

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO Y CONTROL DE
Pseudomonas phaseolicola EN DIFERENTES
VARIETADES DE FRIJOL”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

I S A A C L U N A R O M E R O

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

II

RECONOCIMIENTOS

Agradezco a :

La M. en C. Magda Carvajal Moreno su asesoría y ayuda en el desarrollo de esta tesis.

El Dr. Leopoldo Pucikovsky por sus consejos y ayuda en la revisión de esta investigación.

El Colegio de Postgraduados Dep. de Botánica de Chapingo, Universidad Autónoma de Chapingo y Dep. de Frijol del Campo Experimental del Valle de México (INIA) el haber proporcionado las variedades de Frijol para la realización de este estudio.

El Instituto de Biología por las facilidades que me brindó para realizar el presente trabajo.

El programa de Superación Académica de la UNAM por el otorgamiento de la beca.

III

- I N D I C E -

Objetivos	IV
Introducción.....	1 - 21
Materiales y métodos.....	22 - 31
Capítulo I : Comportamiento de <u>Pseudomonas phaseolica</u> <u>la</u> con diferentes periodos de luz.....	32 - 37
Materiales y métodos.....	32 - 33
Resultados.....	34 - 35
Discusión y conclusiones.....	35 - 37
Capítulo II: Supervivencia de <u>Pseudomonas phaseolica</u> en la superficie foliar del frijol.....	38 - 55
Materiales y métodos.....	39 - 43
Resultados.....	43 - 52
Discusión y conclusiones.....	53 - 56
Capítulo III: Control de <u>Pseudomonas phaseolica</u> por resistencia y ensayo químico.....	56 - 78
Materiales y métodos.....	56 - 67
Resultados y discusión.....	68 - 77
Conclusiones.....	78
Apéndice I.....	79 - 81
Bibliografía.....	82 - 85

IV

- OBJETIVOS -

Los objetivos de este trabajo de tesis consisten en realizar un estudio lo más completo posible, del organismo que ocasiona la enfermedad en el frijol conocida comúnmente como "tizón de halo" cuyo agente causal es la bacteria Pseudomonas phaseolicola; para lo cual se determinará:

- a) El efecto que tiene la luz en el crecimiento de la bacteria mediante pruebas "in vitro".
- b) El tiempo de supervivencia de la bacteria en la superficie foliar del frijol.
- c) La resistencia o susceptibilidad de 19 variedades de frijol al "tizón de halo".
- d) El efecto químico de seis sustancias en el crecimiento de la bacteria.

Todos estos trabajos están encaminados a obtener datos - que contribuyan a conocer más a fondo el comportamiento de la bacteria y poder dar alternativas para su control cuando se presente el problema en el campo.

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO Y CONTROL DE Pseudomonas phaseoli
cola EN DIFERENTES VARIEDADES DE FRIJOL.

INTRODUCCION.

El cultivo del frijol, (Phaseolus vulgaris L.) en México ocupa el tercer lugar en importancia (39) ya que esta leguminosa representa parte de la alimentación básica del pueblo mexicano por ser su semilla una de las principales fuentes de proteína.

En México, el frijol tiene una amplia distribución debido a su gran poder de adaptación, se cultiva en lugares desde los cero hasta los 2200 m sobre el nivel del mar es decir, desde climas templados, hasta tropicales y de áridos hasta húmedos por lo que se emplean diversas técnicas en su producción, de las cuales las más importantes son la asociación maíz-frijol y el frijol sólo o cultivo simple.

De acuerdo a los datos proporcionados por la Dirección General de Economía Agrícola (34), el área cultivada de frijol en nuestro país del año de 1925 a 1980 ha ido en aumento (Tabla 1). Esta superficie aporta la producción suficiente para satisfacer las necesidades de consumo de la población sin embargo a pesar de la extensa superficie que se

Tabla 1 : Producción de frijol en México de 1925 a 1980.

Promedio en años	Superficie cosechada ha.	Producción ton.	Valor de la producción*
1925 a 1929	893 839	169 621	20 920 728
1930 a 1934	666 367	132 000	13 367 518
1935 a 1939	574 220	116 992	21 864 789
1940 a 1944	698 460	156 026	36 092 059
1945 a 1949	775 172	187 993	124 128 177
1950 a 1954	997 969	286 591	223 418 812
1955 a 1959	1 281 114	476 465	574 494 598
1960 a 1964	1 683 671	665 186	1 121 032 939
1965 a 1969	1 946 607	908 892	1 608 298 889
1970 a 1974	1 764 076	945 759	2 764 426 954
1975 a 1979	1 454 064	825 448	5 235 376 128
1980 -	1 763 347	971 359	13 831 647 053

* dado en pesos

siembra los rendimientos por hectárea son bajos. Este bajo rendimiento se debe a varios factores tales como: la siembra intercalada del frijol entre el maíz lo cual dificulta su cosecha, su localización en grandes extensiones de temporal aventurado, así como plagas y enfermedades.

Con el objeto de aumentar los rendimientos unitarios de este cultivo mediante la prevención y combate de enfermedades y plagas, los agricultores, los extensionistas y los profesionales que atienden los problemas del campo tienen la necesidad de conocer las enfermedades, así como los métodos de control, para obtener un mayor rendimiento en el cultivo del frijol.

Patógenos de importancia económica en el frijol.

En la literatura agrícola se menciona que el frijol es atacado aproximadamente por 50 enfermedades (Apéndice 1) que son causadas por diferentes patógenos como: hongos bacterias, virus y nemátodos; además también existen las de origen fisiológico (deficiencias nutricionales, daños mecánicos etc.). En México no se presentan todas las anomalías patogénicas, pero las que se conocen causan serios daños al cultivo.

Entre las enfermedades bacterianas del frijol, "el tizón

de halo" causado por Pseudomonas phaseolicola (Burk) Dows 1926, es la que ocasiona mayores pérdidas. La planta es susceptible en cualquier estado de crecimiento y el patógeno ataca indistintamente hojas, ramas, tallos y vainas (10).

Tomando en cuenta las pérdidas causadas por esta bacteriosis al cultivo del frijol, en los últimos años, se ha hecho necesario tener un conocimiento más exacto de la biología de esta bacteria para controlarla, ya sea por métodos químicos o de resistencia. Su incidencia ha dañado severamente a los Estados de Hidalgo, Guanajuato, Querétaro, Jalisco y Zacatecas (21).

Morfología y fisiología de Pseudomonas phaseolicola.

En el año de 1926 fue descrito por primera vez el organismo Pseudomonas phaseolicola (Burk) Dows (4), causante de la enfermedad de frijol, conocida como "tizón de halo". Este patógeno es un bacilo aerobio, Gram negativo, de 1.3 a 3.2 micras (37), presenta de 1 a 6 flagelos en posición mono ó bipolar. Las células se encuentran aisladas, o en pares, raras veces en cadenas con tendencia a la formación de filamentos (37).

Estructuralmente P. phaseolicola está constituida por una pared bacteriana formada por varias capas, en donde en

contramos polisacáridos, protefnas, glicoprotefnas, lípidos lipopolisacáridos y lipoprotefnas; una cápsula bacteriana, químicamente heterogénea, contiene polipéptidos, polisacáridos, azúcares aminados con ácidos urónicos; tiene dos funciones una de ellas es la de proteger a la bacteria contra la desecación así como de la fagocitosis y la otra es la de almacenar substancias alimenticias para cuando las condiciones del medio son desfavorables para el desarrollo de la bacteria (29).

La membrana citoplásmica, es la siguiente capa después de la pared celular, contiene 20 aminoácidos de forma L así como fosfatidil glicerol, fosfatidil cerina, fosfatidil etanol amina, ácido fosfatídico, su función está relacionada con la actividad respiratoria y síntesis de los constituyentes de la pared. Los pilli o fimbriae son estructuras que se encuentran en gran número alrededor de la pared celular, son muy finos de aproximadamente 7 nm, su función es aparentemente doble puesto que sirven como puente durante el proceso parasexual llamado conjugación, para la transferencia de DNA de una bacteria a otra, así como de adhesión a las superficies (29).

Los mesosomas son organelos que se encuentran en número muy reducido, y parecen ser formados por involuciones de la membrana citoplásmica; son activos durante la división -

ya que siempre son localizados en el sitio donde la pared comienza a dividirse. El nucleoplasma que es una área electrotransparente irregular, en donde encontramos moléculas circulares de DNA que aparece fibroso; en el mismo nucleoplasma, existen unos elementos genéticos llamados plásmidos que son capaces de integrarse al cromosoma y que son autónomos. Los ribosomas se observan como pequeños gránulos de 10 a 20 nm compuestos de 65 % de ácido ribonucleico y 35 % de proteína; la cantidad de ribosomas que se puede encontrar en una bacteria es de unos 15; tienen como principal función la síntesis de proteínas. Finalmente encontramos las inclusiones de almacenamiento que generalmente no se encuentran cuando la bacteria está creciendo activamente; las inclusiones en Pseudomonas son característicamente lípidos. De acuerdo a Clara (1934), la bacteria siempre tiene un solo flagelo y según Le Cosquino de Bussy (1936) de 1 a 3 flagelos; por otro lado los reportes sobre las dimensiones también son contradictorios.

La temperatura óptima de crecimiento es entre 25° C y 30° C, la máxima entre 36° y 37° C y la mínima de 0° C aunque Hedges (1946) y Bergey (1957) encontraron las temperaturas óptimas de 20 a 23° C, una máxima de 33° C y mínima de 2.5° C. El punto térmico letal es entre 49° y 50° C.

El crecimiento tiene lugar en un rango de pH de 5.0 a 8.8

con un óptimo entre 6.7 y 7.3 (37).

El crecimiento de P. phaseolicola en medio de cultivo papa, dextrosa, agar (P.D.A.) produce colonias blancas o color crema y en extracto de carne agar las colonias son blanquecinas circulares con un diámetro de 2 mm. En medio de cultivo B de King las colonias de esta bacteria producen un pigmento fluorescente, que puede ser observado claramente por medio de luz ultravioleta (31).

En relación a la actividad metabólica de P. phaseolicola se tiene conocimiento de una serie de pruebas bioquímicas de gran importancia para la identificación de la bacteria que ocasiona la enfermedad de "El tizón de halo". Dentro de estas pruebas encontramos que Pseudomonas phaseolicola no licúa la gelatina aunque otros autores como Burkholder y Zaleski (1932) y Clara (1934) señalan que la gelatina es licuada muy ligeramente, asimismo no coagula ni peptoniza la leche. Algunas bacterias fitopatógenas reducen los nitratos a nitritos, pero en el caso particular de P. phaseolicola no se realiza esta reducción. Por otro lado la producción de indol es otra prueba muy útil en la identificación de bacterias fitopatógenas, esta característica no es típica de P. phaseolicola, tampoco produce ácido sulfhídrico ni es lipolítica (2). P. phaseolicola tiene la propiedad de producir reacción ácida pero no gas utilizando como fuentes de

carbohidratos a la glucosa, fructosa, manosa, arabinosa, xilosa, sacarosa y glicerol, pero no produce reacción ácida a partir de ramnosa, lactosa, manitol o salicina (3).

Se ha observado que produce reacción alcalina a partir de sales de ácido cítrico y maléico y no produce reacción alcalina a partir de los ácidos acético, fórmico, láctico o tartárico. Respecto a la hidrolización del almidón y de la celulosa que es una característica importante para la identificación de bacterias fitopatógenas, tenemos que no hidroliza al almidón ni a la celulosa (3).

Sintomatología

Los síntomas de esta enfermedad se pueden apreciar en toda la parte aérea de la planta, Burkholder (1930) señaló dos tipos principales de síntomas producidos por el patógeno unos debidos a infección local la cual se presenta en forma de lesiones en las hojas, tallos, vainas y pecíolos y otros a infección de tipo sistémico que puedan causar achaparramiento, clorosis y síntomas de mosaico (10).

Los síntomas más claros y que facilitan su distinción de otras enfermedades, son las que se producen por infección local en las hojas y a los cuales Hedges Florence (1946) aplicó por primera vez el término de "tizón de halo". Las

lesiones aparecen primero como pequeñas áreas menores de 1 mm de diámetro, color verde oscuro y de apariencia acuosa (13,16); conforme avanza la enfermedad estas áreas van aumentando tornándose de color café rojizo, hasta llegar a la necrosis total del centro de la mancha; conforme el tejido va muriendo, el halo amarillo alrededor de la necrosis también va aumentando hasta extenderse en toda la hoja, terminando con la necrosis total y defoliación de ésta (fig. 1).

La infección de tipo sistémico se presenta cuando la bacteria invade el xilema de la planta. Cuando se presenta este tipo de infección, las hojas, principalmente las trifoliadas presentan un amarillamiento general durante varios días siempre que la defoliación no sea muy severa (12) (fig.2).

Otro tipo de síntomas debidos a la infección sistémica pueden aparecer en toda la planta, el más común es un enanismo en ocasiones muy notable, malformación de las hojas (fig. 3) o bien marchitamiento general seguido de la muerte de las plantas (fig. 4).

En el tallo, las lesiones aparecen de color café rojizo en ocasiones acompañadas de un exudado bacteriano, esas lesiones se pueden extender longitudinalmente sobre el tallo desde el cuello de la raíz hasta las hojas cotiledonales que en ocasiones caen debido a la infección (11).

En las vainas las lesiones aparecen como pequeñas man



fig. 1 . Infección en hojas de frijol causada por Pseudomonas phaseolicola.



fig. 2 . Clorosis en hojas trifoliadas ocasionada por P. phaseolicola.



Fig. 3 . Malformación de hojas debido a " El tizón de halo ".



Fig. 4. Marchitamiento general y muerte de la planta de frijol.

chas acuosas o grasosas que alcanzan hasta un centímetro de diámetro. Durante el tiempo húmedo, la superficie de las manchas es brillante y cubierta de una exudación pegajosa de color cremoso (40). Cuando la lesión se seca es de color café rojizo, hundida y a veces se parece a las lesiones producidas por Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. and Magu) Scrib, hongo que ocasiona la enfermedad conocida como antracnosis otra de las enfermedades graves del frijol. Sin embargo cuando la bacteria pasa al sistema vascular del pedúnculo y entra a la vaina, origina una lesión bastante irregular que se localiza principalmente a lo largo de la sutura (12).

La enfermedad se manifiesta en todas las semillas o sólo una parte de ellas. En las semillas de color blanco el área afectada por las bacterias toma un color que varía del crema al amarillo intenso y en las de color oscuro este tipo de daño es difícil de determinar(10,41).

Se ha tratado de utilizar luz ultravioleta para detectar semillas de frijol con Pseudomonas phaseolicola. La selección, bajo luz ultravioleta, de aquellas semillas con áreas de fluorescencia en la testa, determina en forma efectiva las semillas que pueden estar infectadas internamente con el patógeno (27). El inconveniente de este método es que sirve sólo para separar muestras muy pequeñas, además de

que la fluorescencia no es detectable en semillas con testas oscuras. En caso de que la infección sea muy severa, las semillas quedan de tamaño pequeño arrugadas y manchadas por completo. (27).

Zaumayer (1932) reportó que Pseudomonas phaseolicola - puede entrar a la semilla por el micrópilo o rafe, permanecer bajo la testa por largos períodos de tiempo, activarse en el momento de sembrar la semilla, desarrollar la enfermedad cuando empieza el desarrollo de la planta y también inhibir por completo la germinación de la semilla. Concluye que la infección del embrión ocurre durante los primeros estados de germinación por rompimiento en el cotiledón producido con la absorción de agua (41).

Ciclo del patógeno.

El agente causal de la enfermedad conocida como "Tizón de halo", es llevado en la semilla infectada y se desarrolla sobre las plántulas cuando hay suficiente humedad (9). De estas plantas las bacterias se diseminan por el agua de lluvia que salta, y la infección de nuevas plantas ocurre mientras las condiciones de humedad persistan. Cuando las vainas son infectadas, las bacterias penetran a la semilla en desarrollo y si ésta no muere o se deforma, será cosecha-

da al año siguiente que se siembre (9). En la mayor parte de los casos no es posible separar todas las semillas sanas de las enfermas por simple examen visual.

Existen evidencias de que la transmisión por semilla del "tizón de halo" resulta tanto de la infestación como de la infección, y probablemente la infestación es más importante especialmente en áreas bajo riego donde la precipitación es muy baja (15).

Según Hedges (1946) el suelo es un medio inapropiado para que la bacteria del "tizón de halo" pase en forma viable de un período de cultivo al siguiente.

Requerimientos ambientales.

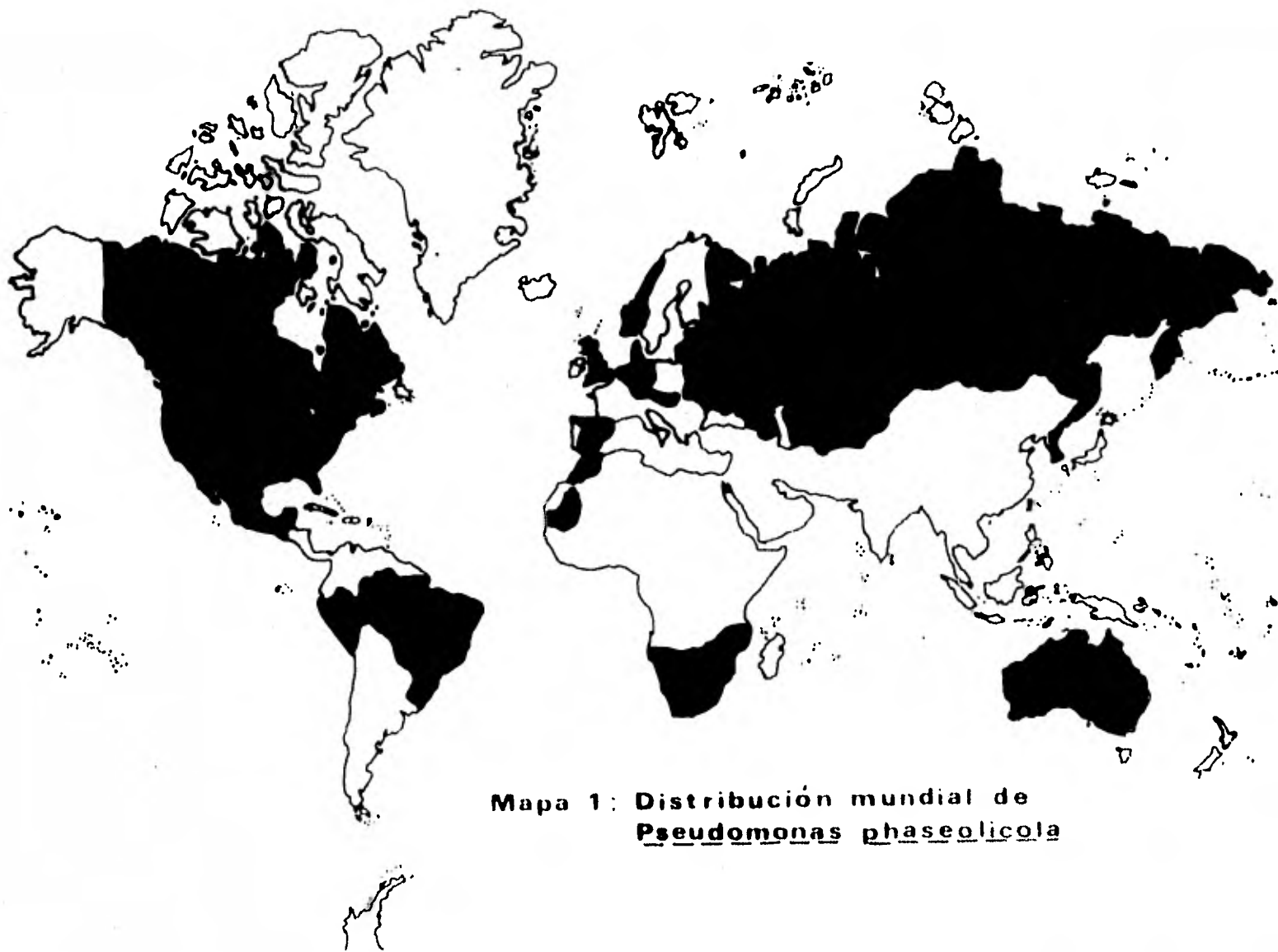
No existe uniformidad en la literatura respecto a las condiciones ambientales para el desarrollo de la enfermedad del "tizón de halo". Goss (1940) mencionó que a 28° C y 32° C el halo característico de la enfermedad no se formaba pero sí a una temperatura de 16° C. Jensen y Goss (1942) encontraron que la expresión de los síntomas de la enfermedad aparecieron en un amplio margen de variación de temperaturas desde los 12° C a 18° C. Respecto al efecto de la baja humedad, ésta no tiene efectos aparentes en el desarrollo y expresión de los síntomas, y aún bajo las más altas

temperaturas, en las cuales las plantas alcanzan el punto de marchitamiento en los casos de baja humedad, la severidad de los síntomas fue igual que en los casos de humedad elevada (21). Por el contrario, Higgins (1930) sugiere que el daño producido por la enfermedad depende de las condiciones del tiempo, y que en los años de lluvias frecuentes durante el período de crecimiento de las plantas deben ser esperados daños severos causados por esta enfermedad.

Distribución y rango de hospedantes.

La ocurrencia del "tizón de halo" fue observada por primera vez en el año de 1926 por Burkholder en la ciudad de Nueva York U.S.A., desde donde se diseminó rápidamente al Oeste y muchos Estados de Norte América (37). Poco después se localizó también en Alemania, en donde ha trastornado considerablemente los cultivos de frijol del centro de Alemania. Asimismo ha sido reportada en el Norte y Sur de Holanda, Gran Bretaña, Dinamarca, Noruega, Rusia, Austria, Hungría, España, Marruecos. Este y Sur de Africa, Mauritania, Australia, Tasmania, Brasil, Perú, Canadá y México (Mapa No. 1).

En México es la enfermedad más importante, producida



Mapa 1: Distribución mundial de Pseudomonas phaseolicola



Mapa 2 : Distribución de *Pseudomonas phaseolicola* en México

por bacterias en las siembras temporales, pues causa daños considerables, defoliando las plantas de frijol en las zonas de clima templado y con periodos de lluvias definido y regular como en la Mesa Central y el Bajío y en las zonas de temporal de los Estados de Aguascalientes, Jalisco, Zacatecas, Durango, Chihuahua, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y Tabasco (9,39,40) (Mapa 2)

En adición a Phaseolus vulgaris también P. coccineus L. P. lunatus var. macrocarpus Moench, P. multiflorus Willd., - Pueraria thunbergiana Benth, P. hirsuta Kurz y Glycine soja (L.) Sieb and Zucc muestran susceptibilidad al "tizón de halo" (37).

Métodos de inoculación.

La literatura al respecto menciona varios métodos de inoculación bajo los cuales se ha obtenido infección en las plantas de frijol (1,5,18,23,32,33).

Andrus (1948) señaló como muy efectivo el método de inoculación conocido como aguja múltiple. Shuster (1958) llevó a cabo la inoculación de un gran número de plantas, acoplado un atomizador de mano a una bomba compresora y asperjando las plantas con una suspensión bacteriana a una presión de 15 libras. Jensen y Goss (1942) indican haber obtenido infección en toda la planta al usar aspersión con

una suspensión de bacterias y con la ayuda de un atomizador de mano. Burkholder (1930) efectuó las inoculaciones en las vainas colocando una pequeña masa de bacterias en la sutura de éstas e introduciéndolas con la ayuda de un escalpelo. Higgins (1930) utilizó como métodos de inoculación la aspersión y la punción al tallo y obtuvo un buen porcentaje de plantas infectadas. Existen otros métodos de inoculación como por ejemplo el de dañar ligeramente las hojas con abrasivos como carborundum y después asperjar o pasar un algodón empapado con una suspensión bacteriana. También es posible la inoculación de las semillas, lo cual se efectúa sometiéndolas a inmersión en una suspensión bacteriana (12).

Toxina.

De las numerosas especies fitopatógenas de *Pseudomonas* sólo cinco son reportadas como causantes de una área clorótica dentro de la planta como síntoma final de la enfermedad éstas son: *Pseudomonas phaseolicola*, *P. tabaci* (Wolff & Foster) Stevens, *P. glicinea* Coerper, *P. coronofasciens* (Elliott) Stevens y *P. tomato* (Okabe) Alstatt (19). Las cinco especies son incluidas por algunos autores en *P. syringae* Van Hall (2). Se piensa que esta clorosis es causada por toxinas extracelulares liberadas por la bacteria cuando ésta se encuentra dentro de la planta.

La toxina producida por *Pseudomonas phaseolicola* difie-

re en sus características químicas y actividad biológica de la toxina que causa el "Tizón de fuego" y de muchas otras fitotoxinas. Aunque algunos reportes (13,19,26,30,35,36) han publicado sobre las propiedades de Pseudomonas phaseolicola, P. glycinea y P. tomato, solo la exotoxina de P. phaseolicola ha sido purificada y parcialmente caracterizada (36).

Se han realizado investigaciones con la toxina de Pseudomonas phaseolicola que indican que ésta inhibe específicamente la enzima ornitín-carbamil-transferasa, la cual es necesaria para la biosíntesis de arginina (36).

La clorosis inducida por la toxina puede ser aliviada mediante la aplicación a la hoja de arginina o citrulina(36).

Se han efectuado una serie de investigaciones, todas ellas encaminadas a encontrar la composición y estructura de la exotoxina producida por P. phaseolicola (19,26,36).

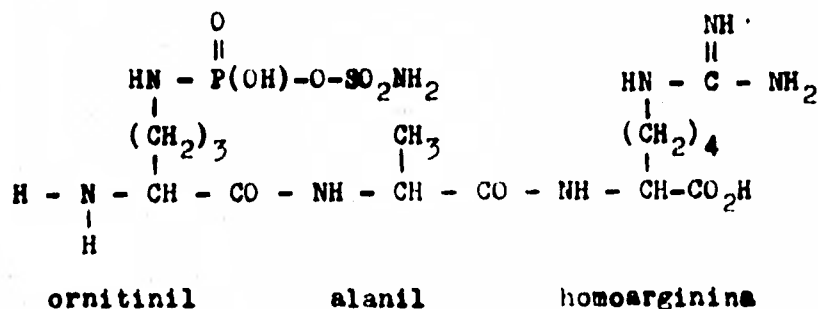
Patil (1974) ha reportado que la hidrólisis ácida de una fracción activa de la toxina produjo glicina, serina, valina y dos aminoácidos no identificados, y a este compuesto lo designó como faseotoxina. Esta fracción produjo clorosis en hojas de frijol, pero aparentemente no causó la acumulación característica de ornitina, lo cual ocurre en la situación natural de la enfermedad.

En contraste, Mitchell (1976) aisló y purificó un com

puesto de la toxina que contiene sólo tres aminoácidos, además sulfato y fosfato al cual designó como faseolotoxina, ninguno de estos tres aminoácidos están presentes en la faseotoxina. Además la faseolotoxina indujo la actividad clorótica en un 80 % y produjo la acumulación de ornitina (26).

Existen otras discrepancias entre los resultados establecidos. Una importante diferencia está dada por la procedencia de la toxina, por el tipo de raza de la cepa. Mitchell (1976) aisló la faseolotoxina a partir de una cepa bacteriana raza 1, mientras que la faseotoxina fue aislada de la raza 2.

Mitchell (1976) reportó que el principal componente activo presente en un filtrado de cultivo de P. phaseolicola raza 1, es un N-fosfosulfamil derivado de un tripeptido (N-fosfosulfamil)-ornitínil-alanil-homoarginina denominado faseolotoxina.



MATERIALES Y METODOS.

Obtención de la fuente de inóculo.

Son tres las fuentes de inóculo para la obtención de Pseudomonas phaseolicola :

- 1.- A partir de semillas de frijol variedad "Ojo de cabra".
- 2.- Hojas de frijol con el síntoma de la enfermedad, colectadas en el Estado de Tabasco.
- 3.- Proporcionada por el Departamento de Fitopatología del Colegio de Postgraduados de Chapingo aislada e identificada a partir de hojas de frijol colectadas en el Estado de México.

1.- La primera fuente de inóculo de la bacteria que ocasiona la enfermedad conocida comúnmente como "Tizón de halo" se obtuvo a partir de semilla de frijol variedad "Ojo de cabra" proporcionada por el Departamento de Frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Este aislamiento se efectuó de la siguiente manera:

Se tomaron 100 semillas de frijol variedad "Ojo de cabra" las cuales fueron desinfectadas superficialmente mediante una solución de hipoclorito de sodio al 2% y dos pasos sucesivos de agua destilada estéril, una vez efectuado esto se colocaron en cajas de Petri conteniendo papa, dextrosa, - agar (P.D.A.) para separar las semillas enfermas de las sa-

nas. En este medio germinaron 92 de las 100 semillas que fueron pasadas a invernadero para continuar su observación y determinar si les aparecían, síntomas de "tizón de halo".

A cada una de las semillas que no germinaron se les aplicó el siguiente tratamiento para ver si tenían Pseudomonas phaseolicola.

- 1) Se colocó la semilla en un mortero agregándole 5 ml de agua destilada estéril y se procedió a macerar.
- 2) En un tubo de ensayo previamente esterilizado, se decantó el líquido obtenido de la maceración.
- 3) A partir de 4 ml de la suspensión obtenida, se efectuaron siembras en medio de cultivo B de King para separar las colonias bacterianas que presentaban fluorescencia.
- 4) Para obtener cultivos puros de las colonias bacterianas que presentaban diferencias en color tamaño y forma, se hizo una resiembra teniendo cada una de las colonias bacterianas en cajas separadas.
- 5) Una vez obtenidos los cultivos de bacterias puros se les aplicaron las pruebas respectivas, para determinar cual de éstos era de Pseudomonas phaseolicola.

2.- Una segunda fuente de inóculo fue obtenida a partir de hojas de frijol colectadas en el Estado de Tabasco Campo Experimental del Colegio Superior de Agricultura Tropical - (C.S.A.T.) y que presentaban el síntoma típico del "Tizón de halo". El aislamiento de la bacteria a partir de estas hojas se hizo desinfectando superficialmente mediante hipoclorito de sodio al 2% por dos minutos, y dos pasos de agua destilada estéril de dos minutos cada uno, en seguida con bisturí se cortaron fragmentos de la región de la hoja donde se observa de color amarillo y verde que es donde se localizan las bacterias y donde va avanzando la lesión. En seguida haciendo uso de unas pinzas se colocaron cada uno de los fragmentos de la hoja en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo B de King y se dejaron incubar hasta observar la aparición de bacterias.

Debido a las características del medio se obtuvo una colonia fluorescente, que fue transferida a otra caja para tenerla en forma pura. A este nuevo cultivo bacteriano se le aplicaron los postulados de Koch para reproducir los síntomas y asegurarnos que era nuestra bacteria.

3.- Una tercera fuente de inóculo fue proporcionada por alumnos del Departamento de Fitopatología del Colegio de Postgraduados de Chapingo.

A esta cepa le aplicaron las pruebas bioquímicas respectivas para su identificación que fueron:

Tinción de Gram

Pudrición de papa

Tinción de flagelos

Hipersensibilidad de tabaco

Prueba de oxidación

Producción de indol

Reducción de nitratos

Producción de ácido sulfhídrico

Utilización de almidón

Prueba de la catalasa

Determinación de la actividad lipolítica.

Pruebas de identificación del patógeno.

Pudrición de papa.

La pudrición de tubérculos de papa es una prueba que se puede utilizar para la identificación de bacterias fitopatógenas y su empleo nos permite diferenciar parcialmente los géneros : Erwinia, Pseudomonas y Xanthomonas. La pudrición por bacterias del género Erwinia se caracteriza por ser de color amarillo cremoso, en algunas ocasiones con formación de un borde de color negro; la pudrición producida por bacterias del género Pseudomonas se caracteriza por ser de color blanco y finalmente las bacterias del género Xanthomonas generalmente no ocasionan ninguna pudrición, a menos que haya alta humedad (22).

La prueba se efectuó de la siguiente manera:

Una papa de la variedad "alfa" se lavó perfectamente con detergente, se enjuagó con agua corriente y después agua destilada estéril. Se utilizó esta variedad por ser muy susceptible a las enfermedades. Posteriormente para su desinfección superficial se limpió con alcohol y se flameó. Una vez desinfectada la papa, con un cuchillo desinfectado en alcohol y a la flama se cortaron rebanadas de papa de 0.5 a 0.8 mm de grosor y se colocaron en cajas de Petri previamente esterilizadas conteniendo un papel filtro mojado con agua destilada

estéril en la base inferior de la caja para mantener una cámara húmeda dentro de ella. Una vez colocada la rebanada de papa en la caja de Petri por medio de un bisturí, se le hizo una incisión, un poco profunda que pasó por el centro de la rebanada de papa, en seguida haciendo uso de un asa para sembrar se puso una cantidad suficiente de la bacteria, a probar, en la incisión efectuada en la papa y se puso a incubar en una cámara a 25°C. Los testigos se hicieron siguiendo la misma metodología, sólo que en la incisión se puso agua destilada estéril y sin bacteria.

Tinción de Gram.

Esta es otra prueba importante para la identificación de bacterias fitopatógenas. Ya que de los cinco géneros de bacterias fitopatógenas más frecuentes sólo en el género Corynebacterium la reacción de Gram da positiva, tificándose de violeta las bacterias. Por otro lado tenemos a los géneros Bacillus y Clostridium que aunque de menor importancia, también llegan a causar daños a los cultivos y en los cuales la tinción de Gram da una reacción positiva. El resto de bacterias fitopatógenas da una reacción negativa, tificándose de rojo.

Esta prueba se efectuó de la siguiente manera:

Se preparó un frotis bacteriano en un porta objetos,

una vez fijado a la flama, se le adicionaron dos gotas de cristal violeta dejándolo actuar por un minuto, transcurrido este tiempo se lavó con etanol al 97 % hasta eliminar exceso de colorante. Finalmente se le agregaron dos gotas de safranina al 1 % y se le dejó actuar durante 30 segundos inmediatamente se lavó con agua corriente y se observó bajo lente de inmersión.

Los organismos Gram negativos se tiñen de color rojo mientras que los Gram positivos de color violeta, esto es debido a la diferencia en la constitución de las paredes bacterianas, ya que mientras las bacterias Gram positivas presentan un alto porcentaje de mucopéptidos en su pared celular, las bacterias Gram negativas presentan un alto porcentaje de lípidos (30).

Fluorescencia.

Ciertos grupos de bacterias fitopatógenas tienen la propiedad de producir un pigmento difusible verde fluorescente el cual es perceptible cuando se ponen a desarrollar las bacterias en medios específicos y se ven con luz ultravioleta. Esta característica es típica de ciertas especies del género *Pseudomonas* (31).

La prueba se realizó sembrando la bacteria en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo B de King, que se preparó

de la siguiente manera:

Se mezclan los siguientes compuestos en las proporciones siguientes:

<u>Producto</u>	Cantidad
Agar bacteriológico	16 g
Proteosa peptona No. 3	20 g
Glicerol	10 ml
Fosfato diácido de potasio	1.5 g
Sulfato diácido de magnesio	1.5 g
Agua destilada	1.0 l

La mezcla de estos constituyentes fue sometida para su esterilización a una presión de 15 lb durante 20 minutos y se reparte posteriormente en cajas de Petri.

Las cajas se dejaron incubando durante tres días para asegurar que no crecía contaminante alguno en el medio.

A partir de un cultivo puro de Pseudomonas phaseolicola se sembró por el método de estría y se colocó la cepa en una cámara de incubación a 25° C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se colocaron las cajas con cultivo bacteriano en un aparato de luz fluorescente a una intensidad de onda larga para observar la fluorescencia.

Si la bacteria desarrollada en el medio es fluorescente se observa de color amarillo intenso y si no lo es, se observa opaca.

Postulados de Koch.

Para poder afirmar que las bacterias, virus y hongos son los agentes causantes de una enfermedad es necesario - aplicar una serie de principios que nos dan las bases para decir que un microorganismo es el causante de la enfermedad.

Estos principios son los postulados de Koch, que se consideran como la prueba más importante, en la determinación - de agentes causantes de enfermedades en los cultivos.

Los postulados de Koch se aplican de la siguiente manera:

- a) Aislar a partir del hospedante enfermo al agente causal que se sospecha está causando el daño.
- b) Identificar al agente causante del daño o sea al posible patógeno.
- c) Multiplicar al supuesto patógeno e inocularlo en una planta hospedante, con lo cual se tienen que reproducir los síntomas exactamente igual como se observaron en un principio, es decir realizar pruebas de patogenicidad.
- d) Reaislar al agente causante del daño, a partir de la planta inoculada.
- e) Volver a identificar al patógeno para corroborar que se trata del mismo organismo del que se partió al iniciar la prueba.

De acuerdo al método indicado, en seis de las ocho semillas analizadas se aislaron bacterias, que de acuerdo a las pruebas que les fueron aplicadas una resultó ser colonia de Pseudomonas phaseolicola.

Asimismo las bacterias aisladas de hojas de frijol con síntoma de "Tizón de halo" colectadas en el Estado de Tabasco, resultaron ser Pseudomonas phaseolicola.

Respecto a la metodología de cada experimento separamos en capítulos a cada uno de ellos con su metodología correspondiente, con el objeto de facilitar la lectura de este trabajo.

Capítulo 1 : COMPORTAMIENTO DE Pseudomonas phaseolicola con
DIFERENTES PERIODOS DE LUZ.

Para obtener un estudio completo de la bacteria que ocasiona el "tizón de halo" se determinó el efecto que tiene la luz en el desarrollo de esta bacteria. No existen datos concretos que indiquen si la luz tiene algún efecto en el crecimiento de Pseudomonas phaseolicola.

Materiales y métodos.

La forma de estudio de este fenómeno es inoculando por el método del punto cajas de Petri conteniendo medio de cultivo B de King. La inoculación de la bacteria en el centro de la caja con medio de cultivo se efectúa con mucho cuidado colocando el asa perpendicular a la superficie del medio y cuidando que en el preciso momento de la inoculación no haya vibraciones en el asa, ya que de otra manera se obtendrán colonias asimétricas que van a ser difíciles de medir.

Para efectuar este método de inoculación es necesario utilizar un cultivo bacteriano de 24 a 48 horas de desarrollo.

Para el experimento se inocularon un total de 80 cajas de Petri, 40 de éstas fueron inoculadas con Pseudomonas phaseolicola por el método antes descrito y las otras 40

con agua destilada estéril estas últimas son los tratamientos testigo. Una vez inoculadas las cajas de Petri 20 de las inoculadas con la bacteria y las otras 20 con agua destilada estéril se cubrieron con papel de aluminio para tener las bacterias en completa obscuridad, las otras 20 cajas de Petri inoculadas con la bacteria y las otras 20 cajas testigo inoculadas con agua destilada estéril, únicamente se sellaron con masking-tape siendo éstas el tratamiento bajo luz continua. En seguida las 80 cajas de Petri se introdujeron en una cámara de germinación marca "lab-line instruments" mantenida con luz blanca continua a una intensidad de - 2250 luxes y a una temperatura de 25° C.

De esta forma se tuvieron tratamientos bajo luz continua y tratamientos en obscuridad mantenidos en los siguientes - períodos de tiempo: 24, 48, 96 y 192 horas conforme se - cumplan dichos períodos se iban sacando las cajas y se efectuaban las mediciones del tamaño de la colonia de Pseudomonas phaseolicola.

En ambos tratamientos (luz y obscuridad) se pusieron cinco repeticiones para cada período de luz y de obscuridad con sus respectivos testigos, los cuales fueron inoculados con agua destilada estéril.

Resultados.

Se obtuvo el tamaño de las colonias en milímetros, de cada una de las repeticiones para cada periodo de tiempo en los dos diferentes tratamientos. Asimismo de los datos obtenidos de cada periodo luminoso y de obscuridad se sacaron los promedios del tamaño en milímetros de las colonias bacterianas. Estos datos se pueden apreciar en la tabla 2.

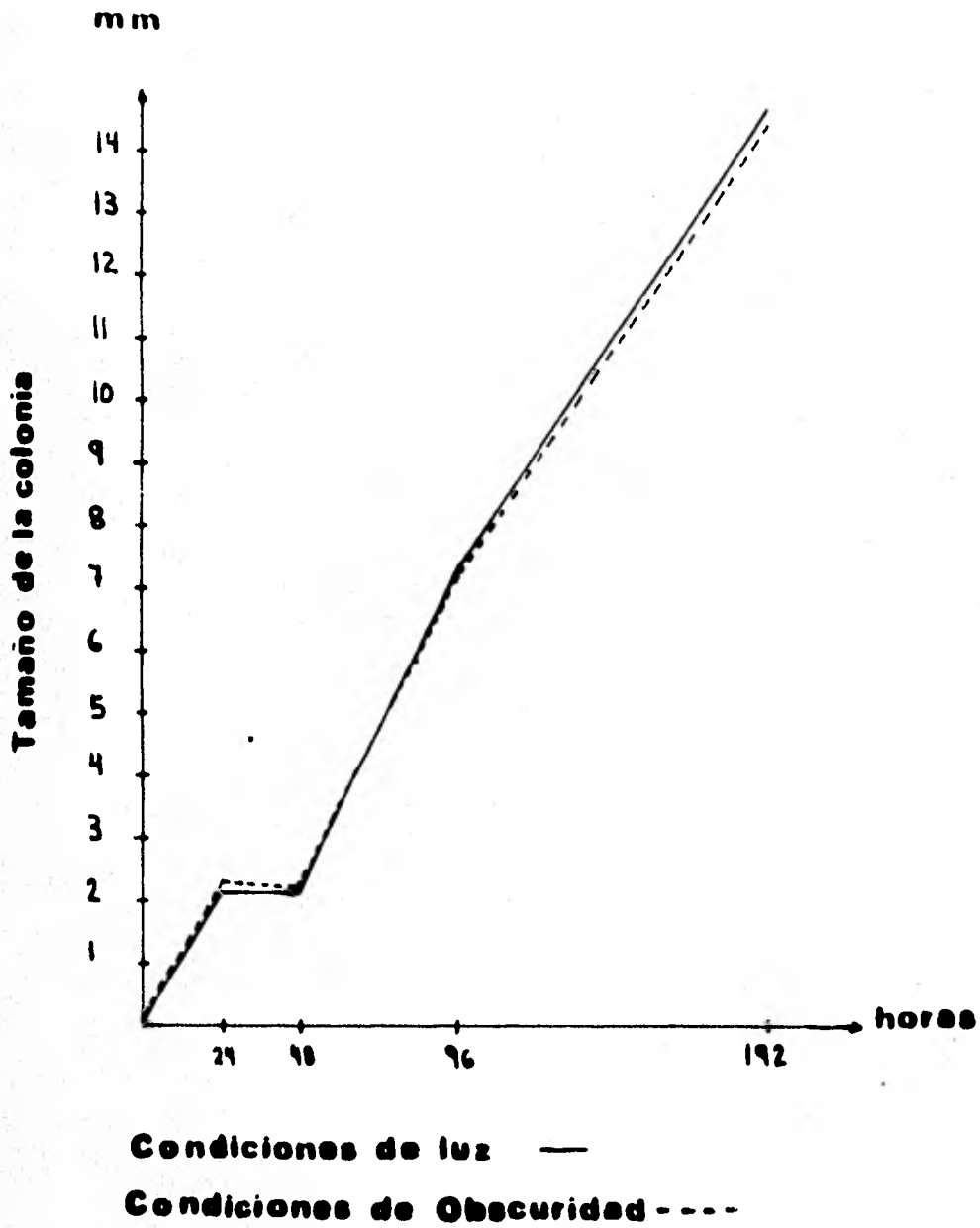
Tabla No. 2 : Crecimiento de <u>P. phaseolicola</u> en diferentes periodos de luz y obscuridad.			
Horas de luz continua	Crecimiento bacteriano en (mm)	Horas de obscuridad	Crecimiento bacteriano en (mm)
24	2.5	24	2.3
	2.0		2.2
	2.0		2.5
	colonia difusa		2.3
	2.0 $\bar{x} = 2.13$		2.2 $\bar{x} = 2.3$
48	2.0	48	2.1
	2.0		2.2
	2.5		2.3
	2.0		2.4
	2.0 $\bar{x} = 2.1$		2.0 $\bar{x} = 2.2$
96	7.0	96	7.0
	7.0		7.0
	7.5		7.0
	7.0		8.0
	7.2 $\bar{x} = 7.3$		7.0 $\bar{x} = 7.2$
192	15	192	13
	15		15
	14		14
	15		15
	14 $\bar{x} = 14.6$		15 $\bar{x} = 14.4$

En la tabla anterior se pueden observar los tamaños en milímetros obtenidos para las colonias de Pseudomonas phaseolicola, para los diferentes tratamientos en sus respectivos períodos de tiempo; asimismo para cada periodo de tiempo se obtuvieron los promedios del tamaño de la colonia de las cinco repeticiones. Como se puede notar no hay una diferencia significativa entre el crecimiento de la bacteria con luz y obscuridad.

Discusión y conclusiones.

El método de inoculación del punto indicado para este trabajo es el más adecuado, puesto que se necesita medir el crecimiento de la colonia, aunque no podemos considerarlo como muy exacto ya que aún cuando utilizemos una misma asa para todas las inoculaciones es difícil que al tomar las bacterias de la fuente de inóculo se adhieran al asa la misma cantidad para cada inoculación; esto nos hará variar un poco nuestros resultados, ya que consideramos que el crecimiento de la colonia bacteriana depende en parte de la cantidad de bacterias que se adhieran al asa. Por otra parte, no se observó mucha variación en el tamaño de la colonia bacteriana para cada período de luz y obscuridad. La diferencia en el tamaño de las colonias para cada tratamiento fue muy pequeña; esta diferencia

Gráfica 1



probablemente se deba a una diferencia en la cantidad de bacterias iniciales inoculadas.

De lo observado en el desarrollo de este experimento, podemos concluir que la luz no tiene efecto alguno en el crecimiento de colonias de P. phaseolicola, esto quedó comprobado al comparar los resultados de los tratamientos sometidos a luz continua y a obscuridad bajo las mismas condiciones de temperatura, en ambos tratamientos no se presentó una diferencia significativa en el tamaño de la colonia (Gráfica No. 1) . De ahí que podamos concluir que la luz no afecta el crecimiento de las colonias de P. phaseolicola.

Capítulo II : SUPERVIVENCIA DE Pseudomonas phaseolicola
EN LA SUPERFICIE FOLIAR DEL FRIJOL

En relación a la supervivencia de P. phaseolicola en la superficie foliar del frijol se sabe muy poco. El conocimiento del tiempo de supervivencia de esta bacteria en la superficie foliar del frijol, ayudaría en buena parte a determinar en que momento sería adecuada la aplicación de bactericidas para su control, ya que si la bacteria sobrevive por un corto período no tendría caso efectuar la aplicación después del período de supervivencia, puesto que no tendría acción alguna sobre el patógeno ocasionando con ello un gasto económico inútil.

Asimismo nos ayuda a conocer mejor los factores que determinan una epifitias pues si sabemos la temperatura y humedad favorables a la bacteria junto con el tiempo en que sobrevive en las plantas se conocerá mejor su dispersión y el tiempo que el inóculo permanece activo.

Una de las finalidades de este trabajo es precisamente observar el tiempo de supervivencia de la bacteria que ocasiona el "tizón de halo" con el propósito de tener un mayor conocimiento de su comportamiento en los cultivos.

Materiales y métodos.

Selección de semilla.

Se seleccionaron 180 semillas de frijol variedad "Bayo mex" de acuerdo a las siguientes características: ausencia de manchas, sin deformaciones y de tamaño homogéneo. Una vez obtenidas las semillas con las características mencionadas, se sembraron en 180 vasos de unicel y se pusieron en condiciones de invernadero, teniéndose cuidado de que la humedad de la tierra no fuera muy alta porque puede pudrir la semilla o bien que no fuera muy baja ya que no habría germinación.

Los tratamientos efectuados fueron de acuerdo a los siguientes tiempos: 1, 2, 4, 8, 24, 48, 192, 384 y 576 horas.

Para cada período de tiempo se tuvieron dos tratamientos uno de ellos consistía en tener la planta en condiciones de humedad foliar lo cual se logró colocando a cada planta de frijol una bolsa de plástico sellada con una liga colocada en la parte inferior del vaso de unicel, de esta forma se mantenía una cámara húmeda para la planta. El segundo tratamiento consistió en tener a la planta en condiciones sin humedad foliar, esto significa que la planta no presentaba agua en la superficie de sus hojas, debido a la ausencia de una cámara húmeda. De esta manera se tenían para el

experimento cinco plantas sin humedad foliar, cinco plantas con humedad foliar y cinco plantas testigo de cada tratamiento.

Concentración de la suspensión bacteriana.

En la determinación del número de bacterias que existen por mililitro en una suspensión bacteriana actualmente se dispone de varios métodos.

La cuenta de bacterias se aplica en la reacción de hipersensibilidad de tabaco y en las pruebas de patogenicidad.

El método empleado en este trabajo fue el de nefelometría, el cual se basa en la turbidez de color blanco opaco que se forma al hacer reaccionar ácido sulfúrico con una solución de cloruro de bario; el precipitado que se forma es parecido a la turbidez que forman las bacterias en suspensión. Un total de 10 tubos de ensaye forman el nefelómetro; es decir, se forman 10 diferentes grados de turbidez a los cuales corresponden las concentraciones de las bacterias por centímetro cúbico. Por lo tanto, se procedió a preparar las soluciones de ácido sulfúrico y cloruro de bario ambas a una concentración del 1 % efectuándose las mezclas de acuerdo con la tabla No. 3 (24).

Tabla No. 3 : Concentraciones bacterianas

Tubo	ml de BaCl ₂ al 1%	ml de H ₂ SO ₄ al 1%	Millones de bacterias por ml
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

A partir de la cepa de P. phaseolicola se hicieron re-
siembras en 25 cajas de Petri conteniendo medio de cultivo
B de King dejándose incubar a 25° C en una cámara de creci-
miento durante 24 horas. La suspensión se preparó adicionan-
do suficiente cantidad de bacterias a un litro de agua desti-
lada estéril, hasta obtener una turbidez igual a la del tubo
patrón conteniendo cloruro de bario más ácido sulfúrico y
que nos indica que la concentración bacteriana es de 2400
millones de bacterias por mililitro.

Método de inoculación.

Las plántulas de frijol variedad "Bayo mex" de aproximadamente ocho días de nacidas se inocularon por el método de aspersión mediante un atomizador manual por la superficie del envés por ser ésta la superficie que presenta mayor cantidad de estomas.

Esto se efectuó con la suspensión de P. phaseolicola preparada de acuerdo al método de nefelometría o comparación por turbidez antes indicado. De acuerdo a la lista de tiempos señalada anteriormente se dejaron las plantas en condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 25°C.

Conforme se cumplían los tiempos establecidos de 1, 2, 4, 8, 24, 48 horas etc. , se cortaban las hojas (en condiciones de humedad foliar, sin humedad foliar y testigo) se colocaron en papel aluminio esterilizado y se llevaron al laboratorio.

La impresión de cada una de las hojas en cajas de Petri con medio de cultivo B de King, se realizó en un microboid, para evitar al máximo contaminaciones por manejo, de este modo se iban efectuando las impresiones y las cajas fueron colocadas en una cámara a 25°C por 24 horas. La impresión se realizó presionando la hoja de frijol sobre la superficie del medio de cultivo B de King, de tal modo que tanto las

nervaduras como las regiones intervenales quedaran perfectamente impresas en el medio de cultivo.

Las bacterias obtenidas de cada una de las impresiones fueron inoculadas en plantas de frijol variedad "Ojo de cabra" por ser ésta muy susceptible al "tizón de halo" y poder reproducir los síntomas y asegurarnos que era nuestra bacteria la que se había mantenido en la hoja y pasado a la impresión.

Resultados.

Para medir el por ciento de área de la impresión foliar en B de King, se tomó el área foliar total como un 100 % y se dividió en cuatro cuadrantes de 25 % cada uno y esto daría una aproximación del por ciento de área foliar con bacterias.

En las plantas de frijol variedad "Bayo mex" designadas para observar el tiempo de supervivencia en la superficie foliar del envés se obtuvieron los siguientes resultados:

Sin condiciones de humedad foliar.

Esto es sin ponerle a la planta una bolsa de plástico después de inocularle la bacteria.

Tabla No. 4: Tiempo de supervivencia de P. phaseolicola y pruebas de fluorescencia para su determinación.

Tiempo de supervivencia en la superficie foliar	Crecimiento de la bacteria en la impresión.	Prueba de fluorescencia.
1 hora	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 95 % del área de la impresión (fig 5)	+
2 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 90 % del área de la impresión (fig. 6). En una de las repeticiones apareció una bacteria blanca en una área muy reducida de la impresión.	+
4 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 70 % del área de la impresión. En una de las repeticiones apareció una pequeña área con bacteria blanca (fig 7.)	+
8 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 65 % del área de la impresión (fig. 8)	+
24 horas	En las cinco repeticiones la	

Tabla No. 4 : continuación.

Tiempo de supervivencia en la superficie foliar	Crecimiento de la bacteria en la impresión	Prueba de fluorescencia.
24 horas	bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 60 % del área de la impresión Crecimiento de bacteria blanca en dos repeticiones.	+
48 horas	En 4 de las cinco repeticiones se desarrolló la bacteria a partir de las nervaduras en el 60 % del área de la impresión. Contaminación por hongos en una de las repeticiones. Crecimiento de bacteria blanca en 3 de las repeticiones.	+
192 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló en el 35 % del área de la impresión Crecimiento de bacteria blanca en 3 de las cinco repeticiones	+
384 horas	En dos de las cinco repeticiones, en la parte media de la impresión se desarrolló la bacteria en el 20 % del área de la impresión. En las cinco repeticiones aparecieron bacterias blancas	+
576 horas	En una de las cinco repeticiones hubo contaminación por hongos. En las cuatro repeticiones no apareció <u>P. phaseolicola</u> .	-



Fig. 5 . Impresión de la hoja de frijol a una hora después de la irradiación, en condiciones sin humedad.

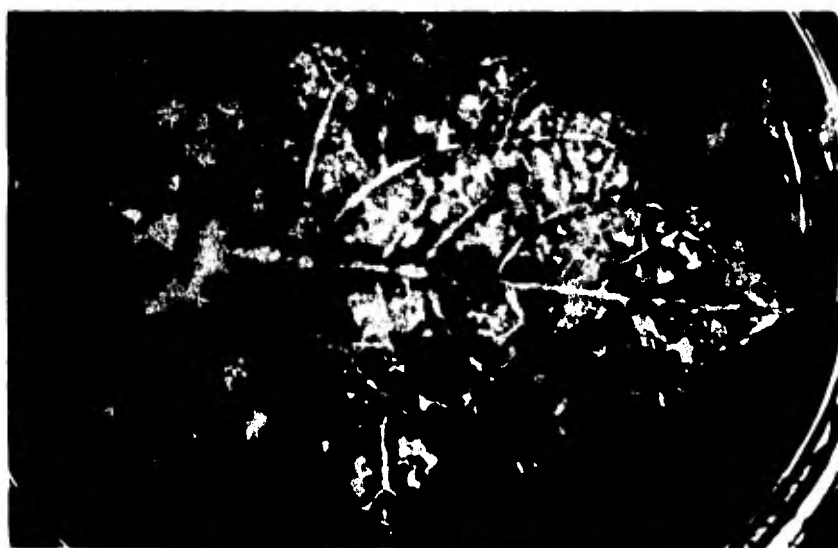


Fig. 6 . Impresión de la hoja de frijol a una hora después de la irradiación, en condiciones con humedad.

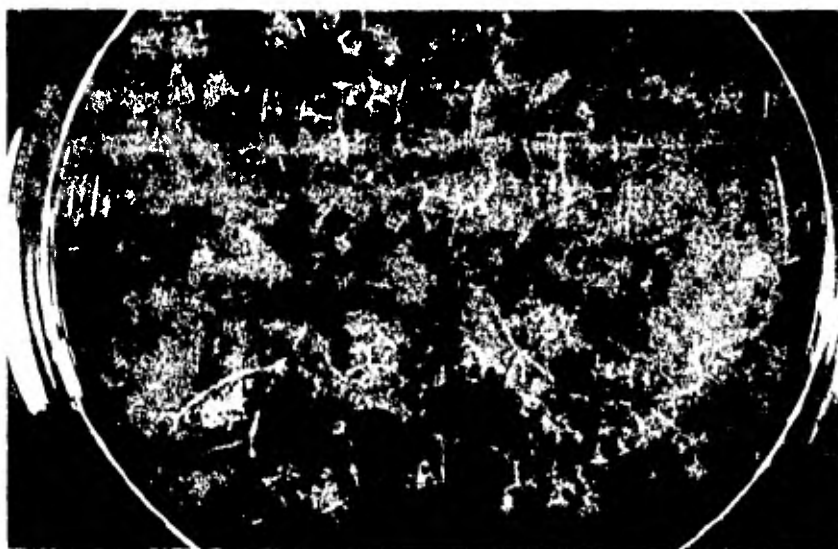


Fig. 7. Imagen de la planta de frijol a 4 horas después de la inoculación, en condiciones con humedad.

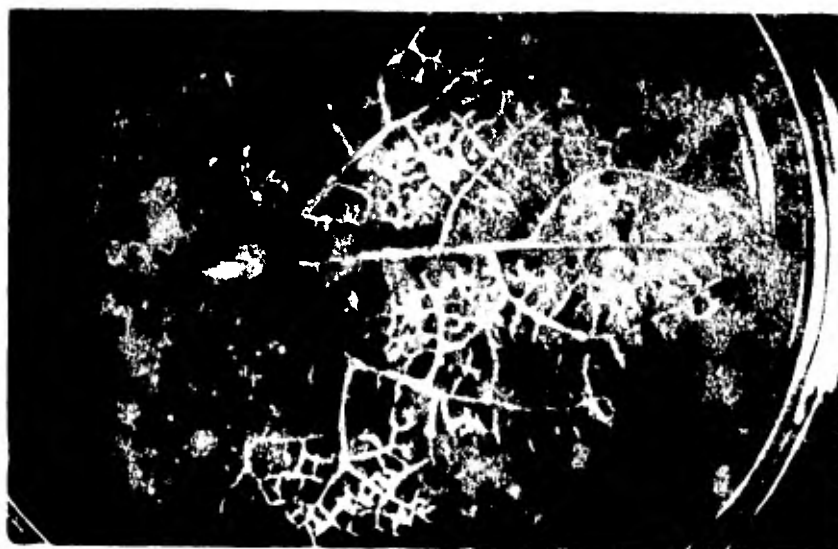


Fig. 8. Imagen de la planta de frijol a 4 horas después de la inoculación, en condiciones con humedad.

Condiciones de humedad foliar.

Por humedad foliar se entiende que la hoja tenía agua libre en ella debido a que el agua de evaporación no se perdía debido a la bolsa de plástico que se le puso a la planta después de inocular la bacteria.

Tabla No. 5 : Tiempo de supervivencia de P. phaseolicola en condiciones de humedad y pruebas de fluorescencia para su determinación.

Tiempo de supervivencia en la superficie foliar	Crecimiento de la bacteria en la impresión.	Prueba de fluorescencia.
1 hora	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 95 % del área de la impresión (fig. 9)	+
2 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 90 % del área de la impresión (fig. 10)	+
4 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 90 % del área de la impresión (fig. 11)	+
8 horas	En 4 de las cinco repeticiones se desarrolló a partir de las nervaduras en el 80% del área de la impresión. Contaminación por hongos en una de las repeticiones (fig. 12)	+

Tabla No. 5 : Continuación.

Tiempo de supervivencia en la superficie foliar	Crecimiento de la bacteria en la impresión.	Prueba de fluorescencia.
24 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 95 % del área de la impresión Crecimiento de bacteria blanca en una de las repeticiones	+
48 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 90% del área de la impresión Crecimiento de bacteria blanca en dos de las repeticiones	+
192 horas	En las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 70 % del área de la impresión Crecimiento de bacteria blanca en las cinco repeticiones	+
384 horas	En 3 de las cinco repeticiones la bacteria se desarrolló a partir de las nervaduras en el 45 % del área de la impresión. Crecimiento de bacteria blanca en las 5 repeticiones.	+
576 horas	En una de las cinco repeticiones se desarrolló la bacteria en el 10 % del área de la impresión, una de las cinco repeticiones se contaminó de hongos.	+



Fig. 9 . Impresión de la hoja de frijol a 1 hora después de la incubación, en condiciones de humedad foliar.

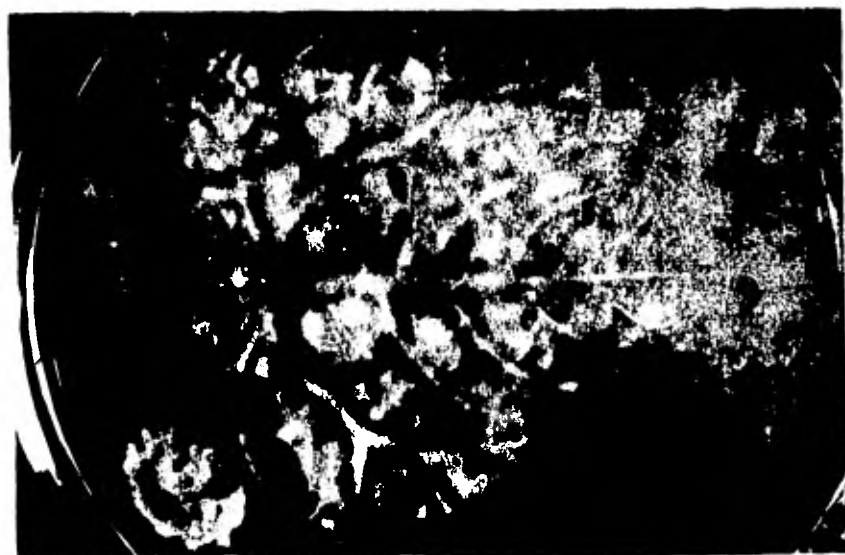


Fig. 10 . Impresión de la hoja de frijol a 2 horas después de la incubación, en condiciones de humedad foliar.

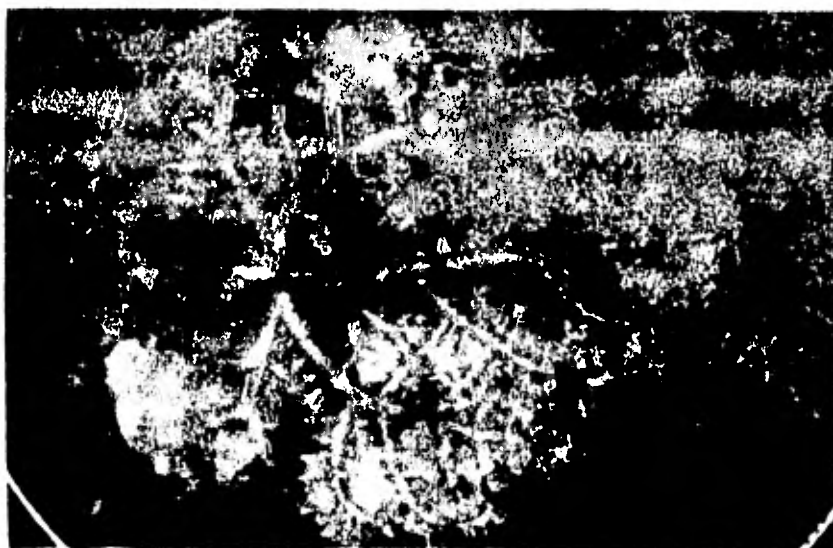


Fig. 11 . Impresión de la masa de frijol a 4 horas dentro de la cámara. Muestra características de humedad colilar.



Fig. 12 . Impresión de la masa de frijol a 4 horas dentro de la cámara. Muestra características de humedad colilar.

La entrada de la bacteria por el sistema estomático se comprobó únicamente en las hojas de 1, 2 y 3 semanas, esto se realizó de la siguiente manera: Una vez que se realizó la impresión de las hojas, éstas se lavaron perfectamente con agua destilada estéril y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2 %, posteriormente se sembraron fragmentos de estas hojas en medio de cultivo B de King donde se obtuvieron colonias bacterianas fluorescentes, las cuales al ser inoculadas en plantas sanas de frijol dieron el síntoma del "tizón de halo".

Discusión y conclusiones.

Como se pudo comprobar en este trabajo la supervivencia de P. phaseolicola en la superficie foliar del envés del frijol variedad "Bayo mex" presentó un decremento de la bacteria en relación al tiempo hasta casi desaparecer, puesto que en las impresiones efectuadas en el tiempo correspondiente a 576 horas sólo se detectó en una de las cajas con impresión, en condiciones de humedad foliar una colonia de P. phaseolico
la.

Esto significa que pudieron suceder dos cosas: primero que cierto número de bacterias pudieron haber muerto cuando se encontraban en la superficie foliar de las hojas por no tener las condiciones nutricionales para su supervivencia y segundo la bacteria pudo haber penetrado a la planta por el sistema estomático del envés. Podemos considerar que ambas cosas suceden, puesto que desde el momento de inocular las bacterias es difícil que todas penetren por el sistema estomático, muchas de ellas se quedarán adheridas a la superficie de la hoja de frijol y posiblemente morirán al no tener las condiciones óptimas para su desarrollo; mientras que las que lograron penetrar encuentran en la planta un medio favorable para nutrirse, reproducirse y desarrollar la enfermedad.

Con base en estas dos posibilidades, al realizar las impresiones en el medio de cultivo, conforme transcurría el tiempo, la cantidad de bacterias presentes en la superficie foliar del envés iba disminuyendo.

Asimismo la entrada de la bacteria por el sistema estomático quedó comprobada al realizar los aislamientos respectivos de las hojas inoculadas por aspersión.

En todas las plantas con bolsa de plástico y que favorecen las condiciones de humedad foliar, la bacteria puede permanecer más tiempo en la superficie ya que la humedad favorece a la bacteria y ésta crecerá mejor; esto se verificó al comparar los resultados de las impresiones de las hojas mantenidas bajo condiciones sin humedad foliar con las impresiones de las hojas mantenidas bajo condiciones de humedad foliar. Donde se obtenía una mayor superficie de crecimiento bacteriano fue en las condiciones de humedad.

Aún cuando se sabe que se requiere de una película de agua para la penetración de la bacteria, en ambos casos -- ésta pudo penetrar, ya que aunque no hubiera agua libre en las hojas sin bolsa de plástico, sí había evaporación de -- agua de la respiración foliar. Esto significa que la bacteria en condiciones con poca humedad requirió de un tiempo muy corto para la penetración y desarrollo de síntomas.

Cabe la posibilidad de que el decremento bacteriano en

la superficie foliar del frijol en relación al tiempo sea - debido a la penetración de la bacteria como antes dijimos.

Asimismo la rapidez con que penetre la bacteria dificultaría el control de esta enfermedad mediante bactericidas - conocidos. Para ello se requeriría de un bactericida sistémico para lograr un control efectivo de esta bacteria por dentro, pero afortunadamente el control más usado es por variedades resistentes.

Se pudo comprobar que las condiciones de humedad foliar son las que favorecen la supervivencia y entrada de la bacteria a la planta por lo que las precauciones deben ser máximas cuando las condiciones ambientales son de alta precipitación, pues favorece el desarrollo del "tizón de halo".

Para concluir este trabajo podemos decir que la bacteria P. phaseolicola sobrevive en la superficie foliar del frijol hasta tres semanas, y se acumula más en las nervaduras quizá porque así se reproduzca más ya que es una bacteria sistémica.

Capítulo III: CONTROL DE Pseudomonas phaseolicola POR RESIS-
TENCIA Y ENSAYO QUÍMICO.

La bacteria Pseudomonas phaseolicola causa pérdidas de consideración al atacar los cultivos de frijol en algunos Estados de la República Mexicana. La incosteabilidad de los métodos químicos impone la necesidad de utilizar variedades resistentes para un mejor control y a un costo más bajo, - accesible para el campesino.

La finalidad de esta investigación es determinar en 19 variedades comerciales de frijol, la susceptibilidad o resistencia que presentan a Pseudomonas phaseolicola para poder dar nuevas alternativas para su control.

Materiales y métodos.

Variedades usadas:

En la determinación de la resistencia y susceptibilidad del frijol al "tizón de halo se utilizaron las siguientes variedades, dadas por el Departamento de Frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (SARH).

- 1.- Amarillo 153
- 2.- Amarillo 154
- 3.- Bayo 107

- 4.- Bayo 400
- 5.- Bayo-mex
- 6.- Cacahuate 72
- 7.- Canario 101
- 8.- Canario 107
- 9.- Flor de mayo
- 10.-Negro 150
- 11.-Negro Jamapa
- 12.-Negro Mecentral
- 13.-Negro Puebla
- 14.-Negro Querétaro
- 15.-Oaxaca
- 16.-Ojo de cabra
- 17.-Pinto
- 18.-Rosita
- 19.-Phaseolus coccineus

Características agronómicas de las variedades de frijol.

Dado que algunas características morfológicas, agronómicas y taxonómicas son comunes entre las variedades de frijol se considera conveniente anotarlas en los siguientes párrafos y posteriormente se dan las características agronómicas para cada variedad.

Características de la especie (8).

Nombre científico: Phaseolus vulgaris.

Tallos : aéreos.

Hojas : compuestas de tres foliolos.

Inflorescencia en racimo simple, fruto simple formado por una vaina.

Susceptible a excesos de humedad, sales, altas temperaturas heladas, plagas, granizo y hongos de almacén.

Altura de la planta de 35 a 40 centímetros.

Características distintivas de las variedades (3).

1.- Amarillo 153.

Flor de color blanco, semilla de tamaño chico y redonda, de color amarillo. Ciclo vegetativo de 120 a 130 días y días de floración de 50 a 60. Las áreas de adaptación son los Estados de Tlaxcala y Puebla

2.- Amarillo 154.

Flor de color blanco, semilla de tamaño regular y forma arriñonada de color amarillo mostaza. Su ciclo vegetativo es de 120 a 130 días y su floración de 70 a 80 días. Las áreas de adaptación son los Valles Altos de los Estados de México Hidalgo, Tlaxcala y Puebla

3.- Bayo 107.

Flor de color blanco, semilla de tamaño regular de forma semiarriñonada de color crema. Su ciclo vegetativo es de 110 días y su floración de 57 días. Su área de adaptación

es el Estado de México.

4.- Bayo-mex.

Flor de color blanco, la semilla es de tamaño regular, redonda y de color amarillo claro. Su ciclo vegetativo es de 90 a 100 días y su floración de 55 días. Las áreas de adaptación son los Valles Altos de los Estados de México, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, zona caliente de Morelos y Guerrero.

5.- Cacahuate 72.

Con flor de color rosa, semilla de tamaño grande y color pinto con fondo crema y manchas rosadas, de los llamados tipo cacahuate; su semilla es alargada. Hábito de crecimiento determinado. Su ciclo vegetativo es de 95 días y su floración a los 45 días. Las áreas de adaptación son los Valles de México, Puebla e Iguala

6.- Canario 101/ 107.

Con flor de color rosa o lila, la semilla es grande de forma arrañada y de color amarillo claro. Su ciclo vegetativo es de 85 a 95 días y su floración a los 55 días. Sus áreas de adaptación son el Valle del Fuerte, Sinaloa, Durango, Cd. Guzmán, Aguascalientes, Sierra de Chihuahua y Mesa Central

7.- Flor de mayo.

Su flor es de color blanco, su semilla de tamaño media-

no de color pinto de rosa y amarillo y se le conoce también como franelo. El ciclo vegetativo es de 95 a 110 días, y su floración de 60 días. Las áreas de adaptación son principalmente en el Bajío, en las zonas productoras de frijol de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Querétaro y Durango.

8.- Negro 150.

Con flor de color morado, su semilla es de tamaño mediano de forma uniforme de color negro brillante. Su ciclo vegetativo es de 120 a 130 días y su floración de 75 días. Las áreas de adaptación son los Valles Altos de los Estados de Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos e Iguala

9.- Negro Jamapa.

Con flor de color morado, su semilla es de tamaño chico y de forma arrifonada, de color negro opaco. Su ciclo vegetativo es de 80 a 85 días y su floración de 35 días. Sus áreas de adaptación son en la zona tropical del Golfo de México, Península de Yucatán, Nayarit, Sinaloa, Guerrero, México y Durango.

10.- Negro Mecentral.

Su flor es de color morado, con semilla grande de forma arrifonada de color negro. Su ciclo vegetativo es de 90 a 100 días con floración a los 60 días. Las áreas de adaptación son los Valles Altos de los Estados de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Durango y Morelos

11.- Negro Puebla.

Con flor de color morado, su semilla es de tamaño grande de color negro brillante con forma elíptica o redonda. Con ciclo vegetativo de 120 días y floración de 68 días. Su área de adaptación es Puebla

12.- Negro Querétaro.

Su flor es de color morado, semilla de tamaño chico de forma arriñonada. Su ciclo vegetativo es de 108 días y su floración de 55 días. Sus áreas de adaptación son los Estados de Querétaro, Guanajuato y Michoacán.

13.- Oaxaca.

Flor de color rosado, su semilla es de tamaño regular de forma arriñonada. Su ciclo vegetativo es de 78 días y su floración de 38 días. Sus áreas de adaptación son los Estados de Oaxaca y Chiapas.

14.- Ojo de cabra/Bayo 400.

Con flor de color rosado, semilla grande de forma arriñonada de color rosa con rayas café. Con ciclo vegetativo de 114 días y floración de 53 días. Sus áreas de adaptación son Jalisco, Zacatecas, Guanajuato, Colima y Puebla.

15.- Pinto 133.

Con flor de color morado, su semilla es redonda y de tamaño regular de color pinto de café con fondo amarillo grisáceo. Su ciclo vegetativo es de 110 días y su floración de 60. Sus

Áreas de adaptación son los Estados de Durango, Zacatecas y Chihuahua.

16.- Phaseolus coccineus.

Su flor es de color blanco, las semillas muestran una gran variación en tamaño forma y color; encontrándose formas redondas, ovaladas y arrifionadas, chicas y pequeñas de colores como blanco, negro, rojo, amarillo, café y pinto donde intervienen dos o mas tonalidades de los colores mencionados. Sus áreas de adaptación son los Estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala.

17.- Rosita.

Con flor de color blanco, su semilla es de tamaño regular de forma arrifionada y de color rosa. Su ciclo vegetativo es de 87 a 100 días y su floración a los 45 días. Su área de adaptación es el Estado de Guanajuato.

Tratamiento de la tierra.

La tierra utilizada en el experimento de resistencia, fue tierra comercial con un alto contenido de materia orgánica, debido a ello se tuvo que cernir por medio de un cedazo con una malla de 0.5 cm de abertura, esto se realizó con la finalidad de tener la tierra más homogénea y de textura más fina, eliminándose de esta forma las piedras y fragmentos vegetales grandes. Ya cernida la tierra, se procedió a llenar las charolas en las que se iban a sembrar las semillas, la cantidad de tierra que se utilizó para cada charola fue siempre la misma, No se le adicionó ningún fertilizante, ni fue esterilizada.

Selección de semilla.

Se seleccionaron 100 semillas de cada una de las 19 variedades de frijol; teniendo cuidado de que éstas no presentaran manchas, deformaciones o algún otro daño observable, una vez obtenidas las semillas con las características deseadas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % y dos lavados de agua destilada estéril y se sembraron en charolas de 20 cm por 30 cm colocando 25 semillas de frijol por charola para tener un total de 100 semillas de cada va-

riedad en cuatro charolas (se sembraron 25 semillas extras de cada variedad para reponer las que no germinaran y tener de este modo las 100 plantas de frijol para el experimento).

Se tuvo cuidado de mantener en las charolas la humedad adecuada para obtener un alto porcentaje de germinación.

Método de inoculación.

Para la obtención de síntomas y determinación de resistencia al "tizón de halo" el tipo de inoculación tiene un papel muy importante ya que de éste depende la infección de la planta. Hay que tener conocimiento acerca de si el patógeno es sistémico o local. Por ello es necesario aplicar previamente al experimento los métodos de inoculación y seleccionar de éstos el más adecuado.

Para seleccionar el método de inoculación que se utilizaría en este experimento se probaron los siguientes:

- a) Inoculación de la semilla
- b) Inoculación por aspersión
- c) Inoculación por inyección

Inoculación de la semilla. Como inóculo se preparó una suspensión de P. phaseolicola de acuerdo al método de nefelometría con una concentración de 2400 millones de bacterias por mililitro y se efectuaron los siguientes tratamientos:

- 1) Las semillas se sometieron a inmersión en la suspensión bacteriana, fueron 10 semillas de frijol variedad "Ojo de cabra" a las cuales por medio de un bisturí se les hizo una lesión en la testa 3 mm bajo el hilio. Se pusieron como testigo 10 semillas con lesión en la testa inmersas en agua destilada estéril.
- 2) Por otro lado se sometieron 10 semillas de frijol variedad "Ojo de cabra" enteras y sin lesión en la testa a inmersión en la suspensión bacteriana. Las semillas testigo permanecieron en agua destilada estéril.
- 3) Se colocaron 10 semillas de frijol variedad "Ojo de cabra" con lesión en la testa 3 mm bajo el hilio en cultivo bacteriano creciendo sobre B de King. Se pusieron como testigo a 10 semillas con lesión en la testa en medio de cultivo sin bacteria.
- 4) Se colocaron 10 semillas de frijol variedad "Ojo de cabra" sin lesión en la testa con el hilio haciendo contacto con las bacterias, en cultivo bacteriano - creciendo sobre B de King.

En los cuatro tratamientos las semillas estuvieron en contacto con las bacterias un período de 24 horas.

Inoculación por aspersión. Este método consiste en asperjar las hojas de la planta con una suspensión bacteriana de

una concentración de 2400 millones de bacterias por mililitro por medio de un aspersor manual. Posteriormente se le coloca una bolsa de plástico a la planta por un tiempo de 48 horas; esto se hace con el propósito de mantener una cámara húmeda a la planta y proporcionar así las condiciones para que la bacteria penetre.

Por este método se obtienen muy buenos resultados ya que la inoculación es homogénea y se obtienen síntomas en toda la planta.

Inoculación por inyección. A partir de una suspensión bacteriana con una concentración de 2400 millones de bacterias por mililitro se inyectó 0.1 ml de esta solución debajo de la epidermis del envés de la hoja primaria del frijol para que se infiltrara. Esta inoculación se realizó en cinco plantas, teniéndose como testigo a cinco plantas inoculadas con agua destilada estéril.

Como complemento del trabajo de control de P. phaseolicola en frijol, se determinó el efecto de seis sustancias en el crecimiento de P. phaseolicola en pruebas realizadas "in vitro".

En relación al control químico del "tizón de halo" Zauney y Thomas (1957), encontraron que el sulfato de estreptomina y sulfato de dihidroestreptomina, se trasladaron dentro del frijol en pequeñas distancias protegiendo a las plantas de la infección de P. phaseolicola. En el campo la aspersión de una solución acuosa de 0.1 % de sulfato de estreptomina, dio buen resultado para el control del "tizón de halo" cuando se hicieron tres aplicaciones. La polimixina y la aureomixina inhibieron el crecimiento de P. phaseolicola (42).

Las sustancias probadas fueron: Agrimicin 100 en una proporción de 200 ppm su componente activo es sulfato de estreptomina y terramicina; Agrimicin 500 en una proporción de 400 ppm su componente activo es el sulfato de estreptomina, terramicina y sulfato de cobre; Benlate 1 gr/litro su componente activo es metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbomato; Actidione su componente activo es el 3 (2-(3,5-dimetil-2-oxociclohexil)-2-hidroxiethyl)-glutarimida; Bactrim 0.5 gr/litro su componente activo es 2,4 diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina 5-metil-3-sulfanilamido isoxazol y Cloranfenicol 1 gr/litro cuyo componente activo es el cloranfenicol isvógiro.

Ya preparadas las soluciones, se impregnaron discos de papel filtro de 0.5 cm de diámetro con cada una de ellas, y por medio de unas pinzas flameadas se colocaron en una caja de -- Petri con medio de cultivo B de King donde previamente se había colocado en el centro la bacteria.

Resultados y discusión.

De los métodos de inoculación probados, para ver cuál era el más adecuado para el experimento se obtuvieron los siguientes resultados.

Inoculación de la semilla:

Tabla No. 6 : Germinación y síntomas en la inoculación de las semillas.

Número de semillas sembradas	No. de semillas germinadas	No. de plantas con <u>síntoma</u>
10 en suspensión bacteriana con lesión.	7	7
10 en suspensión bacteriana sin lesión.	5	5
10 testigo en agua estéril.	10	0
10 en medio de cultivo con bacteria y con lesión.	8	8
10 en medio de cultivo con bacteria y sin lesión.	6	6
10 testigo en medio sin bacteria	10	0

Como podemos ver en los resultados de la tabla No. 6 de inoculación de la semilla, al efectuar este tipo de inoculación, se ve afectado el porcentaje de germinación con lo cual se pierden un buen número de plantas y para poder determinar la resistencia de cualquier variedad lo que necesitamos son plantas en desarrollo para observar todo el proceso del daño que el patógeno causa a la planta. Por tal motivo, este mé

todo de inoculación para trabajos de resistencia es poco práctico.

Por lo que respecta al método de inoculación por inyección los resultados obtenidos fueron los siguientes:

No. de plantas inoculadas	No. de plantas con síntomas	Tiempo de aparición de síntomas
5 con suspensión bacteriana	5	18 días
5 con agua destilada	5	0

Como podemos observar de acuerdo a los resultados obtenidos al inocular las plantas de frijol con una suspensión bacteriana por medio de una jeringa, se obtienen buenos resultados puesto que con este método aseguramos la entrada del patógeno a la planta y por consiguiente la producción de los síntomas. Este método fue eliminado, puesto que necesitamos llevar a cabo el experimento lo más cercano posible a las condiciones naturales y al inyectar al patógeno - lo que estamos haciendo es forzar la entrada de éste a la planta y eliminar las barreras mecánicas que puedan tener las plantas de frijol resistentes.

Consideramos que el método de inoculación más efectivo para este trabajo de resistencia es el de aspersión por las siguientes razones:

- a) El patógeno puede penetrar por el sistema estomático de la planta.

- b) La aspersión es homogénea, con lo cual no está restringida a una zona en especial de la planta, como en el caso de la inoculación por inyección.
- c) La presencia de un ambiente de humedad facilita la entrada de la bacteria a la planta. Lo que se condiciona colocando una bolsa de plástico por 48 horas a las plantas después de la aspersión.
- d) Se ha comprobado la producción de síntomas en toda la planta, mediante este tipo de inoculación.
- e) Consideramos que es un método que se asemeja a las condiciones naturales del ciclo del patógeno.

Una vez seleccionado el método de inoculación por aspersión se procedió a efectuar la inoculación de las 19 variedades de frijol. Las plántulas de frijol que fueron inoculadas tenían ocho días de nacidas.

Se efectuaron tres registros de datos, realizándose el primero 20 días después de la inoculación, el segundo a los 40 días y el tercero a los 60 días.

Los resultados de estos registros aparecen en las tablas : 7, 8 y 9. De estas tablas, los datos registrados a los 60 días fueron los que se tomaron en cuenta para determinar la susceptibilidad o resistencia del frijol al "Tizón de halo". Los dos registros anteriores a los 60 días nos permiten observar las variaciones que se van pre-

sentando conforme la enfermedad se va expresando.

Tabla No. 7 : Susceptibilidad o resistencia de las diferentes variedades de frijol a P. phaseolicola a los 20 días de la inoculación en 100 plantas.

Variedades	No. de plantas con síntomas en hojas terciarias
Negro Querétaro	0
Negro Mecentral	0
Canario 107	0
Canario 101	0
Amarillo 154	3
Amarillo 153	4
Cacahuate 72	4
Flor de mayo	5
Negro 150	5
Negro Jamapa	6
Rosita	6
Pinto	9
Bayo 107	9
Negro Puebla	10
<u>Phaseolus coccineus</u>	11
Bayo 400	14
Oaxaca	16
Bayo-mex	24
Ojo de cabra	36

A los 20 días las 4 primeras variedades fueron resistentes y las 4 últimas susceptibles, las intermedias fueron medianamente susceptibles.

Tabla No. 8 : Susceptibilidad o resistencia de las diferentes variedades de frijol a P. phaseolicola a los 40 días de inoculación en 100 plantas.

Variedades	No. de plantas con síntomas en hojas terciarias
Flor de mayo	7
Amarillo 154	8
Cacahuate 72	9
Negro Querétaro	9
Amarillo 153	10
Negro 150	10
Negro Jamapa	11
Negro Mecentral	15
Negro Puebla	18
Canario 101	19
<u>Phaseolus coccineus</u>	19
Rosita	22
Canario 107	24
Pinto	25
Bayo 400	28
Bayo 107	30
Bayo-mex	42
Oaxaca	52
Ojo de cabra	71

Fueron las variedades más resistentes a los 20 días de inoculada la bacteria.

Las 4 primeras variedades están menos afectadas aunque ya del 7 al 9 % presentan síntomas, esto es de gran importancia ya que entre más se retrase la aparición de síntomas

se da tiempo a que la planta forme la vaina y pueda haber producción de semillas. Aquí es evidente que la resistencia es de tipo horizontal con genes de resistencia menores ya que se llegan a enfermar, pero en forma menos severa que por ejemplo la "Ojo de cabra" que es altamente susceptible; si la resistencia fuera vertical con genes mayores la respuesta sería 0 o 100 es decir "todo o nada" y este tipo de resistencia es menos favorable ya que al mutar el patógeno acaba con toda la riedad mientras que con la resistencia horizontal se tolera algo de infección y esto hace que el patógeno no se vea obligado a mutar para hacerse más agresivo.

A medida que pasa el tiempo las variedades que fueron resistentes a los 20 días, son susceptibles a los 40 excepto el Negro Querétaro que se mantiene entre las cuatro más resistentes.

La resistencia horizontal se manifiesta claramente en las variedades Flor de mayo, Amarillo 154 y Cacahuate 72 que tuvieron los siguientes datos:

Variedades	Porcentaje de aparición de síntomas en plantas con inoculación		
	a los: 20 días	40 días	60 días
Flor de mayo	5	7	9
Amarillo 154	3	8	11
Cacahuate	4	9	13

Como se puede ver la evolución de la aparición de síntomas, en estas tres variedades se retrasa la manifestación de síntomas mostrando una resistencia horizontal muy favorable y

recomendable pues aunque se infecten, es lento el desarrollo y diseminación; mientras que las variedades Bayo 400, Oaxaca y Bayo-mex que son muy susceptibles a los 20 días y a los 60 días llegan a ser medianamente susceptibles. La variedad Ojo de cabra es definitivamente la más susceptible en los 3 registros y no es recomendable en regiones donde el "tizón de halo" sea un problema.

Por último es curioso ver el comportamiento de las variedades Bayo 107, Canario 107 y Canario 101:

Variedades	Porcentaje de aparición de síntomas en plantas con inoculación		
	a los: 20 días	40 días	60 días
Bayo 107	9	30	72
Canario 107	0	24	74
Canario 101	0	19	75

Como se puede observar en estas variedades hay un rápido desarrollo de las bacterias y la diseminación de la enfermedad se acelera mostrándose a los 60 días como claramente susceptibles y no recomendables contra el "tizón de halo" ya que aunque se llegue a formar vaina, las semillas no son de buena calidad y no hay que olvidar que esta bacteria se transmite por semilla y no se pueden usar estas variedades para la producción de semilla certificada.

Tabla No. 9 : Susceptibilidad o resistencia de las diferentes variedades de frijol a P. phaseolicola a los 60 días de la inoculación en 100 plantas.

Variedades	No. de plantas con síntomas en hojas terciarias
Flor de mayo	9
Amarillo 154	11
Cacahuate	13
<u>Phaseolus coccineus</u>	15
Negro Jamapa	16
Negro 150	18
Negro Querétaro	28
Rosita	31
Negro Puebla	35
Oaxaca	36
Amarillo 153	37
Negro Mecentral	40
Bayo-mex	54
Bayo 400	67
Pinto	68
Bayo 107	72
Canario 107	74
Canario 101	75
Ojo de cabra	100

En las cinco primeras aunque hay infección la producción aún es redituable, pues no afecta tanto la formación de vainas y semillas. En las 6 últimas variedades hay altas pérdidas de producción pues ya casi no se forman vainas

además son semillas de bajo rendimiento y germinación.

Para determinar la susceptibilidad o resistencia de las diferentes variedades de frijol al "Tizón de halo" específicamente para este trabajo se elaboró una tabla de valores para aplicarlos a los resultados obtenidos:

Altamente resistente	0	plantas con síntoma
Resistente	de 1 a 15	plantas con síntoma
Moderadamente resistente	de 24 a 50	plantas con síntoma
Moderadamente susceptible	de 51 a 75	plantas con síntoma
Susceptible	de 76 a 99	plantas con síntoma
Altamente susceptible	100	plantas con síntoma

Los resultados de la susceptibilidad o resistencia de las diferentes variedades de frijol en el registro efectuado a los 60 días, no nos muestra ninguna variedad como altamente resistente, pero como resistente al síntoma de "Tizón de halo" tenemos las siguientes variedades: Flor de mayo, Amarillo 154 y Phaseolus coccineus. Es de gran importancia que P. coccineus sea resistente ya que por ser una planta silvestre es fuente de resistencia al cruzarse con el frijol comercial.

Como variedades moderadamente resistentes al síntoma tenemos: Negro Jamapa, Negro 150, Negro Querétaro, Rosita, Negro Puebla, Oaxaca, Amarillo 153 y Negro Mecentral. Como variedades moderadamente susceptibles Bayo-mex, Bayo 400,

Pinto, Bayo 107, Canario 107 y Canario 101. Finalmente como variedad altamente susceptible la "Ojo de cabra".

Por lo que respecta a los resultados de la inhibición del crecimiento de P. phaseolicola "in vitro" con las seis sustancias, se detectó que la solución de Benlate 1 gr/litro inhibe el crecimiento de la bacteria, las otras cinco soluciones no tuvieron efecto sobre el crecimiento y desarrollo bacteriano. Con la solución de Bactrim se presentó el crecimiento de un hongo en tres de las repeticiones, el cual fue identificado como Aspergillus sp. (fig 13). Los bactericidas Agrimicin 100 y Agrimicin 500 no mostraron efectividad en esta prueba.



(fig 13) Arriba y a la derecha de la caja de Petri se observa la inhibición de la bacteria por benlate, el hongo de color verde olivo corresponde a Aspergillus sp.

Conclusiones:

Con base en estos resultados para evitar la presencia de Pseudomonas phaseolicola en el cultivo del frijol, es necesario evitar la siembra de variedades moderadamente susceptibles y susceptibles como: Bayo-mex, Bayo 400, Pinto, Bayo 107, Canario 101, Canario 107 y la altamente susceptible - "Ojo de cabra" en regiones de alta precipitación. Estas variedades solo se deben cultivar bajo riego en lugares cálidos.

Este trabajo realizado en invernadero nos permite manejar las condiciones bajo las que se presenta la enfermedad y reproducir con ello los daños que ocasiona al cultivo, pudiendo dar datos para aplicar a nivel de campo los resultados obtenidos para esta enfermedad.

Asimismo se pudo concluir que la variedad Flor de mayo fue la más resistente al síntoma y por tanto la más recomendable mientras que la variedad Ojo de cabra fue la más susceptible y la menos recomendable.

APENDICE 1 : LISTA DE PATOGENOS QUE ATACAN AL CULTIVO
DEL FRIJOL. (19,37)

Patógeno	Síntoma
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	Agalla de la corona.
<u>Alternaria spp.</u>	Manchas en hojas y vainas.
<u>Aristastoma oeconomicum</u>	Manchas en hojas.
<u>Ascochyta boltshauseri</u>	Manchas en hojas y vainas.
<u>A. phaseolorum</u>	Manchas en hojas.
<u>Bacillus lathyri</u>	Manchas en hojas y tallo.
<u>Botrytis cinerea</u>	Cenicilla, tizón.
<u>Cercospora canescens</u>	Manchas en hojas.
<u>C. phaseoli</u>	Manchas en hojas.
<u>C. phaseolorum</u>	Manchas en hojas.
<u>Colletotrichum lindemuthianum</u>	Antracnosis.
<u>C. truncatum</u>	Antracnosis.
<u>Corticium microsclerotia</u>	Tizón.
<u>Corynebacterium flaccumfaciens</u>	Marchitez.
<u>Diaporthe sp.</u>	Pudrición de raíz.
<u>Epicoccum neglectum</u>	Manchas en hojas.
<u>Erwinia carotovora</u>	Pudrición blanda.
<u>Erysiphe polygoni</u>	Mildiú pulverulento.
<u>Fusarium oxysporum</u>	Marchitez.
<u>Heterosporium sp.</u>	Manchas negras en hojas. viejas.
<u>Isariopsis griseola</u>	Mancha angular en hojas.
<u>I. laxa</u>	Mancha angular en hojas.
<u>Leptosphaeria phaseolorum</u>	
<u>Macrophomina phaseoli</u>	Cenicilla, pudrición carbonosa, pudrición de raíz manchas en hojas.

APENDICE 1 : Continuación

Patógeno	Síntoma
<u>Meloidogyne arenaria</u>	Nódulos en raíz.
<u>M. hapla</u>	Nódulos en raíz.
<u>M. incognita</u>	Nódulos en raíz.
<u>M. javanica</u>	Nódulos en raíz.
<u>Microsphaera diffusa</u>	Mildió pulverulento.
<u>Mycosphaerella cruenta</u>	Manchas en hojas.
<u>Phakopsora vignae</u>	Roya.
<u>Phyllosticta phaseolina</u>	Manchas en hojas y vainas.
<u>Phytophthora parasitica</u>	Podrición de tallo y vainas.
<u>Pleospora herbarum</u>	Manchas en hojas.
<u>Pratylenchus pratensis</u>	Nemátodo de la raíz.
<u>Pseudomonas phaseolicola</u>	Tizón de halo.
<u>Pseudomonas solanacearum</u>	Marchitez.
<u>P. syringae</u>	Manchas en hojas y vainas.
<u>Pullularia pullulans</u>	Manchas en semillas.
<u>Pythium anandrum</u>	Podrición en raíz.
<u>P. aphanidermatum</u>	Marchitez y podrición en raíz.
<u>P. debaryanum</u>	Ahoramiento, podrición de vainas y raíz.
<u>P. rostratum</u>	Podrición en raíz.
<u>P. ultimum</u>	Podrición de raíz y ahoramiento.
<u>Rhizobium phaseoli</u>	Nódulos en raíz.
<u>Rhizopus stolonifer</u>	Podrición blanda.
<u>Sclerotinia sclerotiorum</u>	Marchitez y podrición del tallo.
<u>Sclerotium rolfsii</u>	Tizón.
<u>Stagonospora phaseoli</u>	Manchas en hojas.

APENDICE 1 : Continuación

Patógeno	Síntoma
<u>Uromyces phaseoli</u>	Roya
Virus de la escoba de bruja	En el nombre se establece el síntoma
Virus de la mancha anular	Idem
Virus del mosaico amarillo	Idem
Virus del mosaico común	Idem
Virus de la vaina grasienta	Idem
Virus de la punta enchinada	Idem
Virus del nódulo rojo	Idem
Virus del punteado amarillo	Idem

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Andrus, C.F. 1948. A method of testing beans for resistance to bacterial blights. *Phytopathology* 38: 757.
- 2.- Bergey, H. 1957. Manual of determinative bacteriology. 7 ed. Baltimore Md., Williams and Wilkins, 1094 p.
- 3.- Buchanan et al. 1974. Bergey's Manual of determinative bacteriology, 8 th ed. Williams and Wilkins Company. 1246 p.
- 4.- Burkholder, W.H. 1926. A new bacterial disease of the bean. *Phytopathology* 16: 915-927.
- 5.- Burkholder, W.H. 1930. The bacterial disease of the bean. A comparative study. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Memoir 127. Ithaca, NY. 88 p.
- 6.- Burkholder, W.H. and Zaleski, K. 1932. Varietal susceptibility of beans to an american an european strain of Phytomonas medicaginis var. phaseolicola, and a comparison of the strains in culture. *Phytopathology* 20: 140.
- 7.- Clara, F.M. 1934. A comparative study of the green-fluorescent bacterial plant pathogens. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Memoir 159: 27-28.
- 8.- Crispin, M.A. 1976. Descripción de variedades comerciales de frijol. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 26 p.
- 9.- Crispin, M.A. 1976. Enfermedades y plagas del frijol en México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Folleto de divulgación, No. 39:42.
- 10.- Dowson. W.J. 1957. Plant disease due to bacteria. Cambridge at the University Press. United Kingdom. 231 p.
- 11.- Elliot, Ch. 1951. Manual of bacterial plant pathogens. Ed. 2 *Chronica Botanica* Waltham, Mass. 186 p.
- 12.- Gallegos, C.C. et al. 1966 Estudio genético de la resistencia del frijol a Pseudomonas phaseolicola (Burk) Dows. *Agrociencia* 1, 1: 56-66.

- 13.- Garber, E.D. and Shaefer, S.G. 1963. Genetic and biochemical characteristics of six phytopathogenic species of Pseudomonas. Bot. Gaz. 124: 224-228.
- 14.- Gorlenko, M.V. 1965. Bacterial diseases of plants. II ed. Translate from Russian. Israel Program for Scientific. Translations, Jerusalem: 258.
- 15.- Goss, R.W. 1940. The relation of temperature to common and halo blight of beans. Phytopathology 30: 258-264.
- 16.- Grogan, R.G., Kimble, K.A. 1967. The role of seed contamination in the transmission of Pseudomonas phaseolicola in Phaseolus vulgaris. Phytopathology 57: 28-30.
- 17.- Hedges, F. 1946. Experiments on the overwinter in the soil of bacteria causing leaf and pod spots of snap and lima beans. Phytopathology 36: 677-678.
- 18.- Higgins, B.B. 1930. "Halo blight" of beans and Kudzu. Ga. Exp. Sta. Bull. No. 161: 21.
- 19.- Hoitink, H.H., Siden, S.L. 1970. Partial purification and properties of chlorosis inducing toxins of Pseudomonas phaseolicola and P. glicinea. Phytopathology 60: 1236-1237.
- 20.- Index of Plant Disease in the United States. 1960. Plant pests of importance to north american agriculture. Crops Res. Div. Agric. Res. Serv. of Agric. Handbook No. 165 : 264-267 p.
- 21.- Izquierdo, L.M., Téliz, O.M. 1968. Ensayos sobre el control químico del "Tizón de halo" causado por Pseudomonas phaseolicola. Rama de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Mex. 87-96 pp.
- 22.- Jaimes, S.F. 1977. Manual de prácticas de bacterias fitopatógenas, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Edo. de México. 11p.

- 23.- Jensen, J.H. and Goss, R.W. 1942. Physiological resistance to halo blights in beans. *Phytopathology* 32:246-253.
- 24.- Kiraly, Z.Z. et al. 1970. Methods in plant pathology. Akademiai Kiado, Budapest 160 p.
- 25.- Le Cosquino de Bussy, J.J. 1936. De bacterieziekte van de boon (Phaseolus vulgaris) veroorzaakt door Pseudomonas medicaginis var. phaseolicola Burk. Thesis Univ. Utrecht I: 99 p.
- 26.- Mitchell, R.E. 1976. Isolation and structure of a chlorosis inducing toxin of Pseudomonas phaseolicola. *Phytochemistry* 15: 1941-1947.
- 27.- Parker, M.C. and Dean, L.L. 1968. Ultraviolet as a sampling aid for detection of bean seed with Pseudomonas phaseolicola. *Plant Dis. Rep.*, 52(7): 534-538.
- 28.- Patil, S.S. 1974. Toxins produced by phytopathogenic bacteria. Univ. Hawaii, *Ann. Rev. of Phytopathology* 12: 259-279.
- 29.- Rogers, H.J. and Perkins, H.R. 1968. Cell wall and membranes. Spon L.T.D. London 436 p
- 30.- Rudolph, K., Stahmann, M.A. 1966. The accumulation of L-ornithine in halo blight infected bean plants (Phaseolus vulgaris) induced by toxin of the pathogen Pseudomonas phaseolicola (Burk) Dows. *Phytopathology* 57: 29-46.
- 31.- Shaad, N.W. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Univ. Georgia, 72 p.
- 32.- Schuster, M.L. 1958. A method for testing resistance of beans to bacterial blights. *Phytopathology* 45: 519- 520.
- 33.- Schuster, M.L. 1950. A genetic study of halo blight reaction in Phaseolus vulgaris. *Phytopathology* 40: 604-612 .

- 34.- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1981
Ecotecnia agrícola. Consumos aparentes de productos agrícolas 1925-1980. No. 9 (5).
- 35.- Siden, S.L, Durbin, R.D. 1969. Some comparisons of Chlorosis-inducing pseudomonad toxins. *Phytopathology* 59: 249-250.
- 36.- Smith, A.G., Rubery, P.H. 1979. N-phosphoglutarat does not behave as an active component of the exotoxin of Pseudomonas phaseolicola the causative agent of halo blight of beans. *Physiology Plant Pathology* 15: 269-278.
- 37.- Stapp, C. 1961. Bacterial plant pathogens. Oxford Univ. Press Ed. Great Britain. 292 pp.
- 38.- Westcott, C. 1971. Plant disease handbook. 3 rd. Ed. Van Nostrans Reinhold Company. 843 pp.
- 39.- Yerkes, D.W. 1959. Enfermedades y plagas del frijol en México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Folleto de divulgación No. 39: 49.
- 40.- Yerkes, D.W. et al. 1964. Enfermedades del frijol en México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Folleto de divulgación No. 15 : 29.
- 41.- Zauneyer, W.J. 1932. Comparative pathological histology of three bacterial diseases of bean. *Jour. Agric. Res.* 44 : 605-632.
- 42.- Zauneyer, W.J. and Thomas, R.H. 1957. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S.D.A. Tech. Bull. No. 368. 255 p.