

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE TIZÓN COMÚN  
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith) EN PLANTAS  
DE FRIJOL INOCULADOS CON *Rhizobium phaseoli*

Tesis

Que presenta JOSÉ OSVALDO AGUILAR RAMIREZ  
Como Requisito para Obtener el Grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

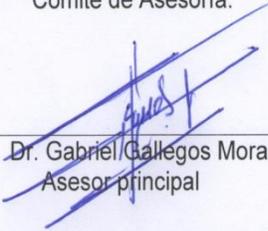
Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

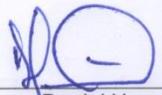
INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE TIZÓN COMÚN  
(*Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* Smith) EN PLANTAS DE  
FRIJOL INOCULADOS CON *Rhizobium phaseoli*.

Tesis

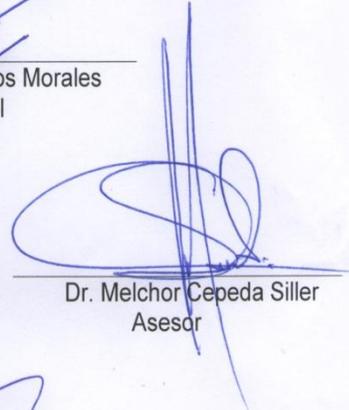
Elaborada por JOSÉ OSVALDO AGUILAR RAMIREZ como  
requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en  
Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del  
Comité de Asesoría.



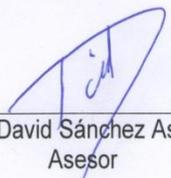
Dr. Gabriel Callegos Morales  
Asesor principal



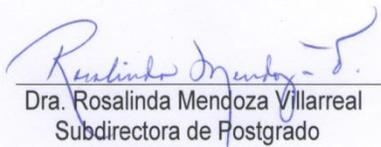
Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo  
Asesor



Dr. Melchor Cepeda Siller  
Asesor



Dr. David Sánchez Aspeytia  
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal  
Subdirectora de Postgrado  
UAAAN

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

## **Agradecimientos**

**A Dios** Por la vida, fortaleza para llegar a la meta, sus bendiciones y riqueza una de ella es mi bella “**familia**” que amo mucho.

**A mi Alma Terra Mater** Por darme la oportunidad de formar parte de ti y brindarme las herramientas para lograr mis objetivos un logro más en mi vida.

**Al Dr. Gabriel gallegos morales** Por compartir conmigo parte de sus conocimientos, dedicar su tiempo para este trabajo de investigación, también agradezco infinitamente sus constructivos consejos, apoyo y amistad hacia mi persona.

**Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo** por su dedicación y su tiempo brindado para realizar esta investigación

**Al Dr. Melchor Cepeda Siller** por su dedicación, motivación y destinar parte de su tiempo para realizar esta investigación

**AL Dr. David Sánchez Aspeytia** Por su dedicación y darme parte de su valioso tiempo compartiéndome sus experiencias y conocimientos por brindarme su amistad y apoyo a mi persona.

**A CONACYT** (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo proporcionado durante el postgrado.

**A mis amigos** por compartir excelentes momentos y por brindarme su apoyo incondicional.

## **Dedicatoria**

### **A mis padres Jorge Ricardo Aguilar Mendoza y Arbelia Ramírez López**

Muchas gracias por darme la vida por sus sabios consejos, valores que me inculcaron para ser una buena persona y por sus infinitos apoyos que me brindan, los sacrificios que hacen para poder lograr algo en la vida y se sientan orgullosos de lo que están haciendo en mí que son un ejemplo a seguir por ser los mejores padres los amo mucho.

**A mis hermanas** Que siempre me apoyan en todo momento, sus consejos que me brindan y motivarme para salir adelante para luchar por mis objetivos.

**A mis sobrinos** Que son un gran motivo para seguir adelante en mi carrera profesional logrando mis objetivos.

**A mis abuelos** por sus apoyos incondicionales en la vida, sus sabios consejos que me ayudan para mi persona.

### **A toda la familia**

Ya que no los puedo mencionar a todos porque la familia es muy extensa les agradezco mucho de todo corazón por sus grandes motivaciones y sus apoyos que me brindaron en todo momento.

## Índice de Contenido

Agradecimientos .....	ii
Dedicatoria.....	iii
Lista de tablas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Resumen .....	viii
Abstract.....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN LITERATURA .....	3
Generalidades del cultivo de frijol .....	3
Origen.....	3
Importancia.....	3
Clasificación taxonomía.....	4
Problemas fitosanitarios .....	4
Enfermedades causadas por bacterias .....	4
Generalidades de <i>Xanthomonas</i> .....	5
Clasificación taxonómica .....	6
Mecanismo de dispersión .....	6
Generalidades de <i>Rhizobium</i> .....	6
Clasificación taxonómica .....	7
Características.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Aislamiento de <i>Xanthomonas</i> spp. ....	9
Aislamiento de <i>Rhizobium</i> spp. ....	9
Reproducción bacteriana.....	10

Prueba de germinación.....	11
Experimento en invernadero.....	11
Experimento en campo.....	13
Análisis estadístico .....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
Aislamiento de <i>Rhizobium</i> spp. ....	14
Aislamiento de <i>Xanthomonas</i> spp. ....	16
Prueba de germinación.....	17
Experimento en invernadero.....	18
Experimento en campo.....	20
CONCLUSIONES .....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Coordenadas de localización del área del estudio .....	11
<b>Tabla 2.</b> Diseño experimental para evaluar el comportamiento de <i>Phaseolus vulgaris</i> a la inoculación de <i>R. phaseoli</i> y del tizón común .....	12
<b>Tabla 3.</b> Comportamientos coloniales, morfológicos y bioquímicos de <i>R. phaseoli</i> .....	15
<b>Tabla 4.</b> Comportamiento morfológicos, colonial y bioquímico de <i>Xanthomonas axonopodis</i> .....	16
<b>Tabla 5.</b> Germinación y emergencia de la plántula de frijol .....	17
<b>Tabla 6.</b> Comportamiento de variables agronómicas en plantas de frijol inoculadas con <i>Rhizobium phaseoli</i> y <i>Xanthomonas axonopodis</i> en invernadero. ....	20
<b>Tabla 7.</b> Comportamiento de variables agronómicas en plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas con <i>Rhizobium phaseoli</i> y <i>Xanthomonas axonopodis</i> en campo .....	22

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Síntomas de bacterias a) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> b) <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Síntomas provocados por <i>Xanthomonas axonopodis</i> en hojas de frijol .....	9
<b>Figura 3.</b> Colecta y muestreo de nódulos del cultivo de frijol .....	10
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de <i>Rhizobium phaseoli</i> a los ocho días de incubación..	15
<b>Figura 5.</b> Crecimiento de <i>X. axonopodis</i> a los cuatro días de incubación .....	16
<b>Figura 6.</b> Pruebas de germinación y crecimiento de semillas de frijol inoculados con <i>Rhizobium phaseoli</i> FM-1, N-2, PS-3, M-4, BJ-5 y ácido indolacético. ....	18
<b>Figura 7.</b> Efecto de la inoculación de <i>Rhizobium phaseoli</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> y la presencia y desarrollo del tizón común en invernadero. ....	19
<b>Figura 8.</b> Efecto de la inoculación de <i>Rhizobium phaseoli</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> y la presencia y desarrollo del tizón común en campo.: .....	21

## Resumen

INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE TIZÓN COMÚN (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith) EN PLANTAS DE FRIJOL INOCULADOS CON *Rhizobium phaseoli*

POR:

JOSÉ OSVALDO AGUILAR RAMÍREZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES

El tizón común bacteriano *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* es una enfermedad que ataca al cultivo de frijol (*P. vulgaris*), se encuentra presente en un 83 % de las áreas de producción de semilla, un 79 % en campos comerciales y reduce los rendimientos hasta un 55 %. La inoculación de *Rhizobium* en plantas como promotor de crecimiento vegetal, fijador de nitrógeno, aunado la síntesis del ácido indolacético, producen en la planta mayor vigor y tolerancia a las enfermedades. Se determinó el comportamiento de la incidencia y severidad del tizón común de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium phaseoli* y *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Para ello se aisló cepas de *Rhizobium* de nódulos radiculares de plantas de frijol y *Xanthomonas* de manchas foliares necróticas. Los aislados se identificaron con base en características morfológicas, coloniales y bioquímicas. Los ensayos en invernadero y campo, se efectuaron en semillas inoculadas con  $10^6$  ufc/ml de *Rhizobium*, una segunda aplicación a diez días de la siembra. Posteriormente quince días después de la emergencia del frijol se inoculo por aspersión *Xanthomonas axonopodis* directamente a la planta. Transcurridos treinta días del cultivo en invernadero se observó que la severidad del tizón común fue inferior (14.5%) en plantas con presencia de nódulos en raíz, que en el testigo (46%), también se encontró que las plantas inoculadas con *Rhizobium phaseoli* BJ-5 desarrollaron mayor vigor, diámetro de tallo, peso seco, número de hojas y longitud de raíz. En el campo, la inoculación con la cepa BJ-5 mostro también menor severidad (25.6%) respecto del testigo (55.8%) y resulto tener mejor crecimiento en la planta. La inoculación de frijol con *Rhizobium phaseoli* permite favorecer nutricional y fitosanitariamente al cultivo.

**Palabras claves:** promotor de crecimiento, fitosanitario, control biológico

## Abstract

Incidence and severity of common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith) in bean plants inoculated with *Rhizobium phaseoli*

BY:

JOSÉ OSVALDO AGUILAR RAMÍREZ

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES

The common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* is a disease that affects the cultivation of bean plants (*P. vulgaris*), is present in 83% of the areas of seed production and up to 79% in commercial fields and reduces yields by up to 55%. The inoculation of *Rhizobium* in plants as a plant growth promoter, nitrogen fixer, combined with synthesis of indole acetic acid, produces a greater vigor and tolerance to disease in the plant. The behavior of the incidence and severity of common blight of bean plants inoculated with *Rhizobium phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* was determined. For this, *Rhizobium* strains of root nodules of bean plants and *Xanthomonas* were isolated from necrotic leaf spots. The isolates were identified based on morphological, colonial and biochemical characteristics. The greenhouse and field trials were carried out on seeds inoculated with  $10^6$  ufc/ml *Rhizobium*, a second application ten days after planting. Subsequently, fifteen days after the emergence of bean plant, *Xanthomonas axonopodis* was sprayed directly to plant. After thirty days of greenhouse cultivation, it was observed that severity of common blight was lower (14.5%) in plants with nodules in the root, than in control (46%), It was also found that plants inoculated with *Rhizobium phaseoli* BJ-5 developed greater vigor, stem diameter, dry weight, number of leaves and root length. In the field, the inoculation with strain BJ-5 also showed lower severity (25.6%) respect to the control (55.8%) and resulted in a better growth in the plant. The inoculation of bean plants with *Rhizobium phaseoli* benefits nutritionally and phytosanitarilly to the crop.

**Keywords:** growth promoter, phytosanitary, biological control

## INTRODUCCIÓN

En México el frijol es de gran importancia en el desarrollo rural, ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada y representa la segunda actividad agrícola más importante. La semilla contiene entre 20% y 25% de proteína, sobresaliendo por su abundancia la faseolina, que posee un alto contenido de aminoácidos esenciales, tales como la lisina y el triptófano; que contiene el frijol en mayor cantidad que en los cereales (Quintero y Quijano, 2013). El frijol es producido en las 32 entidades del país, sin embargo, las que aportan el mayor volumen son Zacatecas, con el 35.9 por ciento de la producción nacional; Durango, 11.6 por ciento; Chihuahua, 9.5 por ciento; Sinaloa, 8.9 por ciento y Chiapas 5.5 por ciento. En conjunto, estos cinco estados generan el 71.4 por ciento de la producción de frijol en México, lo que equivale a 768 mil 334 toneladas (SAGARPA, 2017). Las principales enfermedades que afectan el cultivo del frijol son la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*, la roya o chahuixtle (*Uromyces appendiculatus*), el tizón de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*), el tizón común (*Xanthomonas phaseoli*), las pudriciones de la raíz (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Sclerotium*, *Aphanomyces*, *Phymatotrichopsis* y *Macrophomina*) y los nematodos formadores de agallas en la raíz (*Meloidogyne* y *Nacobbus aberrans*). Otras enfermedades como la cenicilla, moho blanco o el virus del mosaico común llegan a ocasionar epidemias severas (Lépiz, 1999; INIFAP, 2010). También podemos destacar a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* como una bacteria que ataca al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en todo el mundo (Gent *et al.*, 2005). Está presente en un 83 % de las áreas de producción de semillas y hasta un 79 % en campos comerciales, reduce los rendimientos en un 55 %, los que se incrementan a temperaturas de 27 °C, con alta humedad relativa (Fourie, 2002; Belete y Basta, 2017). Para su manejo pueden ser utilizados métodos de control químico, biológicos, cultural y genético (Francisco *et al.*, 2013). El uso de químicos ha permitido obtener mayor producción, pero su empleo excesivo ocasiona problemas al medio ambiente, por lo que la búsqueda de alternativas al manejo de las enfermedades son de

vital importancia (Zavaleta, 2000). El empleo de microorganismos benéficos para generar antibiosis o inducir resistencia sistémica en la planta, se ha reportado en *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus*, y *Rhodococcus fascians* que son compatibles con *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, donde pueden desarrollar actividad protectora contra el tizón común (Zanatta *et al.*, 2007). Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGBR), son usadas como agentes de control biológico, estas bacterias se caracterizan por su habilidad para facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas se debe a que la bacteria permite la acción fúngica (Essalmani y Lahlou, 2003). La estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al.*, 2002), la producción de hormonas (Perrine *et al.*, 2004), de enzimas (Mayak *et al.*, 2004) y la solubilización de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999). Este trabajo tuvo como objetivo determinar el comportamiento de plantas de frijol, inoculadas con *Rhizobium phaseoli* y *X. axonopodis* pv. *phaseoli* y su relación con la presencia y desarrollo del tizón común en la planta.

## REVISIÓN LITERATURA

### Generalidades del cultivo de frijol

#### Origen

El frijol se originó y domesticó en América Latina con dos orígenes geográficos (Mesoamérica y los Andes) genéticamente diferenciables que derivan de un ancestro común de 100,000 años de antigüedad. En México y América del sur, el frijol se domesticó de manera independiente hace aproximadamente 8,000 años. (Bitocchi *et al.*, 2013). La producción mundial de frijol registra tendencia al alza durante la década reciente, impulsada por aumentos en la superficie cultivada y en los rendimientos promedio por unidad de superficie. En siete países se concentra el 63 por ciento de la cosecha mundial de la leguminosa: India, Myanmar, Brasil, Estados Unidos, México, China y Tanzania (FIRA, 2016).

#### Importancia

El comercio de frijol en el mercado internacional es reducido en comparación con otros productos agrícolas; en general, los principales países productores destacan también como importantes consumidores. El frijol en México es producido en las 32 entidades del país, sin embargo, las que aportan el mayor volumen son Zacatecas, con el 35.9 por ciento de la producción nacional; Durango, 11.6 por ciento; Chihuahua, 9.5 por ciento; Sinaloa, 8.9 por ciento y Chiapas 5.5 por ciento. En conjunto, estos cinco estados generan el 71.4 por ciento de la producción de frijol en México, lo que equivale a 768 mil 334 toneladas (SAGARPA, 2017; FIRA, 2016). El 85 % de la superficie sembrada de frijol se establece en el ciclo Primavera-Verano, con condiciones principales de temporal, el cual se divide en semiárido del Norte-Centro y sub-húmedo del eje Neo volcánico o centro de México. En el ciclo Otoño-Invierno se siembra el 15 % restante en las zonas bajas costeras del Golfo de México y del Océano Pacífico (Acosta y Herrera, 2003).

### **Clasificación taxonomía**

El cultivo de frijol se clasifica según Singh *et al.* (1999)

**REINO:** Plantae

**DIVISIÓN:** Magnoliophyta

**CLASE:** Magnoliopsida

**ORDEN:** Fabales

**FAMILIA:** Fabacea

**SUBFAMILIA:** Papilionoideae

**GÉNERO:** *Phaseolus*

**ESPECIE:** *vulgaris* L.

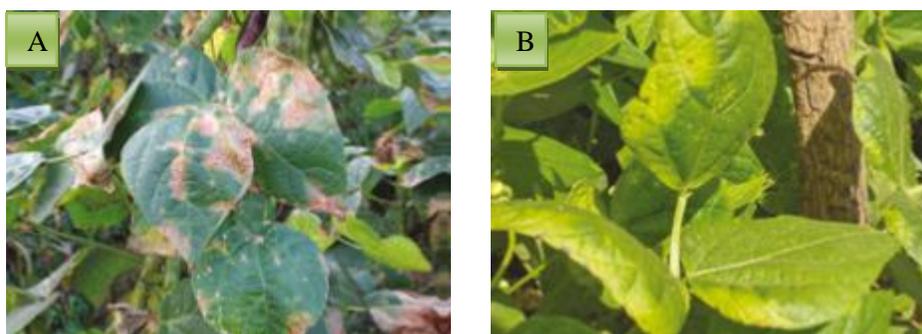
### **Problemas fitosanitarios**

En la producción del frijol se puede ver afectado por factores bióticos y abióticos, el cambio climático contribuye al surgimiento de plagas y enfermedades emergentes incluso en regiones con una alta disponibilidad de agua. Mientras que un clima seco tiende a favorecer a insectos vectores y virus, un clima húmedo favorece a los hongos y bacterias fitopatógenos (Anderson *et al.*, 2004). Las principales enfermedades que afectan el cultivo son la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc. & Magnus) Lams.-Scrib.], la roya o chahuixtle [*Uromyces appendiculatus* (Pers.:Pers.) Unger], el tizón de halo [*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder)], el tizón común [*Xanthomonas phaseoli* (Smith) Dowson], las pudriciones de la raíz (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Sclerotium*, *Aphanomyces*, *Phymatotrichopsis* y *Macrophomina*) y los nematodos formadores de agallas en la raíz (*Meloidogyne* y *Nacobbus aberrans*). Ocasionalmente otras enfermedades como la cenicilla, moho blanco o el virus del mosaico común llegan a ocasionar epidemias severas (Lépiz, 1999; INIFAP, 2010).

### **Enfermedades causadas por bacterias**

El tizón común (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) es una enfermedad cuyos daños se generan en tallos, hojas y vainas, los primeros síntomas aparecen como puntos

de agua en el envés de las hojas, los puntos de las hojas se alargan y se unen hasta formar manchas foliares necróticas irregulares (Figura 1) rodeadas por un delgado halo amarillo (Fourie, 2002; FAO, 2015) y el tizón del halo (*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*), los tejidos que rodean las manchas, gradualmente se convierten en un halo verde-amarillo (Figura 1), los peciolos y ramas infectadas soportan puntos grasosos que desarrollan una de coloración rojiza (FAO, 2015).



Fuente: FAO, 2015

**Figura 1.** Síntomas de bacterias a) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* b) *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

### Generalidades de *Xanthomonas*

El género *Xanthomonas* contiene principalmente especies que causan graves enfermedades en plantas de utilidad agrícola y comercial. Destaca su presencia en cultivos de elevado interés como arroz, algodón, frijol, especies hortícolas como tomate o pimiento y plantas leñosas como los cítricos o los frutales de hueso. Además, son responsables de enfermedades en plantas ornamentales de alto valor económico (Rodríguez-R *et al.*, 2012).

En el cultivo de frijol *X. axonopodis* provoca manchas foliares necróticas irregulares, rodeadas por un delgado halo amarillento, que se desarrollan en el borde o en diferentes áreas de la lámina foliar. Está presente en un 83 % de las áreas de producción, reduce los rendimientos en un 55 %, los que se

incrementan a temperaturas de 27 °C, con alta humedad relativa (Fourie, 2002; Belete y Basta, 2017).

### **Clasificación taxonómica**

*Xanthomonas* se clasifica según Saddler y Bradbury (2005)

**DIVISIÓN:** Bacteria

**PHYLUM XIV:** Proteobacteria

**CLASE III:** Gammaproteobacteria

**ORDEN III:** Xanthomonadales

**FAMILIA I:** Xanthomonadaceae

### **Mecanismo de dispersión**

*X. axonopodis* pv. *phaseoli* se disemina principalmente a través de la semilla, una vez dentro la bacteria puede sobrevivir mediante la formación de una película o biofilm que la protege de las condiciones ambientales desfavorables. También puede sobrevivir en restos vegetales y en el suelo, durante el golpeteo de las gotas de lluvia puede ser llevado a las partes aéreas de las plantas y entrar a través de aberturas naturales o heridas (Darrasse *et al.*, 2007).

### **Generalidades de *Rhizobium***

La relación simbiótica leguminosa/*Rhizobium* fue descubierta por Hellridgel en 1866 (Date, 1956) y desde 1886 hay uso del sistema de inoculación (Erdman, 1968). Como todas las leguminosas, el frijol tiene la capacidad de asociarse a bacterias del suelo llamadas rhizobia (singular *Rhizobium*), dicha asociación entre leguminosas y *Rhizobium*, comprende a la mayoría de las 18,000 especies de leguminosas y resulta en una simbiosis fijadora de nitrógeno de importancia ecológica que aporta anualmente, una cuarta parte del nitrógeno fijado en la biosfera (Catherine *et al.*, 2009). Las bacterias del género *Rhizobium* tienen la capacidad de inducir en las raíces de las leguminosas la

formación de estructuras especializadas llamadas nódulos, dentro de las cuales el N<sub>2</sub> atmosférico, que es muy estable y relativamente inerte, se reduce a iones amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) fácilmente asimilables por la mayoría de las especies vegetales (Marquina *et al.*, 2011). También son usadas como agentes de control biológico, para generar antibiosis o inducir resistencia sistémica en las plantas (Zanatta *et al.*, 2007), estas bacterias se caracterizan por su habilidad para facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas se debe a que la bacteria permite la acción fúngica (Essalmani y Lahlou, 2003). La estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al.*, 2002), la producción de hormonas (Perrine *et al.*, 2004), de enzimas (Mayak *et al.*, 2004) y la solubilización de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999).

### **Clasificación taxonómica**

Según Frank (1889) se encuentra clasificado como:

**DOMINIO:** Bacteria

**PHYLUM:** Proteobacteria

**CLASE:** Proteobacteria alfa

**ORDEN:** Rhizobiales

**FAMILIA:** Rhizobiaceae

**GÉNERO:** *Rhizobium*

### **Características**

Las especies del género *Rhizobium* son bacilos móviles Gram-negativos con pared celular, flagelados (1 a 6 flagelos), aerobios que miden 0.5-0.9 × 1.2-3.0 µm, y pueden ser peritricales o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitraslúcidas u opacas y mucilaginosas, que miden de 2 a 4 mm de diámetro de los 3 a los 5 días de incubación en extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC)

(Abd- Alla *et al.*, 2012), torna en rojo intenso a los 8 días de incubación (Rojas *et al.*, 2009). Las bacterias del grupo *Rhizobium*, además de poder desarrollarse como organismos de vida libre en el suelo, son capaces de formar asociaciones fijadoras de nitrógeno con plantas de la familia de las leguminosas, que permite el reconocimiento e invasión de la leguminosa hospedadora apropiada por el rizobio, seguido por la proliferación y diferenciación de una estructura altamente especializada denominada “nódulo”. Estos nódulos están localizados en las raíces, salvo en el caso de *Azorhizobium* que también es capaz de inducir nódulos en los tallos (Downie, 1994). No obstante, aunque algunos autores consideran rizobios a todas aquellas bacterias capaces de nodular, otros distinguen entre los verdaderos rizobias, pertenecientes a las  $\alpha$ -Proteobacteria e incluidos en la actualidad en 5 géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* y las bacterias no-rhizobia capaces de nodular, constituidas por cepas de algunos géneros pertenecientes a la clase  $\alpha$ -Proteobacteria como *Methylobacterium*, *Devosia*, *Blastobacter*, *Phyllobacterium* y *Ochrobactrum* (Moulin *et al.*, 2001)

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de *Xanthomonas* spp.

Se colectaron plantas con manchas foliares necróticas irregulares rodeadas por halo amarillo (Figura 2), en diferentes áreas de las hojas (Fourie, 2002) en el campo experimental “El bajo” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Las muestra se cortaron en trozos, se desinfectaron con hipoclorito al 1% por 2 minutos y se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en un mortero estéril donde se maceraron en solución salina 0.85%, posteriormente se tomó una asada, que se estrió en el medio de cultivo YDC (Schaad, 1988). Las placas se incubaron a 28 °C por 48 hrs. Al término del periodo, se seleccionaron las colonias bacterianas con color amarillo, convexas, con bordes enteros y de aspecto mucoide (Schaad, 2001) y se purificaron por estría. La identificación se realizó por caracterización morfológica, colonial y bioquímica (Abd-Alla y Bashandy, 2008; Francisco *et al.*, 2013; Osdaghi, 2014).



**Figura 2.** Síntomas provocados por *Xanthomonas axonopodis* en hojas de frijol

### Aislamiento de *Rhizobium* spp.

Se colecto muestras de nódulos de coloración rojiza de diferentes variedades de frijol (Figura 3), en periodo prefloración (Tabla 1), se lavaron y se

desinfectaron con hipoclorito 1% durante 3 minutos, enseguida se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en tubo estéril donde maceraron, posteriormente se tomó una asada y se sembraron en placas con el medio Extracto Levadura Manitol Agar Rojo Congo (ELMA-RC) (Vicent, 1970; CIAT, 1988). Las placas se incubaron a 28 °C por 4 días. Las colonias de color rojo se resembraron en placas con el mismo medio para su purificación, hasta obtener cultivos puros, cada aislado se caracterizó por pruebas morfológicas, coloniales fisiológicas y bioquímicas.



**Figura 3.** Colecta y muestreo de nódulos del cultivo de frijol

### **Reproducción bacteriana**

Para incrementar las poblaciones de *Xanthomonas* se usó el medio YDC líquido, mientras que para *Rhizobium* fue ELMA líquido, propagándose en una incubadora giratoria (C25 Incubador Shaker de New Brunswick Scientific) a 28 °C, 150 rpm durante 72 horas, para obtener de cada bacteria un concentrado celular.

**Tabla 1.** Coordenadas de localización del área del estudio

Localización	Coordenadas	Altitud (msnm)	Muestras	Cepas
UAAAN Buenavista, Saltillo, Coah.	25° 22" de latitud norte y 101° 02" longitud oeste	1742	Frijol, etapa de prefloración	FM-1
San Andres Tlalamac, Edo. México	18° 58' 1" latitud norte y 98° 48' 28" longitud oeste	2073	Frijol, etapa de prefloración	N-2
UAAAN Buenavista, Saltillo, Coah.	25° 22" de latitud norte y 101° 02" longitud oeste	1742	Frijol, etapa de prefloración	PS-3
San Andres Tlalamac, Edo. México	18° 58' 1" latitud norte y 98°48' 28" longitud oeste	2073	Frijol, etapa de prefloración	M-4
UAAAN Buenavista, Saltillo, Coah.	25° 22" de latitud norte y 101° 02" longitud oeste	1742	Frijol, etapa de prefloración	BJ5

### Prueba de germinación

Para la prueba se utilizaron semillas frijol de la variedad flor de mayo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min; posteriormente, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron con papel secante estéril, enseguida las semillas se colocaron sobre toallas de papel húmedo (ISTA, 1995). Se aplicaron siete tratamientos: cada aislado de *Rhizobium* spp., se aplicó como tratamiento, además de ácido indolacético (AIA) y las semillas control se les asperjó con agua destilada, las semillas tratadas se enrollaron en el papel y se colocaron verticalmente dentro de bolsas de plástico y se incubaron a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cada semilla representó una unidad experimental, siendo diez semillas por tratamientos. A los cinco días se evaluó el porcentaje de germinación. Además, a los diez días se cuantificó longitud de raíz (LR), diámetro de tallo (DT) y números de raíces (NR), para hacer analizadas estadísticamente.

### Experimento en invernadero

Para determinar la relación que guarda la presencia del tizón común y su

severidad en plantas de frijol inoculadas con *R. phaseoli*, inicialmente se desinfectaron las semillas de frijol, para ello se uso hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, lavando las semillas tres veces con agua estéril, cada semilla se impregnó con una solución de  $1 \times 10^6$  células de *R. phaseoli*, posteriormente se colocaron en recipientes de unisel de 1 litro de capacidad con  $\frac{3}{4}$  partes de peat moss-perlita (en proporción 3:1). Cada planta representó una unidad experimental, siendo diez plantas por tratamiento (Tabla 2), inoculadas con las cepas de *Rhizobium* al inicio del experimento y diez días después de la siembra. El patógeno (*Xanthomonas axonopodis*) se inóculo a quince días de crecimiento del cultivo, con una suspensión de  $1.6 \times 10^6$  células, aplicadas por aspersión al follaje (Pastor, 1991; Abeysinghe, 2009). La evaluación se efectuó treinta días después para determinar incidencia y severidad del tizón común. acorde a la escala del grado de amarillamiento y necrosis de las plantas inoculadas: 0 = Ausencia de síntomas; 1 = De 1 a 12.5% de área dañada; 2 = de 13 a 25.5%; 3 = de 26 a 38.5%; 4 = de 39 a 51.5%; 5 = de 52 a 64.5%; 6 = de 65 a 77.5%; 7 = De 78 a 90.5%; 8 = de 91 a 100% de área foliar dañada (Gilberston *et al.*,1988; Osdaghi *et al.*, 2009).

**Tabla 2.** Diseño experimental para evaluar el comportamiento de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación de *R. phaseoli* y del tizón común

Tratamientos	Cepas					
	FM	N	PS	M	BJ	<i>Xanthomonas</i>
I. <i>Rhizobium</i> (FM)	+	-	-	-	-	+
II. <i>Rhizobium</i> (N)	-	+	-	-	-	+
III. <i>Rhizobium</i> (PS)	-	-	+	-	-	+
IV. <i>Rhizobium</i> (M)	-	-	-	+	-	+
V. <i>Rhizobium</i> (BJ)	-	-	-	-	+	+
VI. Irrigado solo con agua no inoculado, control absoluto(CA)	-	-	-	-	-	+

+ Aplicado; - No aplicado

### **Experimento en campo**

Para determinar el comportamiento de plantas de frijol inoculados con *R. phaseoli* y la presencia de tizón común en campo se estableció una parcela experimental de 10 m de largo con cinco surcos a 80 cm de distancia entre cada uno. Cada aislamiento de *Rhizobium* se aplicó como tratamiento (Tabla 2), para inocular la semilla y la planta se siguió el mismo procedimiento para el experimento de invernadero. Posteriormente las semillas inoculadas se sembraron a 3 cm de profundidad intercaladas cada 10 cm en el surco en toda la parcela establecida con sistema de riego por goteo. Trascurrido 15 días a la siembra se aplicó *Xanthomonas axonopodis* en suspensión  $1.6 \times 10^6$  al follaje del cultivo (Pastor, 1991) y cincuenta días posteriores se determinó la incidencia y la severidad del tizón común con la escala (Gilberston *et al.*, 1988; Osdaghi *et al.*, 2009).

### **Análisis estadístico**

El comportamiento de las variables analizadas en cada experimento, así como la incidencia y la severidad del tizón común del frijol en cada planta, fue procesado bajo un diseño completamente al azar, donde cada planta se consideró como una unidad experimental, tomando datos de diez plantas por tratamiento. La varianza entre los datos (ANOVA) se analizó a través de comparación de medias según Tukey ( $< 0.05$ ) procesando los datos en el paquete estadístico SAS Statistical System (2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Aislamiento de *Rhizobium* spp.**

Se recuperaron cinco aislamientos de *Rhizobium* spp., a partir de nódulos radiculares de plantas de frijol y de acuerdo a sus características de crecimiento colonial en el medio de cultivo ELMARC su reacción a la tinción Gram ( - ), su morfología de bacilos de tamaños pequeños no formadora de esporas (Tabla 3), así como también su reacción a la presencia de oxidasa, catalasa y crecimiento colonial de forma circular, con bordes ondulados, convexa y aspecto mucoso, se asemejan al género *Rhizobium* características descritas Granda *et al.* (2013); Martínez *et al.* (2005); Pérez *et al.* (2008). Aunado a ello su tolerancia al pH 9 y resistir el estrés NaCl al 5% nos indican que estos aislamientos pudieran tener las características de un buen inoculante del tipo *Rhizobium phaseoli* aspectos importante a la elaboración de inoculante relacionado con leguminosas (Cuadrado *et al.*, 2009; Berrada *et al.*, 2012). La coloración de las colonias de los aislamientos obtenidos fue una coloración beige a las 72 hrs, (Figura 4) que se tornó en rojo intenso a los 8 días de incubación (Rojas *et al.*, 2009), para descartar la semejanza filogenética con el género *Agrobacterium* se utilizó el medio Levadura Manitol adicionado Azul de Bromotimol (LMA-ABT), donde los aislamientos de *Rhizobium* acidificaron el medio tornándolo amarillo mientras que los reportes indican que *Agrobacterium* alcaliniza el medio tornándolo azul (Cuadrado *et al.*, 2009) características diferencial entre estos dos géneros de bacterias.



**Figura 4.** Crecimiento de *Rhizobium phaseoli* a los ocho días de incubación

**Tabla 3.** Comportamientos coloniales, morfológicos y bioquímicos de *R. phaseoli*

Cepas	Tinción Gram	Oxidasa	Catalasa	Crecimiento en NaCl 2, 3 y 5 %	Crecimiento en Ph 4, 5, 7 y 9	Crecimiento MacConckey	Crecimiento LMA- ABT	Colonias				
								Forma	Borde	Elevación	Aspecto	Color
FM-1	-	-	-	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Convexa	Mucoide	Rojo
N-2	-	-	+	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Convexa	Mucoide	Rojo
PS-3	-	-	+	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Planoconvexa	Mucoide	Rojo
M-4	-	-	+	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Planoconvexa	Mucoide	Rojo
BJ-5	-	-	+	+	+	+	+	Circular	Ondulado	Convexa	Mucoide	Rojo

(-) Prueba negativa (+) Prueba positiva

### Aislamiento de *Xanthomonas* spp.

A partir de hojas con síntomas de tizón común (Figura 2) se recuperaron aislamientos que presentaron características típicas del género *Xanthomonas* (Tabla 4), que produjeron colonias amarillas, bordes entero, convexa aspecto mucoso (Figura 5) (Corzo *et al.*, 2015). Al microscopio se observó la reacción a la Tinción de Gram (-), además de pruebas diferenciales como la producción de levana (-), hidrólisis de almidón (+), la oxidación de glucosa y producción de ácido a partir de este carbohidrato, así como también sus colonias de color amarillo nos indican que el aislamiento recuperado es *Xanthomonas axonopodis* (Schaad, 2001; Francisco *et al.*, 2013)



**Figura 5.** Crecimiento de *X. axonopodis* a los cuatro días de incubación

**Tabla 4.** Comportamiento morfológicos, colonial y bioquímico de *Xanthomonas axonopodis*

Cepa	Tinción Gram	Peroxidasa (KOH)	Catalasa	Metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa	Hidrólisis de almidón	Producción de levana	Pigmentos fluorescentes	Forma	Borde	Elevación	Aspecto	Color
Xant	-	+	+	+	+	-	-	circular	entero	convexa	mucoso	Amarillo

## Prueba de germinación

El efecto de la inoculación de los aislados de *Rhizobium* en la germinación se presenta en la Tabla 5. No se encontró diferencias significativas en germinación (%), sin embargo los aislamientos FM-1 y BJ-5 obtuvieron 100% mostrando similitudes en este aspecto con García *et al.* (2016), quienes mostraron que *Phaseolus vulgaris* inoculado con *Rhizobium etli* tuvo un 100 % de germinación o emergencia en 5 días, resultados similares al obtenido en este trabajo con el aislamiento *Rhizobium Phaseoli* BJ-5. Esta promoción del crecimiento o germinación según Cupull *et al.* (2000) se debe a la producción de sustancias de crecimiento vegetal como el ácido indolacético que las cepas de *Rhizobium* pueden sintetizar (Figura 6).

**Tabla 5.** Germinación y emergencia de la plántula de frijol

Tratamientos	Porcentaje de germinación	Longitud de raíz	Diámetro de Tallo	Número de raíces
<i>Rhizobium</i> FM-1	100 <sup>a</sup>	9.08c	2.21a	5.50d
<i>Rhizobium</i> N-2	90 <sup>a</sup>	16.47ab	1.91a	12.30abc
<i>Rhizobium</i> PS-3	90 <sup>a</sup>	17.21ab	2.20a	13.80ab
<i>Rhizobium</i> M-4	90 <sup>a</sup>	16.86ab	2.11a	11.00abcd
<i>Rhizobium</i> BJ-5	100 <sup>a</sup>	19.44 <sup>a</sup>	2.34a	15.80a
Ácido indolacético	90 <sup>a</sup>	9.85c	1.95a	7.30cd
Testigo	80 <sup>a</sup>	13.06c	1.88a	9.9bcd
CV	28.01	27.28	22.59	38.45

\*valores con letras distintas tienen diferencias estadísticas según Tukey < 0.05%.

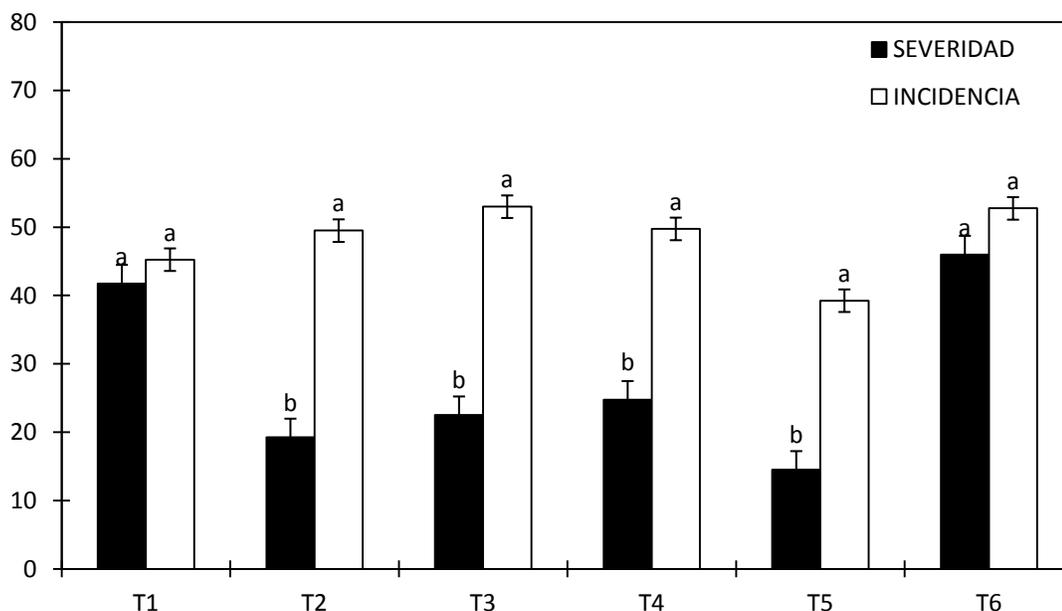


**Figura 6.** Pruebas de germinación y crecimiento de semillas de frijol inoculados con *Rhizobium phaseoli* FM-1, N-2, PS-3, M-4, BJ-5 y ácido indolacético.

### Experimento en invernadero

La inoculación de *Rhizobium phaseoli* en plantas de frijol indujo una mayor tolerancia a la expresión en hojas del tizón común. En la Figura 7 se muestra que la cepa *Rhizobium phaseoli*-BJ-5 mostró menor severidad (14.5%) a esta enfermedad en comparación al control absoluto inoculado con *Xanthomonas axonopodis* que registro un 46% de daño. También se observó que todos los tratamientos se comportaron estadísticamente igual ( $P < 0.05$ ) respecto a la incidencia del tizón común respecto del testigo, lo cual indicó que el patógeno esta activo en todas las plantas infestadas y no existe diferencia entre ellas respecto de su presencia, no así en el grado de respuesta o daño en la manifestación de la enfermedad donde dos de los inoculantes de *Rhizobium phaseoli* (T2 y T5), indujeron o redujeron el nivel de daño (Fig. 1) del tizón común respecto del testigo estadísticamente ( $P < 0.05$ ). Resultados experimentales similares fueron reportados por Zanatta (2007) quien reporta la inducción de resistencia que genera *Rhizobium* spp. en las plantas de frijol.

Mientras que Osdagui *et al.* (2011) quienes al igual que este trabajo encuentran diferencias significativas en la manifestación del tizón común en plantas inoculadas con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* en comparación a las fertilizadas con urea y las no inoculadas.



**Figura 7.** Efecto de la inoculación de *Rhizobium phaseoli* en *Phaseolus vulgaris* y la presencia y desarrollo del tizón común en invernadero. T1: *Rhizobium* (FM), T2: *Rhizobium* (N), T3: *Rhizobium* (PS), T4: *Rhizobium* (M), T5: *Rhizobium* (BJ) y T6: control absoluto (CA)

En la Tabla 6 se muestra la respuesta de *Phaseolus vulgaris* infestado con *Xanthomonas axonopodis* y con cinco inoculantes de *R. phaseoli* a través de biomasa vegetal producida, donde se observa que en la mayoría de las variables cuantificadas las plantas inoculadas manifestaron mayor peso, número de hojas y longitud de raíz que el testigo sin inocular, aunado a esto las plantas inoculadas presentaron mayor nodulación por rhizobios cuando al emplearlos como inoculantes. Las cepas de *Rhizobium* spp. utilizadas en este estudio indujeron el mejoramiento al cultivo posiblemente debido a la habilidad de los rhizobios para producir hormonas como el ácido indolacético y ácido giberélico sustancias reguladoras del crecimiento en las plantas, observándose

un incremento en la emergencia, vigor, biomasa y desarrollo del sistema radical Dey *et al.* (2004); Lugtenberg y Kamilova (2009); Perrine *et al.* (2004).

**Tabla 6.** Comportamiento de variables agronómicas en plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium phaseoli* y *Xanthomonas axonopodis* en invernadero.

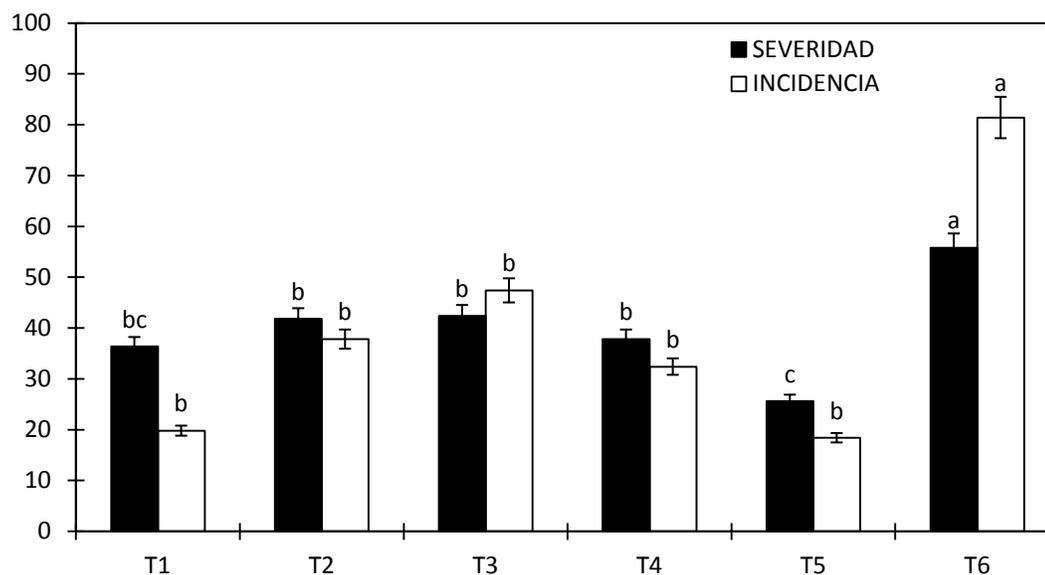
Tratamientos	Peso fresco (gr)	Peso seco (gr)	Número de hojas	Longitud raíz (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Número de nódulos
<i>Rhizobium</i> FM-1	35.05a	5.6a	31.80ab	20.6abc	4.06b	199a
<i>Rhizobium</i> N-2	25.75ab	4.2a	26.80c	21.6a	4.32b	120.2b
<i>Rhizobium</i> PS-3	25.34ab	4.4a	27.60bc	21.2ab	5.22a	116b
<i>Rhizobium</i> M-4	25.25ab	3.6a	28.00abc	19.2bc	4.08b	73bc
<i>Rhizobium</i> BJ-5	33.09a	5.6a	32.60a	21abc	4.44b	228a
Control absoluto	16.82b	3.6a	29.00abc	18.8c	4.08b	48c
SE ±	1.38	0.25	0.57	0.27	0.09	12.61
CV	18.78	27.51	8.41	5.73	7.73	19.36

\*valores con letras distintas tienen diferencias estadísticas según Tukey < 0.05%.

### Experimento en campo

Como se muestra en la Figura 8 la presencia de *X. axonopodis* en las hojas de la planta de frijol disminuye claramente por la inoculación de *Rhizobium phaseoli* cepa BJ-5 (18.4%) seguida por la cepa FM-1 (19.8%) con respecto al control absoluto (CA). La severidad de la enfermedad en las hojas foliares de la planta de frijol en el cultivo fue catalogada como leve, (25.6%) en la cepa BJ-5 cuyos valores numéricos, fueron estadísticamente diferentes comparados con el no inoculado o control absoluto (CA) que desarrollo 55.8% de severidad. Resultados similares han sido reportado Osdagui *et al.* (2011) quienes consignan que la severidad de la enfermedad en el campo evaluado a los 50 días fue muy severo (necrosis completa de las hojas) en el cultivar susceptible y líneas que fueron fertilizados con urea y en el grupo de control, con pérdida muy severa en el rendimiento, sin embargo en las plantas inoculadas con *R. leguminosarum* *bv.* *Phaseoli* la severidad de la enfermedad fue relativamente baja ( $P < 0,01$ ). De acuerdo a Bartsev *et al.* (2004) *Rhizobium* spp., puede inducir resistencia en frijol común y limitar la presencia del tizón común

bacteriano. Otros estudios mencionan que el tratamiento de *Rhizobium* spp. Reduce la pudrición del tallo y la raíz en comparación con plantas no inoculadas (Rahman *et al.*, 2017; Bécquer, 2011).



**Figura 8.** Efecto de la inoculación de *Rhizobium phaseoli* en *Phaseolus vulgaris* y la presencia y desarrollo del tizón común en campo. T1: *Rhizobium* (FM), T2: *Rhizobium* (N), T3: *Rhizobium* (PS), T4: *Rhizobium* (M), T5: *Rhizobium* (BJ) y T6: Control absoluto (CA).

En la Tabla 7 se presenta la respuesta de *P. vulgaris* en el rendimiento de biomasa a nivel plántula *Rhizobium* en campo donde al igual que invernadero se observó mayor rendimiento de peso fresco, seco, número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíz en plantas inoculadas, que las no inoculadas, resaltando la cepa *Rhizobium phaseoli* BJ-5 donde estas variables tuvieron mayores valores en rendimiento. El efecto promotor de crecimiento vegetal de *Rhizobium phaseoli* en *P. vulgaris* coincide con lo reportado por Yadegari, (2008) y Moreno *et al.*, (2007). Otros estudios señalan que *Rhizobium* spp., incrementa la nodulación en las raíces y proporciona mayor fijación de nitrógeno, productividad y fertilidad en los cultivos, incluso bajo condiciones

adversas del suelo, otorgando una alternativa para poder usarlo como reemplazo de fertilizantes nitrogenados (Solaiman *et al.*, 2005; Bhattacharjee y Sharma, 2012). Nuestros resultados también coinciden con los de Colás *et al.* (2014) quienes menciona que todas las plantas co-inoculadas con *Rhizobium* spp., producen mayores rendimientos y números de nódulos en las no inoculadas, lo que demuestra el potencial del uso de inóculo mixtos para mejorar la productividad del frijol común.

**Tabla 7.** Comportamiento de variables agronómicas en plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Rhizobium phaseoli* y *Xanthomonas axonopodis* en campo

Tratamientos	Peso fresco (gr)	Número de hojas	Longitud de raíz (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Número de nódulos
Rhizobium FM-1	404a	68.20a	17.40ab	8.72a	54.20ab
Rhizobium N-2	290ab	61.40ab	18.68ab	9.80a	34.00b
Rhizobium PS-3	390a	63.00ab	17.62ab	8.76a	34.20b
Rhizobium M-4	312ab	51.00ab	15.34b	7.90a	39.20ab
Rhizobium BJ-5	535a	69.80a	19.98ab	9.78a	79.80 a
Control absoluto	136b	43.80b	20.20a	8.34a	12.00b
SE ±	31.21	2.39	0.5	0.22	5.30
CV	37.51	16.87	13.26	12.77	51.78

\*valores con letras distintas tienen diferencias estadísticas según Tukey < 0.05%.

## CONCLUSIONES

El empleo de inoculantes simbióticos del tipo *Rhizobium phaseoli* tiene el potencial para reducir y prevenir los daños causados por *Xanthomonas axonopodis* y la aparición de síntomas asociados a la enfermedad en el cultivo como lo es la clorosis y el tizón común bacteriano del frijol, lo cual puede considerarse una ventaja para evitar el uso de bactericidas y los fertilizantes nitrogenados químicos. El empleo de agentes microbianos pudiera ser una alternativa en el cultivo de frijol por su actividad como promotor de crecimiento vegetal y resolver problemas de orden nutricional y fitosanitario.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla, M.H., and Bashandy, S.R. 2008. Bacterial wilt and spot of tomato caused by *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum* in Egypt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:291-292. DOI 10.1007/s11274-007-9385-8
- Abd-Alla M. H., F. M. Morsy, A-W. E. El-Enany and T. Ohyama (2012) Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* potentially applicable for biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>. *International Biodeterioration and Biodegradation* 67:48-55. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.10.008
- Abeysinghe S., 2009. Induced systemic resistance (ISR) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mediated by rhizobacteria against bean rust caused by *Uromyces appendiculatus* under greenhouse and field conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42(11), 1079–1087. DOI: 10.1080/03235400701622154
- Acosta-Gallegos y Herrera p., p. 2003. Situación del cultivo de frijol común. Producción e investigación. Programa de frijol del INIFAP 60p.
- Anderson, P.; Cunningham, A. A.; Patel, N. G.; Morales, F. J.; Epstein, P. R. and Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecology Evolution* 19:535-544. DOI:10.1016/j.tree.2004.07.021
- Bartsev A., H. Kobayashi and W.J. Broughton, 2004. Rhizobial signals convert pathogens to symbionts at the legume interface. In: *Plant Microbiology*. (M. Gillings, A. Holmes, ed.), BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, 19–31pp.
- Bécquer, C.; Salas, Á.; Palmero, L.; Nápoles, J. 2011. Efecto de la inoculación con rizobios procedentes de Alberta, Canadá, en sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), en condiciones de campo. *Pastos y forrajes* 34: 303-311. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v34n3/pyf06311.pdf>
- Belete T, Bastas KK (2017) Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of Beans with Special Focus on Ethiopian Condition. *Journal de Plant Pathology Microbiology* 8: 403. DOI: 10.4172/2157-7471.1000403
- Berrada H., I. Nouioui, M. Iraqui H., N. El Ghachtouli, M. Gtari and K. Fikri B., 2012. Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco.

African Journal of Microbiology Research 6:5314-5324.

- Bhattacharjee, S. and Sharma, G. D. 2012. Effect of dual inoculation of arbuscular *mycorrhiza* and *Rhizobium* on the chlorophyll, nitrogen and phosphorus contents of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Advances in Microbiology*, 2: 561-564. DOI: 10.4236/aim.2012.24072
- Bitocchi E, E Bellucci, A Giardini, D Rau, M Rodriguez, E Biagetti, R Santilocchi, P S Zeuli, T Gioia, G Logozzo, G Attene, L Nanni, R Papa (2013) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytologist*. 197:300-313. DOI:10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. Simbiosis leguminosas–*Rhizobium*. Manual de métodos evaluación, selección y manejo. Sección microbiología de suelos. Programa de pastos tropicales y Programa de frijol. CIAT, Cali-Colombia 178p. [http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PNABE088.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNABE088.pdf)
- Colás S. A., Torres G. R., Cupull S. R., Rodríguez U. A., Fauvart M., Michiels J., Vanderleyden J. 2014. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology* 62:105-112. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2014.03.004.
- Corzo L. M., Rivero G. D., Zamora G. L., Martínez Z. Y., Martínez C. B. 2015. Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. *Revista de Protección vegetal* 30 (2): 97-103 [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522015000200003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000200003)
- Cuadrado, B., Rubio, G., y Santos, W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionadas de los cultivos de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 38(1), 78-104. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v38n1/v38n1a06.pdf>
- Cupull, S.R.; Sánchez, C.C.; Andreu, C.; Cupull, M.D.C.; Pérez, N.C. 2000. Efecto de *Trichoderma* y *Azotobacter* en el control de *Rhizoctonia solani* y la estimulación del crecimiento de posturas de cafetos. *Centro agrícola* 1: 21-25.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C.E., and Jacques, M.A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *European Journal of Plant Pathology* 119:203-

215 DOI: 10.1007/s10658-007-9164-2

- Date, R. 1956. Inoculación de leguminosas. Primer curso latinoamericano de biología del suelo. UNESCO-universidad de Chile, Santiago.
- Dey R., Pal K., Bhatt D.M. & Chauhan S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 159: 371-394. DOI: 10.1016/j.micres.2004.08.004
- Downie, J. A. (1994). Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiology*. 2, 318-324.
- Erdman, L. 1968. Inocule sus leguminosas. *Agricultura de las Américas* 17 (6): 45-48.
- Essalmani H. & Lahlou H. 2003. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. *Lentis. C.R. Biologies*. 326: 1163-1173. DOI: 10.1016/j.crv.2003.10.003
- FAO 2015. Manejo e identificación de enfermedades que afectan hojas y vainas en el cultivo de frijol. Consulta 23 enero 2016. Disponible en: <http://teca.fao.org/es/read/8392>
- FIRA 2016. Panorama agroalimentario frijol. Consulta: 20 de septiembre 2016. Disponible en: [www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=15394](http://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=15394)
- Fourie, D. 2002. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. *Phytopathologische Zeitschrift* 150:220-226
- Frank, B. (1889). Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges* 7, 332–346.
- Francisco Francisco N, Gallegos Morales G, Ochoa Fuentes YM, Hernández Castillo FD, Benavides Mendoza A y Castillo Reyes F. 2013. Aspectos fundamentales del tizón común bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, patogenicidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31 (2): 147-160. [http://rmf.smf.org.mx/Vol3122013/ArticulosRevision/AR\\_ASPECTOS.pdf](http://rmf.smf.org.mx/Vol3122013/ArticulosRevision/AR_ASPECTOS.pdf)
- García R. V.E., García O. V. R., Escareño H. J. J. y Sánchez Y. J. M. 2016. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Scientia Agropecuaria*, 7 (3): 313-319. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2016.03.20

- Gent, D.H., Lang, J.M., and Schwartz, H.F. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Disease* 89:558-564.
- Gilberston, R. L., Rand, R. E., Carlson, E., and Hagedorn, D. J. 1988. The use of dry-leaf inoculum for establishment of common bacterial blight of beans. *Plant Disease* 72: 385-389. DOI: 10.1094/PD-72-0385.
- Granda M. K., H. Paccha C., C. Campoverde S. y R. Torres G. (2013) Variabilidad de aislados diazotróficos simbióticos en diferentes condiciones agroecológicas del sur del Ecuador. *Centro de Biotecnología* 2:6-15.
- Hassan Dar G., Zargar M.Y. & Beigh G.M. 1997. Biocontrol of *Fusarium* Root Rot in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using Symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. *Microbial Ecology* 34: 74-80 <https://link.springer.com/article/10.1007/s002489900036>
- INIFAP 2010. Manejo integrado de plagas y enfermedades de frijol. Consulta: 21 de enero 2017. Disponible en: <http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/PlagasFrijol.pdf>
- ISTA (International Seed Testing Association). 1995. Handbook of vigour test methods. 2 Ed. Zurich, Suiza. 117 p
- Kuykendall, D. J.; Young, E; Martinez, A.; Kerr, H. Sawada. 2005. *Rhizobium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer US. 325-340p.
- Lepiz-Idelfonso, R. 1999. La contribución de la fitopatología al mejoramiento de los cultivos agrícolas. *El Frijol. Revista Mexicana de Fitopatología* 17(1) 54-72
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting rhizobacteria. *The Annual Review of Microbiology* 63: 541-556. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- Marquina M. E., N. E. González y Y. Castro (2011) Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 59:1017-1036. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442011000300005](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442011000300005).
- Martínez, M., H. Castañeda, J. Martínez, M. Ruiz & C. Álvarez. 2005. Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus* silvestres por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Revista Scientia* 7(2), 175-181.

- Mayak S., Tirosh T. & Glick B. 2004. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 565-572. DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.05.009
- Moreno-Sarmiento N, Moreno-Rodriguez LF, Uribe D (2007) Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. In: Izaguirre-Mayoral ML, Labandera-C, Sanjuan J (eds) Biofertilizantes en Iberoamerica: Visión técnica, científica y empresarial. Vol 1. Denad Internacional, Montevideo, pp 38–45
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. y Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the betasubclass of Proteobacteria. *Nature*. 411, 948-950.
- Osdaghi E, 2014. Occurrence of common bacterial blight on mungbean (*Vigna radiata*) in Iran caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *New Disease Reports* 30, 9. DOI: 10.5197/j.2044-0588.2014.030.009
- Osdaghi E., A. Alizadeh, M. Shams-bakhsh and M.R. Lak, 2009. Evaluation of common bean lines for their reaction to the common bacterial blight pathogen. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 461–468.
- Osdaghi E., M. Shams-bakhsh, A. Alizadeh, M.R. Lak and H.Hatami Maleki 2011. Induction of resistance in common bean by *Rhizobium leguminosarum* bv.*phaseoli* and decrease of common bacterial blight. *Phytopathologia Mediterranea* 50, 45–54
- Pastor C., M. 1991. Técnica, materiales y métodos utilizados en la evaluación de frijol por su reacción a las enfermedades. In: Frijol: Investigación y Producción. López M., F. Fernández y A. Schoonhoven (eds.). 2ª reimposición. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. pp: 157-168.
- Pérez, G., G. Gómez, M. Nápoles, B. Morales. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y Forrajes*. 31(2), 151-159 [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942008000200005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942008000200005)
- Perrine F., Rolfe B., Hynes M. & Hocart C. 2004. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 723-729 DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.07.008
- Prakash, J.; Yadav, J.; Nath, K.; Kumar, A. 2013. Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields

and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecological Engineering* 51: 282–286. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2012.12.022

Quintero T. C. y Quijano R. R. 2013. El frijol común: factores que merman su producción. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica*. 26 (1). [Visto 3 de noviembre 2016]. Disponible en: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol26num1/articulos/el-frijol.html>

Rahman M., Ali ME., Alam f., Islam MN., y Bhuiyan M. 2017. Combined Effect of Arbuscular Mycorrhiza, *Rhizobium* and *Sclerotium rolfsii* on Grass Pea (*Lathyrus sativus*). *The Agriculturists* 15(1):143-155

Rodriguez H. & Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17: 319-339 DOI: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2

Rodriguez-R LM, Grajales A, Arrieta-Ortiz ML, Salazar C, Restrepo S, Bernal A. 2012. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiol* 12: 43. DOI: 10.1186/1471-2180-12-43

Rojas, D.; Garrido, M.; Bonilla, R. 2009. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. *Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 10 (1): 70-80.

Saddler, G.S., and Bradbury, J.F. 2005. Xanthomonadales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2235-2238 DOI: 10.1099/ijs.0.64108-0

SAGARPA 2017. Producción de frijol en México. Consulta: 20 de junio 2017. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacaliforniasur/boletines/2017/mayo/Documents/2017BS164.PDF>

SAS (Statistical Analysis System) Copyright (c) 2002. by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Schaad NW 1988. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Minnesota, U.S: The American Phytopathological Society; 84-107pp.

Schaad NW 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Minnesota, U.S: The American Phytopathological Society; 175-199pp.

Sessitsch, A.; Howieson, J. G.; Perret, X.; Antoun. H. and Martinez-Romero, E.

2002. Advances in *Rhizobium* research. Critical Reviews in Plant Sciences 21:323-378 DOI: 10.1080/0735-260291044278.
- Singh, S. P., H.Teran, C. G. Munoz and J. C. Takegami. 1999. Two cycles of recurrent selection for seed yield in common bean, Crop Science, 39: 391-397.
- Solaiman, A. R. M., Rabbani, M. G. and Molla, M. N. 2005. Effects of inoculation of *Rhizobium* and Arbuscular Mycorrhiza, Poultry litter, Nitrogen, and Phosphorus on growth and yield in chickpea. The Korean Society of Crop Science, 50 (4) 256-261.
- Vincent, JM (1970). A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 164p.
- Yadegari, M., Rahmani, H.A., Noormohammadi,G. and A. Ayneband, 2008. Evaluation of Bean (*Phaseolus vulgaris*) Seeds Inoculation with *Rhizobium phaseoli* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Yield and Yield Components. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 1935-1939 DOI: 10.3923/pjbs.2008.1935.1939
- Zanatta, Z. G.C.N., Moura, A.B., Maia, L.C., y dos Santos, A.S. 2007. Biossay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). Brazilian Journal of Microbiology 38: 511- 515. DOI: 10.1590/S1517-83822007000300024.
- Zavaleta, E. 2000. Alternativa de manejo de las enfermedades de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología 17: 201-207.