

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMIA



Detección e Identificación de Hongos y Bacterias en Semillas de Cuatro Materiales Criollos de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) del Municipio de la Independencia, Chiapas.

Por:

VIDAL HERNANDEZ GARCIA

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Octubre del 2003

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMIA



Detección e Identificación de Hongos y Bacterias en Semillas de Cuatro Materiales Criollos de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) del Municipio de la Independencia, Chiapas.

Por:

VIDAL HERNANDEZ GARCIA

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Octubre del 2003

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Detección e Identificación de Hongos y Bacterias en Semillas de Cuatro Materiales Criollos de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) del Municipio de la Independencia, Chiapas.

Por:

VIDAL HERNANDEZ GARCIA

T E S I S

**QUE SE SOMETE A CONSIDERACION DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:**

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

APROBADA POR:

EL PRESIDENTE DEL JURADO

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE

**M.C. Ma. ELIZABETH GALINDO CEPEDA
SINODAL**

**M.C. Ma. MAGDALENA RODRÍGUEZ VALDES
SINODAL**

EL COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMIA

M.C. ARNOLDO OYERVIDES GARCIA

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO, OCTUBRE DEL 2003

AGRADECIMIENTO

Con cariño a la **UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**, por haberme abierto sus puertas y envolverme en su seno, además de darme los más sabios conocimientos para terminar mis estudios profesionales y ser siempre un hombre de bien ante todos las adversidades que hay en la vida.

Al **Departamento de Parasitología** y a todas aquellas personas que ahí trabajan por su gran atención brindada.

El autor expresa su humilde y profundo agradecimiento al **M.C. Abiel Sánchez Arizpe**, por la oportunidad brindada para realizar esta investigación, por su magnifica y acertada asesoría para la culminación de este trabajo; a sí como, mis mas sinceras gracias por su amistad.

A la **M.C. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda** y a la **M.C. Ma. Magdalena Rodríguez Valdés**, por su invaluable asesoría y sugerencias para la mejor realización y culminación de esta investigación, mil gracias.

A la **Biol. Guillermina Reina Sustaita**, por su valiosa labor desempeñada y apoyo incondicional para la realización de esta investigación.

A la **TLQ Sandra Sánchez**, del Departamento de Semillas, por su colaboración en las pruebas de Vigor y Germinación.

A todos **mis Maestros**, por transmitirme parte de sus conocimientos durante mis estudios.

A mis **Amigos y Compañeros de la Generación XCIV** y a todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en mi formación profesional durante mi estancia en la Universidad.

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen de Guadalupe, quienes me han guiado por el mejor camino e iluminado en aquellos momentos tan difíciles que hay en la vida y por ser siempre mi mayor aliento durante mis estudios hasta lograr mis objetivos que tenía desde un principio.

A MIS PADRES:

Vidal Hernández Pérez

María Luz García Vásquez

A él quien me ha enseñado desde pequeño que para ser alguien en la vida, primero tienes que sufrir librando obstáculos que se presente en el camino, además por la admiración que le tengo ya que a su edad sigue cultivando la tierra y es para mí el mejor campesino que hay en mi pueblo.

A ella por darme buenos principios, educación, deseos de superación y todos los sacrificios realizados para poder llegar en el lugar en donde me encuentro ya que sin su ayuda nunca hubiera logrado este paso.

Por eso, les brindo este trabajo en premio a su gran amor, cariño y en agradecimiento a tantos esfuerzos, lo que he conseguido se los debo a ustedes, gracias.

Mil gracias por tener confianza en mí, espero nunca defraudarlos.

A MIS HERMANOS:

Salomón

Reynaldo

Clara Luz

Dany

Jhonny

Hiver Hugo

Por su incondicional apoyo moral y económico, por su comprensión durante la realización de mi carrera, por que al lado de ustedes he pasado felices y tristes momentos de la vida; gracias por compartir cada momento y por depositar en mi la confianza; recordándoles también que un hijo no solo es decir “papás”, un verdadero hijo es agradecimiento, alegría, humildad y lo primordial obediencia.

A LUCY que es la luz de mi vida, fuente de mis alegrías, refugio de mis pensamientos y arrullo de mi soledad, por que eres para mi y siempre serás mi gran amor. Gracias por el cariño y apoyo incondicional durante los momentos difíciles que hemos pasado juntos.

A MI SOBRINITA:

Yeimy Yarity

Por la bonita alegría que haz traído a la familia y por ser la primer sobrina que tenemos, se que aun no entiendes esto, pero cuando aprendas a leer acuérdate de los que te queremos juguetona.

A MIS PRIMOS Y AMIGOS:

Por su gran apoyo moral, con quienes he convivido y disfrutado grandes momentos de mi vida; a ustedes les deseo el mejor de los éxitos donde quieran que se encuentren.

INDICE DE CONTENIDO

	Págs.
AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
INTRODUCCION	1
Justificación.....	3
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISION DE LITERATURA	4
Importancia de las Enfermedades Transmitidas por Semilla.....	4
Importancia de las Pruebas de Sanidad para Semillas.....	5
Enfermedades Fungosas y Bacterianas Transmitidas por Semillas.....	6
Enfermedades Fungosas Transmitidas por Semillas de Fríjol.....	8
Pruebas de Sanidad de Hongos.....	9
Prueba de papel secante.....	9
Prueba de agar.....	10
Método de toallas enrolladas.....	10
Inspección de semillas secas.....	11
Prueba de síntomas de plantas.....	11
Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Semillas de Fríjol.....	12
Pruebas de Sanidad para Bacterias.....	13
Tinción de Gram.....	14
Prueba en medios selectivos.....	14
Prueba de serología.....	14

Prueba de sintomatología de plantas.....	15
Pruebas bioquímicas.....	15
Prueba de Germinación.....	16
Prueba de Vigor.....	17
MATERIALES Y METODOS.....	18
Evaluación de la Microflora.....	18
Flora fungosa.....	18
Flora bacteriana.....	19
Pruebas Realizadas para la Identificación de Género de la	
Bacteria Problema.....	21
Tinción de Gram.....	21
Prueba de Ryo.....	22
Tinción de flagelos.....	22
Producción de citocromo oxidasa.....	23
Prueba de catalaza.....	23
Metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa.....	24
Hidrólisis de almidón.....	24
Pruebas de patogenicidad.....	25
Pruebas Realizadas para la Identificación de especie	
de <i>Bacillus</i>	25
Crecimiento a 45 ⁰ C y un pH de 5.7 en “caldo de caseína plus”.....	25
Crecimiento en NaCl al 7 %.....	25
Crecimiento utilizando citratos.....	26
Prueba de crecimiento anaeróbico en glucosa.....	26

Producción de ácidos a partir de carbohidratos (Arabinosa).....	27
Producción de ácidos a partir de carbohidratos (Manitol).....	27
Evaluación de la Germinación y el Vigor.....	28
Diseño Experimental.....	29
RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES.....	40
LITERATURA CITADA.....	41
RESUMEN.....	45
APENDICE.....	46

INDICE DE CUADRO

Cuadro	Páginas
4.1	Resultados de las Pruebas Bioquímicas para Género de los aislamientos obtenidos de Semillas de Fríjol Criollo. Departamento Parasitología. UAAAN2003.....31
4.2	Resultados de las Pruebas Bioquímicas para Especie de los aislamientos obtenidos de Semilla de fríjol Criollo. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....32
4.3	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Negro trepador del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN. 2003.....34
4.4	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Negro arbustivo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....34
4.5	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Blanco del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....35
4.6	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Colorado del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....35

4.7	Capacidad de Germinación (%) de Semilla de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....	37
4.8	Vigor (%) en Semillas de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....	37
8.1	Análisis de Varianza el Hongo <i>Alternaria alternata</i> en los Cuatro Materiales de Fríjol Criollo. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....	47
8.2	Análisis de Varianza el Hongo <i>Hansfordia sp</i> en los Cuatro Materiales de Fríjol Criollo. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....	48
8.3	Análisis de Varianza para la Capacidad de Germinación (%) de Semillas de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....	49
8.4	Análisis de Varianza para Vigor (%) de Semillas de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....	50

INDICE DE GRAFICAS

Grafica	Páginas
4.1	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Negro trepador del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN. 2003.....31
4.2	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Negro arbustivo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....32
4.3	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Blanco del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....33
4.4	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Colorado del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....33
4.5	Incidencia de <i>Alternaria alternata</i> detectado en el Análisis de la Semilla de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....42

4.6	Incidencia de <i>Hansfordia sp</i> detectado en el Análisis de la Semilla de Cuatro Materiales de Frijol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.....	42
-----	--	----

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía	Páginas
8.1	Fotografías que muestra al hongo <i>Aspergillus flavus</i> tomada de la Semilla del Fríjol Criollo Negro trepador,62
8.2	Fotografía que muestra al hongo <i>Alternaria alternata</i> tomada de la Semilla del Fríjol Criollo Negro trepador y Blanco.....62
8.3	Fotografías que muestra al hongo <i>Hansfordia sp.</i> tomada de la Semilla del Fríjol Criollo Negro trepador y Blanco.....63
8.4	Fotografía que muestra al hongo <i>Rhizoctonia solani</i> tomada de la Semilla del Fríjol Criollo Blanco.....63
8.5	Fotografías que muestra al hongo <i>Penicillium sp.</i> tomada de la Semilla del Fríjol Negro arbustivo.....63
8.6	Fotografía que muestra al hongo <i>Cladosporium sp.</i> en la Semilla del Fríjol Criollo Colorado.....63
8.7	Fotografía que muestra al hongo <i>Fusarium oxysporium</i> en la Semilla del Fríjol Criollo Colorado.....64

8.8 Fotografía que muestra al hongo *Coniothyrium sp.* tomada
de la Semilla del Fríjol Criollo Blanco.....64

8.9 Fotografía que muestra al hongo *Chaetomium sp.* tomada
de la Semilla del Fríjol Criollo Blanco.....64

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), es un cultivo cuyo grano, con alto contenido de proteínas, ha tenido un papel importante en la alimentación del hombre desde que se recolectaba hasta la actualidad; el cultivo, está distribuido en todo el planeta incluyendo toda América, Europa, Asia y Africa, encontrándose en lugares que oscilan entre cero a 2200 msnm, es decir, en climas que van de templado hasta tropicales y secos.

Después del maíz, el frijol es el cultivo más importante en México por la superficie que se siembra, por la actividad económica que genera y por el volumen de grano consumido por persona. Hasta ahora, debido por su bajo costo, es la principal fuente de proteínas para la población rural y urbana de bajos ingresos.

En la comida mexicana constituye un elemento indispensable, considerándose un consumo per-cápita de 15 Kg por año, lo que constituye una demanda de 1.2 millones de toneladas; además ocupa el segundo lugar en superficie cultivada (2 028 000 ha), y el tercer lugar por volumen de producción anual de básicos (5.6 %).

La producción se distribuye prácticamente en todos los estados de la Republica Mexicana; sin embargo en cuanto a superficie y producción, destacan los Estados de Zacatecas, Sinaloa, Durango, Nayarit, Chihuahua, Jalisco, Tamaulipas, Guanajuato, Puebla y Chiapas. Los estados de Zacatecas, Nayarit, Sinaloa y Jalisco, además de tener una alta producción de grano, destacan por sus altos

rendimientos. Es importante observar que la producción se ha incrementado considerablemente por un aumento en la superficie sembrada y no por rendimiento.

En México se cultiva en dos millones de hectáreas, aproximadamente, que produce un volumen de un millón de toneladas dependiendo de las condiciones climáticas, con un rendimiento promedio nacional de 559 Kg por hectárea. El 90 % es de temporal y se produce en dos épocas, Primavera – Verano y Otoño – Invierno; cultivándose bajo dos sistemas de producción: frijol solo y asociado con maíz.

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L) es uno de los principales cultivos en Chiapas, del cual se siembra alrededor de 130 369 hectáreas con un rendimiento promedio de 560 Kg por hectárea de temporal, igualando al rendimiento a nivel nacional; cuya producción además de satisfacer las demandas del Estado también se comercializa en otras entidades de la nación.

Los bajos rendimientos en Kg/ha de frijol en Chiapas en comparación a otros estados se deben a varios factores limitantes, entre estos uno de los más importantes son las enfermedades, las cuales son causadas por microorganismos (hongos, bacterias, virus, nematodos y organismos tipo fitoplasma), que pueden ocasionar daños hasta del 100 % en regiones productoras donde las condiciones climáticas como temperatura, humedad relativa y precipitación pluvial favorecen el desarrollo de uno o varios patógenos.

Cabe señalar también que debido al incremento del costo de semilla certificada, los campesinos utilizan semilla de la cosecha anterior, la cual pudo o tiene alta incidencia de enfermedades asegurándose con esto una mayor infección para el siguiente ciclo al no separar la semilla manchada portadora de uno o varios patógenos tales como antracnosis, tizones bacterianos, mancha redonda, mancha angular, moho blanco y variantes del mosaico común; tales enfermedades se desarrollan cuando existe las condiciones favorables causando daños considerables, matando en ocasiones el cultivo completo y causando grandes pérdidas económicas al productor.

Justificación:

El Municipio de la Independencia, Chiapas actualmente enfrenta fuertes problemas de Fitosanidad por la Incidencia de un complejo patogénico en los que se encuentra el frijol, por lo que es de gran importancia evaluar estos materiales para conocer la severidad de hongos y bacterias para tener una buena productividad con su previo control.

Por lo anterior se menciona el **Objetivo** de este trabajo:

Detectar e Identificar los hongos y bacterias fitopatógenos en semillas de cuatro materiales criollos de frijol.

Hipótesis

En el Municipio de la Independencia, Chiapas la presencia del hongo *Colletotrychum lindemutheanum* y *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli* afectan la calidad fisiológica de la semilla de frijol.

REVISION DE LITERATURA

Importancia de las Enfermedades Transmitidas por Semillas

La Economía Agrícola mundial sufre, anualmente, significativos menoscabos debido a enfermedades causadas por agentes de diversa índole, entre los cuales figuran principalmente los hongos, bacterias, virus y nemátodos. Aún en países de grandes recursos científicos y técnicos, se habla en pérdidas que en forma global fluctúan entre el siete y el diez por ciento de la cosecha total (Romero, 1993).

Las enfermedades de las plantas son importantes para el hombre debido a que perjudican a las plantas y sus productos. Para los millones de personas que habitan la tierra y cuya existencia depende de los productos vegetales, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una vida normal y acosada por el hombre, o incluso conducir a la muerte por inanición (Agrios, 1995).

Las enfermedades de las plantas son indudablemente uno de los factores principales que limitan la productividad de los cultivos agrícolas en todas las regiones del mundo (Brathwaite *et al.*, 1995)

Los organismos transmitidos por semillas son propagados por la semilla o transportados con ésta y sobreviven como espora o estructuras en reposo dentro de la semilla y sobre ella. Ambos tipos de organismos pueden constituir un mecanismo mediante el cual un agente patógeno puede ser introducido en una zona donde

originalmente no existía y por consiguiente causar grandes pérdidas en los cultivos al enfermarlos (Warham *et al.*, 1991).

Las enfermedades de las semillas son uno de los factores que provocan el deterioro de la misma, además de las condiciones climáticas anteriores a la cosecha, la madurez de la semilla, el daño mecánico, el ambiente de almacenamiento (temperatura y humedad), los insectos y los genes (Warham *et al.*, 1991).

Las enfermedades más importantes transmitidas por semillas de frijol son la antracnosis, tizón bacteriano común y tizón bacteriano del halo (Kreitlom *et al.*, citado por USDA, 1980).

Importancia de las Pruebas de Sanidad para Semillas

Las semillas de gran calidad a parte de tener una gran capacidad de germinación y vigor deben estar exentas de enfermedades transmitidas por las semillas (Warham *et al.*, 1991).

La semilla son portadoras de una microflora que varia según la especie hospedera; esto se aplica especialmente a las microfloras arraigadas a más profundidad, aun que en la superficie también puede haber muchos huéspedes accidentales. La microflora transmitida por la semilla puede ser identificada empleando pruebas de sanidad de las semillas (Warham *et al.*, 1991).

Los patógenos llevados en las semillas afectan directa o indirectamente la calidad de la semilla en el comercio (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1980).

El conocer el estado sanitario de un lote de semillas permite evitar la transmisión de nuevas enfermedades o el incremento del área infectada ya existente implementando medidas preventivas (Peretti, 1994).

Besnier (198), señala que los métodos de ensayo del estado sanitario de las semillas deben ser rápidos, económicos y dar resultados reproducibles de interpretación estadística; y que salvo casos muy concretos, no existe en general una correlación segura y estrecha entre el grado de infección de las semillas y el nivel de infección de las plantas.

Enfermedades Fungosas y Bacterianas Transmitidas por Semillas

Moreno y Zamora (1978), señalan que muchos hongos presentes en las semillas son conocidos por descomponer la celulosa de las semillas, como: *Alternaria*, *Fusarium*, etc. Adicionalmente estos microorganismos pueden ser activadores o supresores de la germinación de la semilla a través de sus toxinas; a la vez el desarrollo de los hongos en los granos antes o durante el almacenamiento lleva una reducción en el valor de la cosecha por pérdida de peso y deterioro en la calidad del grano. Lo más importante es el hecho de que esta contaminación resulte ser un riesgo para la salud humana y animales, tales géneros de hongos como: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Mucor*.

Moreno (1988), reporta que los granos y semillas son invadidos por diversos hongos en el campo, entre ellos: *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y muchos otros que causan enfermedades a las plantas y que son transmitidas de un ciclo a otro a través de las semillas.

Las semillas infectadas con patógenos llevados en ellas, pueden sufrir en el campo una reducción en su población debido a que los patógenos atacan y matan a las plantas (Anderson *et al.*, citado por USDA, 1980).

Debido a la destructividad de la pudrición negra causada por la bacteria *Xanthomonas campestris* y la pata negra causada por el hongo *Phoma lingam* ambos patógenos llevados en las semillas; la producción de semillas de col, coliflor, colinabo y nabo, así como la de frijol y chicharo se cambió del este y medio oeste de los Estados de la costa del pacifico en Estados Unidos (Kreitlow *et al.*, citado por USDA, 1980).

Moreno y Zamora (1978), mencionan que en la semilla de chicharo el hongo *Micosphaerella pinoides* presenta una situación difícil de controlar. El hongo crece directamente dentro de la semilla y dentro del hipocotilo de la nueva plántula.

El chancro bacteriano del tomate, es una enfermedad llevada en la semilla y causada por *Corynebacterium michiganense*, se encuentra en tomates cultivados en el campo de Nueva Jersey a California en varios de los Estados surianos de Estados Unidos. Además que otra enfermedad bacteriana que se propaga en la semilla es la

mancha angular del pepino causada por *Pseudomonas lachrymans* y que se presenta principalmente en regiones húmedas (Kreitlow *et al.*, citado por USDA, 1980).

Enfermedades Fungosas Transmitidas por Semillas de Frijol

Kreitlow *et al.*, citado por USDA, (1980), señala que la enfermedad llamada antracnosis, ocasiono daños severos que costo varios millones de dólares al año por perdidas en el cultivo de frijol en los Estados Unidos; además que puede invernar en los restos de las plantas e infectar el cultivo al año siguiente si se presentan las condiciones favorables y no se hace una rotación con otro cultivo,

Colletotrichum lindemuthianum puede sobrevivir como micelio dentro de la testa de la semilla y como espora entre los dos cotiledones, haciendo la semilla una de las fuentes principales de inoculo para causar epidemias (SARH, 1992).

La mustia hilachosa producida por *Thanatephorus cucumeris* puede transmitirse por semilla cuando los daños son severos y llegan a las vainas dañando la semilla (SARH, 1992).

La pudrición carbonosa del frijol ocasionada por *Macrophomina phaseolina* es de importancia secundaria en México ya que nunca ha causado daños considerables a pesar de que se transmite por semillas, esta básicamente afecta el sistema

radicular y el tallo de la planta de frijol. Su mayor incidencia se observa en clima cálido y cuando se presentan condiciones que favorezcan la sequía (SARH, 1992)

Pruebas de Sanidad para Hongos

Andersen *et al.*, citado por USDA (1980), señala que existe varios métodos para descubrir los hongos que pueden ser llevados por semillas.

Muchos hongos pueden ser detectados haciendo observaciones directas en semillas usando microscopio estereoscopio o una lupa para detectar decoloraciones de semillas anormales, morfológicas o estructuras fructíferas asociadas con la semillas (Agarwal y Sinclair, 1987).

Besnier, (1988), menciona que los objetivos de los ensayos fitosanitarios es la detección e identificación de agentes patógenos presentes en semillas, así como la apreciación de los daños causadas en ellas y la previsión de los posibles problemas de las infecciones existentes.

Prueba del papel secante

Colocar semillas desinfectadas o sin tratar en papel secante húmedo e incubarlas a temperaturas específicas, es muy usada para descubrir algunos patógenos llevados en las semillas (Anderson *et al.*, citado por USDA, 1980).

Después de la incubación de la semilla durante un tiempo determinado, se identifican los patógenos desarrollados por el examen de semillas individuales para descubrir la presencia de cuerpos fructíferos de los hongos (Anderson *et al.*, citado por USDA, 1980).

Pruebas de agar

Las pruebas de agar es un método ampliamente usada para descubrir hongos presentes en semillas, las cuales se desinfectan y se colocan en las cajas que después de unos días de incubación presentan los patógenos que serán identificados por sus características bajo el microscopio. Los medios mas usados en las pruebas de agar son: Agar con extracto de Malta y Papa, así como el Dextrosa Agar (Anderson *et al.*, citado por USDA, 1980).

Método de toallas enrolladas

En este método que es utilizado para detectar principalmente *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol, se utilizan de 200 a 400 semillas que se desinfectan con hipoclorito de sodio al uno por ciento durante 10 minutos y se colocan 50 semillas en una hoja de papel empapada de agua distribuida uniformemente y se cubre con otra hoja de papel también empapada, para luego enrollarse y cubrirlas con polietileno para mantener la humedad durante la incubación (Anselme y Champion, 1981).

Inspección de semillas secas

En el examen de las semillas secas mediante el microscopio estereoscopio se observan un gran número de patógenos mezclados con las semillas como esclerocios o que han transformado la semilla en estructuras fungosas (Anderson *et al.*, citado por USDA, 1980).

Peretii, (1994), señala que esta prueba se realiza directamente con la ayuda de una lupa y proporciona información rápida sobre la sanidad de la semilla.

Besnier (1988), menciona que la semilla seca se examina a simple vista para detectar esclerocios así como manchas en la superficie de las semillas que pudieron ser atacadas por bacterias y antracnosis en frijol, posteriormente se examinan en el microscopio estereoscopio buscando estructuras fungosas sobre las semillas, por lo que cabe señalar que esto solo tiene un valor orientativo y no es mas que un paso para comprobar la infección de patógenos en las semillas.

Prueba de síntomas de plantas

El examen de plántulas no se considera un método satisfactorio en las pruebas de sanidad debido al tiempo requerido, dificultad para examinar las plántulas y los posibles error en la identificación de los agentes causantes de las lesiones observadas ya que diferentes agentes pueden presentar los mismos síntomas (Besnier, 1988).

Hay hongos difíciles de detectar por los métodos anteriores y que se pueden identificar sembrando las semillas en el laboratorio o invernadero sobre suelo, arena y ladrillo molido, donde la identificación se basa en los síntomas de las enfermedades presentadas en las plántulas (Anderson *et al.*, citado por USDA, 1980).

Enfermedades Bacterianas Transmitidas Por Semillas de Frijol

De acuerdo con Oku citado por (Sosa-Moss, 1996), aunque en la naturaleza el número de bacterias formalmente descritas es de alrededor de 1600, menos de 200 son consideradas como responsables de causar enfermedades en las plantas.

El tizón bacteriano común y tizón bacteriano de halo causado por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, son las enfermedades bacterianas más importantes del frijol y ambas se transmiten por semillas (Kreitlow *et al.*, citado por USDA, 1980).

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* vive en semillas y residuos vegetales que han sido infectados y que se encuentran cerca de la superficie del suelo. Cuando prevalece una alta humedad relativa, la bacteria penetra a la planta a través de lesiones o de los estomas. Esta distribuida en regiones principalmente con climas templados y donde prevalecen temperaturas moderadas (SARH, 1992).

SARH (1992), menciona que *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* puede sobrevivir en semillas hasta por 3, 10 y 15 años de edad aún habiendo estados variables y virulentos y que los factores climáticos que favorecen la infección de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* son la alta temperatura (28 °C) y la alta humedad relativa (80 a 90 por ciento).

Pruebas de Sanidad para Bacterias

Demostrar que una bacteria está involucrada en un proceso patológico vegetal, es más difícil que en el caso de los hongos, debido a que son de tamaño muy pequeño, a que no contrastan con los tejidos afectados y a que es necesario lograr una purificación absoluta para conocer sus características (Sosa-Moss, 1996).

La detección de bacterias transmitidas por semillas se requiere técnicas más complicadas que las utilizadas para hongos y que solo se ha detectado la transmisión de seis géneros de bacteria: *Agrobacterium*, *Clavibacter* (antes *Corynebacterium*), *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, de las cuales las más importantes son las del género de *Xanthomonas*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Corynebacterium michiganense* (Besnier, 1988).

Tinción de Gram

Esta es una técnica de coloración diferencial que permite dividir a las bacterias en dos grandes grupos. En el primero se tiñen de morado y se llamas “Gram Positivo” y las del segundo se colorean de rosa y son llamadas “Gram negativas”. Esta técnica es esencial en fitopatología ya que casi todos los géneros de bacterias que atacan a las plantas son Gram negativas, a excepción de *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Clostridium* y *Bacillus* que son Gram Positiva (Brathwaite *et al.*, 1995)

Prueba de medios selectivos

De la Isla (1984), señala que Kado y Heskett publicaron trabajos sobre identificación de los géneros *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* mediante el uso de medios selectivos y este método puede ser mas sencillo y aceptado que los empleados tradicionalmente.

Prueba de serología.

Agrios (1995), menciona que este método es en el que se utiliza la especificidad de una reacción antígeno-anticuerpo para detectar e identificar las sustancias antigénicas y a los organismos que las portan.

Besnier (1988), señala que los métodos serológicos se basan en reacciones de precipitación y aglutinación que se producen entre antígenos y anticuerpos. Los antígenos son sustancias extrañas que se introducen en la sangre de los animales y los anticuerpos son sustancias que se producen en la sangre de los animales para su defensa. Además los anticuerpos contenidos en el antisuero preparado con la sangre de los animales a los que se les a inyectado bacterias fitopatógenas, puede servir para la detección de bacterias existentes en las semillas.

La técnica de serología se emplea las propiedades antigénicas de los microorganismos y que no existe una estrecha relación entre los aislamientos de bacterias fitopatógenas y sus propiedades antigénas. También que los aislamientos de bacterias del mismo hospedante puede resultar serológicamente idénticas, por lo cual estas pruebas no se usan con amplitud en identificación (De la Isla, 1984).

Prueba de sintomatología de plantas

Este método consiste en promover la germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas en ambiente adecuado para que aparezcan los síntomas de las infecciones en razón de estos síntomas característicos para después aislar los exudados bacterianos de las lesiones cultivándolos en medios selectivos confirmando así la infección (Besnier, 1988).

Pruebas bioquímicas

Relativamente pocos caracteres diferenciados se requieren para identificar los géneros predominantes de las bacterias fitopatógenas de las plantas. Pueden ser divididos convenientemente en dos: los que se aíslan y reaccionan fácilmente en medios bacteriológicos estándares y los que no lo son (Schaad, 2001).

Para la distinción de géneros y especies de bacterias se utilizan sus características bioquímicas, como metabolismo de ciertos azúcares, producción de enzimas pectolíticas y tolerancia a ciertos compuestos tóxicos (De la Isla, 1984).

Pruebas de Germinación

Warhan *et al.*, (1991), menciona que las pruebas de germinación de semillas siguen siendo el criterio más importante y el más aceptado internacionalmente para medir la variabilidad de la semilla.

Warhan *et al.*, (1991), señala que en las pruebas de germinación de las semillas es necesario sembrar en un substrato uniforme como: toallas de papel enrollado, arena esterilizada, entre otros; e incubarlas a temperaturas óptimas para que germinen; después de transcurrido el periodo de incubación, se determina el número de plántulas normales, el número de plántulas anormales y el número de semillas no germinadas.

Las pruebas de germinación son el medio mas objetivo para producir y evaluar el potencial de germinación de las semillas, las cuales se colocan bajo condiciones controladas muy precisas consideradas como óptimas para la semilla que se está evaluando durante determinados periodos de tiempo (Sayers, 1982).

Peretti (1994), menciona que para evaluar los resultados del ensayo de germinación, se realiza la lectura del material durante su procesamiento y al termino de éste. Para ello, dentro de cada repetición se determina el número de semillas y plántulas que integran cada una de las siguientes categorías: plántulas normales, plántulas anormales, semillas duras, semillas frescas no germinadas y semillas muertas.

Prueba de Vigor

La Asociación Internacional de Analistas de Semilla, 1977; citado por Sayers (1982), define vigor como la suma de aquellas propiedades que determinan el nivel potencial de actividad y comportamiento de una semilla o lote de semilla durante la germinación y emergencia de plántulas.

Warham *et al.*, (1991), reporta que en lotes de semilla de alta germinación, las pruebas de germinación por si solas no arrojan información suficiente sobre el probable comportamiento en el campo. Es por esto que el vigor de la semilla se vuelve un factor importante y que las pruebas de vigor son necesarias. Las pruebas de vigor de las semillas se basan en la simulación de las condiciones ambientales

adversas durante el almacenamiento o la emergencia en campo como son: prueba en frío, prueba con envejecimiento acelerado y prueba de vigor con estrés complejo.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología, así como en el Laboratorio de Ensayo de Semillas del Departamento de Fitomejoramiento, ambos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México.

Los materiales criollos de frijol utilizadas en este trabajo y que se cosecharon en el ciclo otoño – invierno del 2002 - 2003, fueron traídos del Municipio de La Independencia, Chiapas; con una ubicación de $16^{\circ} 14' 59''$ latitud norte y $92^{\circ} 1' 23''$ longitud oeste y a una altitud de 1300 msnm; colinda al norte y al este con el Municipio de las Margaritas, al sureste con la República de Guatemala, al sur con el Municipio de la Trinitaria y al oeste con el de Comitán.

Evaluación de la Microflora

Flora fungosa

Se utilizó el método del papel secante cuyo procedimiento es el siguiente:

Se tomaron 200 semillas de frijol de cada material criollo; estos son: Negro trepador, Negro arbustivo, Blanco y Colorado; previamente fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al uno por ciento durante diez minutos, enjuagándolas después con agua destilada para limpiar el hipoclorito de sodio. La siembra se llevó a cabo en la cámara de transferencia utilizando cajas de plástico

transparente y papel secante, donde las 200 semillas de cada grupo se distribuyeron en cuatro repeticiones con 50 semillas cada una. A cada caja se colocaron 3 capas de papel secante humedecido siguiendo con la colocación de las 50 semillas uniformemente, posteriormente las cajas se sellaron con clean-pack anotando datos para su respectiva identificación. Las cajas se colocaron sobre una mesa a temperatura ambiente (25°C) durante 25 días en espera del crecimiento de la microflora fungosa. Después de este tiempo se observaron las colonias fungosas a simple vista ya que algunas se desarrollaron rápidamente y otras tardaron más días; por último se realizaron montas permanentes con lactofenol de todos los diferentes tipos de hongos que se encontraron en las semillas y se procedió a la identificación de los hongos con la ayuda de un microscopio compuesto y con las claves de Barnett y Hunter, 1987 y Romero, 1993, registrando los hongos encontrados.

Flora bacteriana

Se utilizó la técnica de “Aislamiento de Diluciones sucesivas y Dispersión” cuyo procedimiento es el siguiente:

Primera se tomaron 12 gramos de semilla aleatoriamente de cada material de los cuales solo se utilizó un gramo de cada material para las disoluciones, previamente se lavaron las semillas con agua destilada estéril para limpiar los residuos de suelo u otro contaminante que podría traer, posteriormente se maceró cada gramo de los materiales y se colocaron con unas pinzas previamente flameadas en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, para así obtener una solución exponente 10^{-1} (solución inicial); una vez hecho esto, en la cámara de

transferencia, la cual había sido previamente desinfectada con alcohol etílico se realizaron las diluciones de la siguiente manera: con una pipeta esterilizada y a punta de mechero se colocó 1 ml de la solución inicial 10^{-1} en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, obteniendo así la solución 10^{-2} para después tomar de esta solución 1 ml para depositarlo en un segundo tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, obteniendo así la última solución 10^{-3} , todo esto a punta de mechero y para los cuatro materiales (Sosa-Moss, 1996).

Se vació los medios de cultivo, utilizando las diluciones hechas, para ver en que concentraciones crecería mejor las colonias bacterianas; El vaciado se hizo de la siguiente manera: con una pipeta estéril y a punta de mechero se vació sembró 0.1 ml de cada una de las diluciones de cada material hechas, en cajas petri con agar KB (apéndice) y YDC (apéndice); las cuales estaban etiquetadas con las concentraciones utilizadas y tipo de material. Posteriormente con una varilla de Drigalski (varilla de vidrio delgada o doblado en forma de L) previamente flameada y a punta de mechero se esparció la muestra haciendo girar la caja petri y repitiendo lo mismo con la varilla de vidrio con la finalidad de no concentrar el crecimiento en un solo punto de la superficie del medio del cultivo, de esta misma manera se procedió con las otras diluciones, una vez concluido esto, las cajas de medios de cultivo sembradas se sellaron con clean-pack y se colocaron de manera invertida en la incubadora a 28°C (Sosa-Moss, 1996).

Las colonias desarrolladas de la siembra realizada en los diferentes medios, se seleccionaron en cuanto a forma y característica de crecimiento en cada uno de

los medios; haciendo uso de una asa bacteriológica previamente flameada y con la ayuda del estereoscopio se tomo una porción de únicamente dos colonias seleccionadas, ya que las demás se trataban de saprofitas por su forma de crecimiento y de esta manera se purificaron por estría cruzada una nueva caja de medio de cultivo del mismo tipo de donde se había extraída. Las cajas se sellaron con clean-pack y se colocaron otra vez de manera invertida en la incubadora a 28⁰C (Sosa-Moss, 1996).

Pruebas realizadas para la identificación de Género de la Bacteria problema

Tinción de Gram

Desarrollada la bacteria el primer paso fue hacer una Tinción de Gram para saber si esta era Gram (+) o Gram (-), para esto en un portaobjeto previamente etiquetado se coloco una gota de agua destilada estéril y a punta de mechero se tomo una porción de la masa bacteriana y se hizo un frotis, el cual se fijo a la flama y se dejo secar a temperatura ambiente; posteriormente bajo la llave de agua y sobre un puente de vidrio se colocaron los porta objetos, a los cuales sobre el frotís se le adiciono la solución de cristal violeta dejándola actuar por un minuto, luego se decanto el colorante y se lavo con agua de la llave a chorro lento para después aplicar la solución de lugol, la cual se dejo actuar también por un minuto y nuevamente se decanto el colorante lavando el frotis con alcohol-acetona hasta observar que no se desprendiera más colorante, lavándose en segundos con agua de la llave, esto para impedir que el alcohol-acetona siguiera actuando;

inmediatamente se le adiciono la solución de safranina y se dejo actuar por un minuto, transcurrido ese tiempo se decanto el colorante, se lavo el frotis con agua de la llave y se dejo secar a temperatura ambiente para después adicionarle una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio compuesto en un aumento de 100 X (Rodríguez, 1994).

Prueba de Ryo

Para corroborar los resultados de la Tinción de Gram se realizo esta prueba, la cual consistió en suspender una pequeña muestra bacteriana en una gota de KOH al 3% sobre un porta objetos, el cual se froto con una asa bacteriológica previamente flameada y levantarla para observar si había o no la formación de un hilo mucoide a partir de la muestra bacteriana.

Tinción de flagelos

Esta prueba consistió en colocar casi en uno de los extremos del porta objetos una gota de agua destilada estéril y con una asa bacteriológica previamente flameada, a punta de mechero se tomó un poco de crecimiento bacteriano desarrollado en el medio y se deposito en la gota de agua frotando suavemente para que se formara una suspensión. Se inclino el porta objetos hacia uno de los extremos de tal manera que la gota se deslizara a lo largo de este, se dejo secar a temperatura ambiente, enseguida se colocaron los porta objetos sobre un puente de vidrio en donde se le adiciono la solución de mordente de flagelos dejándolo actuar

durante cinco minutos, transcurrido este tiempo se decanto la solución y se enjuago el frotis a chorro lento con agua de la llave; enseguida se le adiciono el cristal violeta y se dejo actuar por dos minutos, se decanto la solución y se enjuago con agua de la llave, teniendo cuidado en estos pasos que el agua no cayera de golpe sobre la preparación, se dejo secar a temperatura ambiente y adicionando una gota de aceite de inmersión se observo al microscopio compuesto en un aumento de 100 X (Rodríguez, 1994).

Producción de citocromo oxidasa

En un tira de papel filtro se coloco una gota de la solución acuosa al 1 % de N,N, dimetil para fenil diamina, inmediatamente después y con ayuda de un asa de platino previamente flameada, se deposito sobre el reactivo un poco de masa bacteriana, esperándose alrededor de 20 segundos para ver si se observaba un cambio de coloración del reactivo (Rodríguez, 1994).

Prueba de la catalaza

Para esta prueba se coloco una gota de agua oxigenada en un porta objetos y sobre esta se coloco una porción de masa bacteriana y se frotó para observar la presencia de efervescencia en el caso de ser positiva o la ausencia de ésta cando la reacción era negativa (Rodríguez, 1994).

Metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa

En la cámara de transferencia previamente esterilizada, con un asa bacteriológica se colocó una porción por picadura en tubos con medio Hugh y Leifson (apéndice), procurando que la bacteria llegara hasta al fondo del medio y al sacar el asa se hizo un movimiento giratorio para ir depositando el excedente bacteriano a lo largo del medio. A unos de los tubos se le adicionó 1 ml de aceite mineral esterilizado para provocar la condición anaeróbica y a cada tubo con su respectivo testigo. Los tubos se incubaron a 28⁰C por un espacio de 24-36 horas; se considera fermentación positiva cuando el medio con aceite mineral presentaba un cambio de coloración de azul-verde a amarillo y se considera oxidación cuando el tubo sin aceite mineral cambia de color de la misma forma (Rodríguez, 1994).

Hidrólisis de almidón

Para esta prueba se preparó el medio Hidrólisis de almidón (apéndice), el cual se vació en cajas petri, se sembró la bacteria de 24 horas por puntos discretos, incubándose a 28⁰C por un espacio de 4 días; después de este período se le adicionó unas gotas de solución lugol sobre el cultivo bacteriano y se observó los cambios que presentó; La prueba se considera positiva cuando después de adicionar el lugol se forma un halo transparente por abajo o alrededor del crecimiento bacteriano y cuando todo el medio adquiere una coloración morada, significa que el almidón está presente por lo tanto la prueba es negativa (Király, *et al.*, citado por Rodríguez, 1994).

Pruebas rápidas de patogenicidad

Para esta prueba de patogenicidad de esta cepa bacteriana se utilizo deferentes partes de vegetales como fueron: rebanadas de zanahoria, papa, cebolla, manzanas enteras y vainas de fríjol; las cuales se inóculo la bacteria pura de 24 horas por medio de punción en alguno casos, preparando previamente una suspensión bacteriana y heridas en las rebanadas, e inmediatamente con una asa bacteriológica previamente flameada se le deposita una pequeña cantidad de masa bacteriana.

Pruebas realizadas para la identificación de especie de *Bacillus*

Crecimiento a 45⁰C y un pH de 5.7 en “Caldo de caseína plus”

Para llevar a cabo esta prueba se preparo el medio CG (apéndice), ajustando a la vez el pH a 5.7, el cual se vació en tubos de ensayo, donde se inoculo los medios con una pequeña masa bacteriana con la ayuda de un asa bacteriológica e incubándolo a 45⁰C durante 5 días. La prueba se considera positiva cuando el medio de cultivo se torna turbio a los cinco días. (Schaad, 2001).

Crecimiento en NaCl al 7%

Para esta prueba se preparo el mismo medio CG mas 7% de NaCl (7 gramos de NaCl en 100 ml de caldo), el cual se vació en tubos de ensayo donde se inoculo

los medios con una pequeña cantidad de la bacteria problema. La prueba se considera positiva cuando el medio de cultivo se torna turbio (Schaad, 2001).

Crecimiento utilizando citratos

Para esta prueba se preparo 100 ml de ACS (apéndice), utilizando 2.42 gr. de I agar disolviéndolo en agua destilada obteniendo una coloración original verde previamente se ajusto el pH de 6.8-6.9 y esterilizándolo en autoclave por 15 minutos; luego se coloco en tubos de ensayo; bajo la cámara de transferencia previamente esterilizada, con una asa bacteriológica se coloco una porción de masa bacteriana en los tubos de ensayo, procurando que la bacteria llegara hasta el fondo del medio y al sacar el asa se hizo un movimiento ligero de rotación con el fin de que quedara el excedente bacteriano a lo largo del medio. La prueba se considera positiva si se torna de un color azul (Schaad, 2001).

Prueba de crecimiento anaeróbico en glucosa

Para esta prueba se preparo primero el medio crecimiento anaeróbico (apéndice), colocando el medio en tubos de ensayo con capacidad de 20 ml, inoculando el medio con la bacteria problema, a la vez en unos tubos se coloco 1 ml de aceite mineral estéril para provocar la condición anaeróbica; los tubos se incubaron a 24⁰C durante 48 horas. La prueba se considera positiva si hay producción de gas en los tubos con aceite mineral y si se torna turbio (Schaad, 2001).

Producción de ácidos a partir de carbohidratos (Arabinosa)

Para esta prueba se preparo primero el mismo medio de Hugh y Leifson (apéndice), sin la glucosa, pero si agregando un gramo de arabinosa; todo esto se esterilizo, luego se coloco en tubos de ensayo de 12 ml con tapa y algunos tubos se les coloco 1 ml de aceite mineral estéril y con sus respectivos testigos, se incubo a 28⁰C-30⁰C durante 14 días. La prueba se considera positiva si no hay cambio alguno y que da con su color original que era amarillo y si es negativa el medio se torna de un color azul a gris (Schaad, 2001).

Producción de ácidos a partir de carbohidratos (Manitol)

Para esta prueba se preparo el mismo medio de la anterior prueba, pero ahora en lugar de agregar arabinosa se le agrego un gramo de manitol, colocándolo en tubos de ensayo chicos con tapa y algunos de estos se coloco un ml de aceite mineral con sus respectivos testigos incubando a 28⁰C-30⁰C durante 14 días. La prueba se considera positiva si no hay cambio alguno y que da con su color original que era amarillo y si es negativa el medio se torna de un color azul a gris (Schaad, 2001).

Evaluación de la Germinación y el Vigor

Se tomaron 300 semillas de frijol de cada material criollo; estos son: Negro (trepador), negro (arbustivo), blanco y colorado.

Se hicieron seis repeticiones de cada material criollo con 50 semillas cada repetición, se hace mención que las semillas del material criollo negro (trepador) se trato con el fungicida Captan por que algunas semillas tenían presencia de hongos, todo esto con la finalidad de evitar el desarrollo del hongo que interfieran en la germinación; los otros tres materiales criollos no se trataron por que estaban limpios de lo anterior. Los pliegos de papel anchor previamente esterilizados, fueron sumergidos en agua y luego se extendieron en la mesa del laboratorio para colocar las 50 semillas uniformemente cubriéndolas con otro pliego de papel anchor humedecido, enrollándolos hasta formar un taco colocando una liga en cada extremo para evitar la salida de las semillas, en los tacos se anotaron los datos para un buen control metiendo 2 tipos de materiales criollo con sus seis repeticiones de cada uno en bolsas de polietileno sin cerrarla para después depositarla verticalmente dentro de la cámara germinadora a 25⁰C constante con ocho horas luz y 16 oscuridad durante ocho días para inducir la germinación. Al quinto día se evaluaron plántulas normales y anotando plántulas anormales y semillas sin germinar, regresando los tacos por tres días mas volviendo a evaluar al octavo día (Prueba estándar ISTA, 1985).

El por ciento de germinación corresponde a la media de cada dos repeticiones de 50 semillas, únicamente de las plantas normales de los dos conteos.

En la prueba de vigor, se utilizaron las mismas muestras para la prueba de germinación, y los parámetros para evaluar fueron: Plántulas normales fuertes, plántulas normales débiles, anormales y no germinadas.

Plántulas normales fuertes: Son las que se encuentran totalmente completas, sin ningún daño y de un buen tamaño.

Plántulas normales débiles: Son principalmente las que presentan un solo cotiledón, presentan algún daño en el hipocotilo y daño en la raíz.

Plántulas anormales: Son aquellas a las que les falta alguna de las estructuras primarias o bien algunas están dañadas y una perturbación fisiología en las que las estructuras esenciales están deformadas y podridas (Pruebas estándar ISTA, 1987).

Diseño Experimental

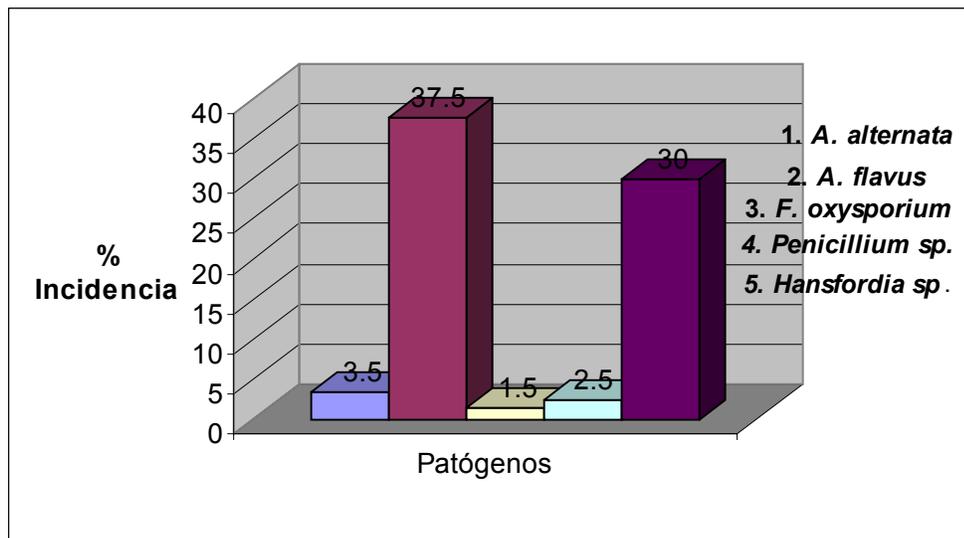
Con los datos obtenidos de las Pruebas de papel secante. Germinación y vigor, realizadas durante la evaluación de semillas de los cuatro materiales de frijol criollo, se utilizó un Diseño Completamente al Azar ya que es el más funcional para la evaluación de ciertos tipos de tratamientos en laboratorio o invernadero, y en los materiales de frijol criollo que tuvieron diferencias significativas tanto en la incidencia de hongos, prueba de germinación y vigor se hizo comparaciones de medias con la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS), según Del Angel, 1991.

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Al analizar las muestras de los materiales de frijol se detectaron una variedad de patógenos en las semillas, siendo la incidencia de éstos muy variada.

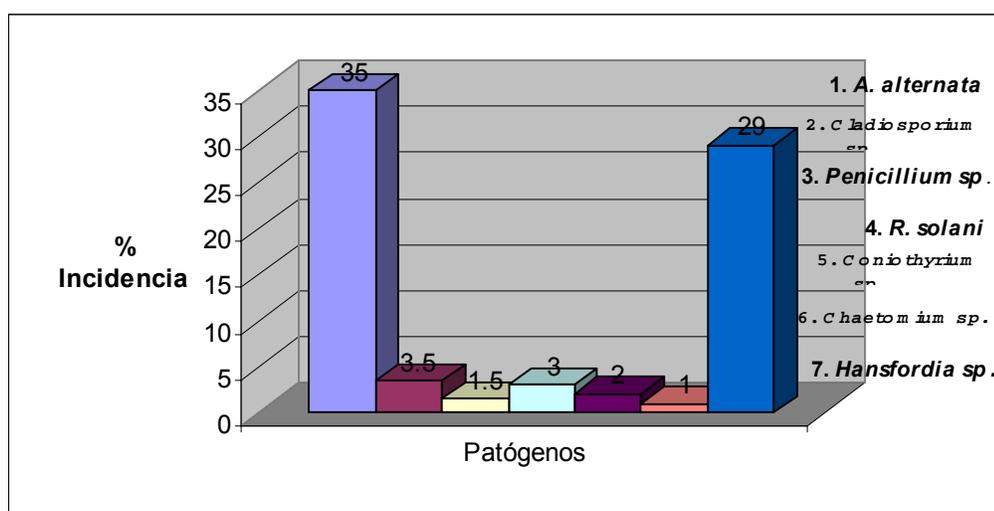
Dentro de la microflora fungosa en el material criollo negro trepador se presentó una incidencia del 37.5 % del hongo *Aspergillus flavus*, seguido de *Hansfordia sp* con un 30% este último no de importancia económica, esto se puede ver representada en la grafica 4.1, con los porcentajes del cuadro 4.3

Grafica 4.1 Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Negro trepador del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.



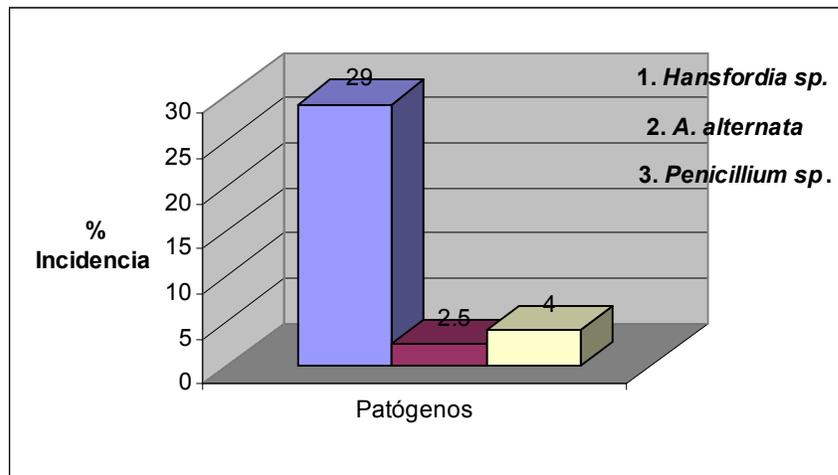
Otro material criollo que fue el Blanco, la flora fungosa se presentó una incidencia alta de *Alternaria alternata* con un 35%, seguido también de *Hansfordia sp* con un 29% que no causa ningún impacto económico por ser saprofita y para una mejor perspectiva se representa la gráfica 4.2, con datos del cuadro 4.5

Grafica 4.2. Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Frijol Criollo Blanco del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.



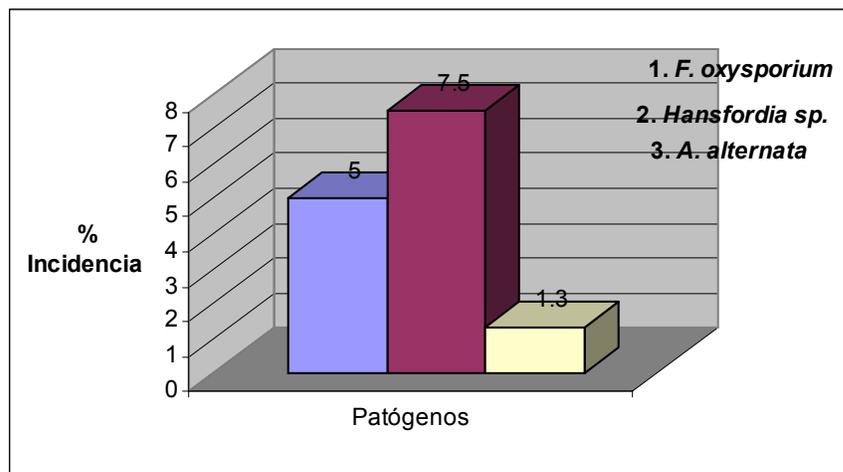
El material criollo Negro arbustivo, en la microflora fungosa se presentó una incidencia alta de un saprofita que fue *Hansfordia sp* con un 29%, seguido de *Penicillium sp* con un 4% que es de importancia económica para granos almacenados, esto como se representa en la gráfica 4.3, con porcentajes del cuadro 4.4

Grafica 4.3. Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Blanco del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.



Dentro de la microflora fungosa en el material criollo Colorado, se presentó una incidencia baja del hongo saprofito *Hasnfordia sp* con un 7.5%, seguido de *Fusarium oxysporium* con un 5% este último de importancia económica, lo anterior se ve reflejado en la grafica 4.4, con datos del cuadro 4.6

Grafica 4.4 Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Fríjol Criollo Colorado del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.



Respecto a la flora bacteriana; de los aislamientos hechos de los cuatro materiales de fríjol, se obtuvieron crecimientos siendo estos en medios de KB y YDC, se seleccionaron colonias a partir de las diluciones las cuales presentaba una consistencia mucoide, puntiforme y de color crema, características del géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*; esta última especie fitopatógena pero que es de menor importancia en comparación a las bacterias fitopatógenas que causan daños graves en cultivos de importancia. Una vez purificados los cultivos de las colonias seleccionadas se procedió a la caracterización de éstas, mediante pruebas bioquímicas y pruebas de patogenicidad (según Schaad 2001).

Cuadro 4.1. Resultados de las Pruebas Bioquímicas para Género de los aislamientos obtenidos de Semilla de Fríjol Criollo. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

Muestra	Tinción de Gram	Prueba de Ryo	Oxidación y Fermentación		Catalasa	Oxidaza	Formación de esporas	Hidrólisis de almidón
Negro trepador	+	-	+	+	+	-	+	+

Los resultados de estas pruebas concuerdan con los del Género *Bacillus* caracterizada por Schaad, (2001).

Cuadro 4.2 Resultados de las Pruebas Bioquímicas para especie de los aislamientos obtenidos de semilla de frijol criollo. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

Muestra	Crecimiento a 45°C y pH 5.7	Crecimiento en NaCl al 7%	Utilización de Citratos	Crecimiento anaeróbico	Producción de ácido de carbohidratos (Arabinosa)	Producción de ácido de carbohidratos (Manitol)
Negro trepador	+	+	+	-	+	+

Los resultados de estas pruebas concuerdan con *subtilis* especie caracterizada por Schaad, (2001).

Donde *Bacillus subtilis* es reconocido como patógeno de plantas, saprofito o como agentes biológicos contra algunos hongos causantes de algunas enfermedades importantes; este es un habitante del heno, leche, polvo suelo y agua; principalmente, su forma es de bastones rectos o curvos, con extremos redondeado y algunas veces en cadenas cortas; es utilizado como agente de control biológico, ya que la acción de su efecto es inhibir los fitopatógenos por dos procesos: el primero es llamado de un nicho, teóricamente por la presencia de *Bacillus subtilis* en la superficie de la raíz, metabolizando los exudados por los patógenos, lo cual hace que sea suficiente para inhibir el ataque de éstos; el segundo proceso es inhibir el ataque fitopatógeno, es una extensión del primer proceso, como *Bacillus subtilis* crece en las superficie de las raíces, puede producir sustancias químicas que inhiben el desarrollo de fitopatógenos, entre otras cosas. Esto puede ser demostrativo *in vitro* muchos fitopatógenos que atacan las raíces (Gustafson, 1993). *Bacillus subtilis* controla biológicamente a patógenos como *Fusarium oxysporium*, *Alternaria*

alternata, *Alternaria citri*, *Macrophomina phaseoli*, *Rhizoctonia solani*, entre otras (Pusey, 1989 citado por Guijón 1994).

Dentro de la pruebas de patogenicidad los resultados fueron casi en su totalidad negativos ya que en ninguno presento daño al ser inoculada la bacteria problema, a excepción de la rebanada de papa que se pudrió un poco por la parte de abajo, se piensa que tal vez, ésta venia enferma; aunque se sabe que ya hay especie de *Bacillus* que ataca a este cultivo; hay solamente tres bacilos fitopatógenos que se saben; el *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* incita la mancha blanca del trigo y el *Bacillus circulans* que causa una enfermedad en tejidos finos de plantas de semillero de la palma datilera y de una decoloración en el tejido fino del corazón de las plantas adultas. El *Bacillus polymyxa* se ha divulgado como el agente causal del destrozo de la planta de semillero del tomate (Schaad, 2001).

Dentro de la microflora fungosa los hongos de mayor importancia que se detectaron fueron: *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium sp.*, *Rhizoctonia solani* y *Cladosporium sp.*; de los cuales los de mayor importancia según Campos (1991) son *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium* por ser patógenos que producen las pudriciones radiculares; los hongos *Aspergillus flavus*, *Penicillium ps*, son importantes según Agrios (1995) por ser patógenos de granos almacenados y por producir las llamadas toxinas: Los restantes son hongos de campos que viven en el suelo. (Fotografías, Apéndice).

Cuadro 4.3 Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Frijol Criollo Negro trepador del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

HONGOS	INCIDENCIA
<i>Alternaria alternata</i>	3.5 %
<i>Aspergillus flavus</i>	37.5 %
<i>Fusarium oxysporium</i>	1.5 %
<i>Penicillium sp.</i>	2.5 %
<i>Hansfordia sp.</i>	30 %

Cuadro 4.4 Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Frijol Criollo Negro arbustivo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

HONGO	INCIDENCIA
<i>Hansfordia sp.</i>	29 %
<i>Alternaria alternata</i>	2.5 %
<i>Penicillium sp</i>	4 %

Cuadro 4.5 Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Frijol Criollo Blanco del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

HONGO	INCIDENCIA
<i>Alternaria alternata</i>	35 %
<i>Cladosporium sp.</i>	3.5 %
<i>Penicillium sp.</i>	1.5 %
<i>Rhizoctonia solani</i>	3 %
<i>Coniothyrium sp.</i>	2 %
<i>Chaetomium sp.</i>	1 %
<i>Hansfordia sp.</i>	29 %

Cuadro 4.6 Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Frijol Criollo Colorado del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

HONGO	INCIDENCIA
<i>Fusarium oxysporium</i>	5 %
<i>Hansfordia sp</i>	7.5 %
<i>Alternaria alternata</i>	1.3 %

Cabe hacer mención que las semillas de los materiales Negro trepador y Blanco fueron más susceptibles a la presencia de hongos como: *Alternaria alternata*, *Hasfordia sp*, *Aspergillus flavus*; ya que se presentaron en muy poco tiempo y con

mucho crecimiento a comparación de los otros materiales. Estos al crecer cubrieron totalmente la semilla de frijol. Días después le siguió el Negro arbustivo con el hongo saprofito *Hansfordia sp* y una incidencia baja de *Penicillium sp*; este último al igual que *Aspergillus flavus* siendo hongos de almacén. *Chaetomium sp* y *Coniothyrium sp* aparecieron después de muchos días y tuvieron poco crecimiento. Según Moreno (1988), estos hongos se presentan en semillas con avanzado estado de deterioro.

En cuanto a la presencia de bacterias en el material criollo Negro trepador, la detección de *Bacillus subtilis* se realizó utilizando los medios bacteriológicos estándares antes mencionados, siguiendo el procedimiento de Schaad (2001).

La germinación y vigor en el material Negro trepador fue muy baja presentando un 2.33 por ciento de germinación y vigor; 1.66 por ciento de plántulas anormales y 96 por ciento de semillas muertas (Cuadro 4.7 y 4.8).

Los materiales que presentaron un alto porcentaje de germinación y vigor con un 91.33 y 41.66 por ciento fue el Colorado, seguido por el Negro arbustivo con 81.66 y 35 por ciento y por último el Blanco con un 76.66 y 49.66 por ciento; esto en comparación al Negro trepador que fue muy bajo con ambos casos de 2.33 % (Cuadro 4.7 y 4.8).

Lo anterior indica que la no germinación de la semilla de frijol criollo Negro trepador pudo deberse a la alta incidencia de hongos que afecta la calidad fisiológica

de la semilla, esto por la alta humedad que poseía la semilla; esto es un indicador claro que estas semillas son ineficientes para su siembra en el campo.

Cuadro 4.7 Capacidad de Germinación (%) de Semilla de Cuatro Materiales de Frijol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

Materiales Criollos utilizados	P. Normales	P. Anormales	Semillas muertas
Negro trepador	2.33 %	1.66 %	96 %
Negro arbustivo	81.66 %	12.66 %	5.66 %
Blanco	76.66 %	15.66 %	7.66 %
Colorado	91.33 %	7.33 %	1.33 %

Cuadro 4.8 Vigor (%) en Semillas de Cuatro Materiales de Frijol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

Materiales Criollos utilizados	PFC1	PDC1	PFC2	PDC2	PA	SM	V
Negro trepador	7	2	0	3	1.66	96	2.33 %
Negro arbustivo	105	26	140	12	12.66	5.66	35 %
Blanco	149	38	81	9	15.66	7.66	49.66 %
Colorado	125	17	149	5	7.33	1.33	41.66 %

Donde:

PFC1: Plántulas fuertes del primer conteo

PDC1: Plántulas débiles del primer conteo

PCF2: Plántulas fuertes del segundo conteo

PDC2: Plántulas débiles del segundo conteo

PA: Plantas anormales

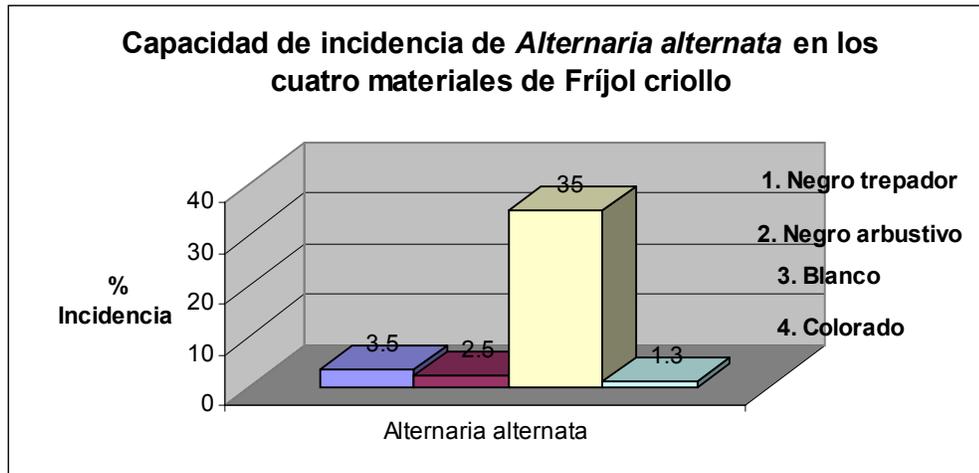
SM: Semillas muertas

V: Vigor

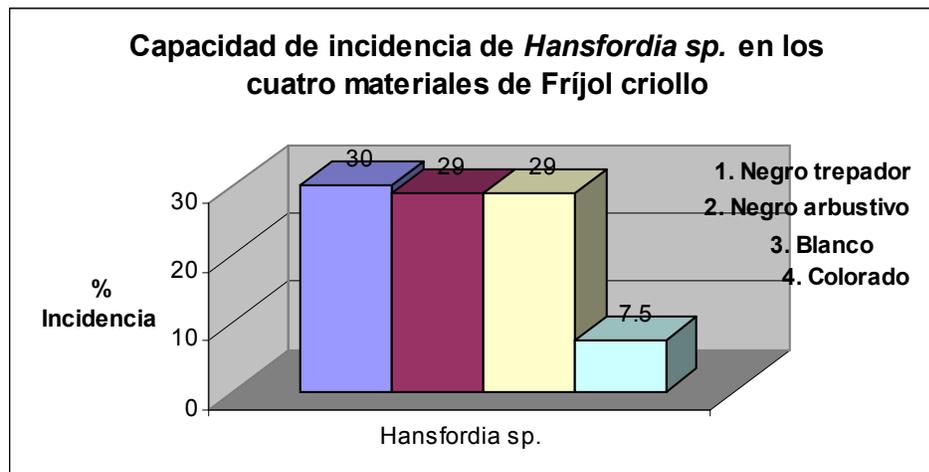
De acuerdo a los resultados obtenidos en el ANVA tanto para *Alternaria alternata* y para *Hansforia sp*, nos indica que en el primero hubo alta y el segundo poca sinificancia; esto quiere decir que los tratamientos son muy diferentes para el crecimiento del primer hongo en cada uno de los materiales y para el segundo quiere decir que los tratamientos son casi iguales para el crecimiento del hongo *Hansforia sp.*, esto se ve reflejado también en los c.v. que fue de: 91.22 % y 29.76 % (Cuadro 8.1 y 8.2, Apéndice).

Para los resultados obtenidos en el ANVA de la Prueba de Germinación y Vigor, nos indica que hay alta significancia en ambos casos lo que quiere decir que todos los tratamientos de ambos son muy diferentes tanto para la Prueba de Germinación que para el Vigor, ya que los c.v. fueron de 5.74 % y 29.08 %; esto se ve reflejado en los resultados (Cuadro 8.3 y 8.4, Apéndice).

Grafica 4.5 Incidencia de *Alternaria alternata* detectado en el Análisis de la Semilla de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.



Grafica 4.6 Incidencia de *Hansfordia sp.* detectado en el Análisis de la Semilla de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.



CONCLUSIONES

Los cuatro materiales de semillas de frijol criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas, utilizadas en el presente trabajo trae presencia de una variedad de hongos de importancia económica y hongos saprofitos; los de importancia económica son: *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Penicillium sp*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium*, *Cladosporium sp* y como hongos saprofitos a: *Hansfordia sp*, *Coniothyrium sp*, *Chaetomium sp*; y la bacteria *Bacillus subtilis*

RECOMENDACIONES

- ❖ Es muy importante de no utilizar semillas para la siembra del siguiente ciclo cuando sabemos que el cultivo del que se obtuvo presenta alta incidencia de algún hongo y que esta produciendo una enfermedad que puede repercutir para la próxima cosecha ya que solo se asegura la presencia de esta enfermedad para el siguiente ciclo.
- ❖ Antes de sembrar separar las semillas arrugadas, manchadas y de colores irregulares ya que estas pueden ser portadoras de hongos o en su caso bacterias fitopatógenas.
- ❖ Al guardar la semilla en un almacén asegurarse que esta lleve una humedad adecuada para que no exista presencia de hongos, retardar el deterioro y que no pierda su calidad germinativa y también en ocasiones tratar la semilla con algún fungicida como Thiram o Captan, entre otros.

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), es un cultivo cuyo grano, con alto contenido de proteínas, ha tenido un papel importante en la alimentación del hombre en la actualidad; su cultivo esta, distribuido en todo el planeta incluyendo todo América, Europa, Asia, y Africa; en México ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada después del maíz y por la actividad económica que genera.

Las enfermedades del frijol como antracnosis y pudriciones radiculares causado por patógenos como *Colletotrychum lindemutheanum*, *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctnia solani*, entre otras, son causa de los bajos rendimientos en Kg/ha de frijol en Chiapas en comparación a otros estados; lo anterior se convierte en limitantes fitosanitarias más importantes en el cultivo. También es importante señalar los patógenos de los granos almacenados como *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp* que pueden afectar a los granos de frijol cuando hay condiciones favorables como temperatura, humedad relativa y precipitación pluvial en el desarrollo de estos patógenos.

En el presente trabajo se realizó la detección e identificación de Hongos y Bacterias en semillas de cuatro materiales criollos de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del Municipio de la Independencia, Chiapas; encontrándose una alta incidencia de hongos fitopatógenos que atacan tanto en semilla como en la formación de la plántula.

BIBLIOGRAFIA

Agrios, N. G. 1995. Fitopatología. 2ª Edición. Editorial Limusa. México. 838 p.

Anselme and R, Champion. 1981. Working sheet No. 45 (*Phaseolus vulgaris/Colletotrichum lindemuthianum*). ISTA Handbook on seed health testing.

Anuario Estadístico por Entidad Federativa. 2002. INEGI. México. 619 p.

Agarwal, V. K. And J. B. Sinclair. 1987. Principales of Seed Pathology. Vol. I. C.R.C., inc. U.S.A. 176 p.

Barnett, H. L. & Hunter, B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. Macmillan Publishing. United States of America. 218 p.

Besnier, R. F. 1988. Semillas Biología y Tecnología. Primera Edición. Ediciones Mundi Prensa. España. 637 p.

Brathwaite *et al.*, 1995. Introducción al Diagnostico Fitosanitario I. Primera Edición. Editorial Futura. México. 72 p.

Campos, A. J. 1991. Enfermedades del Frijol. Primera Edición. Editorial Trillas. México. 132 p.

De la Isla B., M. L. de la. 1984. Fitopatología. Primera Edición. Editorial Futura. México. 132 p.

- Del Angel R. J. M. 1991. Métodos de Investigación Pecuaria. 1ª. Edición. Editorial Trillas. UAAAN, México. 208 p.
- Gilman, J. C. 1956. Manual of Soil Fungi. 2ª Edition. The Iowa State University Press. Iowa. U.S.A. 450 p.
- Gordon *et al.*, 1973. The Genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427. Agricultural Research Service. United State Departament of Agriculture. U.S.A.
- Guijón, L. C. 1994. Epidemiología de las enfermedades de la papa causadas por Hongos fitopatógenos del suelo en el Sur de Coahuila y Nuevo León, Tesis de Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México p. 81, 97.
- Gustafson. 1993. Technical Bulletin Kodiak. Plano, Texas. E. U. A.
- International Seed Testing Association. 1985. Seed Science and Technology 13 (2); 299-520.
- International Seed Testing Association. 1987. Handbook of vigor Testing Methods. ISTA, Switzerland.
- Martínez R. J. R. 1997. Respuesta Antagónica de *Bacillus subtilis* y *Rhizoctonia solani*, en tres variedades de Papa bajo Invernadero. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila, México. 74 p.
- Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. U.A.CH. México. 21 p.

- Moreno, M. E. y J. J. Zamora. 1978. Guía para Evitar Problemas Causados por Hongos en Semillas y Granos Almacenados. Merch Sharp y Dohme de México.
- Moreno, M. E. 1988. Manual para la Identificación de Hongos en Granos Almacenados y sus derivados. Primera Edición. U.N.A.M. México. 109 p.
- Municipios de Chiapas. 1988. Secretaria de Gobernación. México. 612 p.
- Peretti, A. 1994. Manual para el Análisis de Semillas. Primera Edición. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 281 p.
- Rodríguez, M. M. De L. 1994. Manual de Identificación de Bacterias Fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo. México. 114 p.
- Romero C. S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México. 347 p.
- Sayers, R. 1982. Pruebas de Germinación y Vigor. Curso de actualización sobre Tecnología de Semillas. Memoria. Buenavista, Saltillo Coahuila México.
- Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1992. Guía Fitosanitaria para el Cultivo del Fríjol. Primera Edición. Editorial Futura. México.
- Sosa-Moss, C. 1996. Técnicas para el Diagnostico de las Enfermedades de las Plantas. Primera Edición. IICA. México. 223 p.
- Schaad N. W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3ª Edition. The America Phytopathological Society. APS press. Unites States of America. 256 p.

USDA. 1980. Anuario de Agricultura de los Estados Unidos. Semillas. 7^a Edición.
Compañía Editorial Continental. México. 1020 p.

Warham, *et al.*, 1991. Importancia de los Patógenos Transmitidos por Semilla. En
curso Pre-Congreso. XVIII Congreso de Fitopatología. México. 84 p.

APÉNDICE (S)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

FORMULAS DE MEDIOS DE CULTIVOS

Y

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

FOTOGRAFÍAS DE LOS PRINCIPALES HONGOS DETECTADOS

Análisis estadístico

Cuadro 8.1 Análisis de Varianza el Hongo *Alternaria alternata* en los Cuatro Materiales de Fríjol Criollo. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

Trats.	I	II	II	IV	ri	rj	FV	GL	SC	CM	FC
T ₁	1	1	1	1	7	4	Entre Trats.	t-1 3	785.25	261.75	10.88 **
T ₂	1	1	1	2	5	4	E Exp.	t(r-1) 12	288.50	24.04	
T ₃	24	17	25	4	70	4	Total	n-1 15	1073.75		
T ₄	1	1	1	1	4	4					

Nivel de Significancia: 0.01

C.V.= 91.22 %

Resultados en la Comparación de Medias

Tras.	Media
T ₃	17.50 A
T ₁	1.75 B
T ₂	1.25 B
T ₄	1.00 B

Valor de la DMS= 10.59

Cuadro 8.2 Análisis de Varianza el Hongo *Hansfordia sp* en los Cuatro Materiales de Frijol Criollo. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003

Trats.	I	II	II	IV	ri	rj	FV	GL	SC	CM	FC
T ₁	17	19	12	15	63	4	Entre Trats.	t-1 3	213.50	71.166	5.354 *
T ₂	12	16	16	14	58	4	E Exp.	t(r-1) 12	259.50	13.291	
T ₃	8	15	14	13	50	4	Total	n-1 15	373.00		
T ₄	1	10	2	12	25	4					

Nivel de Significancia: 0.05

C.V.= 29.76 %

Resultados en la Comparación de Medias

Tras.	Media
T ₁	15.75 A
T ₂	14.50 A
T ₃	12.50 AB
T ₄	6.25 B

Valor de la DMS= 7.87

Cuadro 8.3 Análisis de Varianza para la Capacidad de Germinación (%) de Semillas de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

Trats.	I	II	II	ri	rj	FV	GL	SC	CM	FC
T ₁	2	4	1	7	3	Entre Trats.	t-1 3	15055.33	5018.44	383.57 **
T ₂	86	79	80	245	3	E Exp.	t(r-1) 8	104.66	13.08	
T ₃	80	80	70	230	3	Total	n-1 11	15160.00		
T ₄	90	93	91	274	3					

Nivel de Significancia: 0.01

C.V.= 5.74 %

Resultados en la Comparación de Medias

Tras.	Media
T ₄	91.33 A
T ₂	81.66 AB
T ₃	7.66 B
T ₁	2.33 C

Valor de la DMS= 9.90

Cuadro 8.4 Análisis de Varianza para Vigor (%) de Semillas de Cuatro Materiales de Fríjol Criollo del Municipio de la Independencia, Chiapas. Departamento de Parasitología. UAAAN 2003.

Trats.	I	II	II	ri	rj	FV	GL	SC	CM	FC
T₁	2	4	1	7	3	Entre Trats.	t-1 3	3883.66	1294.55	14.79 **
T₂	50	27	28	105	3	E Exp.	t(r-1) 8	700.00	87.50	
T₃	63	49	37	149	3	Total	n-1 11	4583.66		
T₄	41	45	39	125	3					

Nivel de Significancia: 0.01

C.V.= 29.08 %

Resultados en la Comparación de Medias

Tras.	Media
T ₃	49.66 A
T ₄	41.66 A
T ₂	35.00 A
T ₁	2.33 B

Valor de la DMS= 25.62

I. MEDIOS PARA AISLAMIENTO

1.1 MEDIO B DE KING (KB)

Proteosa peptona # 3	20.0 g
$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	1.5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	1.5 g
Agar	15.0 g
Glicerol	15.0 g
Agua	1000.0 ml

1.2 MEDIO YDC

Extracto de levadura	10.0 g
Dextrosa	20.0 g
Carbonato de Calcio (Polvo fino)	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1000.0 ml

II MEDIOS PARA CARACTERIZACION

2.1 MEDIO DE HUGH Y LEIFSON

Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Agar	3.0 g
Azúl de bromotimol	0.03 g
Glucosa	10.0 g
Agua	1000.0 ml

El pH se ajusta a 7.1 antes de adicionar el agar. La glucosa se esteriliza por filtro milipore o en autoclave.

2.2 MEDIO PARA HIDRÓLISIS DE ALMIDON

Almidón soluble	1 %
Agar	16 g
Agua	1000.0 ml

Disolver los ingredientes, esterilizar a 121⁰C por 15 minutos y vaciar en cajas petri previamente esterilizadas.

2.3. MEDIO PARA UTILIZACION DE CITRATOS (Agar Citrato Simon's)

NaCl	5.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
(NH ₄) H ₂ PO ₄	1.0 g
Citrato de sodio (Anhidro)	2.0 g
Agar	20.0 g
*Azul de bromotimol	15.0 ml
Agua	1000.0 ml

* Solución al 1 % (P/V) en etanol al 50 %; ajustar el pH a 6.8-6.9, disperse en tubos de ensayo y esterilice en autoclave a 121⁰C por 15 minutos.

2.3. MEDIO CALDO GLUCONATO (CG)

Peptona	1.5 g
Extracto de levadura	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
* Gluconato de potasio	40.0 g
Agua	1000.0 ml

Disolver en el agua por calentamiento y ajusta el pH a 5.7, filtrar y esterilizar a 115⁰C por 20 minutos.

* El gluconato de potasio puede ser reemplazado por gluconato de sodio.

2.4. MEDIO PARA LA PRODUCCIÓN DE ACIDO DE CARBOHIDRATOS

Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Agar bacteriológico	3.0 g
Azúl de bromotimol	0.03 g
Arabinosa	10.0 g
Agua	1000.0 g

Este medio sirve también utilizando Manitol en lugar de Arabinosa y se considera una prueba diferente.

2.5. MEDIO PARA EL CRECIMIENTO ANAEROBOCO (Glucosa)

Caldo nutritivo	8.0 g
* Glucosa al 20 %	50.0 ml
Agua	950.0 ml

III. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

3.1 REACTIVOS PARA TINCION DE GRAM

3.1.1. SOLUCION DE CRISTAL VIOLETA

El cristal violeta actúa como colorante primario y se prepara de la siguiente manera:

Cristal violeta	0.5 g
Fenol	2.5 g
Etanol	20.0 g
Glicerina	80.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

El cristal violeta puede ser sustituido por violeta de genciana, violeta de metilo o azul de metileno.

3.1.2. SOLUCION DE LUGOL

Esta solución debe tener pH alcalino, por que a pH ácido, las bacterias gram positivas aparecen como gram negativas y se prepara de la siguiente manera:

Yodo	1.0 g
KI	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

3.1.3. SOLUCION DE SAFRANINA

Es el colorante secundario o de contraste y esta formado por lo siguiente.

Safranina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Esta solución o colorante no es indispensable en esta tinción, sino que únicamente se emplea para distinguir mejor si una bacteria es gram negativa o positiva y al igual que el cristal violeta se puede sustituir por una solución de fucsina 1:20 o pardo de Bismark al 0.1%.

3.2. REACTIVOS PARA LA TINCION DE FLAGELOS

MORDENTE

Ácido tánico	20.0 g
CrO ₃ sol. Acuosa al 2.5 %	15.0 ml
Agua caliente	80.0 ml

El ácido tánico se disuelve en 80 ml de agua caliente, y se agrega la solución de CrO₃, se mezclan y se guardan en el refrigerador durante 4 días, en un recipiente obscuro.

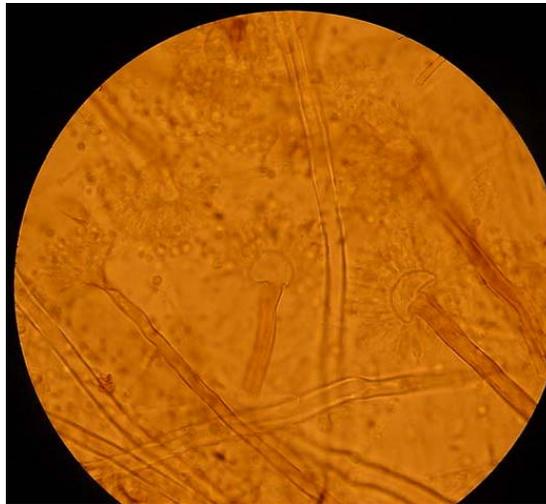
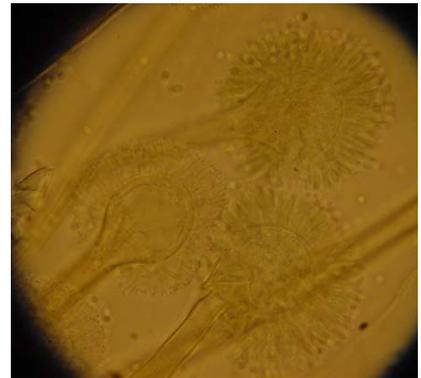
Para emplear el mordente se debe de filtrar previamente.

3.3. PRUEBA DE OXIDASA

Tetrametil para fenilendiamina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Se disuelve el reactivo y se guarda en frascos oscuros.

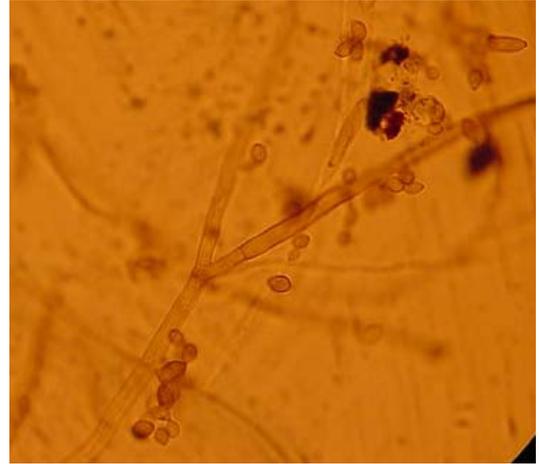
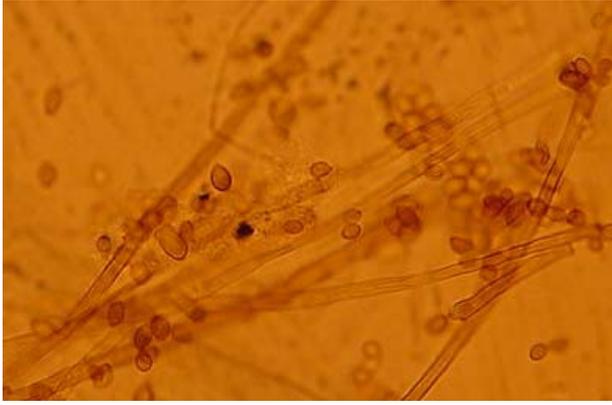
FOTOGRAFÍAS DE LOS PRINCIPALES HONGOS DETECTADOS



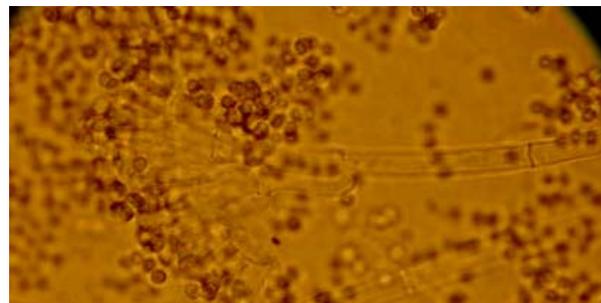
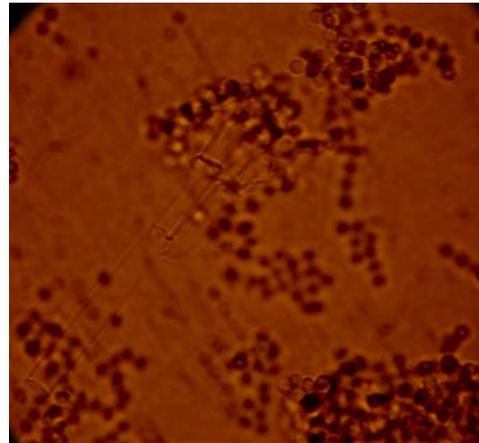
FOTOS. Frijol negro trepdor; *A. flavus*
TOMADAS POR: Hernández García. 2003



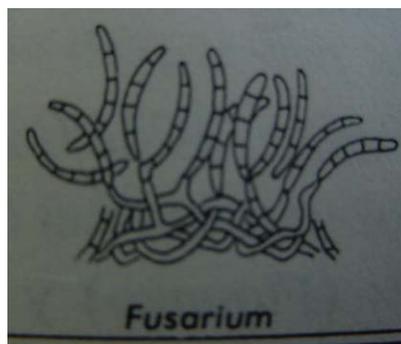
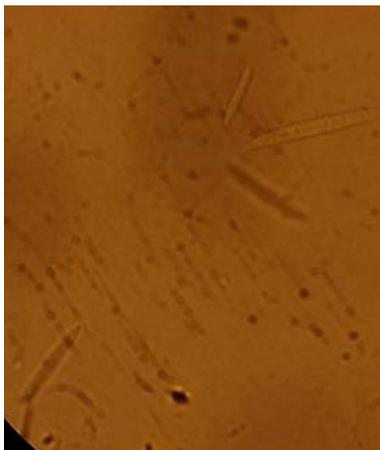
FOTOS: Frijol negro trepdor y blanco; *Alternaria alternata*
TOMADAS POR: Hernández García. 2003



FOTOS: *Hansfordia* sp. en frijol negro trepador y blanco.
TOMADAS POR: Hernández García. 2003

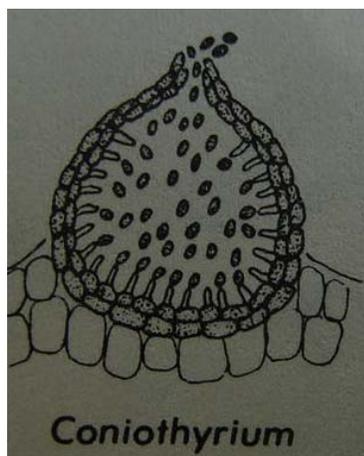


FOTOS: *Rhizoctonia solani*, *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. en frijol blanco y
frijol negro arbustivo.
TOMADAS POR: Hernández García. 2003



FOTOS: *Fusarium oxysporium* en frijol colorado, esta comparada con la del libro de Fitopatología, Agrios 1995.

TOMADAS POR: Hernández García



FOTOS. Frijol blanco; *Coniothyrium* sp. y *Chaetomium* sp, hongos de suelo que son considerados como contaminantes. Comparada con la del libro de Fitopatología Agrios, 1995

TOMADAS POR: Hernández García. 2003