

TRANSMISION POR SEMILLA DE BACTERIAS FITOPATOGENAS DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN COLOMBIA

Por:

Elizabeth Alvarez C.*

Graciela Vanegas G.

Jorge I. Victoria K. **

Resumen

El porcentaje promedio de infección por *Xanthomonas phaseoli* en 21 muestras de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se determinó en 19.9 (método de inspección visual de la cubierta de la semilla), 5.4 (técnica del número más probable -NMP) y 24.4 (inducción de síntomas en plántulas).

Los resultados obtenidos por el método de inspección visual presentaron un coeficiente de correlación altamente significativo - (0.82) con los síntomas producidos por *X. phaseoli* en plántulas de frijol. Los resultados obtenidos por la técnica NMP mostraron coeficiente de variación alto y bajo coeficiente de correlación con los otros dos métodos.

Los mejores resultados se obtuvieron sembrando semillas de frijol en arena esterilizada e incubando plántulas de 8 días a 100 por ciento de humedad relativa y 26°C.

Three different methods were compared to determine percentage of bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) infection by *Xanthomonas phaseoli*. Evaluations were done on 21 samples with an average of seed infection of 19.9, 5.4 and 24.4 determined by the method of abnormal symptoms on seed coats, the most probable number technique (MNP) and induced symptoms on bean seedlings, respectively. Results obtained by abnormal symptoms on seed coats

presented a highly significant correlation coefficient (0.82) with symptoms produced by *X. phaseoli* on bean seedlings. Nevertheless

results obtained by the MNP technique showed a high variation coefficient and low correlation coefficient with the other two methods. Best results were obtained by sowing bean seed samples on sterile sandy soil and later incubation of 8 day-old seedlings under 100% relative humidity at 26°C for 48 h when the symptoms were recorded.

* Estudiantes de pre-grado U. Nacional de Colombia - Palmira.

** Instituto Colombiano Agropecuario ICA - Palmira.

INTRODUCCION

Los rendimientos del fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.), fuente básica de proteína en la alimentación colombiana, se ven afectados por las enfermedades que se presentan en el desarrollo del cultivo.

La semilla es uno de los principales medios de distribución y diseminación de los patógenos bacteriales que afectan las plantas del fríjol entre ellos el *Xanthomonas phaseoli* (Burkholder 1,2; Dutcher et al 3; Schuster 8 y Zaumeyer, 10, 11).

Butcher et al (4), desde 1963 encontraron añublo de halo en ciertos número de campos de semillas de fríjol. Se conoce que unas pocas semillas infectadas pueden resultar en pérdidas considerables en áreas húmedas.

Eliminando las semillas que presentan arrugamientos, decoloraciones, se evita la distribución y diseminación de enfermedades causadas por patógenos bacteriales transmitidos por semilla (Butcher et al, 4, Phatk, 5, Sactler y Perry, 6 y Taylor, 9).

La supresión de la supervivencia de un patógeno bacterial en las semillas, no es la respuesta total para prevenir epidemias, sino tan solo un componente de todo un programa de control. Schuster et al (7), consideran que la aparición de nuevas razas de fitopatógenos complican aún más los métodos de control.

En el Valle del Cauca en 1973 se estimó que las pérdidas ocasionadas por el añublo común causado por la especie bacterial *Xanthomonas phaseoli*, determinó la disminución de los rendimientos promedios en 173 Kg/ha y la producción total en aproximadamente 1.700 toneladas.

En Colombia no existe información sobre transmisión por semillas de bacterias fitopatógenas. La certificación de lotes destinados a la producción de semilla se hace sin ningún criterio definido sobre la transmisión de agentes fitobacteriales.

Por tanto los objetivos del presente estudio de acuerdo con lo anterior consistieron en :

- 1.1. Determinación de niveles de contaminación en muestras de semillas de diferente procedencia.
- 1.2. Determinación de la presencia de las bacterias interna o externamente en las semillas.

- 1.3. Diferenciación de las bacterias patógenas del fríjol presentes en la semilla.
- 1.4. Eficiencia de la transmisión por semilla de las bacterias patógenas del fríjol.

2. MATERIALES Y METODOS

En los estudios realizados en el invernadero y laboratorio del programa de Fitopatología del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) de Palmira, se empleó semilla de fríjol de diferentes variedades (Cuadro 1).

Los niveles de contaminación se determinaron por 3 métodos:

1. Análisis visual: en cada una de las muestras se examinó todo tipo de anormalidades, tales como arrugamientos, decoloraciones, etc.

2. La extracción de las bacterias para los aislamientos de la parte externa de las semillas, se realizó en un agitador horizontal. Para estimar la densidad bacteriana de la parte interna se utilizó la técnica del número más probable (NMP) (Taylor, 9). el medio del cultivo empleado fué YDC.

Para diferenciar las bacterias obtenidas en los aislamientos se inocularon plántulas de la variedad DUVA por el método de punción a través del vértice formado por las hojas cotiledonarias.

3. Transmisión por semillas infectadas. A partir de diferentes grupos de semillas infectadas de fríjol, se determinó la eficiencia en la transmisión de las bacterias de semillas a plantas.

Se formaron grupos de semillas distribuidas así:

Grupos de semillas en porcentajes de 0, 25, 50, 75 y 100, según el número de granos afectados.

Grupos de 100 semillas al azar.

Grupos de 100 semillas clasificadas en categorías, constituida cada una por 20 semillas.

Estos diferentes grupos se sembraron en bandejas de cemento con arena esterilizada. A los 8 días de germinadas las bandejas se colocaron en cámara húmeda a 100% de humedad relativa por 48 horas. Se efectuaron observaciones sobre síntomas de afecciones en los cotiledones, tallos, pecíolos, hojas, que se produjeron a partir de los diferentes grupos. Se determi-

Cuadro 1
Identificación de muestras de semilla de frijol utilizados
en los diferentes análisis

Muestra No.	Variedad	Sitio de recolección	Clase de semilla
1	ICA Palmar	ICA	Comercial
2	ICA Tui	ICA	Comercial
3	ICA Pijao	ICA	Comercial
4	ICA Línea 37	ICA	Comercial
5	ICA Gualí	ICA	Comercial
6	ICA Duva	ICA	Comercial
7	ICA Bunsi	ICA	Comercial
8	ICA Diacol Calima	ICA	Comercial
9	Diacol Calima	ICA	Comercial
10	ICA Línea 20	ICA	Comercial
11	ICA Línea 21	ICA	Comercial
12	P - 402	CIAT	Depar **
13*	P - 51	CIAT	Depar **
14	P - 127	CIAT	Depar **
15 *	Hayado Dorado	CIAT	Depar **
16	P - 537	CIAT	Depar **
17	P - 38	CIAT	Depar **
18	P - 554	CIAT	Depar **
19	P - 115	CIAT	Depar **
20	P - 756	CIAT	Depar **
21 *	Pintado	Dagua	Depar **
22 *	P - 437	Dagua	Depar **
23	P - 668	Dagua	Depar **
24	P - 381	Dagua	Depar **
25	P - 557	CIAT	Depar **
26	Mezcla de variedades	ICA	Comercial

* Semilla tratada previamente con un fungicida

** Depar = De ensayo para adaptación y rendimiento.

narón los porcentajes de plántulas sanas y afectadas y se hicieron aislamientos para establecer los microorganismos presentes.

3. RESULTADOS

3.1. Determinación de niveles de contaminación.

Se estableció el porcentaje de infección de cada una de las categorías, de éstas la categoría V o sea semillas sanas está presente en todas las muestras, constituyendo el mayor porcentaje; lo contrario ocurrió con la III categoría o decoloradas, que se presenta con menor frecuencia. El porcentaje de infección más alto se presentó en la muestra No. 14.

3.2. Determinación de la presencia de las bacterias interna o externamente en las semillas.

1. Técnica externa. Se determinaron 3 clases de bacterias: Amarillas, blancas y *X. phaseoli* cuyo crecimiento se realizó en YDC, (Cuadro 2).

Las muestras 2, 4, 8, 12 presentaron altos porcentajes promedios de *X. phaseoli*. La muestra No. 1 presenta en la categoría V un alto porcentaje de la bacteria; esto demuestra que semilla aparentemente sana puede ser portadora de la bacteria. Todas las categorías presentan *X. phaseoli*. El mayor porcentaje total de colonias bacteriales lo presenta la categoría III, o sea decoloradas.

Cuadro 2

Porcentaje total de frecuencia de colonias bacteriales aisladas externamente de las semillas clasificadas en las distintas categorías.

Bacteria Colonias	CATEGORIAS *					
	I	II	III	IV	\bar{X}^{**}	V
Amarillas	10o/o	10o/o	15o/o	13o/o	12o/o	3o/o
Blancas	8	5	5	5	6	8
<i>X. phaseoli</i>	8	13	15	13	12	3

* Descripción de las diferentes categorías; I manchas en el hilum; II manchas en diferentes partes de la semilla; III decoloradas; IV arrugadas; V sanas.

** Promedio de categorías que presentan los diferentes tipos de bacterias comprendidas desde I hasta IV.

2. **Técnica interna.** Los mayores porcentajes de infección de acuerdo a la tabla de dilución los presentan las muestras 7, 8, 9. El método del NMP no es muy preciso.

3.3. **Patogenicidad de las bacterias presentes en las semillas de frijol.**

Las pruebas de patogenicidad de las bacterias aisladas externa o internamente de las semillas de frijol se realizó en plántulas de la variedad DUVA.

La reacción positiva (exudado de color amarillo en el sitio donde se efectuó la inoculación) demostró la patogenicidad de *X. phaseoli*.

Las bacterias amarillas y blancas resultaron no patogénicas.

3.4. **Eficiencia de la transmisión por semilla de las bacterias patógenas del frijol.**

En el grupo de semillas con diferentes niveles de infección (0, 25, 50, 75, 100), se observó una tendencia decreciente en el porcentaje de germinación en la medida en que aumenta el nivel de infección, lo cual hace suponer que existe cierta influencia de la frecuencia de infección, en la germinación de la semilla.

Se determinó la presencia de ciertos hongos como : *Macrophomina phaseoli*, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Pythium sp.* y de la bacteria *X. phaseoli* por los síntomas que presentaron en las plántulas y por las características de cada uno de estos microorganismos al ser aislados en PDA y TZC, respectivamente.

El coeficiente de correlación (0.82), obtenido permite deducir que existe una relación directa altamente significativa entre las variables: nivel de infección de semillas de frijol y plántulas con lesiones provocadas por *X. phaseoli*. Según el intercepto determinado por regresión (20.2), pudo establecerse que 0o/o de granos afectados presentarán siempre un determinado número de plantas enfermas por *X. phaseoli*.

Para los otros tipos de siembra las muestras con mayor número de plantas con síntomas de infección por *X. phaseoli*, menor era el porcentaje de germinación, lo cual corrobora la influencia de la frecuencia de infección en la germinación de la semilla. En la categoría V se presentan plántulas con *X. phaseoli* lo cual confirma la presencia de bacterias en semilla sana o sin síntomas de infección en su parte externa.

En el cuadro 3, se establecen los porcentajes de infección de semilla obtenidos por cada uno de los métodos empleados.

Cuadro 3

Porcentaje de infección en muestras de semilla de frijol según el sistema de determinación empleado

Muestra No.	Porcentaje de infecc. de acuerdo a categor.	Porcentaje de infecc. de acuerdo al NMP	Porcentaje de plántulas afectadas por <i>X. phaseoli</i> .
1	19	1.4	21.0
2	4.7	1.0	5.3
3	19.1	5.4	9.3
4	11.9	0.7	11.2
5	25.1	0.7	-
7	11.4	13.0	31.6
8	24.7	16.0	30.5
9	15.9	14.0	52.3
10	18.8	1.4	15.6
11	31.4	2.8	44.1
12	18.1	0.01	37.1
26	38.8	9.3	34.0
Porcentaje promedio	19.9	5.4	24.4

De acuerdo a los coeficientes de correlación presentados en la Cuadro 4, se comprobó que el método más confiable en la determinación de infección, es aquel que determina el porcentaje de plántulas con síntomas de infección por *X. phaseoli*.

4. DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran que semillas con presencia de anomalías como arrugamientos, manchas, decoloraciones son portadoras de bacterias tanto en la parte externa como interna, lo cual pudo establecerse de acuerdo a las técnicas utilizadas. De estas bacterias, *X. phaseoli*, resultó ser patogénica y las colonias amarillas y blancas no, según las pruebas de patogenicidad a que fueron sometidas. De acuerdo

Cuadro 4

Coefficiente de correlación entre los diferentes métodos utilizados para determinar el porcentaje de infección por *X. phaseoli* en muestras de semilla de frijol

	Porcentaje de infección de acuerdo a :		
	Categorías	NMP	Plántulas afectadas
Categorías		0.16	0.47 *
NMP	0.16		0.50*
Plántulas afectadas	0.47*	0.50*	

* Significativo al 95o/o.

con la literatura citada, los resultados obtenidos confirman lo dicho por Phatk (5) y Butcher et al (4) quienes examinaron muestras de semillas para detectar anomalías.

Los valores de correlación (α) obtenidos para la siembra en grupos de semillas de tres muestras con diferentes porcentajes de granos manchados mostraron una relación directa, altamente significativa entre las dos variables: porcentaje de granos manchados y número de plantas con síntomas de infección por *X. phaseoli*. De acuerdo al coeficiente de regresión exterior pueden producirse plántulas con síntomas de infección, comprobándose lo dicho por Taylor (9), quien demostró que eliminando semillas con síntomas de infección se reduce la infección de las semillas pero no la elimina totalmente.

De los métodos utilizados el que establece el porcentaje de plántulas con síntomas de infección por *X. phaseoli* es el más preciso.

5. CONCLUSIONES

1. Las semillas con síntomas de manchas o anomalías y las aparentemente sanas son igualmente portadoras de bacterias fitopatógenas en la parte externa e interna.
2. Todas las categorías determinadas de acuerdo al análisis visual presentaron *X. phaseoli*, no pudiendo establecerse un síntoma de infección en la semilla característico para esta bacteria.

3. El empleo de semilla sana (limpia) en la siembra disminuye el porcentaje de infección pero no lo elimina totalmente, ya que son portadoras de microorganismos.
4. A medida que aumenta el número de granos manchados en la siembra, aumenta el número de plántulas con síntomas de *X. phaseoli*.
5. El mejor método para determinar porcentajes de infección es la siembra de semillas y observación de síntomas inducidos en las plantas resultantes.

6. BIBLIOGRAFIA.

1. BURKMOLDER, W. H. *Xanthomonas vinnicola* sp. nov. pathogenic on cowpeas beans. *Phytopatology*. 34: 430-432. 1944.
2. BURKHOLDER, W. H. The longevity of the pathogen causing the wilt on the common beans. *Phytopatology*. 35: 743 - 744. 1945.
3. BUTCHER, C. L., DEAN, L. L. and GUTHRIE, J. W. Effectiveness of halo blight in Idaho. *Plant. Dis. Repr.* 43: 894-896. 1960.
4. BUTCHER, C. L., DEAN, L. L. and AFERRIERE, L. Incidence of halo blight in Idaho. *Plant. Dis. Repr.* 51: 310-311. 1967.
5. PHATK, H. C. Seed borne plant. Viruses identification and diagnosis in seed health testing. *Seed science and technology*. 2: 3-155. 1974.
6. SAETTLER, A. W. and PERRY, S. K. Seed transmitted bacterial diseases in Michigan Navy pea beans *Phaseolus vulgaris*. *Plant Dis. Repr.* 56: 378-381. 1972.
7. SCHUSTER, M. L. COYNE, D. P. and MOFF, BETTY. Comparative virulence of *Xanthomonas phaseoli* strains from Uganda, Colombia and Nebraska. *Plant. Dis. Repr.* 57: 74-75. 1973.
8. SCHUSTER, M. L. and CHRISTIANSEN, D. W. An orange colored bacterium comparable to *Corynebacterium flaccumfaciens* (Medges) Dowson causing bean wilt. *Abstr. Phytopathology*. 43: 483. 1953.

9. TAYLOR, J. D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh) Dowson. 66: 29 - 36. 1970.
10. ZAUMEYER, W. J. Comparative phatological histology of three bacterial diseases of bean. L. Agr. Res. 44: 605-632. 1932.
11. ZAUMEYER, W. J. and THOMAS, H. R, A. monographic study of bean diseases and methods for their control. U. S. D.A. Tech. Bull. No. 868. 1957. 255 p.