

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



**Detección de Hongos y Bacterias Fitopatógenos en Semilla de
Frijol del Estado de Nayarit.**

POR:

CARLOS AMPARO BRAMBILA

TESIS

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

Ingeniero Agrónomo Parasitólogo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio de 1998.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

**Detección de Hongos y Bacterias Fitopatógenos en Semilla de
Frijol del Estado de Nayarit.**

POR

CARLOS AMPARO BRAMBILA

TESIS

**Que somete a consideración del H. Jurado examinador como
requisito parcial para obtener el título de:**

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

APROBADA

**Dr. Abiel Sánchez Arizpe
Presidente**

**M.C. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Sinodal**

**M.C. Jorge Luis Salazar G.
Sinodal**

**M. C. Mariano Flores Dávila.
Coordinador de la División de Agronomía.**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio de 1998.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITARATURA.....	3
Importancia de las Enfermedades Transmitidas por Semilla.....	3
Importancia de las Pruebas de Sanidad.....	5
Enfermedades Fungosas y Bacterianas Transmitidas por Semillas.....	6
Enfermedades Fungosas Transmitidas por Semilla de Frijol.....	8
Pruebas de Sanidad para Hongos.....	10
Pruebas de Agar.....	11
Prueba de Papel Secante.....	11
Método de Toallas Enrolladas.....	12
Inspección de Semillas Secas.....	13
Prueba de Semillas Lavadas.....	14
Prueba de Síntomas de Plántulas.....	15
Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Semilla de Frijol.....	15
Pruebas de Sanidad para Bacterias.....	17

Tinción de Gram.....	18
Prueba en Medios Selectivos.....	18
Prueba de Serología.....	19
Técnica del Bacteriofago.....	20
Prueba de Sintomatología de Plántulas.....	20
Pruebas Bioquímicas.....	21
Prueba de Germinación.....	22
Prueba de Vigor.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Evaluación de la Microflora.....	28
Microflora Fungosa.....	28
Microflora Bacteriana.....	29
Evaluación de la Germinación y el Vigor.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	38
RECOMENDACIONES.....	39
LITERATURA CITADA.....	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

Pag.

4.1	Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Frijol Azufrado, del Estado de Nayarit. UAAAN. 1998.....	34
4.2	Incidencia de los Hongos Detectados en el Análisis de Semilla de Frijol Negro Jamapa, del Estado de Nayarit. UAAAN. 1998....	34
4.3	Incidencia de <i>Xanthomonas campestris pv. phaseoli</i> en Semilla de Frijol Azufrado y Negro Jamapa, del Estado de Nayarit. UAAAN. 1998.....	35
4.4	Resultados de la Detección de <i>X. c. pv. phaseoli</i> en los Medios Semiselectivos YDC y MD5 de Semilla de Frijol del Estado de Nayarit. UAAAN. 1998.....	36
4.5	Capacidad de Germinación (%) de la Semilla de Frijol del Estado de Nayarit. UAAAN. 1998.....	37
4.6	Vigor (%) de la Semilla de Frijol del Estado de Nayarit. UAAAN. 1998.....	37

DEDICATORIA

Antes que nada, doy gracias a **DIOS NUESTRO SEÑOR**; a tí amigo mío por haberme guiado en el mejor de los caminos, tu que siempre me acompañas

a donde quiera que voy, por derramar tu gracia y tu bondad, por darme la facultad de amar a mis semejantes, permitirme concluir satisfactoriamente mis estudios que era uno de mis mayores anhelos, por darme una gran familia y una esposa y dos hijos, por todo ésto gracias **SEÑOR**.

A lo más sagrado que existe para mí.

MIS PADRES

Sr. ODÓN AMPARO MEDINA

Sra. MARIA BRAMBILA GUTIÉRREZ

A él, con gran admiración y respeto, por que con cariño, comprensión y tu confianza depositada lograste forjar en mi un hombre de bién, por apoyarme incondicionalmente en todo para que fuera alguien en la vida.

A ella, que con su confianza, amor, sacrificios y ejemplos me enseñó a seguir adelante. A tí madre, qué puedo decirte yo que siempre he recibido de tí lo mejor con lo cual has logrado formar gran parte de lo que hoy he alcanzado. Eres tu madre la merecedora de todos mis logros.

Estas palabras son pocas para agradecer tanto a quienes después de **DIOS** no alcanzo a pagar lo mucho que me han dado, con cariño, lealtad,

confianza y honestidad que siempre han inculcado en mí, además una serie de valores que me llevaron por buén camino.

Mil gracias por confiar siempre en mí, espero nunca defraudarlos.

CON GRAN RESPETO PARA MIS QUERIDOS HERMANOS.

ENRIQUE y FAMILIA

J. FELICIANO y FAMILIA

MA. DOLORES y FAMILIA

J. IGNACIO y FAMILIA

LETICIA y FAMILIA

MA. ISABEL y FAMILIA

ROSA E. y FAMILIA

GILBERTO

MARTHA A. y FAMILIA

ODÓN y FAMILIA

P. ODÓN y FAMILIA

RUBÉN (+) y FAMILIA

LUZ y FAMILIA

GLORIA y FAMILIA

HÉCTOR y FAMILIA

Por su incondicional apoyo moral y económico, por su comprensión durante la realización de mi carrera, por que al lado de ellos he compartido gratos y tristes momentos de la vida; gracias por compartir cada uno sus sentimientos y por depositar su granito de arena en nuestra vida fraterna.

Especialmente a mi hermana **LOLITA** y su esposo **RENÉ**; por que gracias a ellos pude realizar uno de mis mayores anhelos, tener una profesión. Les agradezco de todo corazón esa confianza que depositaron en mi y que en todo momento me hizo sentir con un gran respaldo. Gracias por ese apoyo que me brindaron incondicionalmente siempre que necesité de ustedes tanto moral

como económico. No los defraudaré y trataré siempre de corresponder a todo ese apoyo y cariño brindados.

Con todo cariño y amor para quién con su esfuerzo, dedicación, empeño, paciencia y apoyo desinteresado hizo posible que este sueño se hiciera realidad; en forma muy especial le dedico el presente trabajo a mi esposa **LUCIA ELIZABETH**.

A mis hijos, **CARLOS ALBERTO** por soportar mi ausencia durante mis estudios, pero principalmente por traerme felicidad, a **ESTÉPHANI** que pronto traerá más alegría a mi familia, a ustedes hijos míos les dedico este trabajo y prometo aprovechar al máximo mis conocimientos para brindarles una vida digna llena de amor y procurar que nunca les falte lo necesario.

A mis compañeros de la **quinta sección** de tronco común y la segunda de **parasitología** por compartir tantos momentos agradables conmigo.

A mis compañeros de la **Generación LXXXIV**.

A todas mis amistades, **Ingenieros y Estudiantes**.

Y al **pueblo de México** por contribuir a que la educación siga siendo gratuita.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por cobijarme durante toda mi carrera y prepararme profesionalmente para contribuir a solucionar los problemas que enfrenta la agricultura nacional.

Mi más sincero agradecimiento al **DR. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE** por su valiosa asesoría en la realización de esta investigación y dedicarme un poco de su tiempo para que este trabajo se realizara de la mejor manera posible, pero más que nada por ser un gran maestro y amigo.

A la **ING. M.C. MA. ELIZABETH GALINDO CEPEDA** por su importante colaboración y sugerencias en la revisión de este trabajo.

Al **ING. M.C. JORGE LUIS SALAZAR GONZÁLEZ** por su colaboración en la realización y revisión de este trabajo.

Al **Departamento de Parasitología Agrícola** por formarme profesionalmente en esta especialidad.

A todos los **Ingenieros** que participaron en mi formación académica.

Al Departamento de Tecnología de Semillas, principalmente a la **ING. MC. LETICIA BUSTAMANTE** y a la **QFB. SANDRA** por su importante participación en la realización de este trabajo.

A todos aquellos que de alguna manera participaron en esta investigación.

**"DE TODAS LAS OCUPACIONES DE LA QUE SE DERIVA BENEFICIO,
NO**

**HAY NINGUNA TAN AMABLE, TAN SALUDABLE Y TAN MEREDEDORA
DE
LA DIGNIDAD DEL HOMBRE LIBRE COMO LA AGRICULTURA”.**

CICERON.

INTRODUCCIÓN

El frijol es el principal cultivo en Nayarit, del cual se siembran alrededor de 90,000 hectáreas, con un rendimiento medio de 1,200 Kg por hectárea, siendo uno de los más altos que se obtienen en el país y cuya producción además de satisfacer las demandas del Estado también se comercializa en otras entidades de la nación.

Más del 95 por ciento de la superficie se siembra en la planicie costera, durante el ciclo otoño - invierno y en condiciones de humedad residual o humedad con riego; predomina el frijol solo y de color negro; sin embargo, también se siembra frijol claro tipo azufrado, que tiene preferencia para consumo en el Estado y peruanos, bayos y eventualmente canarios, que son de aceptación comercial fuera de la entidad. En este ciclo, en ocasiones se intercala frijol con maíz. Los rendimientos que se obtienen por hectárea son superiores a los 1,000 Kg. en humedad y a 2,000 Kg. con riego.

El resto de la superficie se cultiva en temporal en el sur del Estado y se siembra frijol solo principalmente tipo claro, con una media de producción de aproximadamente 800 Kg por hectárea.

Debido al incremento del costo de la semilla certificada, los agricultores utilizan semilla de la siembra anterior, la cual pudo tener alta incidencia de enfermedades asegurándose con ésto una mayor infección en el siguiente ciclo al no separar la semilla manchada portadora de uno o varios patógenos tales como tizones bacterianos, antracnosis, mancha redonda, mancha angular, moho blanco y variantes del mosaico común. Estas enfermedades se desarrollan cuando existen condiciones favorables y causan daño de consideración; matando en ocasiones por completo al cultivo y causando grandes pérdidas económicas al productor.

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

Detectar los hongos y bacterias fitopatógenos presentes en semilla de frijol del Estado de Nayarit.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de las Enfermedades Transmitidas por Semilla

La economía agrícola mundial sufre anualmente significativos menoscabos debido a enfermedades causadas por agentes de diversa índole, entre los cuales figuran preponderadamente los hongos, las bacterias, los virus y los nemátodos. Aún en países de grandes recursos científicos y técnicos, se habla de pérdidas que en forma global fluctúan entre el siete y el 10 por ciento de la cosecha total (Romero, 1993).

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 hambre, 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).

Las enfermedades de las plantas son uno de los factores naturales que más afectan la productividad agrícola. Es común ver cultivos destruidos por los patógenos que llegan a causar daños tan graves, que la cosecha se pierde totalmente (Sosa *et al.*, 1997).

Los organismos transmitidos por la semilla 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 semilla de frijol son la antracnosis, tizón bacteriano común y tizón bacteriano del halo (Kreitlow *et al.*, citado por USDA, 1984).

Importancia de las Pruebas de Sanidad

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

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).

Los patógenos llevados en las semillas afectan directa o indirectamente la calidad de la semilla en el comercio (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

Besnier (1989), menciona que los métodos de ensayo del estado sanitario de las semillas deben ser rápidos, económicos y dar resultados reproducibles y susceptibles 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

Muchos hongos presentes en las semillas son conocidos por descomponer la celulosa de las semillas (*Alternaria*, *Fusarium*, etc.). Adicionalmente estos microorganismos pueden ser activadores o supresores de la germinación de las semillas a través de sus toxinas (Moreno y Zamora, 1978).

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 plántulas (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

Moreno (1988), menciona 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.

El hongo *Diaporthe phaseolorum* se transmite de cosecha a cosecha a través de la semilla de soya, haciéndose presente en forma patógena al momento de la formación de las vainas (Moreno y Zamora, 1978).

Kreitlow *et al.*, citado por USDA (1984), señala que 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 semilla de col, coliflor,

colinabo y nabo, así como la de frijol y chícharo se cambió del este y medio oeste de los Estados de la costa del pacífico en Estados Unidos.

En la semilla de chícharo 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 (Moreno y Zamora, 1978).

Kreitlow *et al.*, citado por USDA (1984), menciona que 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.

Enfermedades Fungosas Transmitidas por Semilla de Frijol

Kreitlow *et al.*, citado por USDA (1984), menciona que la enfermedad llamada antracnosis, ocasionó daños severos que costo varios millones de dólares al año por pérdidas 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 rota 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 inóculo para causar epidemias (SARH, 1992).

La semilla es un agente potencial de diseminación de *Isariopsis griseola* causante de la mancha angular del frijol, ya que este patógeno puede estar en el interior de la misma y reiniciar su actividad cuando las condiciones le sean favorables; convirtiéndose en la fuente de inóculo primario causando defoliación prematura de la planta. Además el patógeno puede permanecer hasta 500 días en los residuos de plantas enfermas (Campos, 1991).

La temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad es de 20 a 25°C, necesitando además agua continua sobre las partes vegetativas o reproductivas de las plantas, o alta humedad por lo menos 48 horas. Se presenta con más frecuencia en las regiones tropicales del Golfo de México (Veracruz y Tabasco); también se ha presentado en zonas semiáridas como Durango, Zacatecas y la Costa de Jalisco, además de Guanajuato, Chiapas y Coahuila causando daños de un 50 hasta un 80 por ciento (SARH, 1992).

Campos (1991), señala que la mancha de *Ascochyta* en frijol causada por *Ascochyta phaseolorum* se puede transmitir por medio de la semilla. También que se ha encontrado en Allende, Jalisco y en Patzcuaro, Michoacán pero que carece de importancia económica.

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).

Esta enfermedad se presentó por primera vez en Veracruz en 1963 y posteriormente se le encontró en Yucatán, Campeche, Tamaulipas, Tabasco, Chiapas, Quintana Roo, Coahuila y Sinaloa. Es frecuente en zonas calientes y húmedas donde puede ocasionar pérdidas en rendimiento hasta del 100 por ciento cuando se presenta a temprana edad (Campos, 1991 y SARH, 1992).

Campos (1991), menciona que la pudrición carbonosa del frijol ocasionada por *Macrophomina phaseolina* es de importancia secundaria en México ya que nunca a causado daños considerables a pesar de que se transmite por semilla.

Esta enfermedad afecta básicamente el sistema radicular y el tallo de la planta de frijol. Su mayor incidencia se observa en regiones de clima cálido y cuando se presentan condiciones que favorezcan la sequía. En los Estados de

Sonora y Tamaulipas a ocasionado daños del 85 al 100 por ciento (SARH, 1992).

Pruebas de Sanidad para Hongos

Andersen *et al.*, citado por USDA (1984), menciona que existen varios métodos para descubrir los hongos que puedan ser llevados por semillas.

El objeto de los ensayos fitosanitarios es la detección e identificación de los organismos patógenos presentes en la semilla, así como la apreciación de los daños causados en ellas y la previsión de las posibles consecuencias de las infecciones existentes (Besnier, 1988).

Pruebas de Agar

Las pruebas de agar es un método ampliamente usado para descubrir hongos presentes en semillas, las cuales se desinfectan y colocan en las cajas que después de unos días de incubación presentan los patógenos que seran identificados por sus características bajo el microscopio. Los medios más usados en las pruebas de agar son: Agar con extracto de Malta y Papa, así como el Dextrosa Agar (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

Besnier (1988), menciona que para los hongos se utilizan tipos de agar con pH bajo y que se puede agregar antibióticos para evitar el crecimiento de bacterias.

Prueba del Papel Secante

El 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 (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

Besnier (1988), menciona que las pruebas con papel filtro son las más utilizadas y se aplican para toda clase de semillas, aunque hay hongos que no crecen adecuadamente en las condiciones de esta prueba y son difíciles de detectar. En este método se debe de estandarizar la temperatura, duración de la incubación y el tipo e intensidad de iluminación.

Después de la incubación de la semilla durante un tiempo determinado, se identifican los patógenos desarrollados por el examen al microscopio de semillas individuales para descubrir la presencia de cuerpos fructíferos de los hongos. Se ha ideado una modificación del papel secante, en donde se agrega una baja concentración de 2, 4 - D al agua con que se moja el papel, esto para inhibir la germinación de la semilla y facilitar el examen al microscopio (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

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 distribuidas uniformemente y se cubren con otra hoja de papel también empapada, para luego enrollarse y cubrirlas con polietileno para mantener la humedad durante la incubación (Anselme and Champion, 1981).

Besnier (1988), menciona que la incubación es durante siete días a 20°C en la oscuridad y que después de este tiempo se observan las semillas en el microscopio estereoscópico para detectar patógenos así como, se elimina la cubierta de la semilla para buscar acérvulos con setas negras y tabicadas.

Inspección de Semilla Seca

Esta prueba se realiza directamente con la ayuda de una lupa y proporciona información rápida sobre la sanidad de la semilla (Peretti, 1994).

En el examen de las semillas secas mediante el microscopio estereoscópico se observan un gran número de patógenos mezclados con las semillas como esclerocios o que han transformado la semilla en estructuras fungosas (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

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 estereoscópico buscando estructuras fungosas sobre las semillas.

Este examen tiene solo valor orientativo y no es más que un paso para comprobar la infección de patógenos por otro medio ya que en ocasiones las estructuras patógenas encontradas en las superficies de las semillas mueren pronto por lo que su presencia no es un signo de infección real (Besnier, 1988).

Prueba de Semillas Lavadas

El lavado de semillas se utiliza para descubrir esporas microscópicas llevadas en las semillas las cuales no se pueden ver a simple vista, esto se hace removiendo las esporas mediante el lavado y observando con el microscopio compuesto con la realización de montas (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

Para la detección de esporas de hongos se coloca un peso determinado de semillas en un frasco con un volumen fijo de alcohol o agua con detergente y se agita durante un tiempo preestablecido, la suspensión obtenida se examina mediante el microscopio compuesto para detectar e identificar las posibles

esporas encontradas, ya sea filtrando la suspensión y examinando el papel con el filtrado o haciendo montas de la suspensión. Además de observar e identificar las esporas se puede medir la cantidad de éstas en un peso determinado de semillas (Besnier, 1988).

Prueba de Síntomas de Plántulas

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 (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

Besnier (1988), menciona que 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 errores en la identificación de los agentes causantes de las lesiones observadas ya que diferentes agentes pueden presentar los mismos síntomas.

Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Semilla de Frijol

Kreitlow *et al.*, citado por USDA (1984), menciona que el tizón bacteriano común y tizón bacteriano de halo causados por *Xanthomonas campestris* *pv.* *phaseoli* y *Pseudomonas syringae* *pv.* *phaseolicola*, son las enfermedades bacterianas más importantes del frijol y ambas se transmiten por la semilla.

P. s. pv. phaseolicola causante del tizón de halo en frijol puede ser diseminada a grandes distancias en la semilla, convirtiéndose en la principal fuente de diseminación de la enfermedad. Además la capacidad infectiva de esta bacteria es enorme, ya que una docena de semillas infectadas distribuidas al azar en una hectárea son suficientes para producir una epifitía general en condiciones favorables (Campos, 1991).

P. s. 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. Está distribuida principalmente en regiones con climas templados y donde prevalecen temperaturas moderadas (SARH, 1992).

Las plantas provenientes de semillas enfermas son los focos primarios de infección del tizón común de donde se disemina hacia otras siembras sanas. Además un 0.02% de semilla infectada con *X. c. pv. phaseoli* puede ocasionar una epifitía (Campos, 1991).

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

La marchitez bacteriana causada por *Corynebacterium flaccumfaciens* se disemina por medio de la semilla obtenida de plantas enfermas y sobrevive en éstas hasta por 24 años. Esta enfermedad es común en las zonas templadas de los Estados de Querétaro, Aguascalientes y Guanajuato, principalmente en las siembras de abril y mayo (Campos, 1991).

Pruebas de Sanidad para Bacterias

Las semillas infectadas con bacterias generalmente no se distinguen de las semillas sanas, por lo cual es necesario realizar pruebas de sanidad para demostrar la presencia de bacterias en las semillas (Andersen *et al.*, citado por USDA, 1984).

Besnier (1988), menciona que para la detección de bacterias transmitidas por semilla se requieren técnicas más complicadas que las utilizadas para hongos y que solo se ha detectado la transmisión de seis géneros de bacterias:

Agrobacterium, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, de las cuales las más importantes son las del género de *Xanthomonas*, *P. s. pv. phaseolicola* y *C. michiganense*.

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 llaman “Gram Positivas” 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* y *Nocardia* que son Gram Positivas (Brathwaite, 1995).

Prueba en Medios Selectivos

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

La inoculación puede hacerse con extractos de semillas enteras desinfectadas superficialmente o con líquidos de lavados de semillas que son sembradas en cajas petri con agar nutritivo e incubadas a 30°C lo cual a las 48 horas se pasa a medios semiselectivos y se incuban nuevamente a 48 horas para examinar las características del crecimiento de las bacterias (Besnier, 1988).

Prueba de Serología

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 (Besnier, 1988).

De la Isla (1984), menciona que en la técnica de serología se emplean las propiedades antigénicas de los microorganismos y que no existe una estrecha relación entre los aislamientos de bacterias fitopatógenas y sus propiedades antigénicas. 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.

Técnica del Bacteriofago

Besnier (1988), menciona que esta técnica se ha utilizado para la detección de *X. c. pv. phaseoli* y *P. s. pv. phaseolicola* en judías, de *P. pisi* en guisante y *X. c. pv. vescicatoria* y *C. michiganense* en semillas de tomate.

El método se basa en la especificidad de los fagos en relación a las bacterias que invaden; las bacterias se suspenden en agar nutritivo licuado a 45° o 50°C. La suspensión se deposita en una placa de agar al dos por ciento, al solidificarse se añade una suspensión de fagos polivirulentos. Después del periodo de incubación ocurrirá lisis en el caso de bacterias idénticas o de especies cercanas (De la Isla, 1984).

Prueba de Sintomatología de Plántulas

Besnier (1988), menciona que el cultivo de plantas hasta la comprobación y aparición de síntomas requiere mucho espacio y tiempo pero que tiene la ventaja de poder utilizarse muestras muy grandes para la detección de infecciones en proporciones muy pequeñas pero que sin embargo es más normal el cultivo de plántulas.

Este método consiste en promover la germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas en ambiente adecuado para que aparezcan los

síntomas de la infección y detectar las plantas infectadas 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

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).

Este método tiene la objeción de que pueden producirse mutantes que presenten otras características entre las más empleadas y confiables aparecen la producción de pigmentos verdes fluorescentes en un grupo de *Pseudomonas*, producción de ácido hidroxibutírico en algunas especies de *Pseudomonas* y Producción de pigmento amarillo insoluble en agua de *Xanthomonas* (De la Isla, 1984).

Prueba de Germinación

Moreno (1984), define germinación como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales que provienen del embrión y que son

manifestaciones de la habilidad de la semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables en el suelo.

Las pruebas de germinación de semillas siguen siendo el criterio más importante y el más aceptado internacionalmente para medir la viabilidad de la semilla (Warham *et al.*, 1991).

Las pruebas de germinación son el medio más 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).

En las pruebas de germinación de las semillas es necesario sembrar semillas en un substrato uniforme (Toallas de papel enrollado, arena esterilizada, etc.) e incubarlas a temperaturas óptimas para que germinen. Después de transcurrido el período de incubación, se determina el número de plántulas normales, el número de plántulas anormales y el número de semillas no germinadas (Warham *et al.*, 1991).

El ensayo del poder germinativo proporciona información sobre el valor de las semillas en relación a su comportamiento a campo en condiciones agroclimáticas favorables y permite la comparación de la máxima capacidad de siembra de diferentes lotes (Peretti, 1994).

Peretti (1994), menciona que para evaluar los resultados del ensayo de germinación, se realiza la lectura del material durante su procesamiento y al término 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.- Son las que presentan un sistema radicular bien desarrollado, un eje caulinar con hipocotilo o epicotilo bien desarrollado, según los casos y una yema terminal; uno o dos cotiledones según los casos; raíz primaria larga y delgada cubierta de pelos radicales; todas estas estructuras pueden presentar daños ligeros considerándoseles aún plantas normales.

Plántulas anormales.- Son aquellas que muestran tales defectos que no parecen puedan dar lugar a plantas normales en condiciones favorables del cultivo.

Semillas duras.- Son aquellas que no han absorbido agua como consecuencia de la impermeabilidad de sus cubiertas.

Semillas frescas no germinadas.- Las que han absorbido agua pero que están aletargadas y no han pasado de esta fase inicial de la germinación.

Semillas muertas.- Son las simientes no viables que se deshacen al ser apretadas al término del ensayo. La imbibición tiene lugar como consecuencia

de fuerzas que responden a las leyes físico - químicas, por lo tanto ingresa agua a las semillas, éstas se inflan, pero como su deterioro es irreversible no ha de producirse la reactivación metabólica propia de la germinación y terminan descomponiéndose por putrefacción (Besnier, 1988 y Peretti, 1994).

Prueba de Vigor

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

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.

Prueba en frío.- Simula las condiciones de campo al inicio de la primavera con altos niveles de humedad en el suelo y bajas temperaturas del suelo.

Prueba con envejecimiento acelerado.- Las semillas se someten a temperaturas de 40 a 45°C y casi 100 por ciento de humedad relativa durante periodos de duración distintas antes de la prueba de germinación.

Prueba de vigor con estrés complejo.- Las semillas se remojan en hipoclorito de sodio a bajas temperaturas antes de la prueba de germinación. Posteriormente se miden las plántulas y se clasifican según su longitud (Warham *et al.*, 1991).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Las variedades de frijol utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

Semilla de frijol variedad azufrado cosechada en el ciclo otoño - invierno 1996 - 1997 en el Ejido de Tuxpan, Nayarit.

Semilla de frijol variedad negro jamapa cosechada también en el ciclo otoño - invierno en el Ejido de Tuxpan, Nayarit.

El material utilizado fué proporcionado por un productor del ejido antes mencionado.

Evaluación de la Microflora

Microflora Fungosa

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

Las semillas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al uno por ciento durante 10 minutos, enjuagándolas después con agua destilada esterilizada para limpiar los residuos del hipoclorito de sodio. Los pliegos de papel anchor previamente esterilizados se sumergieron en un sartén con agua destilada estéril hasta quedar bien empapados, posteriormente se sacó un pliego y se extendió en la cámara de transferencia desinfectada, colocando 50 semillas en el pliego de papel distribuidas uniformemente, luego se le colocó otro pliego de papel encima para después enrollarlos simulando un taco y colocando una liga en cada extremo para evitar que se salieran las semillas. Se hicieron dos repeticiones de 50 semillas para cada variedad.

Posteriormente se incubaron a 25°C por diez días. Después de este tiempo se observaron las semillas con la ayuda de un microscopio de disección y una aguja para observar la presencia de micelio lo cual se checaron las semillas por fuera y se les quitó la testa para ver si presentaban estructuras fungosas en los cotiledones, haciendo montas permanentes con lactofenol de todos los diferentes tipos de hongos que se encontraron en las semillas. Luego 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 Moreno, 1988.

También se utilizó la prueba de placas de agar, la cual consistió en desinfectar 100 semillas de cada variedad en un vaso de presipitado cada una

con hipoclorito de sodio al uno por ciento durante 10 minutos, retirando el exceso de hipoclorito de sodio enjuagando las semillas con agua destilada estéril y colocándolas en papel secante estéril. Posteriormente se colocaron 10 semillas por cada caja petri con PDA sellándolas con clean-pack e incubándolas a 25°C por 10 días, para luego observar la presencia de estructuras fungosas haciendo montas permanentes y observando al microscopio compuesto para identificarlas con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter, 1987 y Moreno, 1988, registrando los hongos encontrados.

Microflora Bacteriana

Se utilizó la prueba de medios semiselectivos cuyo procedimiento es el siguiente:

Se tomaron 100 gramos de semillas de cada variedad y se trataron por separado con ácido nítrico concentrado por dos minutos, luego se retiró el ácido y se enjuagaron con agua destilada estéril hasta alcanzar un pH de 6.5 a 7.0. Después se licuaron las semillas con agua destilada estéril, centrifugando el licuado por tres minutos.

Se agregó 1 ml. del sobrenadante en una caja petri cubriéndola con agar nutritivo y agitando para homogenizar, luego se sellaron con clean-pack y se incubaron a 25°C por tres días. Posteriormente se tomaron las colonias diferentes que crecieron sembrándolas en agar nutritivo, a las 48 horas se les hizo la tinción de Gram y se sembraron en los medios diferenciales YDC y MD5 incubándolas a 25°C por 48 horas para después observar el crecimiento,

consistencia y cambios en el medio de cultivo para determinar los géneros de las bacterias de acuerdo al procedimiento de Schaad 1988.

Otra prueba realizada fue la de siembra en placas de agar nutritivo, en la que se tomaron 30 semillas de la variedad azufrado de las seis repeticiones de la prueba de germinación en la que no hubo tal y solo presentaron exudados bacterianos. El tratamiento que se les dió a las semillas fue solo impregnación con Captán al realizar la prueba de germinación. Las semillas se tomaron de los tacos y se sembraron en tres cajas con agar nutritivo colocando 10 semillas por caja e incubándolas a 25°C por cuatro días, observando las diferentes colonias de bacterias que crecieron y resembrándolas por separado en cajas de agar nutritivo lo cual a las 48 horas de incubación a 25°C, se les hizo la tinción de Gram y se pasaron a los medios selectivos YDC y MD5 incubando a 25°C por 48 horas checando después el crecimiento, consistencia y cambio en el medio para posteriormente identificar los géneros de bacterias de acuerdo al procedimiento de Schaad 1988.

Evaluación de la Germinación y el Vigor

Se hicieron seis repeticiones de cada variedad con 50 semillas cada repetición que se colocaron en pliegos de papel anchor previamente esterilizados. Las semillas se trataron con el fungicida Captán para evitar el desarrollo de hongos que interfieren en la germinación. Los pliegos de papel 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 húmedo, enrollándolos hasta formar un taco colocando una liga en cada extremo para evitar que se salgan las semillas, los tacos se marcaron para un buen control metiendo las seis repeticiones de cada variedad en una bolsa de polietileno por separado sin cerrarlas para después depositarlas dentro de la cámara germinadora a 25°C constante con ocho horas de luz y 16 de oscuridad durante ocho días para inducir la germinación. Al quinto día se evaluaron plántulas normales sacándose del ensayo y regresando los tacos por tres días más cuando se anotaron plántulas normales, plántulas anormales y semillas sin germinar volviendo a evaluar al octavo día.

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

En la prueba de vigor, se utilizaron las mismas muestras para la prueba de germinación, los parámetros para evaluar son: 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 las que presentan un solo cotiledón, algún daño en el hipocotilo, una hoja primaria ausente y daño en la raíz.

Plántulas anormales.- Son aquellas a las que les falta alguna de las estructuras esenciales o algunas de éstas están dañadas irreparablemente, plántulas con una perturbación fisiológica en la que las estructuras esenciales están deformadas o desproporcionadas, o se encuentran podridas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos detectados en la semilla de frijol fueron varios siendo la incidencia de éstos muy variable.

Dentro de la microflora fungosa en la variedad azufrado se presentó una alta incidencia del hongo *Trichoderma viridae* con un 78 por ciento seguido de *Trichothecium sp* con un nueve por ciento (Cuadro 4.1).

En la variedad negro jamapa *Alternaria alternata* y *Macrophomina phaseolina* se presentaron en un 10 por ciento (Cuadro 4.2).

Respecto a la flora bacteriana la variedad azufrado mostro una alta incidencia de bacterias que pudieron ser saprófitas (58 por ciento) ya que degradaron las semillas y *Xanthomonas campestris pv. phaseoli* en un 93.33 por ciento. Para el caso del frijol negro jamapa solo hubo un 3.5 por ciento de *X. c. pv. phaseoli* la cual se observa en los cuadros 4.1 y 4.3.

Dentro de la microflora fungosa se detectaron los siguientes hongos: *T. viridae*, *Trichothecium. sp*, *A. alternata*, *M. phaseolina*, *Aspergillus flavus* y

Chaetomium sp. De los cuales según Campos (1991) solo *M. phaseolina* ataca al cultivo del frijol y se transmite por semilla pero es de importancia secundaria.

A. alternata y *Chaetomium sp* son hongos de campo, lo que demuestra que la semilla no tenía mucho tiempo de ser cosechada.

Cuadro 4.1 Incidencia de la Microflora Detectada en el Análisis de la Semilla de Frijol Azufrado del Estado de Nayarit. UAAAN 1998.

HONGOS	INCIDENCIA
<i>Aspergillus flavus</i>	1.5%
<i>Trichoderma viridae</i>	78%
<i>Trichothecium sp</i>	9%
Bacterias	58%

Cuadro 4.2 Incidencia de los Hongos Detectados en el Análisis de Semilla de Frijol Negro Jamapa del Estado de Nayarit. UAAAN 1998.

HONGOS	INCIDENCIA
<i>Aspergillus flavus</i>	2%
<i>Alternaria alternata</i>	10%
<i>Macrophomina phaseolina</i>	10%
<i>Chaetomium sp</i>	2%

Cuadro 4.3. Incidencia de *Xanthomonas campestris pv. phaseoli* en Semilla de Frijol Azufrado y Negro Jamapa del Estado de Nayarit.

VARIEDAD	INCIDENCIA
----------	------------

Azufrado	93.33%
Negro jamapa	3.5%

En el caso de *T. viridae*, este cubrió casi totalmente la semilla de frijol azufrado y también se desarrollo en el substrato; *Trichothecium sp* y *Chaetomium sp* tuvieron poco crecimiento. Según Moreno (1988), estos hongos se presentan en semillas con avanzado estado de deterioro. *A. flavus* presentó muy baja incidencia siendo el único hongo de almacén detectado.

En cuanto a la presencia de bacterias en la variedad azufrado las semillas fueron degradadas probablemente por bacterias saprófitas cuya presencia se debió al gran estado de deterioro que presentó la semilla debido a las condiciones de almacenamiento (alta humedad de la semilla y temperatura).

La detección de *X. c. pv. phaseoli* se realizó utilizando los medios semiselectivos YDC y MD5 siguiendo el procedimiento de Schaad (1988), resultó positivo ya que la colonia creció en el medio YDC que es semiselectivo para *X. campestris*; creciendo también en el medio MD5 que nos indica el *pv. phaseoli* (Cuadro 4.4). La alta incidencia de *X. c. pv. phaseoli* en la variedad azufrado indica que el cultivo del cual se obtuvo la semilla fué severamente atacado por esta bacteria y que el utilizar la semilla en el siguiente ciclo se presentaría alta incidencia en la enfermedad ya que un 0.02 por ciento de semilla infectada puede causar una epifitía según Campos (1991).

Cuadro 4.4 Resultados de la Detección de *X. c. pv. phaseoli* en los Medios Semiselectivos YDC y MD5 de Semilla de Frijol del Estado de Nayarit. UAAAN 1998.

VARIEDAD	COLONIA	YDC	MD5
Azufrado	Amarilla	(+) mucoide	(+) mucoide
Negro jamapa	Amarilla	(+) mucoide	(+) mucoide

La germinación y vigor en la variedad azufrado fue muy baja presentando un 3.33 por ciento de germinación, 0.33 por ciento de vigor, 3.33 por ciento de plántulas anormales y 93.33 por ciento de semilla muerta (Cuadros 4.5 y 4.6).

La variedad negro jamapa presentó alto porcentaje de germinación y vigor con 96 y 86.66 por ciento en comparación a la variedad azufrado.

Esto indica que la no germinación de la semilla de frijol azufrado pudo deberse no a la presencia de microorganismos sino al estado de deterioro de la semilla debido a las condiciones de almacenamiento como alta humedad de la semilla, temperatura, humedad relativa y el tiempo de exposición, permitiendo el desarrollo de bacterias saprófitas quienes se encargaron de descomponer las semillas (Garay y Mendoza, 1985) citado por Vidales (1991).

Cuadro 4.5 Capacidad de Germinación (%) de Semilla de Frijol del Estado de Nayarit. UAAAN 1998.

VARIEDAD	P. NORMALES	P. ANORMALES	S.MUERTAS
----------	-------------	--------------	-----------

Azufrado	3.33 %	3.33 %	93.33 %
Negro jamapa	96%	1.66 %	2.33%

Cuadro 4.6 Vigor (%) de la Semilla de Frijol del Estado de Nayarit UAAAN 1998.

VARIEDAD	X	PC	NF1	ND1	NF2	ND2	A	M	VIGOR
Azufrado	X	0	0	0	0.33	3	3.33	93.33	0.33 %
Negro jamapa	X	55	21	34	31.66	9.33	1.66	2.33	86.66%

Donde:

V = Vigor

A = Plántulas anormales

M = Semillas muertas

X = Media de 3 repeticiones por variedad

PC = Primer conteo

NF1 = Plántulas normales fuertes del primer conteo

ND1 = Plántulas normales débiles del primer conteo

NF2 = Plántulas normales fuertes del segundo conteo

ND2 = Plántulas normales débiles del segundo conteo

CONCLUSIONES

La microflora detectada fueron los siguientes hongos de campo: *Trichoderma viridae*, *Trichothecium sp*, *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus flavus* y *Chaetomium sp* y la bacteria causante del tizón común del frijol *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*.

RECOMENDACIONES

1. Separar las semillas manchadas, arrugadas y decoloradas ya que pueden ser portadoras de hongos y bacterias fitopatógenos.
2. Antes de almacenar la semilla asegurarse que la humedad de ésta sea la adecuada para retardar el deterioro y no pierda su calidad germinativa.

3. No utilizar semilla para siembra cuando el cultivo del que se obtuvo presentó alta incidencia de tizón común ya que solo se asegura la presencia de esta enfermedad en el siguiente ciclo.

LITERATURA CITADA

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

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

Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. McMillan Publishing Company, U.S.A. 218 p.

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

Brathwaite D., C.W. 1995. Introducción al Diagnóstico Fitosanitario I. Primera Edición. Editorial Futura. México. 72 p.

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

Isla, B.de, M.L. de la. 1984. Fitopatología. Primera Edición. Editorial Futura. México. 376 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. 1984. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Instituto de Biología, UNAM. México.**
- Moreno, M.E. 1988. Manual para la Identificación de Hongos en Granos Almacenados y sus Derivados. Primera Edición. UNAM. México. 109 p.**
- Peretti, A. 1994. Manual para Análisis de Semillas. Primera Edición. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 281 p.**
- Romero, C.S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Primera Edición. Universidad Autónoma de CHapingo. México. 347 p.**
- Sayers, R. 1982. Pruebas de Germinación y Vigor. Curso de Actualización sobre Tecnología de Semillas. Memorias. Buenavista, Saltillo, Coahuila México.**
- Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd Edition. APS. PRESS. St. Paul, Minnesota. 158 p.**
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1992. Guía Fitosanitaria para el Cultivo del Frijol. Primera Edición. Editorial Futura. México.**
- Sosa, M.C. 1996. Técnicas para el Diagnóstico de las Enfermedades de las Plantas. Primera Edición. IICA. México. 221 p.**
- USDA. 1980. Anuario de Agricultura de los Estados Unidos. Semillas. 7 ed. Compañía Editorial Continental. México. 1020 p.**
- Vidales, M.A. 1991. Influencia de los Factores Climáticos sobre la Calidad de la Semilla de Soya durante la Postmaduración. Tesis. Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila, México. 130 p.**
- Warham, *et al.*. 1991. Importancia de los Patógenos Transmitidos por Semilla. En curso pre congreso. XVIII Congreso de fitopatología. México. 84 p.**