	-	CYMMYT
X3092	Híbrido	PIONEER
X3214	-	CYMMYT

y por cada método. (para la mezcla de las cepas utilizadas ver el cuadro 1)

### 3.6 Campo

#### 3.6.1 Establecimiento de una parcela en el campo.

Para obtener más información sobre el desarrollo de la enfermedad, se instaló una parcela donde había registrado una alta incidencia de la pudrición del tallo del maíz. En esta parcela se empleó la cultivar Tuxpeño altamente susceptible a esta enfermedad.

\*Tomado de Timothy et al (1988)

### 3.6.1.1 Labores culturales

La siembra fue efectuada en forma manual en tres fechas a intervalo de diez días en un terreno de 600 m<sup>2</sup> de superficie. El área correspondiente a cada fecha fue rastreada dos días antes de la siembra. Los residuos de la cosecha anterior fueron incorporados "in situ". Un alto grado de estos residuos corresponden a tejidos de plantas afectadas. Estos presentaron en algunos tratamientos hasta un 90 % de incidencia de la pudrición suave del tallo del maíz. La distancia utilizada fue un 50 cm x 100 cm entre golpes y entre surcos respectivamente.

Con el fin de observar el posible efecto de los insectos del suelo la parcela fue dividida en dos partes una de ellas recibió Lorsban al momento de la siembra en cada fecha en una cantidad de 5-10 Kg por hectarea. Para el control de los insectos foliares se utilizó malathion al 57% en una dosis de 6cc/litro a los 15 días de cada siembra.

A los 15 días de cada siembra se colocó en un semicírculo aproximadamente a 4 cm de distancia de la base de las plantas una cantidad de abono correspondiente a 150Kg/ha de la fórmula completa 15-15-15 en cada golpe de plantas. El control de malezas se realizó en forma manual a los 20 y 50 días después de cada siembra. La plantación

fue regada cinco veces por aspersión debido a la escasez de lluvia en los meses de realización de este estudio. A partir de los diez y ocho días de cada siembra, para cada tratamiento, las observaciones, se llevaron a cabo semanalmente en 20 plantas escogidas al azar de los surcos centrales.

### 3.6.1.2 Inoculación

Cuando las plantas, de acuerdo a las fechas de siembra alcanzaron 25, 35 y 45 días se procedieron a inocularles pipeteando 1 ml de suspensión bacteriana en el cogollo de cada una (Hartman y Kelman, 1973). En este trabajo se escogieron del surco central cuatro plantas por parcela útil (Fig 1.)

### 3.6.2 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de las 12 cepas bacterianas mencionadas en las pruebas de patogenicidad (3.1.3). La metodología utilizada para la preparación del inóculo y la inoculación fueron la misma, pero con la sola diferencia de que en esta ocasión se mezclaron las cepas por medio de un agitador magnético durante 15 minutos.

Camino						
Estructura de drenaje						
- Lorsban			+ Lorsban			
1	2	3		1	2	3
**	**	**		**	**	**
**	**	**		**	**	**
**	**	**		**	**	**
**	**	**		**	**	**
**	**	**		**	**	**
**	**	**		**	**	**

1, 2, 3 = 25, 35, 45 días de edad

Figura 1. Arreglo espacial de las parcelas y tratamientos en el experimento de campo. La Montaña, CATIE Turrialba.

El seguimiento de las observaciones se llevó a cabo sobre las plantas inoculadas y las 10 plantas alrededor de cada una de ellas, observandose además la población de insectos que viven en el cogollo de la población de las plantas mencionadas.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Diagnósis de la pudrición del tallo del maiz.

#### 4.1.1 Síntomas.

La enfermedad observada en la finca experimental de CATIE en Turrialba, presenta una pudrición suave húmeda, ligeramente café, del cogollo a nivel del cuarto o quinto entrenudo. Estas afecciones suspenden la comunicación entre los tejidos conductores de la parte inferior y superior de la planta por desintegración de la médula. Lo que resulta en una clorosis de las hojas superiores acompañada de coloración púrpura de las márgenes seguido de un marchitamiento. En este estado al halar la parte superior del tallo todo el verticilo se desprende facilmente. Las plantas sanas se pueden distinguir de las enfermas por el olor desagradable de la pudrición en una etapa avanzada.

El diagnóstico basado solamente sobre síntomas puede inducir a errores y no es suficiente para definir la causa de una enfermedad; Lelliot y Stead, (1988) describen que grandes cantidades de patógenos pueden producir síntomas de pudrición suave del tallo, entre ellos se destacan los géneros bacteriales Erwinia spp, Pseudomonas spp, Flavobacterium sp Clostridium spp asimismo patógenos

fungosos como Fusarium moniliforme.

Los síntomas observados fueron similares con aquellos descritos en maíz por Victoria et al (1975) en Colombia, Ark (1940); Boewe (1949); Hoppe y Kelman (1969); Kelman et al (1957); en Los Estados Unidos Volcani (1961); en Israel Rosen (1926); Stanley y Orton (1932); Rangarajan y Chakravarti (1971); Sabet (1954); Sabet et al (1964).

Estos autores encontraron que los agentes causales de esas pudriciones suaves eran E. dissolvens Rosen Burkolder (syn) de Pseudomonas dissolvens; E. carotovora pv zeae (Sabet) (syn) E. chrysanthemi pv zeae (Sabet) Victoria, Arboleda y Muñoz.

Los síntomas observados muestran una gran afinidad con las bacterias del grupo de pudrición suave, al cual pertenece el agente causal de la pudrición suave del tallo del maíz.

#### 4.1.2 Caracterización preliminar de los aislamientos.

De las muestras colectadas durante este estudio y otras hechas con anterioridad se obtuvieron 12 aislamientos bacteriales y dos fungosos que se identificaron de acuerdo al cultivar, su procedencia y época de recolección (Cuadro 3).

Cuadro 3. Aislamientos de las bacterias utilizadas en este estudio de acuerdo a su procedencia su fecha de colección, variedad y código asignado al aislamiento.

Código	Variedad	Procedencia	Fecha
1	Tuxpeño	La Montaña	Oct. 1988
2	Tuxpeño	La Montaña	Oct. 1988
3	Tuxpeño	La Montaña	Oct. 1988
4	Ticov7	La Montaña	Mar. 1987
5	Ticov6	La Montaña	Mar. 1987
6	Diamantes	La Montaña	Agt. 1988
7	Bomba aspersora	La Montaña	Agt. 1988
8	E.J.N.*	La Montaña	Agt. 1988
9	Tuxpeño	La Montaña	Oct. 1988
10	Tuxpeño	La Montaña	Oct. 1988
11	Tuxpeño	La Montaña	Oct. 1988
12	Tuxpeño	La Montaña	Oct. 1988

Los crecimientos bacterianos en YDC dan colonias cremas y cambian de color en el medio MS de verde a amarillo, asimismo todas son gram negativas.

Segun el procedimiento común de identificación inicial descrito por Schaad (1980), con base en las características de las colonias en el medio YDC ,MS y prueba de gram, las cepas bacterianas aisladas del tallo del maíz pertenecen al género Erwinia. A pesar que la identificación de una bacteria no puede estar basada solamente en estas pruebas,

\*Enrique Jiménez Núñez

si constituyen un paso preliminar muy significativo en la identificación del patógeno.

Los aislamientos de hongos en el medio agar agua y PDA dan un crecimiento micelial abundante de color rosado y el cual cuando se examinó al microscopio presenta conidios característicos de Fusarium sp.

#### 4.1.3 Prueba de patogenicidad.

En condiciones óptimas de humedad y de temperatura, durante toda la prueba, los síntomas de la enfermedad en la cultivar Tuxpeño se obtuvieron entre los 3-8 días de la inoculación con los aislamientos bacteriales (Cuadro 4).

Asimismo cuando las plantas fueron colocadas en el invernadero, en el cual se suministró condiciones de cámara húmeda por 16 horas, y dos riegos diarios, todas las cepas usadas también fueron patogénicas al cultivar Diamantes (Cuadro 5).

Cuadro 4. Patogenicidad de doce aislamientos bacteriales en la variedad Tuxpeño y porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz a los 3, 6 y 9 días de la inoculación, en condiciones de cámara húmeda más humidificador.

Cepas	Días después de la inoculación		
	3	6	9
1	0	75	100
2	0	66	100
3	0	50	100
4	0	100	100
5	0	66	100
6	60	66	100
7	100	100	100
8	75	100	100
9	60	100	100
10	75	100	100
11	0	50	100
12	0	50	100

Cuadro 5. Patogenicidad de doce aislamientos bacteriales en la variedad Diamantes de acuerdo al porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz a los 3, 6 y 9 días de la inoculación\*

Cepas	Días después de la inoculación		
	3	6	9
1	0	66	100
3	0	50	100
4	0	34	100
5	0	0	100
6	0	66	100
7	100	100	100

**Cuadro 5a. Presencia de síntomas de pudrición del tallo en plantas de maíz var. Tuxpeño Inoculadas con aislamientos bacteriales procedentes de varios hospederos.**

Cepas	Presencia
<i>Erwinia</i> sp. (maíz)	+
<i>E. carotovora</i> (chile)	+
<i>E. chrysanthemi</i> (chile)	+
<i>P. fluorescens</i> (chile)	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+
<i>Escherichia coli</i>	-

#### 4.1.4 Identificación de las cepas aisladas a partir de la pudrición del tallo del maíz.

En la identificación y caracterización se dió énfasis a las cepas consideradas más virulentas en las pruebas de patogenicidad en condición óptima de humedad y de temperatura para desarrollo de las bacterias. En otras cepas tales como 1, 2, 3, 4 y 5 se hicieron las pruebas necesarias para comprobar su identidad (Cuadros 6a y 6b).

De acuerdo a las pruebas preliminares realizadas en el laboratorio, todas las cepas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae.

Cuadro 6a. Características de las cepas aisladas de la pudrición del tallo del maíz  
 CATIE, Turrialba Costa Rica, 1989

Pruebas	CEPAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Formas	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ
Bordes	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent
Elevación	con	con	con	con	con	con	con	con	con	con	con	con
KOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagelos	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri
Polipeptato												
OF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levan			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Papa			+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	-	-	+						-
Voges Proskauer	+	+	-	+	-	+	-	-	+	d	+	+
Ureasa	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
NaCl 5%						+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 36aC				+	+	+	+	+	+	+	+	-
Producción de H <sub>2</sub> S				+		+	+	+	+	+	+	+
Almidon						-	-	-	-	-	-	+
Inositol			-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Sorbitol			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa								+	+		+	
Gas glucosa				+		-	-		+	-	+	+
Manosa				+		+	+		+	+		+
Ramnosa			+	+	+	+	-	+	+	+	+	
Lactosa			-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Melibiosia						+	-		-	-		
Salicina			+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa			+	+	+	+	+	+		+	+	
Rafinosa			+			+	+	+	+	+	+	
Arabinosa									+	+	+	
Maltosa									+	+	+	
Xilosa									+	+	+	

+ = reacción positiva

- = reacción negativa

d = dudosas

Cuadro 6b. Caracterización de las cepas reaisladas de la pudrición del tallo del maiz de la Montaña. Turrialba, Costa Rica.

Prueba	CEPAS										
	1r	2r	3r	4r	5r	6r	7r	8r	9r	10r	11r
Formas	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ	circ
Bordes	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent	ent
Elevación	con	con	con	con	con	con	con	con	con	con	con
KOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagelos	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri	peri
Polipectato						-					
OF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos		+	+		+	+	+	+	+	+	+
Indol			-			-	-	-	-	-	-
Levan					-	-	-	-	-	-	-
Papa						-					
Fenilalanina			-			-	-	-	-	-	-
Gelatina						-	+	-	-	+	-
Rojo de metilo	+	+	+	-	-	+					
Voges Proskauer			-	+	-	+	-	-	+	-	+
Ureasa	-		-	-	+	+	-	+	+	-	-
NaCl 5%						+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 36°C				+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de H <sub>2</sub> S						+	+	+	+	+	+
Almidon						-	-	-	-	-	-
Inositol			-		-	+	-	-	-	+	+
Sorbitol			+			+	+	+	+	+	+
Manitol			+			+	+	+	+	+	+
Fructosa						+	+	+	+	+	+
Gas glucosa			+			-	-	-	+	+	+
Manosa						+	+		+	+	+
Raenosa			+			+	-	+	+	+	+
Lactosa			+			-	-	-	+	+	-
Melibiososa						+	-		-	-	
Salicina			+			+	+	+	+	+	+
Sacarosa			+			+	+	+	+	+	+
Rafinosa			+			+	+	+	+	+	+
Arabinosa						-			+	+	+
Maltosa						+			+	+	+
Xilosa						+			+	+	

+ = reacción positiva  
 - = reacción negativa

El estudio de reacciones fisiológicas y bioquímicas realizado en el laboratorio de Microbiología de la UCR comprobó este resultado preliminar y determinó que 11 de las 12 cepas pertenecían al género Erwinia verificado por medio de la tabla del Manual Bergey's , (1982) y las cepas de referencia obtenidas de la ATCC.

Las cepas resultantes de los aislamientos a partir de las muestras del campo y las reaisladas a partir de las plantas con síntomas de pudrición suave en la prueba de patogenicidad fueron muy similares (Cuadro 7) con lo cual se cumplen los postulados de Koch para la patogenicidad de los 12 aislamientos aislados.

**Cuadro 7. Correlación de las cepas reaisladas de la pudrición tallo del maíz con las cepas originales. Turrialba, 1989.**

Cepas	N° de pruebas	Correlación con las cepas originales
1r	13	1,00
2r	12	1,00
3r	25	0,92
4r	11	1,00
5r	11	1,00
6r	37	1,00
7r	34	0,97
8r	24	1,00
9r	37	0,95
10r	35	1,00
11r	34	0,94

Segun Colwell et al, (1968) reportado por Victoria et al, (1975), el "Indice de Similitud" es consistente para separar las bacterias, porque se calcula a partir de las características negativas y positivas presentadas entre ellas. Los Cuadro 7 y 7a muestran este "Indice de Similitud" tanto para los aislamientos originales como para los reaislamientos.

**Cuadro 7a. Identificación de las cepas aisladas de tejidos con pudrición de tallo de maiz y de una muestra de agua de una bomba aspersora de acuerdo a su "Indice de Similitud"**

Cepas	Familia	Género sp.	Número de Pruebas			Coeficiente Similitud
			+	-	Tot	
1	Enterobacteriaceas	Erwinia sp	15	0	15	1,00
2	"	"	15	0	15	0,94
3	"	"	25	1	26	0,96
4	"	"	28	1	29	0,96
5	"	"	-			
6	"	"	37	0	37	1,00
7	"	"	32	2	34	0,94
8	"	"	24	0	24	1,00
9	"	"	35	2	37	0,95
10	"	"	33	2	35	0,94
11	"	"	23	2	25	0,92

-= reacciones no similares  
+= reacciones iguales

Con base en estos resultados las bacterias de la pudrición del maiz alcanzan un "Indice de Similitud"

superior a 0,92 con especies del grupo carotovora y amylovora tales como E. carotovora, E. nigrifluens, E. rubrifasciens y E. cypripedii.

Este grupo de Erwinia tiene en común la actividad pectolítica, aunque algunas en menos grado que otras; por ejemplo en el medio de Behara (1968) utilizado en esta identificación solo puede ser detectada esta actividad para las especies E. carotovora y E. rubrifasciens, mientras que en otros medios más sensibles tales como Hildebrand, (1971) estas cuatro especies muestran actividad pectolítica. Por otra parte, estas bacterias están asociadas a pudrición en diferentes órganos y especies de plantas (Bergey's 1982). E. carotovora es la especie más común de las cuatro tanto en problemas de pudrición suave en plantas (Fahy y Persley 1983) como en pudrición suave del tallo del maíz (Sabet 1964; Hoppe y Kelman 1969)

Por la morfología de los aislamientos E. stewartii especie que se ha asociado a esta enfermedad en el trópico húmedo costarricense (Guevarra, 1988) y especialmente en "La Montaña "se descartó totalmente como agente causal de la pudrición del tallo debido a que esta especie es la única del género Erwinia que no es móvil y no tiene flagelos; lo cual no está de acuerdo a los resultados presentados en los Cuadros 6a y 6b donde todas tienen

flagelos peritricos y son moviles.

Segun Kado et al (1972) las pruebas clásicas de identificación son a menudo dificiles de interpretar. Los fenotipos simples y variables cambian dependiendo del ambiente en el cual la bacteria se ha desarrollado y reflejan una pequeña porción del genome bacteriano. Por lo tanto, es necesario confirmar los resultados obtenidos mediante una prueba de ácido grasos o DNA (DE Boer y Sasser, 1986)

#### 4.2 Resultados de comportamiento de 7 cepas

Los resultados se aprecian en el analisis de varianza del Cuadro 8 donde se ve una diferencia altamente significativa entre las cepas aisladas al 5% y también entre las diferentes fechas de lectura.

La comparación de medias de tratamientos o cepas se aprecia en el Cuadro 9

Las cultivares utilizados en este experimento desde el punto de vista estadístico son iguales a pesar que la cultivar Diamantes colocado en las mismas condiciones sufre más daños que el cultivar Tuxpeño.

Cuadro B. Análisis de varianza del porcentaje de incidencia de pudrición bacteriana del tallo del maíz por cepa. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1989

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C
Var	1	0,0018	0,0018	0,02 NS
Cepas	7	41,51	5,93	51,79 **
Cepas * Var	7	1,93	0,28	2,42
Rep (cepa) Error (a)	16	4,51	0,28	2,46 NS
Lect.	3	10,63	3,54	30,97 **
Var * Lec	3	0,29	0,09	0,87 NS
Cepas * Lec	21	6,9	0,33	2,87 **
Cepas * Var * Lec	21	2,13	0,10	0,89 NS
Error (b)	112	12,82	0,11	
Total	191	80,76		

\*=  $P > F = < 0,01$   
 \*\*=  $P > F = < 0,05$

C.V. = 37,1025

Cuadro 9. Diferencias en la prueba de Duncan para el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz de acuerdo a las cepas. CATIE, 1989.

Cepas	Medias		Grupo*
	Transformadas	No transformadas	
7	1,43	91,95	A
6	1,39	91,66	AB
9	1,17	76,45	B
10	1,09	70,83	B
11	1,06	70,16	C
8	0,69	44,45	C
12	0,44	28,66	D
Testigo	0	0	

\*Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes al 5 %

De acuerdo al porcentaje de incidencia la prueba de Duncan presentada en el Cuadro 9 indican que las cepas son muy diferentes. Un estudio detallado de cada cepa en cada fecha indica que se diferencian entre ellas en su virulencia para atacar el maíz porque una ataca más rápido que otra a pesar de que a los doce días todos han llegado a dar una incidencia promedio arriba de un 80% (Cuadro 10) Este Cuadro hace resaltar la importancia de la cepa 7 identificada como E. rubrifaciens aislada de la bomba aspersora y su virulencia para atacar al maíz. Este comportamiento se expresa en la figura 2 donde la cepa 7 es es más eficiente que las cepas 9, 10 y 11. Hay que notar

Cuadro 10. Diferencias entre lecturas de la incidencia de la pudrición del tallo del maíz a los 3, 6, 9, 12 días.

Días de lectura	Cepas						
	6	7	8	9	10	11	12
3	30,66	87,33	0	43	30,66	38,16	13,33
6	79	93,3	25	82	79	70,33	14,5
9	83,3	93,3	69,5	90,33	83,33	80,33	34,5
10	87,5	93,3	83,33	90,33	87,5	94,5	65,66

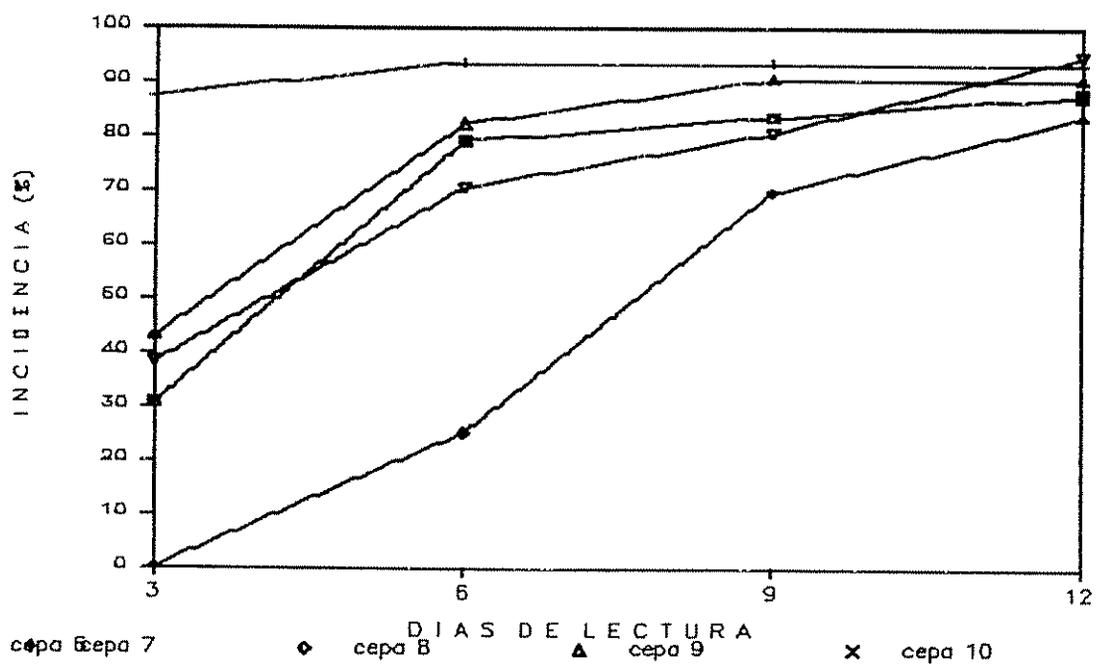


Fig 2. Avance de la incidencia de la pudrición del tallo de *ZEA MAYS* a los 3, 6, 9 y 12 días de inoculación de acuerdo a la virulencia de las cepas utilizadas. CATIE, 1989.

sin embargo que las condiciones en las cuales se ha realizado el ensayo no son uniformes. Se ha observado que la luz incidente en una misma mesa tiene un patron diferente si se trata del borde al centro o hacia adelante de la mesa y también segun que las plantas se han colocados en posición distintas del invernadero. Se ha notado que en las condiciones normales del invernadero la humedad es muy baja, y constituye un factor limitante en la expresión de la enfermedad tal como lo indican Anilkumar y Chakravarti, (1971); Hartman y Kelman, (1973); Prasad y Sinha, (1977).

#### **4.3 Prueba de estandarización de los factores edad, dosis para evaluación de la resistencia.**

Hay una diferencia altamente significativa entre las diferentes dosis utilizadas entre las cepas utilizadas y la edad por cepas y por dosis (Cuadro 11).

El análisis de Duncan indicó que bajo las condiciones del ensayo la dosis del inóculo fue muy importante en el desarrollo de la enfermedad (Cuadro 12 y 13 y las gráficas 3 y 4).

Estos resultados da base para sospechar que estas bacterias estan presentes en la planta como epífitas, muchas de las cuales han sido descritos (Blakeman, 1985; Cook y Baker, 1983) que describen a ciertas bacterias

Cuadro 11. Analisis de varianza del porcentaje de incidencia de pudrición bacteriana del tallo del maíz según la edad, la cepa y la dosis del patógeno. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 1989.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C
Var	1	0,0026	0,0026	0,02 NS
Edad	2	0,63	0,315	1,82 NS
Var * Edad	2	0,97	0,485	2,84 NS
Dosis	3	31,40	9,44	60,65 **
Var * dosis	2	0,29	0,14	0,79 NS
Edad * dosis	4	1,13	0,28	1,56 NS
Var * edad * dosis	6	0,78	0,13	0,76 NS
Cepas	2	1,07	0,535	3,13 *
Cepas * Var	2	0,91	0,455	2,65 NS
Edad * Cepa	4	2,79	0,70	4,05 *
Trat * Dosis	4	0,40	0,10	0,56 NS
Var*Edad*Cepas*Dosis	24	4,35	0,18	1,05 NS
Error	120	20,70	0,17	
Total	179	65,50		

\*=  $P > F = < 0,01$

\*\*=  $P > F = < 0,05$

C.V. = 103,41

Cuadro 12. Prueba de Duncan para el efecto de dosis en el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.

Dosis	Medias	
	No transformadas	Grupo*
10 <sup>6</sup>	66,38	A
10 <sup>7</sup>	13,87	B
10 <sup>8</sup>	5,55	BC

\*Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes al 5 %.

Cuadro 13. Prueba de Duncan para el efecto de edades en el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.

Edades	Medias	Grupo*
30 días	31,37	A
40 días	23,23	A
50 días	22,76	A

\*Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes al 5 %.

como organismos residentes de la filosfera. Estas bacterias posiblemente atacan a la planta cuando ellas estan en una alta concentración en el cogollo y existen condiciones adecuadas de humedad y de temperatura. Esto se hace más crítico cuando existen sustancias que facilitan la penetración de la bacteria hasta los tejidos meristemáticos de la planta.

En condiciones de campo cuando se asperjan plaguicidas con surfactantes hay un aumento de la enfermedad.

A pesar de que el analisis de varianza indicó que no existe diferencia significativa entre las edades, la media de incidencia más alta corresponde a los 30 días de edad. Lo que esta de acuerdo con la presencia de las epidemias de 1986 y 1988 donde la edad más crítica estuvo entre los 20 y 30 dias ver seccion análisis de resultados de campo.

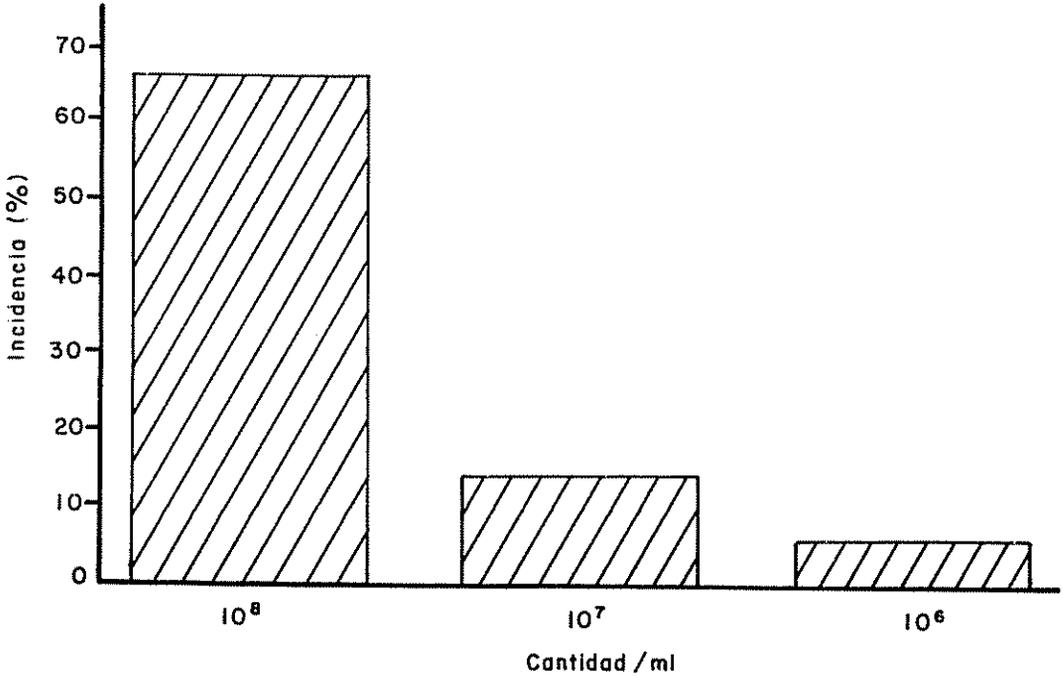


Fig. 3 Comparación de medias de la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays de acuerdo a la dosis de inóculo. CATIE, 1989

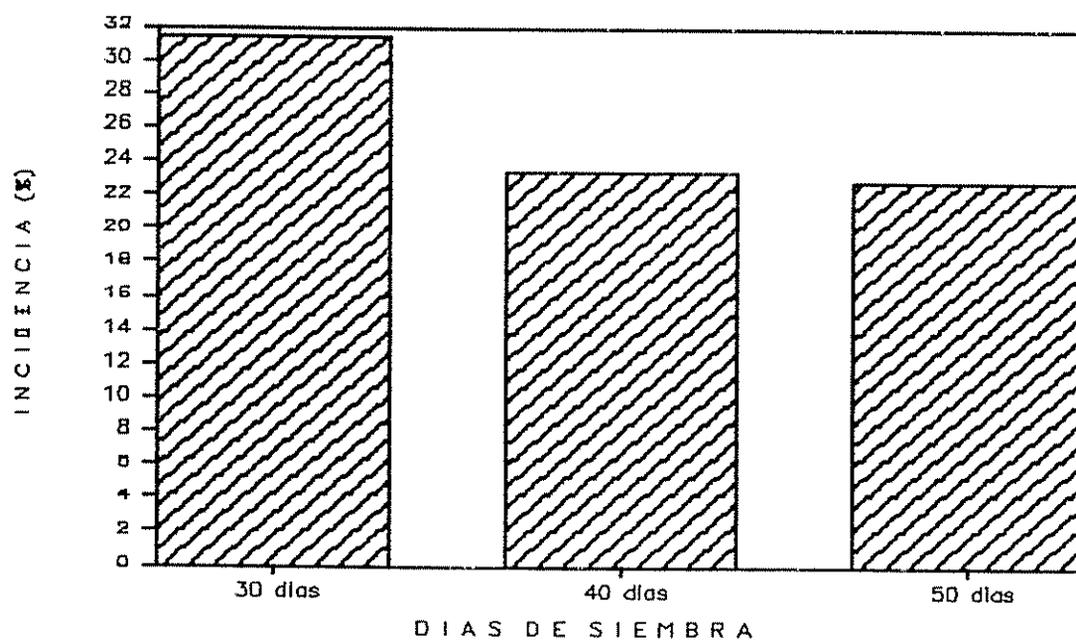


Fig 4. Comparación de medias de la incidencia de la pudrición del tallo de *ZEA MAYS* de acuerdo a la edad de la planta. CATIE, 1989.

Un análisis más detallado a partir de los promedios de datos en cada edad y dosis del patógeno para cada cepa y cada variedad se puede observar a partir de las gráficas 5-10 donde se puede observar que la bacteria causa daño a cualquier edad pero ocurrió que en la dosis más alta se registró la incidencia más alta. A pesar de que hay una diferencia significativa entre las cepas utilizadas se observó que siempre que la dosis más alta del patógeno provoca una incidencia más alta en la población de las plantas más jóvenes. Este estudio encuentra lo mencionado por Victoria et al (1975) sobre la bacteria de pudrición suave en observado en Colombia que la Bacteria ataca el maíz a cualquier edad y resalta el problema que ha sucedido en La Montaña durante los años anteriores; la cantidad de inóculo inicial aumentada por las condiciones climáticas favorables presentes permiten un gran ataque en las plantaciones de maíz de 20-40 días de edad.

#### **4.4 Evaluación de la resistencia de materiales.**

El análisis de varianza de esta prueba indica que no existe diferencia significativa entre los cultivares (Cuadro 14).

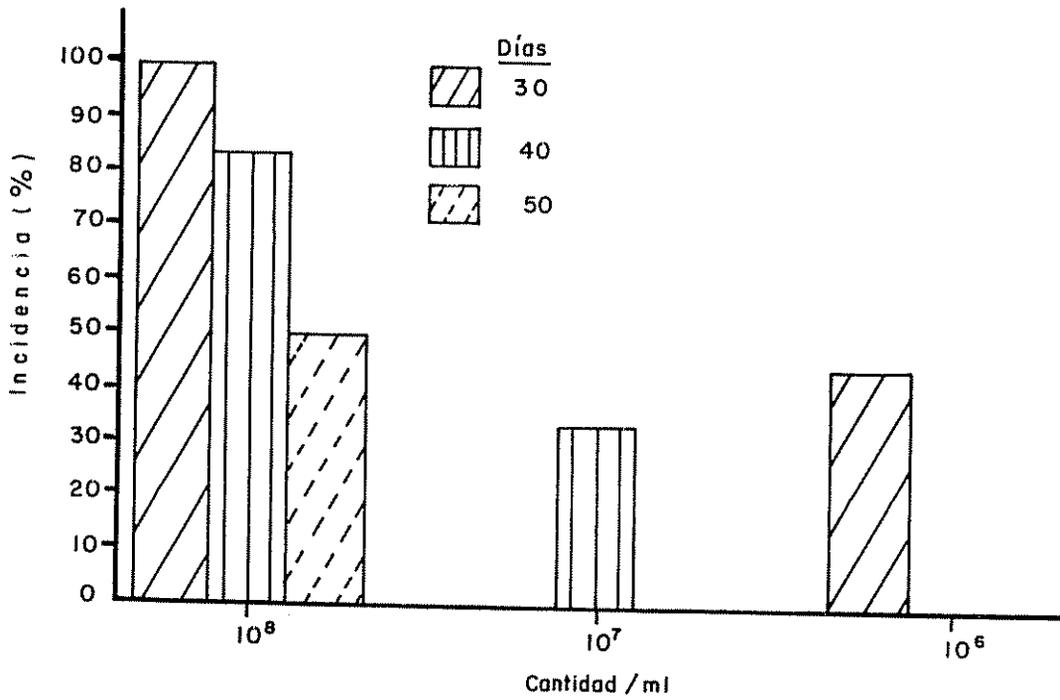
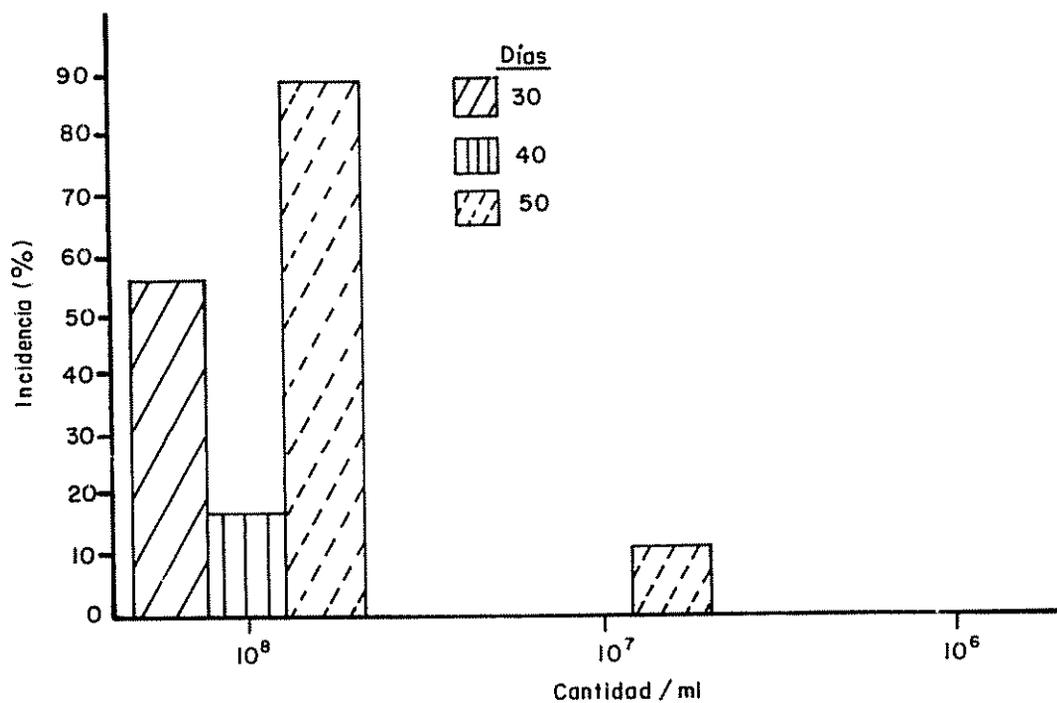


Fig. 5 Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Tuxpeño de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo ( cepa B). CATIE, 1989



**Fig. 6** Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Tuxpeño de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa IO). CATIE, 1989

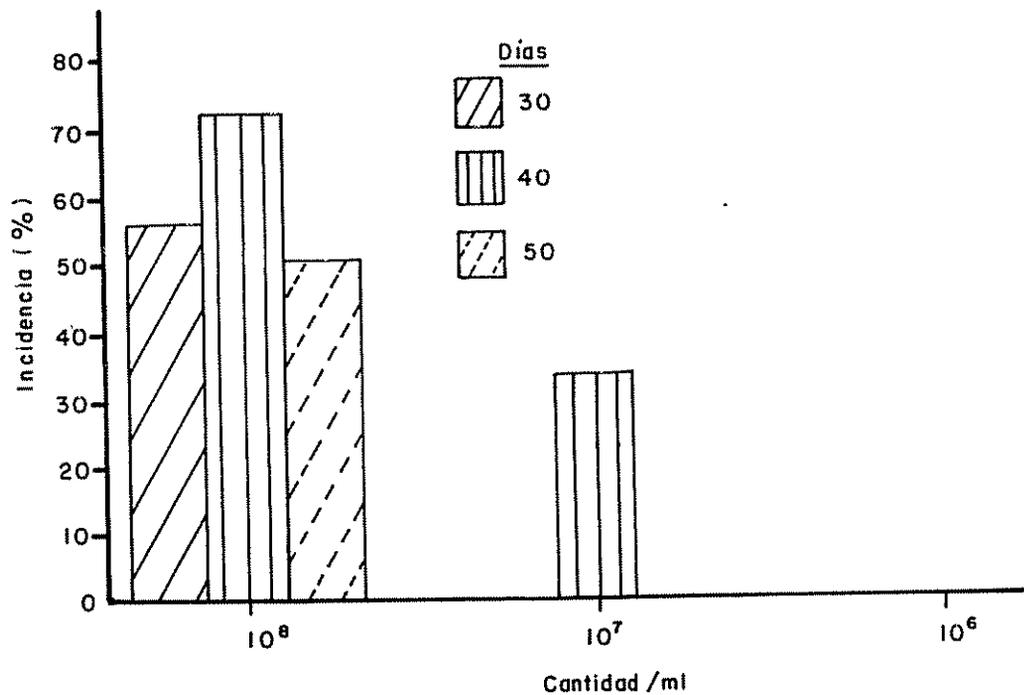
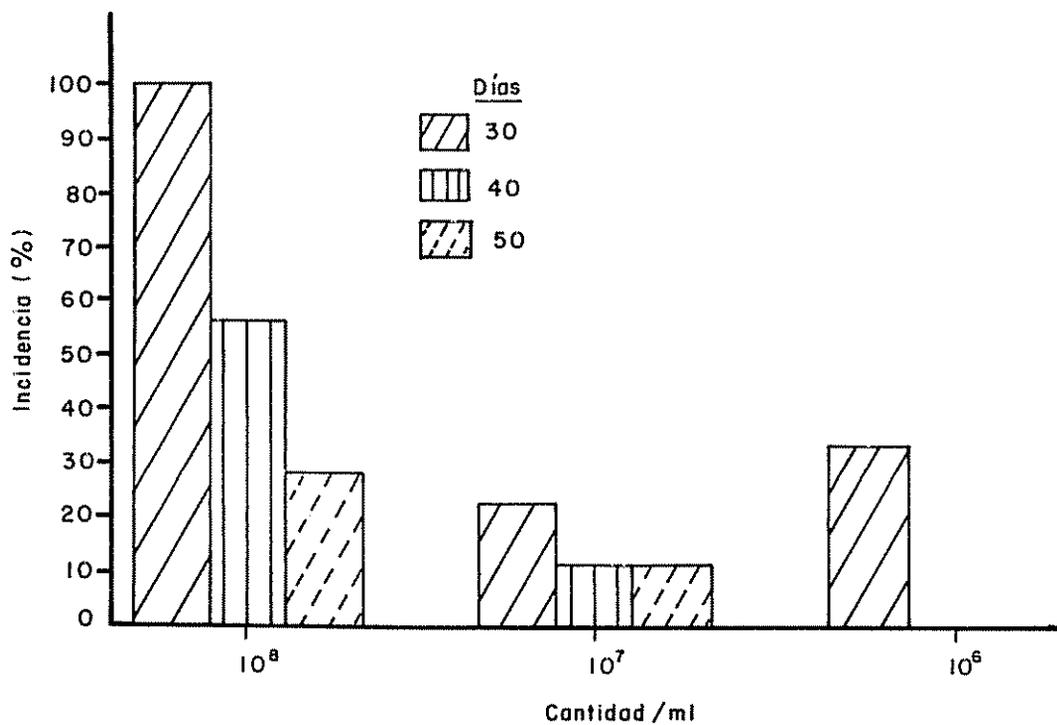


Fig. 7 Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Tuxpeño de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 9) CATIE, 1989



**Fig. 8** Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Diamantes de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 8) CATIE, 1989

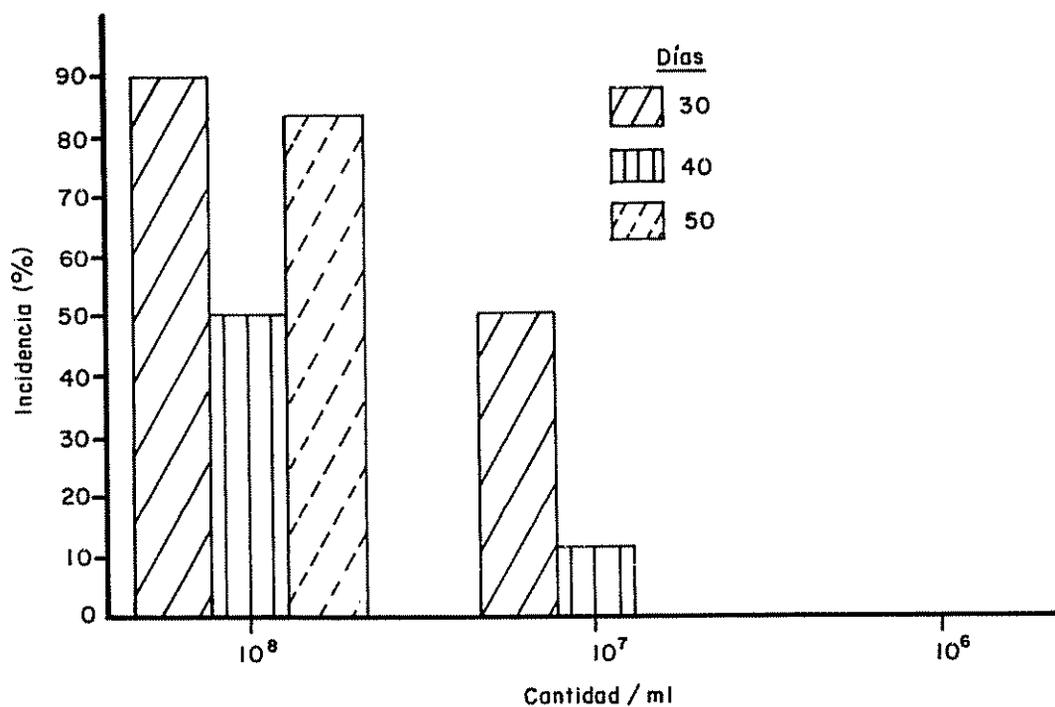


Fig. 9 Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Diamantes de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa IO). CATIE, 1989

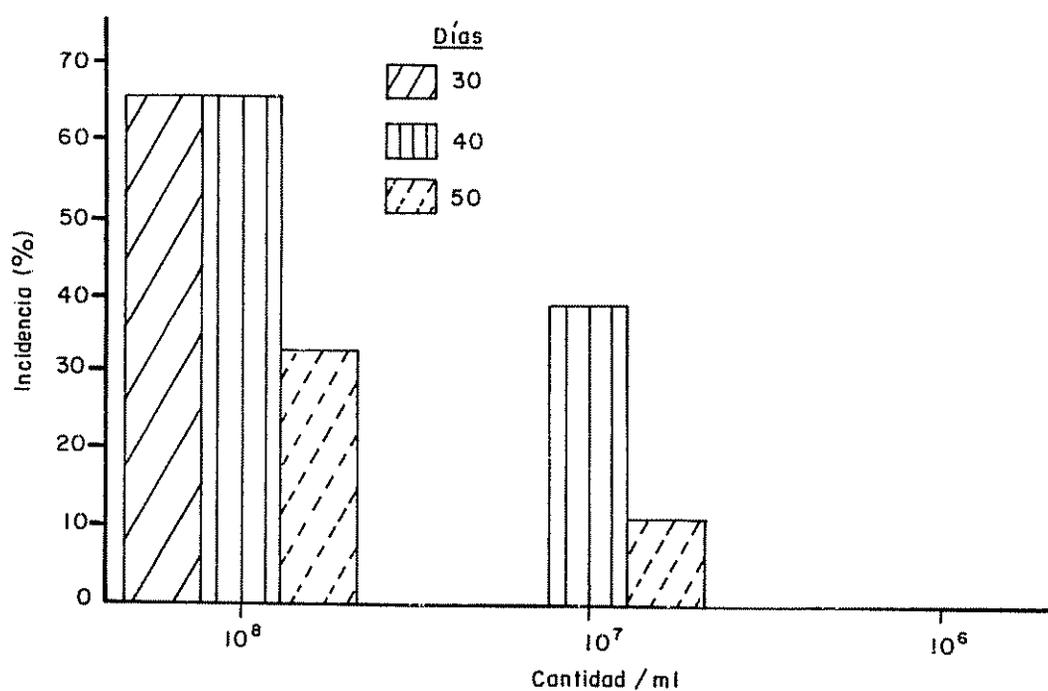


Fig. 10 Diferencias en la incidencia de la pudrición del tallo de Zea mays en la variedad Diamantes de acuerdo a la edad de la planta y a la concentración de inóculo (cepa 9). CATIE, 1989

**Cuadro 14. Analisis de varianza del porcentaje de incidencia de pudrición bacteriana del tallo del maíz según la resistencia de cultivares. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.**

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
MET	1	17,56	17,56	151,76 **
VAR	9	4,10	0,45	3,95 *
VAR * MET	9	5,27	0,58	5,06 **
ERROR	100	11,57	0,12	
TOTAL	119	38,51		

\*  $P > F = < 0,01$ -  
 \*\* $P > F = < 0,05$  C.V. = 82,06

Sin embargo, la prueba de Duncan para el efecto entre los cultivares muestra que los cultivares son diferentes. (Cuadro 15, figura 11).

**Cuadro 15. Prueba de Duncan para el efecto de cultivares en el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.**

Cultivares	Medias		Grupo*
	Transformadas	No transformadas	
Tico V7	0,68	44,5	A
Tuxpeño	0,65	41,66	AB
E.J.N.	0,55	36,16	ABC
Maicillo	0,55	30,5	ABC
X3092	0,42	27,83	ABCD
Guanani	0,40	22,16	ABCDE
Diamantes	0,36	19,33	BCDE
BB33	0,33	15,33	CDE
ACROSS 7728	0,13	8,33	DE
X 3214	0,10	5,5	E

\*Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes al 5 %.

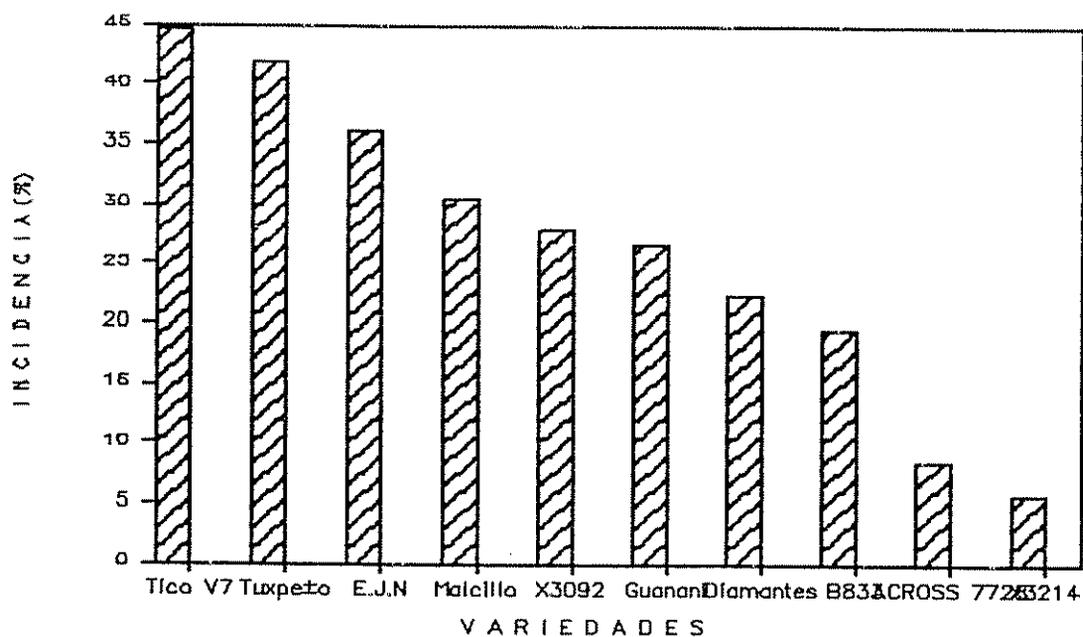


Fig 11. Comparación de medias de la incidencia de la pudrición del tallo de ZEA MAYS de acuerdo a la variedad. CATIE, 1989.

En orden creciente en susceptibilidad los cultivares se pueden clasificar: Tico V7 y Tuxpeño, EJM y maicillo, Acro y Guanani, Diamantes y B833, X3092 y X3214. De un lado estas diferencias puede explicarse por el hecho que los cultivares tienen diferentes niveles de resistencia. Por otra parte la resistencia-susceptibilidad no es la expresión solamente del patógeno o de la planta sino que es constituida por la interacción de estos factores más las condiciones ambientales (Agrios, (1985), las cuales en este experimento no fueron ideales para humedad y luminosidad.

Se ha observado también que dentro de un mismo cultivar existe gran diferencia. Lo que es común en maíz por ser una planta alogama. Los cultivares locales y mejorados son todos productos de cruces naturales o artificiales, lo que resulta de una amplia variabilidad genética.

Las metodologías de inoculación son altamente significativas al 5% (Cuadros 14 - 16).

La metodología de punción presenta ciertos problemas en cuanto a la llegada de la bacteria a los tejidos susceptibles de la planta, tal como el punto apical lo cual es muy importante para el desarrollo del patógeno. Por lo mencionado anteriormente a cerca del crecimiento desigual en esas condiciones el ápice de plantas de maíz de una

Cuadro 16. Prueba de Duncan para el efecto de método de inoculación en el porcentaje de incidencia de la pudrición del tallo del maíz. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.

Métodos	Medias		Grupo*
	transformadas	no transformadas	
Pipeteo	0,79	50,26	A
Punción	0,03	2,23	B

misma edad puede estar a un nivel diferente del suelo, lo que implica que la bacteria no entra en contacto con los tejidos más susceptibles.

La comprobación de la resistencia y de la metodología de inoculación muestran una diferencia netamente significativa entre los dos métodos. Para el método por pipeta no se encontró diferencia entre los 10 cultivares; todas presentaron una incidencia de 100 % a los 8 días de la inoculación. En el método por punción solamente los cultivares Tuxpeño, Diamantes y la B833 muestran una susceptibilidad (Cuadro 17, Fig 12). Esos expresan la comprobación de resistencia de los cultivares y los métodos de inoculación.

A pesar de los resultados obtenidos de los dos métodos de inoculación con respecto a la resistencia no se pudo definir el nivel de resistencia de los cultivares

evaluados. es necesario estudiar sus síntomas al nivel del campo y los rendimientos en granos obtenidos cuando se presentó la enfermedad bajo condiciones artificiales de inoculación. Además para demostrar si la planta tiene resistencia al patógeno es necesario la evaluación de los compuestos fenólicos inhibidores de ciertas cepas de la bacteria en el maíz (Lacy et al, 1979; Hartman et al, 1975).

Cuadro 17. Comprobación de dos métodos de inoculación en la resistencia de 9 cultivares al patógeno de la pudrición del tallo de Zea mays L a los 3, 6 y 8 días después de la inoculación.

Variedades	pipeteo			Punción		
	3 días	6 días	8 días	3 días	6 días	8 días
TV7	100	100	100	0	0	0
DIAM	72	72	72	0	0	80
V833	100	100	100	0	0	38
GUAN	75	75	75	0	0	0
EJN	100	100	100	0	0	0
X3214	66	66	66	0	0	17
TUX	100	100	100	0	0	25
ACRO	100	100	100	0	0	25
X3092	88	88	88	0	0	25

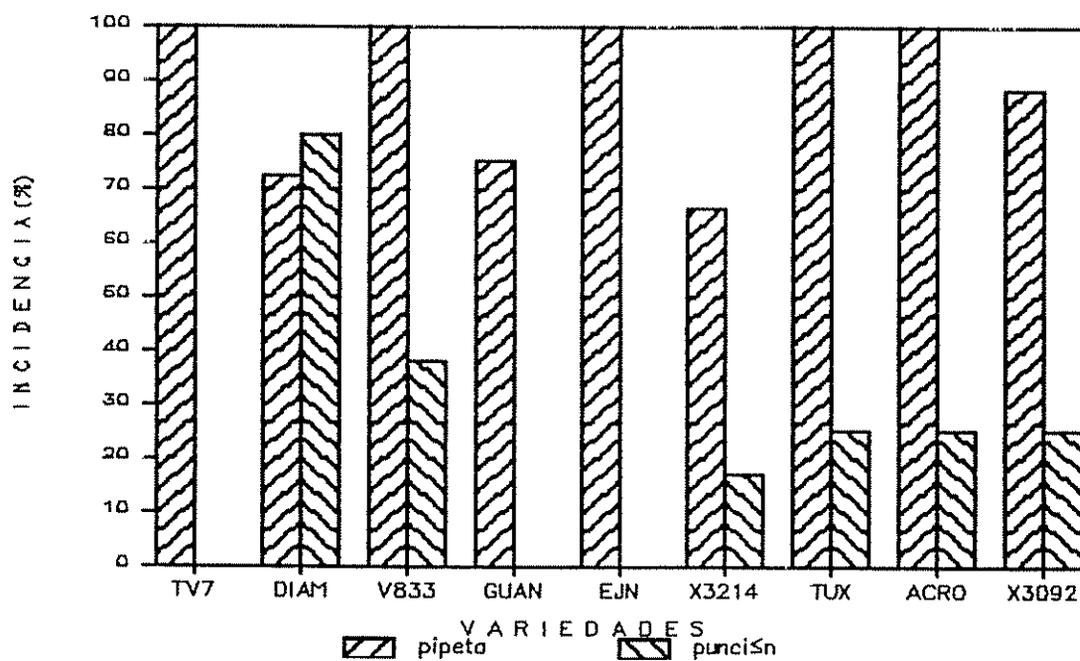


Fig 12. Diferencia de la incidencia de la pudrición del tallo de *ZEA MAYS* de acuerdo a la variedad y al método de inoculación. CATIE, 1989.

Este ensayo de metodología de inoculación aporta una explicación muy importante en la forma de penetración de la bacteria y la respuesta de la planta al nivel de inóculo. Con referencia a los trabajos anteriores efectuados sobre la pudrición del tallo del maíz el método de inoculación por punción tiene resultados variables, (Sabet, 1954); Hingorani et al, 1959; Sabet, 1956; Hoppe y Kelman, 1969; Kelman et al, 1957; Rangarajan y Chakravarti, 1971; Sabet et al, 1964; Zachos et al, 1963; Hartman y Kelman, 1973). Con base en los resultados y las referencias de trabajos efectuados en eficiencia de diferentes métodos de inoculación, (Bartz, 1981); Forster y Echandi, 1973) se puede afirmar que la diferencia se debe a que en el método de inoculación por punción la probabilidad de la bacteria para entrar en contacto con la superficie de tejidos susceptibles es menor que en el método de inoculación con la pipeta.

Hartman y Kelman (1973) reportaron que el método de inoculación por pipeta es más eficiente para la penetración de la bacteria a través de los tejidos jóvenes. También encontraron que el Tween 20 ayuda a la penetración porque baja la tensión superficial de la suspensión bacteriana y además se ha observado en los testigos manchas que atestiguan la presencia del producto.

#### 4.5 Resultados del ensayo preliminar de campo para la observación de la pudrición del tallo del maíz

No hubo infecciones naturales a pesar de la incorporación de los residuos de las plantas afectadas con pudrición suave en la cosecha anterior. Las condiciones ambientales en las cuales se realizó el experimento fueron muy diferentes de aquellas en las cuales se han registrado las epidemias de esta enfermedad. Si se compara la época de desarrollo epidémico de la pudrición del tallo del maíz en los años 1986 y 1988 se podría observar que ellos tienen un promedio de temperatura y precipitación diferente a la del período de este experimento enero-marzo de 1989 figuras (13 y 14). Cuando se comparan los meses de epidemia de 1988, Julio a Setiembre, y la de 1986 mayo-julio, con los del ensayo, la temperatura es netamente diferente y es superior al del intervalo enero a marzo 1989, en 2.2 y 2.6 grados°C respectivamente. El promedio mensual de la precipitación, para la época del experimento, fue inferior a la de 1988 (250 mm) y 1986 (150 mm).

En cuanto a la humedad relativa (figura 15) no existe diferencia entre los distintos y los promedios anuales fluctuan entre 83-85%.

Saxena y Lal (1984) indican que para obtener un desarrollo epidémico de la pudrición del tallo del maíz es

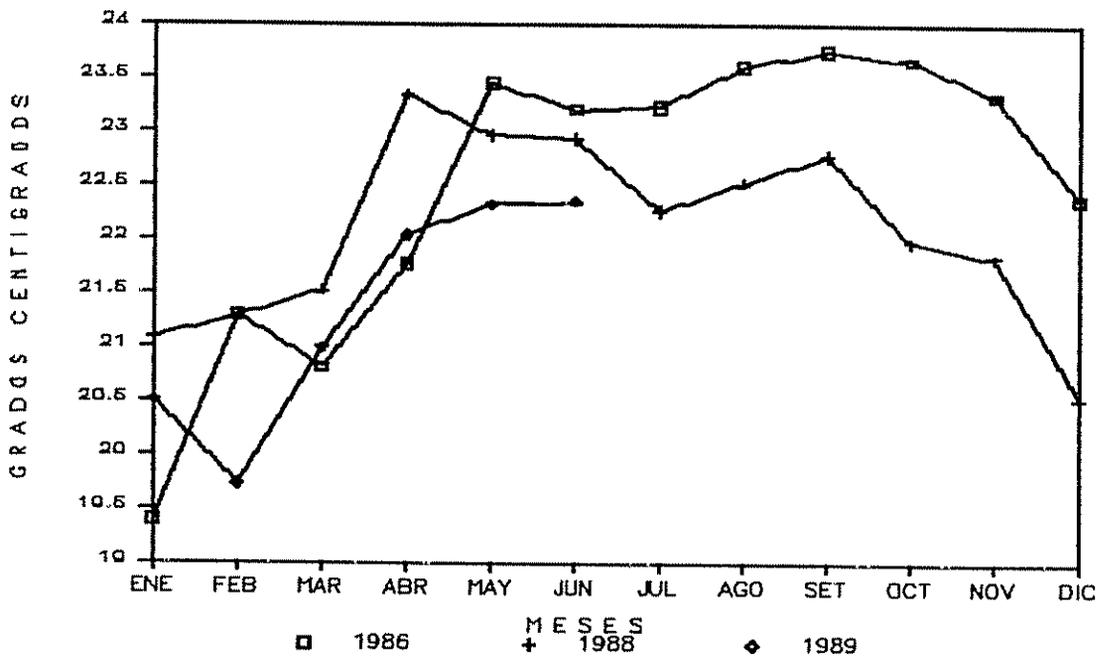


Fig 13. Temperatura promedio mensual de los años 1986, 1988, 1989, registrada en la estación experimental "La Montaña" CATIE, Turrialba,

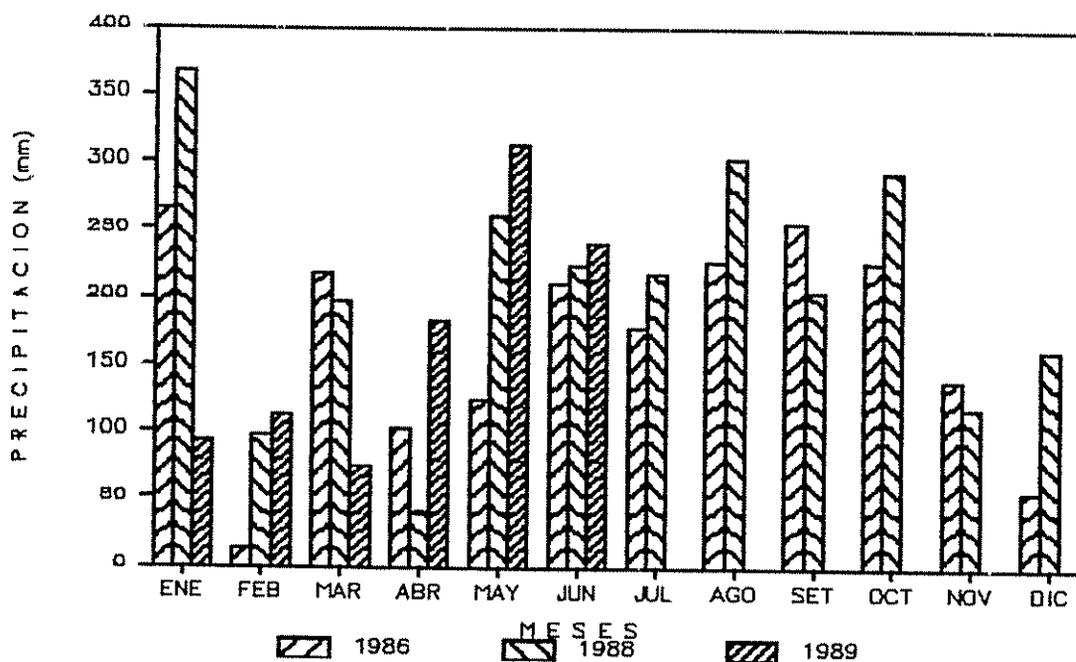


Fig 14. Precipitación promedio mensual de los años 1986, 1988, 1989 registrada en la estación experimental "La Montaña" CATIE, Turrialba.

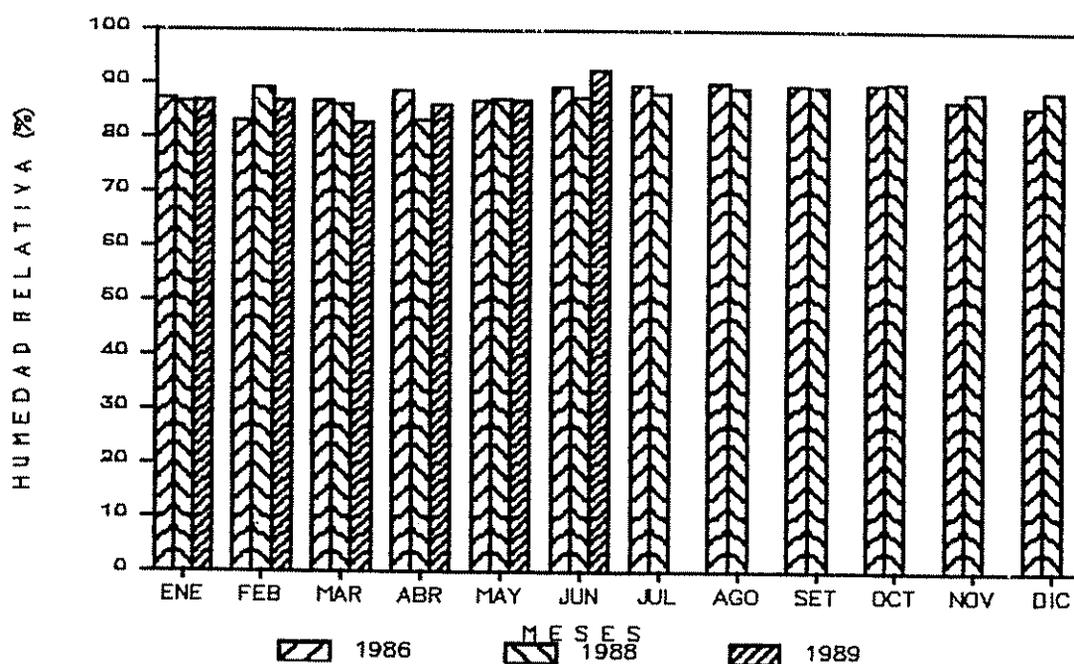


Fig 15. Humedad promedio mensual de los años 1986, 1988, 1989 registrada en la estación experimental "La Montaña" CATIE, Turrialba.

necesario alta precipitación y temperatura. Esta enfermedad se desarrolla en Turrialba bajo condiciones similares.

También se puede apuntar, de acuerdo a Anilkumar y Chakravarti (1971); Hartman y Kelman (1973); Prasad y Sinha (1977), que la supervivencia del patógeno y su diseminación estuvo limitada por esos factores meteorológicos enfatizados anteriormente.

#### 4.1.5 Resultados de la inoculación en el campo

La inoculación en el campo fue positiva y los síntomas se observaron a los quince días después de una lluvia y dos irrigaciones por aspersion. Estos resultados confirman los dos ensayos anteriores y enfatizan que los factores climáticos influyen sobre el desarrollo de la pudrición del tallo del maíz. Estos resultados concuerdan con los analizados por Perombolon y Kelman, (1980) que afirman que la temperatura se constituye en el factor más importante en el desarrollo de la pudrición suave. Lo anterior se ha observado en el caso de otros cultivos (Berger, 1977) e indica que a una temperatura inferior a 15 grados centígrados (ver Cuadro A1) muchos tipos de microorganismos pueden incrementarse a una tasa elevada y desplazar al grupo E. carotovora.

#### 4.1.6 Observación de los insectos

Los insectos observados en el cogollo de las plantas inoculadas se pueden apreciar en el Cuadro 18. La no presencia en este ensayo de insectos capaces de diseminar la bacteria no excluye que bajo otras condiciones climáticas se observen insectos que ayuden la diseminación de la bacteria. Sin embargo, las observaciones de las plantas cercanas a estas indican que la bacteria de la pudrición suave del tallo del maíz en Turrialba no está relacionada con los insectos encontrados. Esto nos indica que el patógeno tiene las características de atacar el maíz en forma similar a la descrita por Hartman y Kelman (1973) con la bacteria del verticilo.

Cuadro 18. Descripción de los insectos encontrados en el cogollo de las plantas de maíz inoculadas en La Montaña. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1989.

Vulgar	Científico	Familia	Orden	Especies comunes	Estatus	Hábitat	Distribución geográfica
Tijerillas	Forficula sp.	Forficulidae	Dermoptera	Doru teniatum (Dohrn)	Depredador	-	
Escarabajo San Salvador de grano	Colepterus sp.	Nitidulidae	Coleoptera	Colepterus macropterus	Plagas secundarias	Granos	México Centro América
2º Escarabajo de grano				Colepterus posticus	Plagas secundarias		
Pata de hoja	Leptoglossus sp.	Coreidae	Hemiptera	Leptoglossus phyllopus Leptoglossus zonatus	Plagas secundarias	Hojas	USA, México Centro América
Tortuguilla Waquita	Diabrotica sp.	Chrysomelidae	Coleoptera	Diabrotica balteata Diabrotica adelpha Diabrotica porracea	Plagas menores Plagas menores Plagas menores	Hojas Flores Raíces	USA México Centro América

\*Descripción de acuerdo a King y Saunders, 1984.

## 5. DISCUSIONES GENERALES Y CONCLUSIONES

### 5.1 Diagnóstico de la de la pudrición del tallo del maíz.

De acuerdo a los estudios realizados sobre sintomatología, la identificación, la caracterización de los aislamientos y la comprobación de los postulados de Koch, la pudrición del tallo del maíz en condiciones de Turrialba es causada por especies bacteriales del género Erwinia donde se destacan E. carotovora, E. chrysanthemi, E. cyripedii, E. nigrifluens y E. rubrifasciens lo cual concuerdan en parte con diversos autores que han llegado a identificar a este grupo de especies bacteriales como causantes de problemas semejantes en otras zonas (Sabet, 1954; Victoria, 1975). Los resultados logrados muestran que la enfermedad tiene baja especificidad ya que se probó que diversas especies de Erwinia y aún géneros diferentes a este como Pseudomonas y Klebsiella pueden causar los mismos síntomas de la enfermedad.

Asimismo para que se dé la enfermedad es necesario que la bacteria esta en alta concentración en el cogollo de la planta, que exista condiciones adecuadas de humedad y temperatura y que exista algún agente que rompe la tensión superficial del agua facilitándole la penetración de la bacteria en los tejidos meristemáticos o recién formados.

Debido a los resultados obtenidos con Klebsiella en este experimento y a los datos citados por Waldee, (1945) con Enterobacter cloacae que también induce la pudrición del tallo del maíz es necesario realizar una revisión de las enterobacteriaceae que atacan a las plantas, ya que se ha asumido que solo el género Erwinia sp es el agente causal (Schaad, 1980). Asimismo los resultados confirman lo dicho por diversos autores (Dye, 1968; Lelliot y Stead, 1982).

Sin embargo no toda Erwinia que produce pudrición suave pertenece al grupo carotovora. La caracterización y la identificación de la bacteria a nivel de laboratorio por métodos clásicos y el cálculo de un coeficiente de similitud a partir de los resultados encontrados nos lleva a una aproximación más precisa sobre la naturaleza del patógeno, lo que se incluye en el grupo carotovora y amylovora. Los resultados de este trabajo descartan por completo la asociación de la pudrición con E. stewartii el cual había sido mencionado (Guevarra, 1988) como el principal agente sospechoso de causar la enfermedad antes de iniciar este trabajo; asimismo el posible papel de Fusarium moniliforme se descartó debido a que no fue posible aislarlo a partir de los materiales infectados y que los aislamientos bacteriales por si solos son capaces de inducir los síntomas similares observados en el campo

## 5.2 Interacción planta-patógeno.

Los ensayos realizados sobre la relación planta-patógeno demostraron que el desarrollo de la enfermedad es favorecido por un nivel de inóculo alto. Y cuando las plantas de maíz son jóvenes se nota que la incidencia es directamente proporcional a la dosis.

Los resultados de la resistencia de los cultivares y los métodos de inoculación indican que para que exista la enfermedad es necesario que la bacteria llega hasta el meristemo o tejidos cercanos y se reproduzca en grandes cantidades. Muestra de ello es el éxito del método de inoculación por pipeta, ya que la adición de un surfactante (Tween 20) permitió la llegada de la bacteria en una alta concentración a los puntos meristemáticos por el embudo natural del cogollo de la planta.

Por lo que concierne a las bacterias en general, el agua constituye un agente abiótico de diseminación muy importante. La pudrición suave en general y especialmente en maíz es más crítica (Hoppe y Kelman, 1969); Kelman et al, 1957) bajo condiciones de riego por aspersión que por gravedad. En el ejemplo de la pudrición suave del tallo del maíz en Turrialba se observó la importancia del agua en la diseminación y el desarrollo de la enfermedad. De acuerdo a estudios anteriores realizados con este factor en

relacion al grupo carotovora o especificamente Erwinia carotovora (Maddox et al 1988); Harrison et al 1987), se ha determinado su presencia en la superficie de rios y agua de superficie.

En el caso particular se logró aislar E. rubrifasciens a partir del agua pasada de la bomba aspersora que constituye la cepa más virulenta de los aislamientos utilizados ya que este agua proviene de un río pequeño y casi estancado. Por otra parte debido a que en las aspersiones de plaguicidas corrientemente se agrega humectante y surfactante, el uso de esta solución permite el distribuir y aumentar el inóculo de la enfermedad a través de la plantación. Este inóculo va a sobrevivir epifiticamente en el cogollo de la planta en espera que los factores de clima, edad de la planta y concentración de las bacterias sean adecuados para comenzar a atacar la planta de maíz

Con base en estos resultados se puede considerar que el patógeno no fue transmitido por un insecto, la bacteria sobrevive en los residuos infectados de hospederas en el suelo, cuando se siembra el maíz gana el cogollo de las plantas jóvenes por sálpique o por el riego por aspersión o mediante las aplicaciones de agroquímicos y se reproduce cuando las condiciones ambientales son favorables. En los tiempos lluviosos las aplicaciones de plaguicidas con adjuvantes o surfactantes constituye un factor muy importante en la diseminación y de la penetración de la bacteria en los tejidos jóvenes del tallo.

### 5.3 Interacción-ambiente-patógeno- planta

De acuerdo a Wallace (1978); Agrios et al (1985); Berger (1977), la producción de enfermedad no es el resultado solamente de la interacción del patógeno y la planta sino que también esta influida por factor ambientales. Esto fue observado en el experimento de campo que a pesar de que se inóculo algunas plantas de maíz los primeros síntomas sólo se observaron después de una lluvia y dos riegos por aspersión.

Las observaciones sobre las condiciones climáticas en que se realizó el experimento y las que se presentaron durante las epidemias de 1986 y 1988 son diferentes, en especial la precipitación. La pudrición en el ensayo no

especial la precipitación. La pudrición en el ensayo no fue tan fuerte como la observada en los años citados.

Además de las condiciones climáticas se puede apuntar que el patógeno tiene otras plantas hospederas en la finca, ya que las cepas de Erwinia carotovora y Echrysanthemi aisladas de Chile fueron altamente virulentas al maíz. De acuerdo a Dickey (1979); Moffet (1983) se puede señalar que la bacteria tiene otros hospederos en plantas cultivadas y no cultivadas.

#### 5.4 Conclusiones

1. La pudrición del tallo del maíz en Turrialba es causada por bacterias del Género Erwinia de los grupos carotovora y amylovora.
2. El nivel de inóculo constituye un factor muy importante en el desarrollo de la enfermedad. El patógeno tiene una respuesta cuantitativa en el maíz.
3. El Chile constituye uno de los hospederos alternos del agente causal.
4. La participación de los insectos en la entrada de la bacteria no se comprobó.

5. La bacteria penetra por el embudo formado por las hojas superiores.
6. El clima de alta precipitación pluvial combinada con una alta temperatura constituye el factor principal en el desarrollo de la enfermedad.
7. Existe diferentes niveles de resistencia y de susceptibilidad al agente causal en cultivares de maíz comercial.

#### 5.5 Recomendaciones

1. Desinfectar con cloro los materiales de uso como las bombas aspersoras.
2. Evitar el uso de cultivares susceptibles durante los periodos lluviosos favorables a la diseminación de la enfermedad.
3. Evaluar a nivel del campo el comportamiento de germoplasma por su nivel de susceptibilidad al patógeno.
4. Evaluar a nivel de la finca la presencia del patógeno en malezas y plantas cultivadas.

5. Estudiar la dinámica de población de la flora bacteriana del agua utilizada en el sistema de riego de la finca.
6. Hacer el monitoreo de las otras zonas favorables a la pudrición suave del tallo del maíz.
8. Comprobar el efecto de los insectos y adjuvantes en la llegada de la bacteria al nivel de los tejidos jóvenes.

## 6. CITAS BIBLIOGRAFICAS.

- AGRIOS, G.N. 1985. Fitopatologia. (Mexico) Limusa 756 p.
- AMAD, S; AHAD, A; ASLAM, M; IQBAL, H. 1985. Effect of plants density on intensity of stalk rot in maize. Pakistan Journal of Agriculture Research (Pakistan) 5(3):170-171.
- AMERICAN PHYTOPATOLOGICAL SOCIETY. 1980. Compendio de enfermedades del maiz. (EE.UU, Buenos Aires, Argentina) Hemisferio Sur 102 p.
- ANDERSON, B. 1987. Associated with cornstalks in Illinois in 1982 and 1983. Plant Disease (EE.UU) 71:135-137.
- ANILKUMAR, T.B; CHAKRAVARTI, B.P. 1971. Survival of maize bacterial stalk rot pathogens in tissue under different moisture and temperature conditions. Indian Phytopathology (India) 24:567-570.
- ARK, P.A. 1940. Bacterial stalk rot of sweet corn in Illinois caused by Phytophthora blanda. Phytopathology (EE.UU) 30:1.
- BASHAM, H.G; BATEMAN, D.F. 1975. Killing of plant cells by pectic enzymes the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plants cells. Phytopathology (EE.UU) 65: 141-153.
- BERAHA, L. 1968. A rapid method for the preparation of a semi solid medium for detection of pectolytic enzyme activity in Erwinia carotovora. Plant Disease Reporter (EE.UU) 52:167.
- BERGER, R.D. 1977. Application of epidemiological principles to achieve plant disease control. Annual Review of Phytopathology (EE.UU) 15: 165-183.
- BLAKEMAN, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In Biological control on the phylloplane. Ed. by C. E. Windels; S. E. Lindow. St Paul, Mn. p. 6-31.
- BOEWE, G.H. 1949. Bacterial stalk rot of corn in Illinois. Plant Disease Reporter (EE.UU) 3:342-343.
- BONILLA, N.L. 1983. El cultivo del maiz. 2 ed. (San

- BONILLA, N.L. 1983. El cultivo del maiz. 2 ed. (San José, C.R, CAFESA). 48 p
- BRENNER, D.J; FANNING, G.R; STEIGERWALT, A.G. 1977. Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwiniae* and other enterobacteria. II. Corn stalk rot bacterium and *Pectobacterium chrysanthemi*. International Journal of Systematic Bacteriology (G.B) 27: 211-221.
- BUCHANAN, R.; GIBBONS, N. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th. Ed. William and Wilkins. Baltimore. 1910 p.
- CHISTENSEN, J.J; WILCOXON R.D. 1966. Stalk rot of corn. St Paul MN. American Phytopathological Society. Monogr. 3. 59 p.
- CIMMYT. 1984. An analysis of changes in third world food and feed use of; Mexico report two p.
- COEN, E. 1968. Zonas potenciales del cultivo de maiz y épocas de siembra en Costa Rica. UCR. Serie Agronomía n° 9. 28 p.
- COLWELL, R.R; MOFFET, M.L; SUTTON, M.D. 1968. Computer analisis relationships among phytopathogenic bacteria. Phytopathology (EE.UU) 58:1207-1215.
- COOK, R.S; BAKER, K.I. 1983. The nature and practice of the biological control of plants pathogens. St Paul, MN, APS. 539p.
- COTHER, E.J; BLACKNEY, A.B. LAMB.S. 1980. Laboratory scale preparation of sodium polypectate for use in selective media for pectolytic *Erwinia*. Plant disease (EE.UU) 64: 1086-1087.
- COWAN, S.T. 1974. Enterobacteriaceae. In Buchanan, R.E; Gibbons N.E. (eds) Bergey 'S manual of determinative Bacteriology, 8th ed. Baltimore: Williams and wilkins 1268p.
- CUPPELS, D; KELMAN, A. 1974. A evaluation of selective medium for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. Phytopatology (EE.UU) 64:468-475.
- DANIELS, M.J; DOW, J.M; OSBOURN, A.E. 1988. Molecular genetics of phytopathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology (EE.UU) 26:285-312.

- DE BOER, S.H; Kelman A. 1974. Evaluation of procedures for detection of pectolitic *Erwinia* spp. on potato tubers. *American Potato Journal* (EE.UU) 52: 117-123.
- ; SASSER, M. 1986. Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* Y *E. carotovora* ssp *atroseptica* on the basis of cellular fatty acid composition. *Canadian Journal of Microbiology* (Can) 32:796-800.
- DHINGRA, O.D; SINCLAIR, J.B. 1986. Basic plant pathology methods. (EE.UU) CRC Press. 355 p.
- DICKEY, R.S. 1979. *Erwinia chrysanthemi*. A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *E. spp.* *Phytopathology* (EE.UU.) 69:324-329.
- 1981. *Erwinia chrysanthemi*: Reaction of eight plant species to strains from several hosts and to strains of other *Erwinia* species. *Phytopathology* (EE.UU) 71:23-29.
- ; CLAFLIN, L.E; ZUMOFF, C.H. 1987. *Erwinia chrysanthemi*: Serological comparisons of strains from *Zea mays* and other hosts. *Phytopathology* (EE.UU) 77:426-430.
- DIOLEZ, A.; COLENO, A. 1985. Mutac insertion directed mutagenesis in a pectate lyase gene of *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*. (EE.UU) 23: 913-917.
- DOWSON, W.J. 1957. Plant diseases due to bacteria. London, Cambridge Univ. Press. 232 p.
- DYE, W.S. 1968. The taxonomic study of the genus *Erwinia*. The amylovora group. *New Zealand Journal of Science* (New Zealand) 11:590-607.
- 1969. The taxonomic study of the genus *Erwinia*. 2 The carotovora group. *New Zealand Journal of Science* (New Zealand) 12:81-97.
- ERCOLANI, G.L. 1984. Infectivity titration with bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopatolgy* (EE.UU) 22:35-52.
- FAHY, P.C; PERSLEY, G.J. 1983. Plant bacterial diseases. A diagnostic guide. (EE.UU) Academic Press. 393 p.

- FAO. 1980. Improvement and producción of maize, Sorghum and millet. Breeding, Agronomy and Seed production:2 In FAO Pl. production and protection (Pakistan) Paper 2)24/2):72-77
- FORSTER, R.L; ECHANDI, E. 1973. Relation of age of plants, temperature, and inoculum concentration to bacterial canker development in resistant and susceptible Lycopersicon spp. Phytopathology (EE UU) 63:773-777.
- FRENCH, E.R; HEBERT, T.T. 1980. Métodos de investigación GIJESM, F.V. 1986. Analisis of the pectin-degrading enzymes secreted by three strains of Erwinia chrysanthemi. Journal of General Microbiology (G.B) 132:617-624.
- GILBERTSON, R.L; BROWN, W.M; RUPPEL, E.G. 1985. Prevalence and virulence of Fusarium spp. associated with stalk rot in Colorado. Plant Disease (EE.UU) 69:1065-1068.
- GONZALEZ, L.C. 1972. Principales enfermedades de los cultivos de Costa Rica. (San José, C.R. Universidad de Costa Rica). 129 p.
- GUERRERO, F. A. et al. 1987. Bacteriología diagnóstica. Tinciones, medios de cultivo, prueba para identificación. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 153 p.
- GRAHAM, D.C. 1964. Taxonomy of the soft rot coliform Bacteria. Annual Revieww of Phytopathology (EE:UU) 2:13-42.
- GUEVARRA, L.F. 1988. Estimación y Simulación de pérdidas causadas por plagas insectiles en el cultivo de maiz Zea mays L. Thesis M.SC. Turrialba CATIE. 190 P.
- HARRISON, M.D; FRANC, G.D; MADDOX, D.A; MICHAUD, J.E. 1987. Presence of E. carotovora in surface water in North América. Journal of Applied Bacteriology (G.B) 62(6):564-570.
- HARTMAN, J.R. 1969. The genus Pectobacterium (soft rotting, Erwinia group. Dept Plant Pathology, University of Wisconsin. 7 p.

- HARTMAN, J.R; KELMAN, A; UPPER, C.D. 1972. Differences in sensitivity of soft rot *Erwinia* sp. to an inhibitory fraction from corn. *Phytopathology* (EE.UU) 62:803.
- , J.R; KELMAN, A. 1973. An improved method for inoculation of corn with *Erwinia* spp. *Phytopatology* (EE.UU) 63:658-663.
- HAYWARD, A.C. 1974. Latent infection by bacteria. Annual review of *Phytopathology* (EE.UU) 812. 7-97.
- HEPPERLY, P.R; RAMOS-DAVILA, E. 1987. *Erwinia chrysanthemi* Burk, McFadden & Dimock: a bacterial worl and stalk of sorghum (*sorghum bicolor* (L.) Moench.) *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* (P.R) 71(3)265-275.
- HILDEBRAND, D.C. 1971. Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* spp. and other bacterial plant pathogens. *Phytopathology* (EE.UU) 61:1430-1436.
- HINGORANI, M.K; GRANT, V.J; SINGH, N.J. 1959. *Erwinia carotovora* f.sp. *zeae*. A destructive pathogen of maize in India. *Indian Phytopathology* (India) 12:150-157.
- HOLDRIDGE, L.R. 1979. *Ecologia basada en zonas de vida*. (San Josè, C.R IICA) .216 p.
- HOPPE, P.E; KELMAN, A. 1969. Bacterial top and stalk rot disease of corn in Wisconsin. *Plant Disease Reporter* (EE.UU) 53(1):66-70.
- HSU, S.T; TZEN, K.C. 1981. Species of *Erwinia* associated with soft rot diseases of plants in Taiwan. In proceeding International conference on Plant Patogenic Bacteria (5, 1981, Cali, CoL., CIAT). p 1-18.
- INTA. 1980. *El cultivo de maiz*. Buenos Aires, Argentina. 163 p.
- KELMAN, A; PERSON, L.H; HEBERT, T.T. 1957. A bacterial stalk rot of irrigated corn in North Carolina. *Plant Disease Reporter* (EE.UU) 41(9):798-802.
- KING, A.B.S; SAUNDERS, J.L. 1984. *The Invertebrates pests of annual Food Crops Central America*. London ODA. 166 p.

- KOUTOUJANSKY, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft rot *Erwinias*. Annual Review of Phytopathology (EE.UU) 25:405-430.
- KUCHAREK, T; BARTZ, J. 1984. Bacterial soft rot of vegetables and agronomic crops. Plant Pathology Fact Sheet (EE UU) No. 12:1- 4.
- LACY, G.H; HIRANO, S.S; VICTORIA, J.I; KELMAN, A; UPPER, C.D. 1979. Inhibition of soft-rotting *Erwinia* spp. strains by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2h-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in relation to their pathogenicity on *Zea mays*. Phytopathology (EE.UU) 69:757-763.
- LAL, S; SAXENA, S.C. 1978. Loss estimation and possibility of diseases control by the application of calcium hypochloride. Indian Phytopathology (India) 31: 120.
- THING, B.S; PAYAK, M.M; RENFRO, B.L. 1970. Bacterial stalk rot of maize. Resistance breeding and chemical control. Indian Phytopathology (India) 23:156-157.
- LELLIOT, R.A. 1974. Genus XII *Erwinia*. In Bergey manual of Determinativa Bacteriology. Ed by Buchanan R.E. and Gibbons. N.E. 332-339. Baltimore Williams and Wilkins 8th ed. 1268p.
- DICKEY, R.S. 1974. 1984. *Erwinia*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology, vol 1 N. R. Kriegand J.G. Holt. Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore p 469-476.
- ; STEAD, P. 1988. 1988. Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London. 193 p.
- LOPES, C.A; STALL, R.E; BARTZ, J.A. 1986. Bacterial stalk and top rot of maize in Florida caused by *E. chrysantemi* pv. *zeae*. Plant Diseases (EE.UU) 70:259.
- MADDOX, D.A, HARRISON, M.D. 1988. Presence and population dynamics of *E. carotovora* in irrigation water in south central of Colorado. Journal of Applied Bacteriology (G.B) 64(2):169-182.
- MAZZUCHI, U. 1972. A bacterial stalk rot bacterial of maize (*Zea mays* L.) in Emilia. Phytopatology Mediterranea 11:1-5.

- MC GOVEN, R.J; DICKEY, R.S. 1985. Effect on plant nutrition on susceptibility of chrysanthemum morifolium to E. chrysanthemi. Plant Disease (EE.UU) 69 (12):1086-1088.
- MOFFET, M.L. 1983. Bacterial plant pathogen recorded in Australia. In Plant bacterial diseases: A diagnostic guide. Ed by P.C. Fahy and G.J. Persley. (EE.UU) Academic Press, p. 317-335
- MONTES DE OCA, G.H. 1985. Situación fitopatológica del maíz y sorho. In Informe en taller manejo integrado de plagas maíz y sorho. Ed. Instituto Politécnico-Loyola (Republica Dominicana) p.12.
- O'NEILL R; LOGAN C. 1975. A comparison of various selective media for theirb efficiency in the diagnosis and enumeration soft rot coliform bacteria. Journal applied bacteriology (G.B) 39: 139-146.
- OTTA, J.D; WOOD, L.S. 1977. Ocurrence in South Dakota of bacterial stalk rot of corn caused by E. chrysanthemi pv zeae Plant Disease Reporter (EE.UU) 61:536-537.
- PAYNE, J.H; SHOEDER, C. KEEN, N.T; COLLMER, A. 1987. Multiplication and virulence in Plant tissues of Eschericha coli clones producing pectate lyase izozymes PLb and PLe at high levels and of an Erwinia chrysanthemi mutant deficient in PLe. Applied and Environmental Microbiology (EE.UU) 53(10):2315-2320.
- PEPPER, E.H. 1967. Stewart's bacterial wilt of corn. American Phytopathology Society. (EE.UU ) Monograph.4 36 p.
- PEROMBOLON, M.C.M; KELMAN, A. 1980. Ecology of the soft rot Erwinias. Annual. Review of Phytopathology (EE.UU) 18:361-387.
- PETO, S. 1953. A dose-reponse equation for the invasion of micro-organisms. Biometrics (EE.UU) 9:320-335.
- PRASAD, H. 1930. A bacterial stalk rot of maize in Emilia. Indian Journal of Agriculture Science (India)25: 72
- 1977. Survival and retention of infectivity of bacterial stalk pathogen of maiz and its perpetuation on varied cropping pattern. Plant and Soil (Holanda) 47:245-248.

- PURCELL, A.H. 1982. Insect vector relationships with procaryotic planta pathogens. *Phytopathology* (EE.UU) 20: 397-417.
- QINONES, N.C; FERNANDEZ.P, A.I; VASQUEZ, J.A; SIMON, I.M. 1986. Estudio de la influencia de tres niveles de NPK y cuatro distancias de plantación en la resistencia de Solanum tuberosum Lin. a los generos Erwinia y Fusarium. *Centro Agrícola* (Cuba) 13(2):60-67.
- RAGARAJAN, M; CHAKRAVARTI, B.P. 1967. A strains of Pseudomonas lapa isolated from corn seeds causing bacterial stalk in India. *Plant Disease Reporter* (EE.UU) 51(9):764-766.
- . 1970. Bacterial stalk rot of maize in Rajasthan, effect on seed germination and varietal susceptibility. *Indian Phytopathology* (India) 23:470-477.
- . 1970. Studies on the survival of corn stalk rot bacterial. *Plant and Soil*. (Holanda) 33:140-144.
- REINFSCHEIDER, F.J.B; LOPES, C.A. 1982. Bacterial top and stalk rot of maize in Brasil. *Plant Diseases* (EE.UU) 66:519-520.
- REVERCHON, S; ROBERT-BAUDOY, J. 1987. Regulation of expression of pectate lyase genes *pelA*, *pelD*, and *pelE* in Erwinia chrysanthemi. *Journal of Bacteriology* (EE.UU) 169(6):2417-2423.
- SABET, K.A. 1954. A new bacterial disease of maize in Egypt. *Empire journal of experimental Agriculture*. Egipto. 27: 65-67.
- ; SAMRA, A.S; EL-SHAFFEY, H.A. 1964. On the systematic position of the coliform bacteria responsible for stalk rot of maize. *Annals of Applied Biology* (G.B) 53:267-274.
- SARWAR, M; AHMAD, Y; AKTAR, M.A. 1986. Screening for disease resistance in sorghum, maize and pearl millet. *Plant Genetic Resources News letter* (Italia) 68:42-45.
- SAXENA, S.C; LAL, S. 1981. Effect of fertilizer application on the incidence of bacterial stalk rot of maize. *Indian Journal of Mycology and Plant Phytopathology*. (India). 11: 164-168.

- SAXENA, S.C. 1982. Studies on the survival of Erwinia chrysanthemi. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology (India) 12:116.
- , 1984. Biological differences in maize cultivars resistant and susceptibility to Erwinia stalk rot. Indian Journal Mycology Phytopathology. (India). 14:275-276.
- , 1984. Use of meteorological factors in prediction of Erwinia stalk rot of maize. Tropical pest management (India). 30 (1):82-85.
- SCHAAD, N.W; HESKETT, M.G; GARDNER, J.M; KADO, C.I. 1973. Influence of inoculum dosage, time after wounding, and season on infection of Persian Walnut trees by Erwinia rubrifaciens. Phytopathology (EE.UU) 63: 327-329.
- , 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. (Georgia) 72 p.
- , 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology (EE.UU) 17:123-147.
- ; HESKETT, MG; GARDNER, J M; KADO, C.I. 1973. Influence of inoculum dosage time after wounding and season of infection of Persian walnut trees by Erwinia rubrifaciens. Phytopathology. EE UU 63: 327-329.
- STANLEY, A.R; ORTON, C.R. 1932. Bacterial stalk rot of sweet corn. Phytopathology (EE.UU) 22: 26.
- STARR, M.P. 1983. Phytopatogenic Bacteria. Ed by Mortmer p. Starr selections from The Prokariotes. (EE.UU) :
- ; CHATTERJEE, A.K. 1972. The genus Erwinia: Enterobacteria pathogenic to plants and animals. Annual Review of Phytopathology (EE.UU) :309-426
- TAPIA, B.H. 1983. Técnicas de producción de maíz. ed MIDINRA Nicaragua. 214 P.
- THIND, B.S; PAYAK, M. 1976. A laboratory method for evaluating of maize germoplasm to Erwinia carotovora var zeae. Plant disease Reporter (EE.UU) 65:414-416.

- THIND, B.S; SINGH, N. 1978. Maize borer, Chilo partellus (Swinhoe) as carrier of Erwinia carotovora var zeae, the causal agent of bacterial stalk rot of maize. Current science (India) 45(3):117-118.
- ; RANDHAWA, P.S; SONI, P.S. 1984. Chemical control of bacterial stalk rot E. chrysanthemi pv zeae and leaf stripe E. rubrilineans of maize. Journal of Plant Diseases Protection (India). 91:424-430.
- ; PAYAK, M.M. 1978. Evaluation of maize germoplasm and estimation of losses to Erwinia stalk rot. Plant Diseases Reporter (EE.UU) 62: 319-323.
- . 1985. A review of bacterial stalk rot of maize in India. Tropical pest management (India) 31(4):311-316.
- THOMPSON, D.L. 1965. Control of bacterial stalk rot by chlorination of water in sprinkler irrigation. Crop Science (EE.UU) 5:369-370.
- THYR, B.D. 1988. Bacterial canker of tomato: inoculum level needed for infection. Plant Disease Reporter (EE. UU) 52(9)741-743.
- TIMOTHY, D.A; HARVEY, P.H; CHRISTOPHER, R.D. 1988. Development and spread of improved maize varieties and hybrids in developing countries. (Washington DC. AID) 71 P.
- VAN DER PLANK, J.E. 1975. Principles of plant infection. New York, London Academic Press. 216p.
- VICTORIA, J.I. 1977. Resistance in corn (Zea mays. L) to bacterial stalk rot in relation to virulence of strains of Erwinia chrysanthemi. Dissertation Abstract 38 (10):4566B.
- ; ARBOLEDA, F; MUNOZ, S. 1975. La pudrición suave del tallo de maíz (Zea mays L.) en Colombia. Noticias fitopatológicas (Colombia) 4(2):136-147.
- VILLALOBOS R, N.R. 1985. Movilidad de Aspergillus flavus Link. ex Fries en mazorca de cinco genotipos de maíz (Zea mays.L) empleando tres métodos de inoculación. Tesis Ing. Agr. UNA. (Heredia Costa Rica) 65p.

- VOLCANI, Z. 1981. A maize disease caused by a strains of Erwinia carotovora in Israel. Journal Agr. Research 11: 179-182.
- WALDEE, E. L. 1945. Comparative study of some peritrichous phytopathogenic bacteria. Iowa State. College Journal of Science 19:435-484.
- WALLACE, H.R. 1978. The diagnosis of plant diseases of complex etiology. Ann. Rev. Phytopathology (EE.UU) 18:378-402.
- YOUNG, J.M; DYE, D.W; BRADBURY, J.F. PANAGOPOULOS, C.G. 1978. A propose nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research 21: 153-177.
- ZACHOS D.G; PANAGOPOULOS, C.G; MAKRIS, S.A. 1983. A disease of maize in Greece caused by Erwinia carotovora Jones Holland Ann. Inst Phytopatholog. Benaki.5: 288-293.

## **Apendice**

**Cuadro A1. Promedio de mínimas de temperatura y humedad relativa mensual de La Montaña en 1986, 1988, 1989.**

Meses	Temperatura			Humedad		
	1986	1988	1989	1986	1988	1989
Enero	15,25	16,17	16,17	65,13	54,17	53,59
Febrero	16,46	17,45	14,62	55,46	59,45	53,00
Marzo	16,82	16,77	15,69	61,19	57,81	49,49
Abril	18,16	18,45	17,84	63,20	52,44	52,60
Mayo	19,60	18,95	18,07	58,35	55,26	52,39
Junio	19,94	18,72	18,66	61,40	55,30	61,73
Julio	20,14	18,20	18,66	60,94	55,23	62,19
Agosto	20,32	18,62	18,12	62,42	55,68	
Setiembre	19,75	19,07		61,20	57,00	
Octubre	20,36	18,29		62,06	58,04	
Noviembre	19,35	17,51		57,50	55,60	
Diciembre	17,98	16,63		55,06	55,81	

Cuadro A2. Preparación de medio de cultivo. CATIE.  
Turrialba, Costa Rica. 1988.

Medio	Ingredientes	Cantidad
Y.D.C	Extracto de levadura	10 g
(Extracto de levadura	Dextosa	20 g
Dextrosa-carbonato de calcio)	Carbonato de calcio	
	Calcio	20 g
	Agar	20 g
	Agua	1000 cc
Agar nutritivo	Agar	20 g
	Extracto de carne de vacuna	3 g
	Peptona	18 g
	Agua	1000 g
MG (Medio granada)	Dextrosa	5 g
	Peptona	10 g
	Caseina	1 g
	Regulación pH a 7,2 con Na OH	
	TZC	0,5 g
	Agar	18 g
	Cristal violeta	50 ppm
	Cicloheximida al 1 %	10 cc/l
	Sulfato de polimixin	100 ppm
	Agua	1000 cc
MS	Agar	15 g
	Manitol	10 g
	Acido nicotínico	0,5 g
	L. asparagina (anhidro)	3,0 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dibasoco	2,0 g
	Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	Sodium taurochlorate (Difco)	2,5
	Media de pH 7,2 7,3	
	Tergitol 7	0,1 ml
	Acido nitrilotriacético al 2 %	10 ml
	Azul de bromitol al 0,5 %	9 ml
	Rojo neutral al 0,5 %	2,5 ml
	Hidróxido de sodio sol 1N	5,0 ml
	Nitrato de Talium al 1 %	1,75 ml
	Cloruro de cobalto al 14 mm	50 ml
	Cicloheximida al 1 %	5 ml
	Agua	1000 cc

Agar Tripticasa	Peptona (Trypticase)	15 g
soya	Peptona (phytone)	5 g
	Cloruro de sodio	5 g
	Agar	15 g
	Agua destilada	1000 cc
	pH después de autoclavado	7,3

---

\* French (1982); Guerrero et al. (1987)