

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**



**Prueba de Efectividad Biológica de un Producto Orgánico contra Hongos  
y Bacterias en el Cultivo de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)  
bajo Condiciones de Campo.**

**Realizada por:**

**ELENA SANTIAGO SANTIAGO**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

***Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Noviembre del 2001***

## INTRODUCCION

El frijol *Phaseolus vulgaris* L. es la leguminosa más importante de México y en América Latina, ocupa el segundo lugar después del maíz en consumo *per capita*. Se cultiva principalmente para la producción de semilla; no obstante, algunas variedades son utilizadas como frijol ejotero, que es producción de vainas verdes inmaduras ( SAGAR, 1997).

Uno de los cultivos básicos en México es el frijol, el cual presenta una gran diversidad de limitantes productivas baja rentabilidad, las diferentes prácticas agrícolas, las plagas, patógenos y malezas, como las principales causas de la baja productividad de esta leguminosa (SAGAR, 1997).

En 1999 la superficie sembrada de frijol en México fue de 2, 343, 688 ha y la superficie cosechada fue de 1, 694, 659 ha, siendo su valor en pesos de 5 ,727, 246, 357 (INEGI 2000).

No obstante la importancia del cultivo y la gran cantidad de investigaciones que se han realizado con el propósito de optimizar su cultivo e incrementar su rendimiento, sigue siendo necesario hacer investigaciones en esta especie, considerando que cada vez salen al mercado nuevos

productos con diferentes propósitos, unos para el eficiente control de plagas y enfermedades otros para el mejoramiento de los suelos donde se lleva a cabo su cultivo; otros con el fin de eficientar el agua, y algunos otros para aumentar la producción.

En el caso particular, esta investigación maneja un producto orgánico a base de extractos vegetales para el control de hongos y bacterias.

Los productos químicos, además de representar un costo elevado para el productor, además de que constituyen una amenaza para el medio ambiente, pues muchos de ellos contaminan fuertemente tanto el suelo y el subsuelo como el acuífero subterráneo, con las consecuencias catastróficas conocidas. Mientras que la aplicación de productos de tipo orgánico ( tal es el caso del **BELA plus** ) no representan peligro de contaminación al medio ambiente donde se aplican, puesto que además de ser eficientes para el control de los hongos y bacterias tiene la característica de incorporarse rápidamente al suelo y degradarse como materia orgánica en el mismo.

## **OBJETIVOS**

1. Probar la eficiencia del producto **BELA Plus** en el control de patógenos (hongos y bacterias) del suelo en el cultivo de frijol.
2. Determinar la dosis adecuada del producto para el control eficiente de patógenos del suelo en el cultivo del frijol.

## HIPOTESIS

1. El producto **BELA plus** será eficiente en el control de patógenos del suelo en el cultivo de frijol.
2. Al menos una de las dosis probadas del producto **BELA plus** controlará de forma eficiente los patógenos del suelo en comparación contra otro producto de síntesis química.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Origen e Historia

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L) es una planta originaria de América tropical y subtropical; su uso con características domésticas, según los restos más antiguos data de más de cinco mil años aproximadamente. La llegada de los españoles a nuestro continente permitió que esta leguminosa se introdujera al viejo mundo a comienzos del siglo XVI y se difundió a todo el mundo (SAGAR, 1997).

Kaplan,(1967) reporta restos de *Phaseolus vulgaris* con antigüedad de 6000 y 7000 años antes de Cristo en el suroeste de Estados Unidos de América, y 7680 años antes de Cristo en el Callejón de Huaylas, Perú.

Según Mark, (1979) las formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* se localizan en las partes Occidental y Sur de México, así como en Guatemala y Honduras en Centroamérica a lo largo de una franja de transición ecológica localizada entre los 500 y 1800 msnm . También se han encontrado en la parte oriental de la cordillera Andina, en América del Sur, entre los 1800 y 2800 msnm.

Abencerraje, (1984) menciona que el frijol ejotero es una leguminosa que ha sido subexplotada en México debido principalmente a la falta de difusión de las propiedades proteínicas del cultivo y al desconocimiento de su manejo.

## Ubicación Taxonómica del Cultivo

Lépiz, (1983) cita la clasificación del frijol *Phaseolus vulgaris*, de la siguiente manera:

Reino. ....Plantae  
Subreino .....Spermatophyta  
Tipo ..... Angiospermae  
Clase.....Dicotiledoneae  
Subclase.....Diapetala  
Orden.....Rosales  
Familia.....Fabaceae  
Subfamilia.....Papilionoideae  
Tribu.....Phaseoleae  
Subtribu ..... Phaseoleae  
Género.....*Phaseolus*  
Especie..... *vulgaris* L.

## Descripción Botánica del Cultivo

Según CIAT, (1985) debido al gran número de variedades que representan al cultivo de frijol se las clasifica de la siguiente manera:

(1) Las de hábito de crecimiento determinado arbustivo, (2) las de crecimiento indeterminado arbustivo y, (3) las de crecimiento indeterminado postrado.

El INEGI, (1997) reporta dos grupos, dejando sólo arbustivas de crecimiento bajo y determinado, y trepadoras de tallos largos y crecimiento indefinido.

La abundancia de la ramificación y follaje así como la duración de su ciclo vegetativo, también son importantes para su clasificación.

**Raíz.** Es pivotante y fibrosa, un eje principal con numerosas raicillas que se encuentran principalmente cercanas a la superficie. La raíz puede alcanzar hasta 1.2 metros de profundidad, pero generalmente se encuentra entre los primeros 20 – 25 cm y un diámetro de 5 cm . Galván, (1976).

**Tallo.** Es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular, debido a pequeñas corrugaciones de la epidermis.

El tallo tiene generalmente un diámetro mayor que las ramas; puede ser erecto, semiprostrado o prostrado, según el hábito de crecimiento de la variedad. (CIAT, 1985).

**Hojas.** Las hojas del frijol son de dos tipos: simples y compuestas. Están insertadas en los nudos del tallo y las ramas, en dichos nudos siempre se encuentran estípulas que constituyen un carácter importante en la sistemática de las leguminosas. (CIAT, 1985).

**Flor:** La del frijol es una típica flor papilionaceae. En el proceso de desarrollo de dicha flor se pueden distinguir dos estados: el botón floral y la flor completamente abierta. (CIAT, 1985).

**Inflorescencia.** Las inflorescencias pueden ser axilares o terminales. Desde el punto de vista botánico se consideran como racimos; es decir, un racimo principal compuesto de racimos secundarios, los cuales se originan de un complejo de tres yemas que se encuentran en las axilas, formadas por brácteas primarias y prolongación del raquis. (CIAT, 1985).

**Fruto.** El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido, puesto que el fruto es una vaina. Dos suturas aparecen en la unión de las dos valvas, una es la sutura dorsal y otra la sutura ventral. (CIAT, 1985).



**Semilla.** La semilla es exalbuminosa, es decir, que no posee albumen; por lo tanto, las reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. (CIAT, 1985).

**Legumbre.** Es el fruto de las leguminosas, también llamado vaina. La vaina puede ser verde, amarilla, blanca o plateada. Las semillas se propagan por dehiscencia, o sea, que la vaina al madurar se abre dejando escapar sus semillas. (SEP, 1983).

### **Importancia Económica del Cultivo**

La SARH, (1981) menciona que en México el cultivo del frijol se encuentra entre los principales productos básicos de la alimentación del pueblo mexicano, ocupando el segundo lugar en superficie cultivada, después del maíz.

Tiene importancia social, ya que para efectuar sus labores de cultivo se requiere de mano de obra asalariada, debido a que no está completamente mecanizado.

### **Requerimientos Climáticos y Edáficos**

El frijol ejotero es un cultivo de estación cálida; no se deberá plantar hasta que el suelo esté en condiciones adecuadas de temperatura, ya que por razón de su origen es notablemente sensible al frío.

La temperatura mínima de germinación es de 10 °C, y para su desarrollo vegetativo la temperatura óptima está entre 15 y 20 °C (INVFL Ch 1970).

Los factores climáticos que más inciden en la duración de las etapas de desarrollo son la luz y la temperatura; tanto promedios de estos factores como las variaciones diarias y estacionales de la temperatura, desempeñan una función muy importante en la duración de las etapas del desarrollo. (CIAT, 1985).

Una buena calidad de las vainas tiernas se puede mantener por unos pocos días a temperaturas inferiores a 5°C, pero en estas condiciones el daño por frío se induce. Algún daño por frío puede ocurrir aún a la temperatura recomendada de almacenamiento de 5°C después de 7-8 días. Entre 5 y 7.5°C se espera una vida de anaquel de 8-12 días.

La pérdida de agua es un problema común de los ejotes en postcosecha. Se requiere aproximadamente una pérdida de peso del 5% para que la marchitez y el arrugamiento se vuelvan visibles. Con una pérdida de peso del 10-12% los ejotes ya no son comerciables.

**Suelo.** Los suelos ácidos presentan un ambiente favorable para el crecimiento del frijol por muchos factores, como la influencia de materia orgánica del suelo.

**Fertilización.** El frijol ejotero es una leguminosa, por lo cual gusta de la asociación con la bacteria que fija el nitrógeno atmosférico. La presencia de

esta bacteria es notable, ya que provoca hinchamientos característicos llamados nódulos. (Cronquist, 1977).

**Métodos de cosecha.** El frijol no debe cosecharse cuando se presentan lluvias o después de que se ha aplicado algún producto químico con alto poder residual, pues si se realiza la cosecha en las condiciones mencionadas, en último término se puede dar lugar a enfermedades. El frijol ejotero debe ser cosechado cuando la vaina esta aún inmadura, si se desea obtener ejote; los cortes frecuentes inducen a la planta a que continúe produciendo nuevas vainas. (Splittstoesser, 1979).

Parsons, (1981) indica que los métodos de cosecha difieren de acuerdo con el propósito del cultivo; de esta forma, en el frijol ejotero se recolectan las vainas completas sin causarles daño.

**Indices de Cosecha.** Los ejotes tipo amarillo, verde o púrpura se cosechan en plena fase de rápido crecimiento y desarrollo. Los ejotes típicos se cortan aproximadamente 8-10 días después de la floración. Se les debe cosechar cuando el fruto es de color verde brillante, la vaina esta succulenta y las semillas son pequeñas y verdes. Después de este estado, el desarrollo de la semilla reduce la calidad y la vaina se vuelve esponjosa, correosa y pierde su color verde.

**Enfermedades.** Cuando los ejotes han sufrido daño por frío ocurren pudriciones por diversos patógenos. Durante el almacenamiento a  $\geq 7.5$  ( $\geq 45^\circ\text{F}$ ) también pueden presentarse pudriciones en la superficie de los tallos y los frutos si hay presencia de humedad libre. Los microorganismos comunes causantes de pudriciones postcosecha en ejotes son los hongos *Pythium*, *Rhizopus* y *Monilia*. Estos hongos pueden formar "nidos" de pudrición o desarrollarse en ejotes dañados o quebrados. (Parsons, 1981).

### **Hongos Asociados al Cultivo en Material Vegetativo**

#### ***Fusarium solani***

##### **Etiología**

Agrios, (1996) menciona que cuando el hongo ha crecido en un medio artificial como papa dextrosa agar, la producción de micelio aéreo es poco denso y generalmente blanco grisáceo.

El hongo produce clamidosporas, macroconidios y microconidios, aunque estos últimos se observan en muy raras oportunidades .

Los macroconidios se desarrollan principalmente a partir de unos conidióforos cortos ramificados, los cuales al emerger forman esporodoquios diminutos, esparcidos, sin estroma.

Los macroconidios son hialinos y fusiformes, y su célula apical es levemente encorvada y puntiaguda.

El tamaño y el número de septos del macroconidio varían de acuerdo con el medio de cultivo utilizado y las condiciones de incubación. (Agrios 1996).

**Figura No. 1** *Fusarium solani*, Toma al microscopio.

### **Epidemiología**

Se encuentra en suelos naturalmente infestados en forma de clamidosporas o en esporas de resistencia. El patógeno esporula en las lesiones que causa en las raíces, principalmente en las que quedan por encima del suelo, produciendo macroconidios, los cuales sobreviven como clamidosporas (Agrios, 1996).

### **Condiciones Favorable a la Infección**

Schroth y Hendrix, (1961) establecen que las clamidosporas de *Fusarium* germinan en el suelo cuando las condiciones como humedad, temperatura, oxígeno y nutrientes son las adecuadas.

Estos mismos investigadores observaron la germinación de clamidósporas en suelos contiguos a semillas de frijol y puntas de raíz a 16 horas después de que el contacto se realizó entre la parte del hospedero y el suelo.

### **Síntomas**

Los primeros síntomas se observan en el hipocótilo y en la raíz, primero en forma de manchas rojizas, cuando la plántula tiene de 8 a 15 días de

nacida; a medida que la enfermedad avanza las lesiones se unen y se tornan de color café; se extienden hasta el cuello de la raíz, y no tienen forma definida.

Las raicillas mueren por el ataque del hongo y permanecen adheridas a las plantas; éstas oponen poca resistencia al ser extraídas del suelo, no se observa un marchitamiento muy pronunciado del hospedante, aunque el crecimiento de la planta se retarda y se presenta amarillamiento y caída prematura de las hojas. En las plantas atacadas se desarrollan raíces adventicias que le permiten continuar vivas e incluso producir grano, pero si las condiciones son favorables, el hongo puede llegar a matarlas: primero aparece en la parte aérea cierta flacidez del follaje y finalmente la planta muere.

Al abrir la raíz principal ésta presenta ahuecamiento y manchas longitudinales de color rojizo a lo largo de la zona infectada, la pudrición en este caso es seca (Bolkan, 1980).

### **Control**

Barrera, (1977) señala que en general se recomienda una buena preparación del terreno, nivelar el suelo para evitar encharcamientos de agua ya que éstos favorecen el desarrollo del hongo. Además sugiere la rotación de cultivos y disminuir la densidad de población. Por otra parte, Bolkan, (1980)

,menciona que el daño por *Fusarium solani* debe disminuirse mediante la aplicación de los fungicidas, como Nabam, Formaldehido, PCNB o Benomil .

Papavizas y Lewis, (1975) concluyen que al tratar la semilla de frijol con Captafol, Carboxin ó Triforine a una dosis de 2.4 g/100g de semilla, dan un buen control sobre el daño causado por *Fusarium solani*.

### **Control Biológico**

Papavizas y Lewis, (1977) indican que con la aplicación al suelo de residuos maduros e inmaduros de soya, sorgo, cebada, avena, centeno y maíz, se redujo en forma significativa la enfermedad. *F. solani* se logró controlar adecuadamente a nivel de invernadero, al aplicar al suelo paja de cereales, harina de alfalfa y maleza; esta última fue algo fitotóxica, cualidad que aumentó la población de actinomicetos debido a la alta proporción de C:N (Olivas, 1972).

### ***Rhizoctonia solani* Kuhn**

#### **Importancia y distribución**

Anaya y Romero,(1999) mencionan que esta enfermedad se confunde comúnmente con la marchitez causada por *P. capsici* debido a la similitud en síntomas y, por lo tanto, su distribución e importancia no está bien definida; sin embargo, se ha identificado en Morelos, Estado de México y Guanajuato.

### **Etiología**

Ogoshi, (1987) menciona que *Rhizoctonia solani* presenta células multinucleadas en las hifas vegetativas jóvenes, forma un aparato esporífero localizado en el septo, además contiene una constricción sobre las ramificaciones hifales en el punto de unión con la hifa principal y formación de un septo en la ramificación del punto de origen, también ramificación cerca del septo distal de las células en hifas jóvenes, una coloración café de hifas aéreas maduras. Además, indica que el hongo puede producir células monilioides y esclerocios, aunque no en todos los aislamientos. Cuando se aísla en PDA, el hongo difiere en coloración de micelio y cantidad de esclerocios producidos; finalmente, afirma que *Thanatephorus cucumeris* es el estado perfecto o sexual de *Rhizoctonia solani*, y que contiene ocho grupos de anastomosis, mientras que Parameter *et al.*, (1969 ) reportan cuatro grupos de anastomosis.

Esta especie ha sido emparentada con *Corticium vagum* de los Basidiomicetos.

**Figura No. 2** *Rhizoctonia solani* Kuhn. Toma al microscopio.

## **Epidemiología**

Anaya y Romero, (1999) mencionan que las condiciones que favorecen la incidencia de la enfermedad son: exceso de humedad en el suelo y temperatura alrededor de 15 °C o mayores.

Este hongo produce estructuras de resistencia llamadas microesclerocios, que son como piedrecillas negras que quedan adheridas al



tubérculo, dando el aspecto de que estuviera impregnado de lodo. Dichas estructuras se producen al inicio de las lluvias; en las plantas suculentas se puede observar el micelio como filamentos de color café o ámbar a la altura del cuello de la raíz; esto lo diferencia de *Fusarium*, ya que en éste pueden observarse estriaciones de color rosa en la raíz porque la epidermis se agrieta y se forman conidios. *Rhizoctonia* sobrevive también en residuos de cosecha y se disemina en los tubérculos de papa. Los esclerocios germinan entre 8 y 30 °C, aunque el intervalo óptimo de temperaturas es de 21 a 25 °C

Las pérdidas que ocasiona esta especie van desde 20 a 50% de plantas muertas en siembra directa; a esta pérdida deben agregarse los gastos de replante, diferencias en maduración y reducciones en rendimiento.

La fase sexual de *Rhizoctonia solani* Kuhn es *Thanateporus cucumeris*, que se presenta en primavera y desarrolla un micelio de color blanco en los tallos podridos de la papa.

El hongo ataca un gran número de plantas y cada cepa es específica, como en el caso del frijol, mientras que otras tienen un mayor número de hospedantes y causan daños de diferentes grados de severidad; la gravedad del daño depende de la humedad y temperatura del suelo, del estado nutricional del inóculo y de los exudados producidos por las raíces de las plantas, mismas que estimulan el desarrollo del micelio. El hongo sobrevive en forma de esclerocios, micelio y basidiosporas; sin embargo, se desconoce la importancia que puedan tener estas últimas como inóculo.

Las estructuras se encuentran en el suelo en residuos de la cosecha anterior. El patógeno puede diseminarse por medio del agua de riego, por el viento que arrastra esclerocios y esporas a grandes distancias, así como por medio de semilla (Bolkan , 1980).

### **Infección de la Planta**

En cuanto a este proceso, Christou (1962) detalla el mecanismo de infección de *Rhizoctonia solani* en hipocotílos de frijol de la siguiente manera: : el hongo produce un cojinete de infección en la epidermis del hipocotílo y penetra la cutícula directamente por medio de clavijas de infección y simultáneamente originándose de los cojinetes de infección.

Después de la penetración de la cutícula y la pared celular, las clavijas de infección en la célula epidérmica se alargan a un tamaño normal como el de las hifas, las cuales se transforman en características hifas primarias que desarrollan un septo a distancia corta de su punto de origen; poco después vigorosa hifas invaden la corteza intracelularmente, pero más abundante intercelularmente, avanzando longitudinalmente entre los espacios intercelulares envolviendo las células corticales, y éstas son detenidas por la endodermis.

Algunas veces la hifa se ramifica de una manera ahorquillada antes de invadir el tejido inferior y el tejido invadido desarrolla una pronunciada coloración café la cual algunas veces se extiende con el avance del hongo.

Al completarse la infección se desarrollan esclerocios de varios tamaños en el tejido infectado, observándose hifas entrelazadas principalmente con células en forma de barril y el resto de las células del hospedero colapsadas sin observarse una organización de los esclerocios en la corteza y la médula. Finalmente la penetración en la epidermis sólo durante los estados tempranos de vida del hospedero.

### **Síntomas**

Anaya y Romero, (1999) mencionan que en condiciones favorables ataca plántulas antes de que emerjan o poco después de la emergencia, las lesiones son hundidas y de tamaño variable, con coloraciones café canela a café rojizo. Las áreas oscuras y necróticas son más evidentes cuando el tejido atacado es grande; si las condiciones son favorables, las lesiones se extienden y adquieren un aspecto hundido, que puede llegar a cubrir toda la base del tallo y destruir raíces, debilitando a la planta o causándole un acentuado amarillamiento. En plantas de más de 15 cm de altura ocasiona marchitez, en las raíces se observan áreas necróticas que varían en tamaño de acuerdo con el desarrollo de la enfermedad. Las partes aéreas se aprecian con clorosis, marchitez y por último sobreviene la muerte. Los síntomas en la parte aérea son más notorios después de la floración (marchitez y muerte de la planta). En el cuello provoca una pudrición no compacta, por lo que se desprende fácilmente la epidermis; esto último es la diferencia de la marchitez causada por *P. capsici*.

## **Control**

Anaya y Romero, (1999) sugieren que para evitar el exceso de humedad, sembrar cuando la temperatura del suelo sea superior a 15 °C y a menor profundidad.

Fumigar el suelo de los almácigos con bromuro de metilo o PCNB 75% en dosis de 8 a 10 g / m<sup>2</sup>, cuando se aplica en banda total, o 2.0 kg/100 L de agua cuando se aplica en banda o a lo largo del surco; existen otros productos específicos como Monceren y PCNB y después intervalos de cinco a siete días. En plantas más grandes se recomienda aplicar Captan, Benlate, Tecto o Monceren dirigido al cuello de la planta (aflojando la boquilla).

Críspin, citado por Campos, (1987) menciona que al tratar la semilla con fungicidas se reduce la incidencia del patógeno. Así mismo, señala que los más efectivos son Semesan, Arasan y Rhizoctol; este último muy efectivo contra *Rhizoctonia solani*.

El tratamiento del suelo, antes o durante la siembra, tiene la ventaja que controla los hongos en un buen volumen del suelo en el que crecen las raíces de las plantas. Así, ofrece mayor protección y por más tiempo que el tratamiento a la semilla (Beebe, 1984).

## ***Pythium irregulare***

### **Etiología**

Gilman, (1963) describe a esta especie con micelio bien desarrollado, hifas de 2-6  $\mu$  de diámetro con muchas ramas laterales; esporangios esféricos a piriformes, terminales o intercalares, 10 – 30 $\mu$  de diámetro, escasos en la mayor parte de los cultivos, formando esporas en una vesícula o germinando directamente como conidios. Tubo de descarga corto o igual al diámetro del esporangio; zoosporas desde pocas a 15 o más en la vesícula, 4 – 6 X 10 – 12 $\mu$ , ogonios terminales o intercalares, sésiles o pedicelados, esféricos a cilíndricos, de forma muy variable; la pared lisa o con varias protuberancias, de longitud variable las cuales pueden o no estar separadas por medio de una septa, diámetro del oogonio incluyendo las protuberancias 14 - 26 $\mu$ , oosporas lisas, sin llenar el oogonio en la madurez, de estructura típica con pared en la cual se encuentra embebido un corpúsculo refringente. Anteridios pedicelados, uno a tres por oogonio, muy raras veces hipóginos, por regla general naciendo un pedicelo oogonal.

**Figura No. 3** *Pythium irregulare*. Toma al microscopio

### **Epifitiología**

El tubo germinal de las esporas o el micelio saprófito de *Pythium* entra en contacto con las semillas (o los tejidos de las plántulas) de las plantas hospedantes, ya sea al azar o bien debido a que los exudados de esas plantas le sirven al hongo como nutrientes y estimulan quimiotrópicos para sus

zoosporas y micelio, los cuales se mueven o crecen en dirección de las plantas. El hongo penetra directamente en las semillas a través de sus cubiertas hinchadas y humedecidas, o bien a través de hendiduras, e incluso puede penetrar el embrión o a los tejidos de las plántulas emergentes mediante la presión mecánica y degradación enzimática; las enzimas pectinolíticas que secreta el hongo degradan la lámina media que mantiene unidas las células, dando como resultado la maceración de los tejidos. Las invasiones posteriores y la degradación de los tejidos es el resultado del crecimiento del hongo entre las células y a través de ellas. Al nivel de los puntos donde las hifas penetran por las paredes celulares, se estrechan aproximadamente la mitad de su diámetro normal.

Las semillas infectadas que han sido destruidas forman una masa putrefacta que consta principalmente del hongo y sustancias como la suberina y lignina, a las que el hongo no puede degradar.

### **Control**

Agrios, (1996) cita que las enfermedades que produce *Pythium* en los invernaderos pueden controlarse mediante el uso de suelos esterilizados con vapor o con calor seco, con compuestos químicos volátiles como el bromuro de metilo con o sin cloropicrina, y mediante el uso de semillas tratadas con esos compuestos. Sin embargo, también deben tratarse con una solución de sulfato de cobre al 1%. Aun así, es fácil y frecuente que el piso, las

herramientas y el material que se utiliza vuelvan a contaminarse con el suelo infestado de este hongo.

### **Control Biológico**

En años recientes se ha logrado controlar el ahogamiento de plántulas y a la pudrición de las semillas ocasionadas por este hongo tratando estas últimas con conidios de los hongos antagónicos *Trichoderma* sp., *Penicillium oxalicum* y *Gliocadium virens*, incorporando los conidios de *Trichoderma* o *Streptomyces* sp.

Algunas prácticas culturales en algunas ocasiones son útiles para disminuir el nivel de la infección, el drenaje adecuado de los suelos es el más importante de todos. Es recomendable mejorar el drenaje de los suelos pesados y de la circulación de aire entre las plantas.

En ocasiones, el tratamiento de las semillas va seguido de la aspersión de las plántulas con Metalaxyl, Ziram, Clorotalonil, Captán o compuestos cúpricos soluble; esto reviste una importancia particular cuando el suelo ha sido muy infestado con *Pythium*.

### ***Alternaria* spp.**

#### **Etiología**

Hifas estériles rastreras, septadas. Conidióforos solitarios o agrupados, erectos, septados, la mayoría simples, cortos. Conidios en forma de clava invertida, la mayoría con el ápice alargado, muriformes en la porción inferior,

de color oscuro, más claro en los extremos, en cadenas más o menos largas y generalmente simples (Gilman,1963).

**Figura No. 4** *Alternaria* sp. Toma al microscopio.

### ***Phoma* sp.**

#### **Etiología**

Picnidios globosos o ligeramente en forma lenticular con una papila pequeña en el ápice, membranosos a coriáceos o casi carbonosos, negros. Esporas pequeñas oviformes, fusiformes, cilíndricas a casi esféricas, unicelulares, hialinas, ordinariamente con dos gotas de aceite. Conidióforos filiformes, pocas veces cortos, o casi ausentes, simples o algunas veces bifurcados (Gilman,1963).

**Figura No. 5 y 6** *Phoma* sp. Tomada al microscopio

### ***Monilia brunnea***

#### **Etiología**

Colonias en agar redondas, sin extenderse, muy vellosas; hifas aéreas trepadoras densamente entretejidas, hialinas, 2.5-3  $\mu$  de diámetro; superficie de color café ante claro, regresando al café (Gilman, 1993).

Los conidióforos son producidos por el micelio aéreo, esparcidos sobre las hifas, 8-20  $\mu$  de largo, estrechándose repentinamente cerca del ápice para producir una célula corta como esterigma la cual produce cadenas de



conidios. Las cadenas conidiales frecuentemente ramificadas, lisas, de color ante claro,  $5.5 - 7.5 \times 3-4 \mu$  (Gilman, 1963).

## **Hongos Asociados al Cultivo en el Suelo**

### ***Collectotrichum lindemuthianum*, Sacc. Magn**

#### **Importancia y distribución**

Es una de las enfermedades más importantes del frijol en las zonas temporaleras de climas templados en México.

Se presenta en la Mesa Central y el Bajío, Chihuahua, Durango, Zacatecas, S.L.P, y Nuevo León, donde la temperatura fluctúa de 20 °C a 25°C durante el desarrollo del cultivo; además del frijol, ataca a otras especies del género *Phaseolus* .

#### **Etiología**

Acérvulos subcuticulares con conidióforos simples alargados y conidios unicelulares hialinos y con setas oscuras.

*Glomerella* sp. es el estado sexual de este hongo.

#### **Síntomas**

Es una enfermedad sistémica y vive sobre la semilla como espora o micelio y dentro de ella como micelio.

La fuente de inóculo son las esporas en el suelo o la semilla infectada y de tal manera que las plantas en estado de dos hojas presentan áreas necróticas y hundidas y posteriormente en las hojas se observan estas mismas lesiones en sus nervaduras y tejidos adyacentes, ocasionando la muerte de la planta.

El hongo ataca tallos, hojas, pecíolos, pedicelos, sépalos y vainas, y si esto último sucede ataca también a las semillas en formación. En las vainas es donde las manchas se observan de color café oscuro a negro hundidas, las cuales pueden penetrar hasta la semilla donde causa los daños más graves por que disminuye la calidad tanto del ejote como del grano.

Las lesiones varían de tamaño desde simples puntitos hasta manchas circulares hundidas de más de 1 cm de diámetro, pero que al juntarse forma una lesión más grande que cubre gran parte de la vaina .

Cuando existen condiciones favorables como temperatura de 18 °C y alta humedad relativa (80%), se observa en el centro de la lesión unas masas de coloración rosada que corresponden a los conidios.

La semilla atacada presenta manchas ligeramente hundidas en la testa, de tamaño variable y de color café oscuro.

Los daños disminuyen el rendimiento de 20 a 30 % o más en condiciones favorables, y baja considerablemente la calidad al manchar la semilla; cuando ataca plántulas les causa la muerte (Mendoza y Pinto, 1985).

Este patógeno sobrevive de una estación a otra sobre los restos de plantas infectadas y en la semilla.

Cuando germinan las semillas infectadas las lesiones que aparecen sobre los cotiledones sirven como fuente de inóculo secundario; las esporas son únicamente diseminadas por el agua y las hojas primarias y el hipocótilo son los focos de infección secundarios.

La penetración tiene lugar mediante una especie de cuña, que se forma en la cara del apresorio en contacto con el huésped y que atraviesa la cutícula por compresión mecánica.

Las salpicaduras de la lluvia y las gotas de agua arrastradas por el viento son los medios principales de diseminación local del patógeno (Walker, 1973).

La temperatura óptima para el desarrollo del hongo es de 17 a 18 °C; arriba de 27°C la infección no ocurre y debajo de 13°C, se reduce la infección (Mendoza y Pinto, 1985).

Las labores en los campos de frijol durante un período lluvioso o en presencia de rocío sobre las hojas, constituyen otra forma importante de diseminación, por el contacto de masas de esporas con el hombre, animales de labor y maquinaria. Para que se produzcan brotes epidémicos es esencial la coincidencia de períodos de tiempo lluvioso a intervalos frecuentes.

La antracnosis (*C. lindemuthianum*) puede desarrollarse en el frijol ejotero durante el transporte; en tales casos la infección ha tenido lugar en el campo en fechas próximas a recolección y las lesiones pasan inadvertidas durante el envasado (Lauritzen, 1919), citado por Walker (1973), quien descubrió que los síntomas tardan en aparecer sobre las legumbres unos cinco días a temperaturas de 22, 25 y 27 °C, siete días a 15.5 y 17.5 °C (Walker, 1973)

Es una enfermedad sistémica y vive sobre la semilla como espora o micelio y dentro de ella como micelio.

La fuente de inóculo son las esporas en el suelo o la semilla infectada y de tal manera que las plantas en estado de dos hojas presentan áreas necróticas y hundidas y posteriormente en las hojas se observan estas mismas lesiones en sus nervaduras y tejidos adyacentes, ocasionando la muerte de la planta.

El hongo ataca tallos, hojas, pedicelos, sépalos y vainas, y si esto último sucede ataca también a las semillas en formación. En las vainas es donde las manchas se observan de color café oscuro a negro hundidas, las cuales pueden penetrar hasta la semilla donde causa los daños más graves porque disminuye la calidad tanto del ejote como del grano.

Las lesiones varían de tamaño desde simples puntitos hasta manchas circulares hundidas de más de 1 cm de diámetro, pero que al juntarse forma una lesión más grande que cubre gran parte de la vaina.

Cuando existen condiciones favorables como temperatura de 18 °C y alta humedad relativa (80%), se observa en el centro de la lesión unas masas de coloración rosada que corresponden a los conidios..

### **Epifitiología**

La semilla atacada presenta manchas ligeras hundidas en la testa, de tamaño variable y de color café oscuro.

Los daños disminuyen el rendimiento de 20 a 30 %, más en condiciones favorables, y baja considerablemente la calidad al manchar la semilla .

Cuando germinan las semillas infectadas las lesiones que aparecen sobre los cotiledones sirven como fuente de inóculo secundario; las esporas son únicamente diseminadas por el agua y las hojas primarias y el hipocótilo son los focos de infección secundarios.

La penetración tiene lugar mediante una especie de cuña, que se forma en la cara del apresorio en contacto con el huésped y que atraviesa la cutícula por compresión mecánica.

Las salpicaduras de la lluvia y las gotas de agua arrastradas por el viento son los medios principales de diseminación local del patógeno ( Walker, 1973)

## **Control**

Para atenuar los daños ocasionados en las variedades susceptibles, se recomienda destruir los residuos de la cosecha anterior, rotación de cultivos por lo menos tres años, empleo de semilla sana y variedades resistentes, como Canario 107, Bayo Durango, Bayo 107, Seich 73, las cuales deben sembrarse de acuerdo con su adaptación en las diferentes zonas del país.

El uso de fungicidas es también recomendable, iniciando las aplicaciones cuando aparecen los primeros síntomas con Benomyl, Maneb, Zineb, Captafol, Folpet, Tuzet, Antracol, Ferban y otros, a las dosis recomendadas por el INIA o Sanidad Vegetal. (Mendoza y Pinto, 1985).

## ***Botrytis bassiana***

### **Etiología**

Césped miceliar extendido, como fieltro, blanco. Conidióforos erectos, blancos, simples o excepcionales bifurcados, con ramas laterales cortas.

Conidios globosos sobre las fialidas laterales o en cabezuelas a los lados del conidióforo, 2-3  $\mu$  de diámetro.

Este hongo ha sido descrito como parásito de larvas de insectos (Gilman, 1963).

## ***Genicularia***

### **Etiología**

Conidióforos erectos o ascendentes, hialinos, que se ramifican simpódicamente; conidios hialinos, bicelulares con células diferentes con una célula ápical redondeada, grande, ovoide que se inserta solitaria en ramificaciones simpódicas; es atrapadora y destructora de nemátodos, de los cuales se alimenta o bien puede ser saprófito ( Barnett y Hunter, 1999).

## Bacterias Asociadas al Cultivo

### ***Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*,**

#### **Tizón del halo**

##### **Importancia Económica**

Smith, (1992) menciona que en América del Norte, donde la mayoría de los cultivos llevan cierta resistencia a la bacteria, ésta, aunque de menor importancia que la del tizón común debida a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, es aún una enfermedad importante, que causó en 1997 pérdidas estimadas en dos millones de dólares. El mismo autor menciona que en Europa, donde los cultivares son más susceptibles, es probablemente la enfermedad más importante del frijol enano y de guía; se estima que las pérdidas de la vaina pueden ser de 62.5%.

#### **Figura No. 7** Sintomatología de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

##### **Síntomas**

Tres a cinco días después de la infección aparecen manchas pequeñas, acuosas, generalmente en el envés de la hoja (Omer y Wood, 1969).

Más tarde se forma un halo de tejido amarillo verdoso, alrededor de las lesiones acuosas.



El tallo y las vainas también pueden ser infectadas durante las epidemias severas y presentan típicas manchas grasosas.

Cuando la infección ocurre a través del sistema vascular, el tejido adyacente a las nervaduras y especialmente el de las ramitas, aparece húmedo y con una coloración rojiza.

Cuando la infección se origina a partir de semilla contaminada, se puede presentar adelgazamiento en un punto específico del tallo o pudrición de la unión en los nudos sobre los cotiledones. Por lo general, las vainas infectadas tienen manchas acuosas de color café o rojo, y las semillas en formación se pueden pudrir, o arrugarse y decolorarse. Las lesiones acuosas se presentan a los tres días de la inoculación de vainas desprendidas colocadas en agua o solución nutritiva ( Pitts y Pierce, 1966).

Zaumeyer y Thomas, (1957) encontraron un síntoma que consiste en el daño o destrucción del punto de crecimiento que tiene lugar después de que se ha sembrado la semilla infectada. El patógeno produce normalmente un exudado de color plateado en las lesiones, independientemente del órgano de la planta infectada.

La clorosis sistémica de la planta, con amarillamiento y malformación de las hojas, también se puede presentar sin que haya síntomas marcados de infección.

Coyne y Schuster, (1955) afirman que la clorosis y el halo típico de esta enfermedad se deben a una toxina no específica para ningún hospedante que produce la bacteria durante el proceso de infección. Esta toxina conocida como faseolotoxina, tiene la fitotoxina funcional principal, denominada M – g-fosfosulfamilornitina (Mitchel y Bielecki, 1977).

Pero los investigadores no están de acuerdo en si la toxina juega o no un papel importante en la respuesta de la planta a la infección. *P. syringae* pv. *phaseolicola* puede producir hemicelulosas que degradan los materiales de la pared celular del hospedante durante la patogénesis (Maino, 1972).

### **Etiología**

*P. phaseolicola* presenta las siguientes características: células individuales, en forma de varillas rectas que se desplazan por medio de flagelos polares, es gram negativa, estrictamente aerobia y no necesita factores de crecimiento. El poli – B- hidroxibutirato no se acumula intercelularmente como carbono de reserva; los cultivos producen pigmentos fluorescentes difusibles, particularmente en medios con deficiencia de hierro. La enzima arginina dihidrolasa no se encuentra presente.

La temperatura óptima de crecimiento varía de 20 a 23°C; en agar produce colonias de color entre blanco y crema con un matiz azulado, que puede estar acompañado por un pigmento verde fluorescente (Weber, 1973).

Las células bacterianas pueden sobrevivir almacenadas en nitrógeno líquido a -172 °C durante 30 meses sin que su patogenicidad se altere (Moore y Carlson, 1975).

### **Epidemiología**

*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* sobrevive en semillas infectadas y en residuos vegetales en la superficie del suelo hasta que las condiciones ambientales son propicias para el desarrollo de la infección (Schuster y Coyne, 1975).

La bacteria patogénica aparentemente no puede entrar directamente a las plantas a través de una cortada en la cutícula, pero es introducida por heridas de insectos a través de los estomas, de poros acuosos, de lenticelas y frecuentemente a través de nectarios de flores. Este patógeno puede sobrevivir por algunos meses en estado inactivo en los tejidos de la planta.

Al penetrar el patógeno a través de los estomas, de allí pasa al sistema vascular de la hoja; por las venas mayores y la yema central al peciolo y al tallo de la planta. La bacteria se traslada a los vasos fácilmente. En ataques severos llena las cavidades subestomáticas y lisígenas. Grandes grupos de células son disueltas y reemplazadas por masas de bacterias. La presión del exudado llega a ser tan alta que rompe la epidermis de los tallos jóvenes y el organismo emerge al exterior para servir de inóculo a nuevas plantas (Butler y Jones, 1947).

## **Diseminación**

Los métodos de diseminación del organismo causal son importantes por su relación con un posible control. La manera de distribución puede ser dividida dentro de dos categorías:

1. A grandes distancias, como de una a otra parte del continente.
2. De planta a planta o de campo a campo.

La enfermedad puede ser transportada de continente a continente por medio de semillas infectadas, las cuales propician una considerable diseminación. Plantas en crecimiento frecuentemente llevan lesiones en los cotiledones nudos cotiledonarios o en las primeras hojas. Esas lesiones gradualmente crecen y cuando las condiciones atmosféricas son suficientemente húmedas, masas pegajosas del exudado bacteriano se acumulan en la superficie de la masa pegajosa; la bacteria se extiende a otras plantas por varios agentes distintos, así como con la lluvia acompañada por el viento que lleva la bacteria a otras plantaciones, donde las condiciones son ideales y empiezan las infecciones secundarias.

## **Huéspedes**

La bacteria se menciona que ha sido transmitida a diferentes especies de *Phaseolus* además de *P. vulgaris*, como *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. angularis*, *P. bracteatus*, *P. acutifolius*, *P. polyanthus*, *P. polystachus*, *P. radiatus*, así como *Glycine max*, *Pueraria hirsuta* y *P. thunbergiana* (Zaunmeyer y Thomas, 1957).

Smith, (1992) indica que el cultivo importante atacado es el frijol, enano o de enrame, pero también son huéspedes naturales *Phaseolus lunatus* var. *macrocarpus*, *P. atropurpureus*, *P. radiatus*, *P. aureus*, *P. multiflorus*, *Pueraria thumbergiana* y *Pachyrhizus erosus*; sin embargo, se necesitaba interpretar estos datos con precaución, ya que la gama de huéspedes de los patovares de *P. syringae* en leguminosas es dudosa y puede haber empalmes.

### **Medidas de control**

Prácticas culturales, como el patógeno sobrevive entre las épocas de siembra en el tejido de frijol presente en la superficie del suelo, según Schuster y Coyne, (1975) se recomienda barbecho profundo y la rotación de cultivos a fin de disminuir la intensidad inicial del inóculo.

El uso de semilla libre de patógeno, producida bajo condiciones desfavorables para el desarrollo del organismo, es importante puesto que permite disminuir la cantidad del inóculo inicial dentro del cultivo (Zaumeyer y Thomas, 1957). Como el tejido vegetal en polvo contiene bacterias que pueden infectar a las semillas, Grogan y Kimble, (1967) proponen que este polvo se debe eliminar limpiando las semillas después de la cosecha. La semilla contaminada se puede tratar con productos químicos o antibióticos para destruir las bacterias que se encuentran en el interior de la semilla.

García (1980), menciona que no debe cosecharse cuando las plantas se encuentran húmedas.

**Control químico.** Se ha tratado de erradicar las bacterias que pueden encontrarse en la semilla antes de la siembra, pero estas medidas de control no han tenido mucho éxito, debido a que las bacterias en la semilla están protegidas por la cutícula, de manera que los métodos más usuales de tratamientos no son efectivos contra ellas, únicamente con tratamientos más largos, los cuales dañan considerablemente la germinación (García, 1980).

En Europa se ha recomendado la inmersión de semillas en agua corriente durante 12 horas y luego un período de 15 a 20 minutos en agua a temperaturas de 52 a 55 °C (Butler y Jones, 1994). Resultados de otros investigadores indican que los antibióticos estreptomicina, neomicina, bacitracina, cloromicetina, subtilin y penicilina han reducido la prevalencia del tizón del halo cuando semilla infectada fue remojada en soluciones acuosas de esos antibióticos antes de la siembra.

García, (1980) encontró que la aplicación de aspersiones de “Agrimycin – 100” controlan bien al patógeno.

Según Hagedorn *et al.*, (1969) el tizón del halo ha sido controlado mediante el uso del caldo bordelés, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre, óxido cúprico, sulfato de estreptomicina y sulfato de deshidroestreptomicina.

Sin embargo, el control no siempre es efectivo; estos productos se aplican con equipo terrestre o aéreo, semanal o bisemanalmente, a una tasa de 200 a 400 g / 100 L de agua o al iniciarse la floración y formación de vainas

a razón de 0.1 % de I.A. por cada 675 litros de agua / ha, para prevenir la diseminación y desarrollo del tizón del halo en las hojas y vainas (Taylor y Dudley, 1977).

### ***Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli***

#### **Tizón común**

##### **Distribución geográfica**

Es una enfermedad frecuente en áreas productoras de frijol; puede presentarse en vainas, hojas, tallos y semillas.

Esta enfermedad es más frecuente en los estados de Chihuahua, Durango, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Estado de México, Puebla y Tlaxcala (Campos, 1987).

**Figura No. 8** Sintomatología de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

##### **Síntomas**

Los síntomas son manchas traslúcidas de aspecto acuoso en el envés de los folíolos; las manchas se originan a partir de estomas, los cuales son puntos de entrada e infección; luego, estas manchas aumentan irregularmente de tamaño y con frecuencia coalescen (Yoshii, 1980).

El tejido infectado se ve flácido, esta rodeada de una zona estrecha de tejido amarillo limón posteriormente las lesiones se vuelven necróticas y de

color café y pueden llegar a cubrir un área tan amplia que causan defoliación o reducción del diámetro del tallo (Yoshii, 1980).

Las lesiones en las vainas se manifiestan en forma de manchas húmedas (hidróticas) que crecen gradualmente; se tornan rojo – oscuro y levemente hundidas. Cuando la infección ocurre durante la formación de la vaina la semilla se pudre o arruga.

Si se siembran semillas infectadas, las plántulas sufren infección sistémica que puede acarrear marchitez y muerte; durante los períodos húmedos, la superficie de los tejidos exuda un líquido bacteriano amarillento. En los peciolos de las hojas y en los tallos, pueden aparecer también manchas de aspecto acuoso. Al avanzar la enfermedad, a veces el sistema vascular se torna pardusco, apareciendo tumores de color pardo en la región próxima al primer nudo. Las plantas cargadas de fruto en ocasiones llegan a quebrarse por este punto (Walker, 1973).

### **Diagnóstico**

En el campo, el diagnóstico se puede hacer en base a los síntomas que se observan en las plantas enfermas.

### **Daños**

En Canadá y Estados Unidos se han registrado pérdidas en el rendimiento que varía de 10 a 38%; en Colombia se han calculado disminuciones de 22 y 45 % en el rendimiento de grano.



## **Etiología**

El tizón común del frijol es causado por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith y Dowson); la cual pertenece a la familia Pseudomonadaceae ( Buchanan y Gibbons, 1974).

*Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* presenta las siguientes características bioquímicas, físicas y fisiológicas. Producen células individuales en forma de varilla recta (bacilos), con un flagelo polar, gram-negativa y aerobia estricta, en agar nutritivo con glucosa produce un pigmento amarillo insoluble en agua denominado xantomadina y crecimiento mucoso; produce ácido como subproducto metabólico, a partir de arabinosa, glucosa, manosa, tralosa o celobiosa. Ocasiona además la proteólisis de la leche (Yoshii, 1980).

Produce a menudo una sustancia parecida a la bacteriocina; existen tres tipos de *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* : rugosa, lisa y semimucoso, esta última es la más virulenta; este patovar se distingue de *fuscans* por que éste es capaz de producir un pigmento de color café (melanina) en medio de cultivo que contenga tirosina (Campos, 1987).

## **Diseminación**

Obviamente las bacterias pueden ser diseminadas con bastante efectividad a partir de la semilla, ya sea que se encuentre fuera o dentro de ella (Zaumeyer y Thomas, 1957). Los residuos de paja de frijol infestados

presentes en los sembrados constituyen otro medio de diseminación de las bacterias (Schuster y Coyne ,1955).

### **Hospederos**

El bacilo ha sido encontrado parasitando al frijol mungo *Phaseolus mungo*, a la habichuela *Phaseolus coccineus*, al frijol caballero o “cachitas” *Dolichos lablad*, a la soya *Glycine max*, al caupi *Vigna sinensis*, al frijol terciopelo *Stizolobium deeringlanum*, al frijol lima *Phaseolus lunatus*, al *P aureus* , *P. acutifolius var. latifolius* y *P. angularis*, además del frijol de mata y de guía *Phaseolus vulgaris* (Zaumeyer y Thomas, 1957).

### **Epidemiología**

Las bacterias fitopatógenas pueden sobrevivir, sobre o dentro de la semilla infectada. Las bacterias penetran a través de grietas en la cutícula y continúan su avance por los espacios intercelulares hasta llegar al sistema vascular; como consecuencia de la infección sistémica pueden aparecer lesiones en las hojas y tumoraciones en el tallo (Campos, 1987).

El mismo autor asegura que la infección primaria puede iniciarse también a través de los estomas, mediante inóculos procedentes de los cotiledones infectados o restos de plantas enfermas; la propagación continua el inóculo secundario procedente de estas lesiones primarias, puede efectuarse mediante el agua de lluvia arrastrada por el viento, el polvo, los instrumentos de labranza, el hombre y los animales. Esta bacteria puede vivir

de 18 a 24 meses en la hojarasca y en otros residuos vegetales; también puede sobrevivir hasta por tres años en condiciones de humedad de 10 a 50 % y temperaturas de 25 °C.

*Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* es un patógeno de clima cálido; causa más daño a 28°C; en general la temperatura y la humedad alta son condiciones favorables para la enfermedad. Aunque las bacterias fitopatógenas no forman esporas, muchas toleran la desecación y pueden sobrevivir en condiciones extremas de sequía. Produce un polisacárido extracelular en medio de cultivo y en la planta hospedante, donde sobrevive por períodos prolongados, bajo diferentes condiciones ambientales (Yoshii, 1980).

### **Control**

Las prácticas culturales de uso más frecuente para reducir la incidencia del tizón común son: el uso de semilla libre del patógeno, rotación de cultivos y barbecho profundo.

Son recomendables algunos productos químicos, como: sulfato de cobre, hidróxido de cobre, el N – hidroximetil – N Metilditiocarbamato potásico ó “Bunema”, “Agrymicin 100”, caldo bordelés, estreptomycin, Kasugamycin, polimixina y aureomicina (Campos, 1987).

Lo mejor es sembrar variedades resistentes a esta enfermedad.

En cuanto a la resistencia de la planta, Schuster y Coyne, (1955) fueron los primeros en encontrar que *P. acutifolius* (frijol therapy) era resistente a *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*; luego Honma, (1956) empleó a *P.*

*acutifolius* como fuente de resistencia para incorporar en *P. vulgaris* la herencia de la resistencia y se encontró que se heredaba cuantitativamente.

## **Información General del Producto BELA plus**

### **Datos proporcionados por INTRAKAM, S.A. de C.V.**

**BELA plus** es un producto obtenido mediante la reacción entre algunas sustancias inorgánicas grado alimenticio, inhibidoras de hongos y bacterias, a las que se añaden el extracto de plantas desérticas (*Larrea tridentata*), más humectantes y penetrantes.

Para obtener una mayor efectividad, la aplicación debe lograr un total cubrimiento de la hoja, tanto en el haz como en el envés. Su período de protección varía de 10 a 15 días después de la aplicación, es estable y eficaz en suelos ácidos, neutros y alcalinos.

### **Modo de Acción**

Inhibe la acción de las enzimas fundamentales a nivel de la pared de la bacteria, del micelio y de los cuerpos fructíferos de los hongos mediante tres acciones principales:

1. Desnaturalización enzimática que genera cambios en la forma de las enzimas, de tal manera que no embone con el sustrato.
2. Interferencia entre la enzima y el sustrato.
3. Inhibición de la acción enzimática.

**BELA plus** produce estos efectos por que aporta una mayor cantidad de sustancias inhibidoras y antagónicas de las principales enzimas responsables de la elaboración de las sustancias fundamentales, que mantienen activa la pared de la bacteria del micelio y de los cuerpos fructíferos del hongo.

**BELA plus**, a través de la acción de algunos componentes principales y específicos del extracto vegetal (lignanós, flavonoides y alcaloides), inhibidores inorgánicos y otros inhibidores enzimáticos, así como de los oxidantes, desactiva la enzimas de la pared de la bacteria, del micelio y de los cuerpos fructíferos del hongo mediante una desnaturalización que puede ser química o morfológica.

Esta inhibición en primera instancia produce un bloqueo de la síntesis de sustancias fundamentales en la pared, una ruptura de la misma y posteriormente su plasmólisis.

La inhibición del desarrollo del microorganismo ocurre en forma progresiva después de la aplicación, dependiendo de la concentración y el tipo de microorganismo.

### **Dosis**

Para aplicación al suelo en surco abierto, la dosis por hectárea es de un litro en 100 litros de agua.

### **Formas de Aplicación**

- Aplicaciones foliares
- Aplicaciones al suelo por inyección tónica
- Aplicaciones al sistema de riego
- Aplicación al suelo por aspersión
- Tratamiento a la semilla.

### **Información General de TIMSEN (Anónimo,1999)**

Es uno de los fungicidas, bactericidas que protege a las plantas contra enfermedades causadas por los agentes antes mencionados, así como para desinfectar equipos agrícolas, también es usado en tratamientos de post – cosecha en frutas, tubérculos y hortalizas.

### **Características Fisicoquímicas**

**TIMSEN** es estable y trabaja desde pH 3 hasta pH 11, con relación a su medio de aplicación. El nombre químico del ingrediente activo es N – alkyl dymethyl benzyl amonio.

Este no es un producto tóxico debido a que su  $DL_{50}$  en ratas albinas es de 525  $mg\ kg^{-1}$  de peso.

### **Mecanismos de Acción.**

La eficiencia y efectividad de **TIMSEN** se fundamenta en la técnica de refinamiento y distribución de los radicales alquil para integrar el alquil dymethyl benzyl amonio, molécula formada por carga lipofílica positiva (catiónico) e hidrofílica negativa (aniónica).

Es estable en presencia de materia orgánica.

**TIMSEN** desactiva las enzimas proteolíticas de la pared a través de una desnaturalización química y morfológica la cual no permite el embone correcto entre la enzima y el substrato; de esta manera se inhibe en la pared de la bacteria, del micelio y de la espora del hongo, así como en la cápside del virus, todas las reacciones bioquímicas dependientes de estas enzimas; esto genera un bloqueo de la síntesis de sustancias en la pared, una ruptura de la misma, y posteriormente su plasmólisis. La muerte del microorganismo ocurre en un tiempo hasta de 30 minutos después de la aplicación, dependiendo de la concentración y el tipo de microorganismo.

Su mecanismo de acción se fundamenta en dos principios básicos, considerando su uso agrícola.

- La lenta liberación del ingrediente activo de **TIMSEN**, cuando es aplicado en forma sólida y mezclado con fertilizantes químicos y orgánicos, ya que incrementa su tiempo de mayor actividad biológica.



- Cuando se diluye **TIMSEN** en agua se libera inmediatamente el ingrediente activo, entrando en solución, lo que implica que su actividad biológica sea menos prolongada.

En la planta **TIMSEN** a través de su fracción dimetil y la urea tiene una alta afinidad con las enzimas transportadoras, lo que permite su movimiento tanto acro como basipétalo.

La fracción urea, que es mínima en relación con las dosis de aplicación, forma parte de los compuestos nitrogenados, integrándose así a los metabolitos primarios.

La fracción alquil por su alta polaridad sigue la ruta de los inhibidores y en función de su poca cantidad se integra al etileno para seguir desempeñando junto con esta sustancia las acciones fisiológicas correspondientes.

La fracción alquil es solo un radical para mantener el ingrediente activo estable hasta entrar en contacto con el blanco (microorganismo o bien la planta). En este caso el radical alquil sigue la ruta metabólica de los precursores adentro de la planta.

La fracción bencil amonio tiene una acción específica sobre microorganismos, y en la medida que tiene contacto con ellos su concentración va disminuyendo, ya que cada acción requiere de una cierta

cantidad de bencil amonio, por lo cual esta sustancia no tiene ningún efecto colateral metabólico en la planta, ni tampoco tóxico en el suelo.

### **Relación Costo – Beneficio**

Es difícil establecer un rango de costo - beneficio de **TIMSEN** en cuanto a rentabilidad de los resultados, debido a que a veces no existe punto de comparación entre la pérdida causada por las enfermedades que **TIMSEN** controla y el valor del producto. Sin embargo, algunos estudios en papa y ornamentales arrojan una relación de 1: 10 hasta 1: 100.

### **Uso Agrícola**

**TIMSEN** es usado en aspersiones foliares, aplicaciones al suelo (líquido o en mezcla con fertilizantes y otros agroquímicos), en microaspersión, así como en riego subterráneo a diferente concentración, dependiendo del tipo de microorganismo a prevenir o eliminar.

### **Formas de Aplicación**

- Foliar
- Riego por goteo
- Riego rodado

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del Área Experimental**

Este experimento se llevó a cabo en el ciclo agrícola verano-otoño del 2000, en el rancho Los Pinos, propiedad de la Promotora Rural Las Alazanas, el cual está ubicado en la carretera No. 57 México-Piedras Negras, de la cual se toma la desviación a San Antonio de las Alazanas, perteneciente al municipio de Arteaga, Coahuila, México; cuyas coordenadas son: latitud Norte 25° 20' 24'', longitud Oeste 100°47' 53'', y una altitud de 2100 msnm.

El análisis de muestreo de suelo y material vegetativo, para la identificación de hongos y bacterias presentes en el cultivo, se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología, perteneciente al Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### **Características del Área Experimental**

Cada parcela experimental constó de 5 surcos de 10 m de longitud, con una separación de 0.90 m entre surco y surco, conformando un área total de 45m<sup>2</sup> por cada parcela.

La superficie experimental fue de 900 m<sup>2</sup>, mientras que la superficie por cada unidad experimental como ya se dijo fue de 45 m<sup>2</sup>.

### **Clima del área experimental**

El área experimental cuenta con un clima BW (h) w (e), que se clasifica como clima desértico con condición de temperatura cálido, sobre 22 °C y extremos entre 7 y 34 °C, con un régimen de lluvias de verano, de acuerdo al sistema Koppen, modificado por García, (1987); con una temperatura media anual de 22.8 °C, según Mendoza (1983); la precipitación media anual es de 319.3 mm.

### **Suelo del área experimental**

El tipo de suelo que se encuentra en el área experimental es E + Hc, que se clasifica de acuerdo a CETENAL, (1972) como calcáreo con textura media.

### **Vegetación del área experimental**

La región presenta características, según CETENAL, (1972) de pastizal inducido.

## **TRATAMIENTOS**

En el experimento se evaluó un producto orgánico a diferentes dosis, en el cual se utilizó otro producto como testigo comercial, con los cuales se le dio forma a los diferentes tratamientos que se muestran a continuación.

**CuadroN°: 1** Dosis de los productos utilizados por tratamiento.

N° de tratamiento	Fuente	Dosis utilizada
1	Bela Plus	Baja: 20 mL en 4 L de agua
2	Bela Plus	Media (dosis comercial): 40 mL en 4 L de agua
3	Bela plus	Alta: 80 mL en 4 L de agua
4	Timsen	T. C.: 5.32 g en 4 L de agua
5	Agua	T. A. (agua): 32 L /ha.

**Cuadro No. 2** Distribución de los Tratamientos y Bloques en el lote experimental.

I	II	III	IV
T1	T <sub>1</sub>	T1	T1
T2	T2	T2	T2
T3	T3	T3	T3
T4	T4	T4	T4
T5	T5	T5	T5

T<sub>1</sub> =Bela Plus dosis baja

T<sub>2</sub> = Bela Plus dosis media

T<sub>3</sub> = Bela Plus dosis alta

T<sub>4</sub> = TIMSEN (testigo comercial) dosis recomendada

T<sub>5</sub> = Agua (testigo absoluto).

Una vez establecido el cultivo se realizó una aplicación de los productos a evaluar.

La 1ª aplicación se realizó el 22 de junio del 2000 al momento de la siembra; a la dosis calculada por parcela se le agregaron 4 L de agua, esto para tener uniformidad en la aplicación.

Para esta actividad se utilizó una mochila de mano y la aplicación fue dirigida al suelo sobre la semilla.

### **Material Utilizado**

El cultivo utilizado para el experimento fue el frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad Black Valentine, la cual presenta un ciclo vegetativo de alrededor de 60 días.

### **Variables a Evaluar**

- Detección poblacional de bacterias y hongos fitopatógenos.
- Géneros y especies de tales microorganismos en los diferentes tratamientos

### **Preparación del Terreno para la Siembra**

Las actividades realizadas para el terreno fueron el barbecho, rastreo, surcado y repaso del surcado; este último se llevó a cabo con azadones.

## **Siembra**

La siembra se realizó a dos semillas por cada 30 cm aproximadamente de distancia entre planta y planta; esto se llevó a cabo el día 22 de junio del 2000; se calculó un mínimo de 85% de germinación.

## **Fertilización**

En el caso de la fertilización la fórmula fue la de 80 – 100 – 100 en donde se utilizó el Fosfato Mono - Amónico (MAP) 12 –61- 00 y Nitrato de Amonio de fórmula 33.5 – 00 – 00 como fuentes para formular los requerimientos. Para lo cual se calculó por medio de una regla de tres, donde se obtuvo que se necesitaban 164 kg de MAP y 180 kg de Nitrato de Amonio por ha.

Una vez obtenidos los datos anteriores, se tuvo que calcular la cantidad a aplicar de fertilizante por parcela, por lo que se realizó otra regla de tres simple y se obtuvo que se necesitaban 738 g por parcela de MAP y 810 g por parcela de Nitrato de Amonio.

La fertilización se dividió en dos partes, la primera después de la siembra el 24 de junio del 2000 y la segunda un mes después que fue el 24 de julio del 2000, por lo que se tuvieron que realizar nuevos cálculos, los cuales son los siguientes:

$$738g / 2 = 369 \text{ g por parcela de MAP}$$

$$810g / 2 = 405 \text{ g por parcela de Nitrato de Amonio}$$

Las aplicaciones se realizaron a chorrillo.

## Fertilizantes Foliares

En las primeras semanas de desarrollo del cultivo, se fue observando una deficiencia, la cual provocó un retraso en el crecimiento además de una clorosis, por lo que se tuvieron que realizar dos aplicaciones de fertilizantes foliares, esto para proporcionarle nutrientes a la planta directamente para un efecto de recuperación rápida, además de un mejor desarrollo.

La primera aplicación se llevó a cabo el 5 de Julio del 2000, en la cual se aplicaron los siguientes productos.

**Cuadro No. 3.** Primera aplicación de fertilizantes foliares y dosis.

Producto	Dosis
Ácido Giberélico	50 g/ha.
Sinerba NPK	200 g/ha.
Sinerba Plus	5 g/ha.
Sinercid (dispersante)	100 ml

Cabe mencionar que todos los productos anteriores se mezclaron y se diluyeron en 16 litros de agua, los cuales se aplicaron en el lote experimental.

La segunda aplicación se realizó el 16 de Agosto del 2000, con los siguientes productos.



**Cuadro N:º4** Segunda aplicación de fertilizantes foliares.

Producto	Dosis
Sinerba Complex	100g / 10,000 m <sup>2</sup>
Fulmigib 20	5 ppm / 10,000 m <sup>2</sup>

Estos productos se diluyeron de igual manera en 16 litros de agua.

Sin embargo, cabe mencionar que Sinerba Complex, es un compensador foliar múltiple activado con vitaminas, ácidos húmicos y fúlvicos.

### **Control de Malezas**

En el lote experimental se tuvieron problemas con las malezas, tales como trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) y nabo silvestre (*Brassica campestris*), para las cuales el control se llevó a cabo manualmente, tratando de que todo el ciclo del cultivo estuviera libre de estas malezas, pero debido a la agresividad de reproducción fue difícil mantener el cultivo completamente limpio.

### **Control de Plagas**

Para este control se realizaron tres aplicaciones de insecticidas elaborados a base de extractos de ajo que actúan como repelente, esto se aplicó a una dosis de 160 mL en cada 10 litros de agua; además de una aplicación de Kobidin 800, que es un repelente orgánico a base de aceite

vegetal, a una dosis de 24 mL en 12 litros de agua. Las plagas que se presentaron fueron chicharritas, pulga saltona y chapulines; estos últimos el ocasionaron un daño de defoliación, aunque cabe mencionar también que los conejos fueron las que más daño causaron, ya que no hubo manera de controlarlos.

### **Riegos**

Los riegos se realizaron por aspersion, aunque se tuvieron graves problemas ya que en algunas partes el sistema se encontraba averiado y en una ocasión el sistema de bombeo dejó de funcionar por algún tiempo, debido a que sufrió una descompostura, por lo que los riegos fueron irregulares.

## Técnicas de Aislamiento de Microorganismos

### Metodología para la Detección de Hongos Fitopatógenos a partir de Suelo

1. Se pesa 1 g de suelo de la muestra a analizar, se agrega a un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril y se agita hasta tener una solución homogénea.
2. De esta suspensión se realizan diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  y se toma 1 mL de la suspensión madre y se transfiere a otro tubo que contenga igualmente 9 mL de agua destilada estéril, y así sucesivamente se repite este paso hasta la dilución  $10^{-5}$  utilizando una pipeta diferente para cada dilución.
3. De cada dilución que se realizó se tomaron las de  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  las cuales se sembraron en cajas con medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) tomando 0.1 mL de la suspensión y difundiendo en toda la caja petri con una varilla de vidrio.
4. Luego se procedió a incubar las cajas a la temperatura ambiente del laboratorio o en la incubadora a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C durante 8 ó 10 días.
5. Una vez desarrollados los hongos se purificaron y se realizaron las preparaciones correspondientes, o sea las laminillas de las cepas de hongos.
6. Se observaron al microscopio compuesto y se identificaron con la ayuda de las claves taxonómicas de (Barnett y Hunter, 1999).

**Metodología para la Detección de Hongos Fitopatógenos a partir de Material Vegetativo.**

1. Desinfección del tejido vegetal con hipoclorito de sodio al 5 %.
2. Lavar con agua destilada estéril y secar utilizando papel filtro estéril.
3. Sembrar en medio de cultivo PDA.
4. Incubar las placas de los cultivos a temperatura ambiente del laboratorio durante 8 a 10 días.
5. Preparar laminillas de las cepas de los hongos desarrollados en las placas de cultivo.
6. Observar al microscopio compuesto e identificar con el uso de clases taxonómicas.

## Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias

### Medios Diferenciales

Para Schaad, (1990), autor a quien seguiremos de alguna manera en lo relativo a bacterias, la adición de ciertos reactivos o compuestos químicos dentro de un medio, puede dar como resultado la inhibición o cambios en el crecimiento de ciertos microorganismos, lo cual permite una diferenciación entre algunas bacterias.

**Medio D3.** Es selectivo para especies de *Erwinia*, la cual característicamente produce una coloración roja en el medio; lo intenso del color depende de las especies.

Las colonias son pequeñas, y las especies del grupo *amylovora* tornan un color naranja.

**Medio D4.** Selectivo para especies de *Pseudomonas*. En el caso de *Pseudomonas solanacearum* no se desarrollan colonias pequeñas, blanco cremoso o amarillo pálido, o transparente fluorescente.

**Medio D5.** Selectivo para especies de *Xanthomonas*

### Medio SX agar

El medio SX puede ser usado para el aislamiento de *Xanthomonas campestris* y varias otras especies que hidrolizan almidón para tejido vegetal y suelo. También es útil para la siembras directas de semilla contaminada.

**Figura No . 9** Siembra en Medio SX Agar.

### **Tinción de Gram o Tinción Diferencial**

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas es la Tinción de Gram, por que no solo permite determinar la forma y agrupación de las bacterias, sino también es de considerable valor en la identificación y clasificación, al separar a las bacterias en Gram negativas y Gram positivas. Las bacterias que retienen el primer colorante o sea el cristal violeta, son Gram positivas y las que son decoloradas por el alcohol y adquieren la coloración roja o parda según el colorante de contraste empleado, son Gram negativas.

### **Metodología**

1. Hacer un frotis en un porta objetos, colocar una gota de agua destilada y suspender una pequeña muestra bacteriana con la ayuda de una asa bacteriológica y secar con calor.
2. Cubrir el frotis con cristal violeta y dejar actuar durante un minuto y lavar con agua corriente.
3. Cubrir el frotis con lugol, dejar actuar un minuto, lavar con agua corriente.
4. Decolorar con alcohol etílico de 95 o alcohol – cetona 1:2 y lavar con agua corriente.

5. Cubrir el frotis con safranina, dejar actuar durante 1 minuto y lavar con agua corriente.
6. Secar al aire, luego agregarle una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio compuesto.

**Figura No. 10** Tinción de Gram (-).

### **Prueba de RYO**

La reacción de Gram también puede corroborarse por medio de la prueba de RYO, que consiste en colocar una gota de suspensión bacteriana concentrada mezclada con una gota de KOH al 3%.

Suslow *et al.* citados por CIMMYT, (1997) mencionan que la prueba de RYO es rápida, confiable y simple.

Sin embargo, el método no es viable para *Bacillus megaterium* y algunas cepas Gram + de *Clavibacter* spp.

**Figura No. 11** Prueba de RYO

### **Tinción de Flagelos**

Los flagelos son apéndices celulares responsables de la movilidad de la bacteria y su disposición se ha utilizado durante mucho tiempo como un criterio taxonómico, claro que hay algunas especies que carecen de ellos.

Para poner de manifiesto estas estructuras se requiere de tinciones especiales basadas principalmente en el engrosamiento de su diámetro, ya que los

flagelos son sumamente delgados y no visibles con el objetivo de inmersión (100X).

### **Metodología.**

Para realizar esta preparación es necesario trabajar con mucho cuidado, ya que los flagelos son muy frágiles y se pueden desprender muy fácil.

1. Colocar una gota de agua esterilizada en el extremo de un porta objetos.
2. Con el asa bacteriana tomar un poco del crecimiento bacteriano desarrollado en el medio y depositarlo en la gota de agua para que se forme una suspensión; también se puede partir del crecimiento en medio líquido.
3. Se inclina el portaobjetos de tal manera que la gota se deslice suavemente a lo largo de aquél.
4. Dejar secar al aire.
5. Cubrirlo durante 5 minutos con el mordente de flagelos.
6. Escurrir y enjuagar con agua de la llave evitando que caiga de golpe sobre la preparación.
7. Se adiciona cristal violeta y se deja durante 2 minutos.
8. Se deja escurrir y se enjuaga con agua de la llave muy suavemente.

Se deja secar para observar al microscopio con el objetivo de inmersión

Rodríguez, 1994.



## Prueba de Oxidasa

Esta prueba se debe realizar en cultivos jóvenes de 24 horas sembrados en agar nutritivo o medio B de King; es necesario para esta prueba, según Kovacs, 1956; Bradbury, 1970, citados por CIMMYT, 1997, poner una gota del reactivo fresco de oxidasa, sobre un papel filtro; enseguida se toma una pequeña muestra visible de la colonia de la bacteria, esto con una asa bacteriológica la cual se frota en el papel filtro donde se colocó la gota del reactivo.

Si la reacción es positiva se forma un halo de coloración azul oscura, la cual aparece inmediatamente en menos de 10 segundos. La reacción es negativa, cuando no aparece el color o si éste aparece después de 1 minuto.

Algunas bacterias ( como muchas cepas de las *Xanthomonas*), inducen el color de 15 a 60 segundos estrictamente hablando, pero otras tardan para ser positivas. Esta solución es tóxica y carcinogénica, por lo que se recomienda que no entre en contacto con la piel y se debe preparar justo antes de usarse y protegerse de la luz (forrar el matraz con papel aluminio), o ponerlo en un frasco azul.

El análogo del Dimethyl también puede ser usado, pero éste produce una reacción roja (Sands, 1990) citado por CIMMYT, (1997). Esta prueba es importante para determinar de todas maneras si la bacteria tiene extracromo

de oxidasa, pero puede confundirse si la reacción ocurre después de los primeros 10 segundos y es equivocadamente positivo.

Muchas de las bacterias saprófitas de plantas que son fluorescentes en el medio B de King son positivas a la oxidasa y similarmente a dos patógenos del trigo, *P. fuscovaginae* y *P. cichorrio*, fluorescentes en el medio B de King y son oxidasa – positiva; estas especies pueden ser distinguidas por un examen como la detección de Dihidrolasa de Arginina ó el uso específico de Carbohidratos.

### **Prueba de Catalasa**

La catalasa es una enzima que se produce y se encuentra en todo crecimiento bacteriano activo, capaz de usar oxígeno para respirar. En general las bacterias que no respiran con oxígeno no producen catalasa.

### **Metodología**

En una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de Hidrógeno) se le agrega un poco de crecimiento bacteriano y se mezcla.

Inmediatamente se presenta una efervescencia, si esto sucede entonces la prueba es positiva.

### **Prueba de Formación de Levana**

Para este procedimiento, Lelliot et al., 1996; Dye y Kemp, 1977 citados por CIMMYT, (1997), mencionan el uso de cajas petri conteniendo agar nutritivo más sucrosa al 5% y una vez solidificado el medio con la ayuda de

una asa bacteriana se realiza una siembra por punción tomando la muestra de un cultivo puro de la bacteria.

La producción de levana ( polímero de fructuosa) es positiva si después de siete días de incubación a 25 °C, muestran colonias grandes mucoides y umbonadas, (CIMMYT, 1997).

**Figura No. 12** Formación de levana.

### **Dihidrolasa de Arginina**

La Arginina es un aminoácido, que puede ser catabolizado en Ornitina mediante una reacción enzimática que produce ATP y Amoniaco ( $\text{NH}_3$  ).

El compuesto es generalmente conocido como Dihidrolasa de Arginina por que contiene dos enzimas que producen L–Citrolina.

Ciertas *Pseudomonas* pueden desarrollarse bajo condiciones anaeróbicas mediante este mecanismo, como un resultado del Carbamoil fosfato, un producto asociado con la producción de ornitina. (CIMMYT, 1997).

**Figura No. 13** Prueba de dihidrolasa de arginina.

### **Hidrólisis de Almidón**

El almidón es un polímero de glucosa, ampliamente distribuido en el reino vegetal como sustancia de reserva. Ciertas bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas* en su mayoría), son capaces de polimerizar el almidón por medio de enzimas extracelulares, las cuales hidrolizan el almidón y la maltosa.

### **Procedimiento**

1. El medio de cultivo de almidón se siembra la bacteria problema y se incuba por 4 días a 28 °C.
2. Después de este período adicionar unas gotas de solución de lugol sobre el cultivo bacteriano y se observan los cambios que se presentan.
3. Si después de adicionar el lugol se forma un halo transparente por abajo o alrededor del crecimiento bacteriano, se considera la prueba positiva.

Cuando todo el medio adquiere una coloración azul significa que la bacteria está hidrolizando, por lo tanto la prueba también se considera positiva, de lo contrario, si el medio al haberle agregado lugol toma una coloración totalmente oscura, entonces la prueba se considera negativa (Rodríguez, 1994).

**Figura No. 14** Prueba de Hidrólisis de Almidón.

### **Prueba de Tolerancia al Cloruro de Tetrasolio (TTC)**

Las *Xanthomonas* no son fácilmente distinguidas como otras bacterias en forma de varilla, oxidativas, Gram negativas; esto por su nutrición o examen

fisiológico. Sin embargo, ellas son inusualmente sensibles al tetrasolio (Leliott *et al.* citados por CIMMYT, 1997).

### **Procedimiento**

1. El medio en TTC se vacía en cajas petri
2. Con una asa bacteriológica se toma una porción de la bacteria
3. La cual se siembra por punción.

### **Figura No. 15** Prueba de resistencia al cloruro de tetrasolio

Si la bacteria crece en este medio y además toma una coloración roja con un halo blanco alrededor, la prueba se considera positiva; de lo contrario, si no hay crecimiento la prueba se considera negativa.

### **Produccion de Arabinosa**

La arabinosa es un carbohidrato utilizado como fuente de carbono en diferentes medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas para identificación de bacterias. Como por ejemplo: producción de ácido a partir de disacáridos.

### **Figura No. 16** Producción de arabinosa.

### **Producción de Indol.**

Algunas bacterias bajo condiciones aeróbicas y en ausencia de azúcares, son capaces de producir indol en medios que contengan suficiente

triptofano para tal fin, ó puede emplearse caldo nutritivo, pero es mejor el caldo triptofano o tripticasa puesto que contiene mayor cantidad de triptofano (Rodriguez, 1994).

### **Metodología**

1. Sembrar en un tubo con caldo nutritivo la bacteria problema.
2. Incubar a 28°C durante 24 a 48 horas.
3. Del reactivo de Kovac adicionar 0.3 mL a cada uno de los tubos sembrados.
4. Agitar perfectamente y observar los cambios de coloración.
5. El alcohol isoamílico tiene como función extraer el indol del medio que sobresale a la superficie en forma de una capa delgada, y al estar presente el p- dimetil amino benzal se forma un nuevo compuesto que da una coloración roja.

Si se forma un anillo rojo en la parte superior del tubo, la prueba se considera positiva. Si no hay formación del anillo rojo la prueba es negativa.

**Figura No. 17** Prueba de producción indol

### **Licuefacción de Gelatina.**

La gelatina es una proteína simple, obtenida de la hidrólisis del colágeno, la cual puede ser despolimerizada por todas aquellas bacterias que sintetizan la exoenzima gelatinasa. Sin embargo, es importante señalar que el medio

donde se va a probar la acción de dicha enzima debe estar exento de carbohidratos, ya que al ser fermentados inhiben la síntesis de la gelatina.

### **Metodología**

1. Se siembra la bacteria problema en un tubo que contenga gelatina nutritiva
2. Se incuba a temperatura ambiente, o bien a 28 °C durante cuatro días.
3. Se mantienen los tubos por unos 10 ó 15 minutos a temperatura ambiente o en refrigerador a una temperatura de 18 °C.
4. Se observa la consistencia del medio.

Si el medio de cultivo sembrado permanece líquido, en comparación con el testigo que deberá estar sólido, la prueba es positiva; por el contrario, si los medios sembrados presentan la misma consistencia que el testigo, la prueba es negativa (Rodriguez,1994).

### **Reducción de Nitratos**

La prueba de reducción de nitratos (adaptado por Bradburg, 1970 y citado por CIMMYT (1997), menciona que es particularmente útil para distinguir *Xanthomonas* spp. la cual no reduce nitratos, para muchos que se encuentran dentro de las *Pseudomonas* spp.; esto, una vez realizado el medio y puesto la bacteria e incubado.

La reducción de nitratos a nitritos toma lugar en la superficie una coloración roja después de un momento, entonces la prueba se considerará positiva; sin embargo, si los nitritos no son detectados, esto no necesariamente indica que la bacteria no reduce nitratos, puesto que algunas bacterias producen nitrógeno molecular ( $N_2$ ) para nitritos. En este caso sería muy necesario un metabolito intermediario, el cual puede ser el zinc, ya que esto reduce algunos nitratos presentes a nitritos, después de algunos minutos de haber aplicado el zinc.

La superficie se torna de una coloración roja, confirmando así si el patógeno reduce o no nitratos a nitritos. (CIMMYT, 1997).

### **Metodología**

1. Sembrar la bacteria en tubos con caldo nitrato.
2. Incubar durante 5 días.
3. A partir de las 24 horas de incubación, probar en uno de los tubos la reducción de los nitratos al agregar 1 mL de la solución A ( 0.8% de ácido sulfanílico en ácido acético 5N ) y enseguida de 1 mL de la solución B(0.5% naftilamina en ácido acético 5N (Rodríguez,1994).



**Figura No. 18** Reducción de nitratos.

### **Producción de H<sub>2</sub>S**

Ciertas bacterias tienen la capacidad de reducir los aminoácidos sulfurados (cisteína, metionina) con la formación de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), y su presencia puede ser fácilmente detectada al añadir proteínas con aminoácidos sulfurados, al medio de cultivo, y también una sal de plomo o hierro, que al reaccionar con el gas producido, formarán un sulfuro metálico de color oscuro.

### **Metodología**

1. Se toma una pequeña muestra de la bacteria problema y se siembra por estría en tubos con medio de cultivo.
2. De ahí se le coloca una tira de papel impregnada con acetato de plomo; este no debe tener contacto con el medio.
3. Se incuba a 28°C por 96 horas.
4. Se examinan los tubos diariamente durante 7 días para detectar la aparición de una coloración café en la superficie del medio de cultivo, o bien por eso se le pone la tira de papel para que la coloración café o negra aparezca en el papel. Esta coloración es debida a la reacción entre el H<sub>2</sub>S producido

por la bacteria y el acetato de plomo presente en el medio de cultivo. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente: (Rodríguez, 1994).



**Figura No. 19** Prueba de Producción de H<sub>2</sub>S

### **Hidrólisis de Esculina**

Todas las *Xanthomonas* patovars *campestris* hidrolizan esculina a través de β Glucosidasa, reacción que resulta de la glucosa y dihidrocumarina, la cual toma una coloración café oscuro para este procedimiento (Sands, 1990); (Lelliott y Steas, 1987 citados por CIMMYT), se mezclan, disuelven y calientan 10 g de peptona, 1 g de esculina, 0.5 g de citrato de amonio férrico y 12 g de agar en 1 litro de agua destilada. Colocar 5 mL dentro de cada tubo para la prueba, esterilizar los tubos en autoclave a 121 °C por 15 minutos e inocular por estría en el medio.

La reacción es positiva si ésta progresivamente se va obscureciendo y poniendo de un color indefinido en 3 a 4 días, y desaparece su fluorescencia bajo la luz ultravioleta, Sin embargo, la prueba de hidrólisis de esculina se utiliza para diferenciar el patovar *phaseolicola* del *pv syringae*.

**Figura No. 20** Prueba de hidrólisis de esculina.

## **Pruebas Rápidas de Patogenicidad**

### **Reacción de Hipersensibilidad en Tabaco.**

La reacción de hipersensibilidad es una prueba muy útil dentro de la fitobacteriología, por que con ella se puede determinar fácil y rápidamente si una bacteria es o no fitopatógena, sobre todo para aquellas bacterias aisladas de muestras con manchas foliares y tizones, aunque también algunas que causan pudriciones pueden dar la reacción positiva.

Esta prueba, también es útil en la identificación de especies de *Pseudomonas* del grupo fluorescente.

### **Metodología**

Para llevar a cabo esta prueba, primeramente se prepara una suspensión bacteriana con  $10^{-7}$  UFC/ mL y por medio de una jeringa esterilizada se infiltra a los espacios intercelulares de una hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum*), ya sea a través de una nervadura central o de lámina foliar.

Las plantas tratadas se mantienen a temperatura ambiente 26 – 30 °C, dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación; si la zona infiltrada presenta turgencia o necrosis la prueba se considera positiva (Rodríguez,1994).

## **Pudrición del Tubérculo de Papa**

Para las pruebas aisladas de órganos con pudrición, la patogenicidad se puede valorar con la prueba de pudrición del tubérculo de papa, y los resultados se pueden observar a las 24 horas de haberse realizado.

### **Metodología**

Un tubérculo de papa, de preferencia de la variedad Alpha, se lava, seca y se desinfecta superficialmente, bañándola con etanol al 70 %, seguido de un flameado (evite adicionar mucho alcohol porque al quemar se podrá dañar las capas externas del tubérculo y se correrá el riesgo de contaminación por bacterias esporuladas, como *Bacillus* spp.); de este tubérculo se cortan rebanadas de aproximadamente 5 mm de grosor y se colocan en cajas petri con papel filtro (previamente esterilizado); se pueden acomodar dos rebanadas por caja y una de ellas servirá de testigo.

A cada una de las rebanadas se les hace una incisión superficial y sólo en una de ellas se pone crecimiento de la bacteria a probar; finalmente se le adicionan unos 2 – 3 mL de agua esterilizada para mojar el papel y crear un ambiente húmedo, se incuban a 28 °C durante 24 – 72 hrs.

A partir de las primeras 24 hrs se palpa el tejido de cada una de las rebanadas; si la que ha sido inoculada se siente blanda indica que la bacteria

probada sintetiza enzimas pectolíticas y es muy probable que sea el agente causal de la pudrición.

Al igual que la prueba anterior, también sirve para diferenciar variedades patogénicas de *Pseudomonas fluorescentes* (Rodríguez, 1994).

### **Método de Biolog.**

La identificación microbiana comprende 5 pasos fundamentales. Estos pasos se aplican a todas las identificaciones. Un escaso número de especies poseen peculiaridades que pueden requerir un paso extra a técnicas especiales de manejo (Anonimo, 1999).

**Paso 1:** Se aísla un cultivo puro en medio Bug.

El aislamiento de un cultivo puro no es siempre algo fácil. Las bacterias a menudo tienen superficies pegajosas y células que a veces se juntan en grupos.

Como primer paso para una identificación precisa, se realizan siembras en estrías en medio de cultivo de agar usando técnicas correctas para generar colonias bien aisladas. Siempre deben usarse medios de cultivo **Biolog** recomendados y en condiciones adecuadas de desarrollo o de crecimiento.

**Paso 2:** se realiza una tinción de Gram y se determina el protocolo de prueba. La técnica de tinción de Gram apropiada y la interpretación son el segundo paso importante en el proceso de identificación.

**Paso 3:** se prepara el inóculo a la densidad celular especificada. Los microbiólogos a veces están entrenados para preparar suspensiones bacterianas de manera casual, con frecuencia juzgando tal densidad microbiana al tanteo.

Esta práctica no dará resultados exactos y reproducibles. La suspensión bacteriana determina la suspensión de oxígeno, un parámetro clave a controlar cuando se prueban microorganismos en placas de Biolog.

**Paso 4:** se inocula e incuba en placas de **Biolog**. Se pipetea la cantidad específica de suspensión bacteriana en la placa del **Biolog**, se cubren e incuban las placas bajo las mismas condiciones de temperatura y atmosféricas usadas para el cultivo del microorganismo en cuestión. Las placas de **Biolog** no necesitan recubrimientos de aceite o productos para revelar a color.

**Paso 5:** se lee la placa y se determina el proceso de identificación. Después de un período apropiado de incubación, se leen las placas a simple vista o utilizando el lector "MicroStation". En cualquier caso, el modelo formado

en los “hoyos”, se inserta en el software “MicroLog, el cual busca en la base de datos y da la identificación en cuestión de segundos (Anónimo, 1999).

**Figura No. 21** Prueba de Biolog.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados que a continuación se presentan son los que se obtuvieron después de una aplicación con el producto orgánico **BELA plus**.

La identificación de hongos, tanto de suelo como de material vegetativo, se basó en las claves taxonómicas de Gilman, 1963 y Barnett y Hunter, 1999.

**Cuadro No. 5** Hongos aislados de material vegetativo del muestreo general.

<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>	<b>T<sub>4</sub></b>	<b>T<sub>5</sub></b>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
<i>Monilia brunnea</i>	<i>Monilia brunnea</i>	<i>Monilia brunnea</i>	<i>Monilia brunnea</i>	<i>Monilia brunnea</i>
<i>Phoma</i> sp.	-	<i>Phoma</i> sp.	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
-	<i>Pythium irregulare</i>	<i>Pythium irregulare</i>	-	<i>Pythium irregulare</i>

El producto **BELA plus** no tuvo efecto en ninguna de las dosis para el caso de los hongos como *Fusarium solani*, *Alternaria* sp., *Monilia brunnea* y *Rhizoctonia solani*.

Al parecer, el producto **TIMSEN** controló eficientemente *Pythium irregulare*, igual que la dosis baja de **BELA plus**. *Phoma* sp. se comportó



de una manera muy irregular, ya que se presentó en dos de los tratamientos, incluyendo para este organismo el tratamiento de la dosis alta. Sin embargo, en el testigo comercial hubo un control eficiente, y tampoco se aisló del testigo absoluto, tal vez por la acción de antagonistas en un suelo sin tratar.

**Cuadro No. 6** Hongos aislados del suelo a partir del muestreo general.

<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>	<b>T<sub>4</sub></b>	<b>T<sub>5</sub></b>
<i>Fusarium solani</i>				<i>Fusarium solani</i>
	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>		<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
	<i>Botrytis bassiana</i>	<i>Botrytis bassiana</i>		<i>Botrytis bassiana</i>
				<i>Genicularia</i> sp.

Por lo que se refiere a los aislamientos de muestras de suelo *Genicularia* sp., que es un hongo reportado como asociado a nemátodos (de acuerdo con Barnett y Hunter, (1999) únicamente se aisló en el testigo absoluto, y pudiera ser que fue afectado por los productos nematostáticos aplicados en un experimento simultáneo llevado a cabo por Barreto, (2001) y la explicación sería que no tuvo nemátodos para su nutrición o bien que el nematostático presentó algún efecto en el hongo.

*Fusarium solani* se presentó únicamente en la dosis baja de **BELA plus**; no se presentó en el testigo comercial, pero sí estuvo en el testigo absoluto.

*Colletotrichum lindemutianum* se presentó únicamente en la dosis media T2 y en ambos testigos. *Botrytis bassiana* se aisló en dos tratamientos de **BELA plus** y también en el testigo absoluto.

Para el caso de hongos, el producto **BELA plus** no actuó eficientemente con una sola aplicación; esto nos indica que se deben de realizar más aplicaciones directamente, tanto foliares como dirigidas al suelo.

Los resultados que a continuación se presentan son los que se obtuvieron después de una aplicación con el producto orgánico **BELA plus**.

La identificación de las bacterias tanto de suelo como de material vegetativo se basó en la metodología de Shaad, 1990; Rodríguez, 1994; CIMMYT, 1997, y Lelliott y Stead, 1987.

**Cuadro No. 7** Bacterias aisladas de material vegetativo a partir del muestreo general realizado.

T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
Dosis baja	Dosis media	Dosis alta	Testigo comercial	Testigo absoluto
_____	_____	_____	_____	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>phaseolicola</i>

Los datos de la identificación de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* aparecen en el cuadro **Nº9** del Apéndice.

La presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* en material vegetativo pone de manifiesto que hubo un control de la bacteria en las tres dosis del producto evaluado; el testigo comercial igualmente tuvo un control sobre esta bacteria, ya que sólo se presentó en el testigo absoluto.

**Cuadro No. 8** Bacterias aisladas de suelo a partir del muestreo general realizado.

T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
Dosis baja	Dosis media	Dosis alta	Testigo comercial	Testigo absoluto
_____	_____	_____	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>

Los datos de la identificación de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* aparecen en el cuadro **N°10** del Apéndice.

Se encontró la presencia de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en el testigo comercial como inóculo en el suelo, pero no se encontró causando daño, ya que tal vez no tuvo las condiciones adecuadas para manifestarse. Por algún motivo, este patógeno no apareció en el testigo absoluto.

Un trabajo que se instaló en las mismas parcelas con un nematostático aplicado con tratamientos similares (Barreto 2001), es decir, el testigo absoluto igual para ambos experimentos y en el que el control de nemátodos permitió una marcada preponderancia en las poblaciones de rabaditidos

(bacteriofagos ) que tal vez tengan una preferencia por *Xanthomonas*, y menos por *Pseudomonas*.

*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* se encontró únicamente en el testigo absoluto, lo cual indica que hubo un efecto tanto del producto evaluado como del testigo comercial.

Por lo que se refiere al producto en sí ( **BELA plus**), su actividad biológica es relativamente corta, de 20 a 25 días, además de que en el suelo cualquier sustancia sufre una degradación inmediata.

Los datos de su identificación aparecen en el cuadro **Nº9** del Apéndice

## CONCLUSIONES

El producto **BELA plus**, aplicado directamente donde está el problema, provee un control eficiente contra hongos, tanto en la dosis recomendada como en una dosis alta. Sin embargo, el producto no tiene una acción sistémica, ya que no hubo un buen control de hongos en la parte aérea de la planta.

Al realizar una sola aplicación al suelo, los resultados son poco consistentes, lo que indica que es conveniente efectuar más de una aplicación, ya que su actividad biológica es muy corta, debido a que se incorpora rápidamente al suelo.

Para el caso de bacterias, el producto tuvo una respuesta muy satisfactoria, ya que *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* encontradas en el testigo comercial y en el testigo absoluto, no se hallaron en ninguna de las dosis aplicadas de **BELA plus**.

## LITERATURA CITADA

- Abencerraje, R. 1984.** Respuesta del *Phaseolus vulgaris*, bajo condiciones de riego al fertilizante líquido obtenido por biodegradación anaeróbica del estiércol de bovino en la región de Derramadero Coahuila. Tesis de M. C. Especialidad de Suelos Programa de Graduados UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Agrios, N. G. 1996.** Fitopatología, 2ª ed. Editorial Limusa. México D.F. 838 p.
- Alexopoulos, J. C. and C.W. Mims. 1979.** Introductory Mycology. John Wiley and Sons. Third edition. New York. 632 p.
- Anaya, R. S. y N. J. Romero. 1999.** Hortalizas y enfermedades. Editorial Trillas. México, D. F. 544 p.
- Anónimo. 1999.** Información de Microlog System. Release 40. User Guide.
- Barnett. H. L. and Hunter. 1999.** Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Fourth edition.
- Barreto, A. J. 2001.** Influencia de las poblaciones de nemátodos de un producto orgánico Nematostático en el cultivo de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de campo en la región de Arteaga, Coahuila. Tesis Licenciatura UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah. 59 p.

- Barrera, J. 1977.** Influencia de la densidad de siembra sobre el rendimiento, pudriciones radicales y componentes de rendimiento en tres variedades de frijol. Tesis profesional. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México.
- Beebe, S. 1984.** Pudriciones radicales del frijol y su control. CIAT. Cali, Colombia. 52 p.
- Bolkan, A. H. 1980.** Las pudriciones Radicales del frijol. CIAT. Cali, Colombia. 310 p.
- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974.** Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins. 1268 p.
- Butler, E. J. and S. G. Jones. 1947.** Plant Pathology. Mac Millan. London. 979 p.
- Secretaría de de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). 1997.** Canasta Agropecuaria N°44. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. Claridades Agropecuarias. Dirección General de Información y Análisis de Mercados. México, D. F. pp.1-32
- Campos A. J. 1987.** Enfermedades del frijol. Editorial Trillas. México, D. F. 132 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1985.** Referencia de los cursos de capacitación sobre frijol dictados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

- Comisión de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL). 1972.** Arteaga G14C34. Cartas de uso potencial, uso del suelo y Edafología México, D. F. 305 p.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 1997.** The Bacterial Diseases of Wheat . El Batán, Texcoco, Méx.
- Christou, T. 1962.** Penetration and host –parasite relationships of *Rhizoctonia solani* in the bean plant. *Phytopathology* 52: 381 –389.
- Coyne, D. P. and M. L. Schuster. 1974.** Breeding and genetic studies of tolerance to several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Bacterial pathogens. *Euphytica* 23: 651 – 656.
- Coyne D. P. and M. L. Schuster 1975.** Genetic and breeding strategy for resistance to rust *Uromyces phaseoli* (Reben) in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 24: 795 – 803.
- Cronquist, A. 1977.** Introducción a la Botánica. 2ª ed. Editorial CECSA. México, D. F. pp. 104 – 107.
- Galvan, C. F. 1976.** Descripción Botánica del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L), Seminario técnico. SAG, INIA, CAERIB. Río Bravo, Tamps.
- García, E. 1980.** Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen , México. Carta climatológica 14 RVII.
- García, E. 1987.** Modificaciones al sistema de clasificación; climática de Köppen. 4ª ed. Editorial Offset Lanos. México, D. F. 217 p.



**Gilman, C. J. 1963.** Manual de Hongos del Suelo. 1ª ed. Editorial Continental México, D. F.

**Grogan, R. G. and K. A. Kimble. 1967.** The role of seed contamination in the transmission of *Pseudomonas phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 57: 28 – 31.

**Hagedorn, D. J., E. K. Wade and G. Wis. 1969.** Chemical control of bean bacterial diseases in Wisconsin. *Plant Dis. Repr.* 53: 178 – 181.

**Honma, S. 1956.** A Bean interespecific hybrid. *J. Hered.* 47: 217 – 220.

**Institut National de Vulgarisation pour Les Fruit , Legumes, et Champignons 1970.** “La judía verde”. Trad. por Lourdes Buesa Oliver. Editorial Acribia. Barcelona, España.

**Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 1997.** Sector alimenticio en México. México, D. F.

**Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2000.** Anuario estadístico por entidad federativa. Edición 2000. México, D. F. pp. 306 – 308 .

**Kaplan, L. 1967.** Archaeological *Phaseolus* from Tehuacán Puebla. Editorial The prehistory of the Tehuacán Valley. Vol 1.

**Lelliott, R. A. and Stead 1987.** Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants.

- Lépiz, I. R. 1983.** Frijol en el Noreste de México. SARH, Centro Nal. de Investigaciones Agrícolas del Pacífico Norte. Campo Agr. Exp. del Valle de Culiacán. Comisión Permanente para la Investigación y Experimentación Agrícola en Sinaloa. Culiacán, Sin., México. 218 p.
- Mark, E. E. 1979.** Contribución al conocimiento del frijol *Phaseolus vulgaris*, en México. Colegio de Postgraduados, Rama de Botánica. Chapingo, Méx.
- Maino, A. L. 1972.** Degradation of Bean cell walls during early Stages of Halo Blight infections caused by *Pseudomonas phaseolicola* and interactions with *Achromobacter* sp. *Phytopathology* 62: 775.
- Mendoza, Z. C. y C. B. Pinto. 1985.** Principios de Fitopatología y Enfermedades causadas por hongos. UACH, Chapingo, México. 310 p.
- Mendoza, H. J. M. 1983.** Diagnóstico climático para la zona de influencia inmediata de Arteaga. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 238 p.
- Mitchell, R. E. and R. L. Bielecki. 1977.** Involvement of phaseolotoxin in halo blight of beans, transport and conversion to functional toxin. *Plant Physiol.* 60: 723 – 729.
- Moore, L. W. and R. V. Carlson. 1975.** Liquid nitrogen storage of Phytopathogenic bacteria. *Phytopathology* 65: 246 – 230.
- Ogoshi, A. 1987.** Ecology and pathogenicity of anastomosis and Intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* . *Phytopathology* 25: 125 -143.

- Olivas, E. E. 1972.** Estudio sobre control biológico de *Fusarium solani* f. *phaseoli*. *Agrociencia* 9: 83 –90.
- Omer, M. E. H. and R. K. S. Wood. 1969.** Growth of *Pseudomonas phaseolicola* in susceptible and in resistant bean plants. *Ann. Appl. Biol.* 63: 103 – 116.
- Papavizas, G. C. and J. A. Lewis. 1975.** Effect of seed treatment with fungicides on bean root rots. *Plant Disease Repr.* 59: 24 –28.
- Parameter J. R. Jr., R. T. Sherwood and W. D. Plantt. 1969.** Anastomois grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59: 1270-1278.
- Parsons, M. D. 1981.** Frijol y Chícharo. 3ªed. Editorial Trillas. México, D. F.
- Pitts, R. and W. H. Pierce. 1996.** A Halo Bligth Pathogenicity test. *Plant Dis. Repr.* 50: 38 –239.
- Rodríguez, M. M. L. 1994.** Manual de identificación de bacterias fitopatógenas UACH. Depto. de Parasitología. Chapingo, Méx.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1981.** Logros y Aportaciones de la Investigación Agrícola. Centro de Investigaciones Agrícolas del Pacífico Norte. Santiago Ixcwintla Nayarit, México.
- Secretaría de Educación Pública (SEP). 1983.** Frijol Común (*Phaseolus vulgaris*). México, D. F.

- Schaad, N.W. 1990.** Laboratory guide for identification of plant pathogenic Bacteria. 2nd. ed. ADS Press. St. Paul, MN.
- Schuster, M. L. 1955.** A method for testing resistance of beans to bacterial blights. *Phytopathology* 45: 519 – 520.
- Smith, F. M. 1992.** Manual de Enfermedades de las Plantas 1ª edición.
- Splittstoesser, W. E. 1979.** Vegetable Growing Handbook. Av. Publishing Co. Westport, Connecticut. pp. 155 – 158.
- Taylor, J. D. and C. L. Dudley. 1977.** Effectiveness of late copper and streptomycin sprays for the control of halo blight of *Pseudomonas phaseolicola*. *Ann. Appl. Biol.* 85: 217 – 221.
- Walker, J.C. 1973.** Patología vegetal. Traducción de la segunda edición Americana por Antonio Aguirre Aspetita. Ed. Omega, S. A. Barcelona, España. 818 p.
- Weber, G. F. 1973.** Bacterial and fungal diseases of plants in the tropics. University of Florida. Gainesville, FL. 673 p.
- Yoshii, K. 1950.** Los anublos común y fusco; en problemas de producción del frijol.
- Zaumeyer, J. W. and H. R. Thomas, 1957.** A Monographic study of bean diseases and methods for their control. USDA. Tech. Bull. N° 868. 255 p.

## APENDICE

**Cuadro No. 9** Características confirmatorias del “Tizón común” *Xanthomonas campestris pv phaseoli* en el cultivo de frijol variedad Black valentine.

Pruebas de Identificación	RESULTADOS	
	OBTENIDOS EN EL LABORATORIO	OBTENIDOS DE LA LITERATURA
Tinción de gram	-	-
Reacción de oxidasa	-	-
Reacción de catalasa	+	+
Desarrollo mucoide en YDC	+	+
Prueba de tolerancia al TTC	-	-
Hidrólisis de almidón	+	+
Desarrollo a 35°C	+	+
Licuefacción de gelatina	v	+
Hidrólisis de esculina	+	+
Producción de ácido a partir de Arabinosa	+	+
Desarrollo en medio D5	+	+
Desarrollo en SX agar	+	+
Prueba de patogenicidad	+	+

**Cuadro No. 10** Características confirmatorias para el “Tizón del halo”

*Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*).

<b>Pruebas de Identificación</b>	<b>RESULTADOS</b>	
	<b>OBTENIDOS EN EL LABORATORIO</b>	<b>OBTENIDOS DE LA LITERATURA</b>
Tinción de gram	-	-
Reacción de oxidasa	-	-
Reacción de catalasa	+	+
Fluorescencia en KB	+	+
Formación de levana	+	+
Desarrollo en medio D4	+	+
Patogenicidad en papa	-	-
Hipercensibilidad en Tabaco	+	+
Dihidrolasa de Arginina	-	-
Producción Indol	+	+
Reducción de Nitratos	-	-
Hidrólisis de Esculina	+	+