

ENSAYO SOBRE CONTROL QUIMICO DEL TIZON DE HALO DEL FRIJOL CAUSADO POR *Pseudomonas phaseolicola* (BURK) DOWS

Por Medardo Izquierdo Luna¹ y Moisés Téliz Ortiz

Rama de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Méx.

Sinopsis

Se estudió la posibilidad de controlar el "tizón de halo" del frijol en el campo por aspersiones de Agrimicina 100, Sulfato de Dihidroestreptomocina y caldo bordelés, solo y mezclado con los antibióticos. Las plantas provinieron de semilla inoculada por inmersión en una suspensión acuosa del patógeno *Pseudomonas phaseolicola*. Los testigos no asperjados con los bactericidas resultaron altamente infectados. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos respecto al peso promedio por planta, total de ejote y ejotes comerciales. Según la prueba de Duncan, los mejores tratamientos fueron Agrimicina (500 ppm) y caldo bordelés. *In vitro*, el caldo bordelés causó la mayor inhibición del patógeno. Se verificó la translocación ascendente de los antibióticos. Aunque con leves efectos fitotóxicos, la efectividad de los antibióticos en el campo fue evidente. El caldo bordelés, con resultados iguales o superiores a los antibióticos, podría recomendarse por su bajo costo, contra el tizón de halo. Queda pendiente determinar el máximo de aspersiones necesarias y la época adecuada de su aplicación para recomendaciones prácticas.

Summary

The possibilities of controlling halo blight of beans were studied under field conditions spraying with Agromycin 100, streptomycin sulphate and Bordeaux mixture alone, and mixed with the antibiotics. Bean plants were obtained from seeds inoculated by immersion in a water suspension of the pathogen, *Pseudomonas phaseolicola*. Check plants not sprayed with the chemicals, resulted highly infected. Significant differences were found among treatments in relation to average plant weight, total pod number and number of commercial pods. Using Duncan's procedure the best treatments were agromycin (500 ppm) and Bordeaux mixture. *In vitro*, Bordeaux mixture caused the greatest inhibition of the pathogen.

Upward movement of the antibiotics inside of plants was verified. Even with slight phytotoxic effects, the effectivity of the antibiotics was evident. Bordeaux mixture, with results similar or superior to those obtained with antibiotics, could be recommended against halo blight, because of its low cost. The minimum number of sprays and the right time to apply them for practical recommendations is still to be determined.

Introducción

El frijol, *Phaseolus vulgaris* L., es una planta susceptible a numerosas enfermedades que reducen su calidad y producción. Entre las enfermedades bacterianas del frijol, "el tizón de halo", causado por *Pseudomonas phaseolicola* (Burk.) Dows., es la que causa mayores pérdidas. La planta es susceptible en cualquier estado de crecimiento y el patógeno ataca indistintamente hojas, ramas, tallos y vainas.

¹ Dirección actual: Universidad Técnica de Manabí, Casilla 13, Portoviejo, Ecuador.

Tomando en cuenta las pérdidas causadas por esta bacteriosis al cultivo del frijol en los últimos años, principalmente en los estados de Hidalgo, Guanajuato y Querétaro, según observaciones personales del coautor, se llevó a cabo el presente estudio con el fin de advertir las posibilidades de su control por medios químicos. No fue el propósito principal el de llegar directamente a recomendaciones prácticas, pues se incluyó un antibiótico de precio alto y un gran número de aspersiones. Se trató de sentar bases en el campo mexicano para estudios que se traduzcan en medidas de control para el agricultor.

Revisión de literatura

Sintomatología. La enfermedad es local y sistémica, y todos los tejidos y órganos, excepto las raíces, pueden ser invadidos. La infección local se presenta en forma de lesiones en hojas, tallos, vainas y pecíolos; por el contrario, la infección sistémica puede causar aehaparramiento y síntomas de mosaico (1).

En las hojas, las lesiones aparecen primero como pequeñas áreas, menores de 1 mm, color verde oscuro y de apariencia acuosa; un halo amarillento puede circundar cada lesión. A medida que avanza la enfermedad, las lesiones se extienden y pueden coalescer llegando a cubrir gran parte de la hoja (4).

Las lesiones sobre tallos de plántulas son hendididas y empiezan como manchas acuosas que posteriormente forman estrías o bandas rojizas longitudinales a lo largo del tallo. La superficie de tallo a menudo se agrieta y un exudado bacterial gris viscoso puede acumularse en la lesión (3).

En las vainas tiernas las manchas son al principio redondas, color verde oscuro, acuosas o grasosas. La infección de la vaina en reciente formación, ocasiona su acortamiento y distorsión. La infección puede ocurrir en los elementos vasculares de las suturas dorsal y ventral, para finalmente entrar a la semilla por los funículos. Las semillas severamente infectadas son generalmente más pequeñas, arrugadas y tienen áreas decoloradas fácilmente detectables en variedades blancas, pero no tan obvias en semillas oscuras (1) (10).

La bacteria es transportada de un lugar a otro por la semilla infectada. Durante la germinación de la semilla, la bacteria se reactiva en las manchas de la testa o de los cotiledones, e invade los vasos. A la emergencia, el punto de crecimiento puede morir y el desarrollo se detiene. Aunque *P. phaseolicola* puede penetrar por heridas, también es capaz de entrar al tejido intacto a través de los estomas y diseminarse internamente por el sistema vascular (6).

El patógeno. *Pseudomonas phaseolicola* (Burk.) Dows., es un bacilo aerobio, Gram-negativo de 1.3 a 3.2 x 0.4 a 0.6 micras, con 1 a 6 flagelos mono o bipolares, que se presentan individualmente en pares, rara vez en cadenas (6).

La bacteria en cultivo produce un pigmento verde fluorescente. En extracto de carne-agar, las colonias varían de blanco a crema, son levantadas, circulares, con margen más grueso que el centro y borde entero. La temperatura óptima de crecimiento es entre 25 y 30°C; la máxima, entre 36 y 37°C y la mínima, abajo de 0°C. El crecimiento tiene lugar en variaciones de pH de 5.0 a 8.8, con óptimo entre 6.7 y 7.3 (6) (3).

Hospedera y distribución. En adición a *Phaseolus vulgaris*, también *P. coccineus*, *P. lunatus* var. *macrocarpus*, *P. multiflorus*, *Pueraria thunbergiana*, *P. hirsuta* y *Glycine soja*, muestran susceptibilidad al patógeno. Se asume que la enfermedad se presenta en todos los países donde se cultiva el frijol (6).

Según Hedges (5) el suelo es un medio inapropiado para que la bacteria del tizón de halo pase en forma viable de un período de cultivo al siguiente.

En Wisconsin, Walker y Patel (8) determinaron que la enfermedad se extendió de 65 a 80 pies (19.5 a 24.3m) a partir de un foco de infección, en la dirección del viento, obteniendo plántulas en su mayoría con 100% de infección. De acuerdo con estos autores, no se tiene evidencia de dispersión de esta enfermedad por implementos agrícolas.

Control del tizón de halo. El uso de semilla sana es el mejor medio de control. En áreas donde ha ocurrido la enfermedad, la rotación de cultivos reduce bastante el inóculo (3). La inmersión de la semilla en desinfectantes antes de la siembra ha tenido poco efecto, puesto que la bacteria puede alojarse entre la testa de la semilla y los cotiledones, e incluso en el interior de éstos. La eficiencia del asperjado o espolvoreado a las plantas con sustancias químicas es dudoso, especialmente en climas húmedos. Las plantas, una vez infectadas, no pueden ser curadas por este método (6).

En los últimos años se ha obtenido un éxito parcial con el uso de algunos antibióticos ensayados como terapéuticos, pero aún no es posible hacer un avalúo final de su utilidad práctica, particularmente desde el punto de vista económico. Zaumeyer y Thomas (10) encontraron que el sulfato de estreptomina y el sulfato de dihidroestreptomina, se translocaron dentro del frijol en pequeñas distancias, protegiendo a las plantas de la infección de esta bacteria. En el campo, la aspersión de una solución acuosa de 0.1% de sulfato de estreptomina, dio buen control del tizón de halo cuando se hicieron 3 aplicaciones. La polimixina y la aureomicina inhibieron el crecimiento de *P. phaseolicola* en cultivo.

Williams (9), trabajando con semillas infectadas, las sumergió por 30 minutos antes de la siembra en el campo, en soluciones de sulfato de estreptomina en concentraciones de 50, 100, 250 y 500 ppm. El promedio de incidencia del tizón de halo fue de 56, 49, 36 y 38% respectivamente, entre las plantas de semilla tratada, y de 72% en las plantas de semilla no tratada.

Téliz y Burkholder (7) señalan que *Pseudomonas fluorescens* mostró decidido antagonismo a *P. phaseolicola* tanto *in vitro* como *in vivo*.

Materiales y métodos

La cepa inicial de *P. Phaseolicola* fue proporcionada por el coautor, quien la aisló de plantas de frijol infectadas en la región de Chapingo. De esta cepa se hicieron cultivos monocelulares usando el medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) con 0.6% de dextrosa.

Se utilizó la variedad Canario por su susceptibilidad a la bacteria; para obtener plántulas con infección homogénea, se ensayaron varios métodos de ino-

culación en los que las semillas se remojaron en agua corriente para suavizar la testa y después se inocularon, sumergiéndolas por diferentes lapsos en una suspensión acuosa de la bacteria.

Trabajos de campo. En el campo se condujeron dos ensayos de aplicación de bactericidas, distribuidos en bloques al azar con 9 tratamientos y 4 repeticiones. Todas las parcelas incluyeron 2 surcos con semilla inoculada y 2 con semilla sana, además de dos surcos de protección de maíz y de frijol (Fig. 1).

A los 15 días de la siembra, cuando las hojas primarias estuvieron a medio desarrollo, se inició una serie de aspersiones semanales hasta un total de 10, con los 9 tratamientos siguientes:

1. Agrimicina 100*, 500 ppm (partes por millón)
2. Agrimicina 200 ppm
3. Sulfato de Estreptomicina**, 600 ppm
4. Sulfato de Estreptomicina, 300 ppm
5. Caldo Bordelés neutro (en proporción 1:0.5:100)
6. Agrimicina 500 ppm y Caldo Bordelés (partes iguales)
7. Sulfato de Estreptomicina 600 ppm y Caldo Bordelés (partes iguales)
8. Testigo a: Plantas no asperjadas, provenientes de semilla inoculada
9. Testigo b: Plantas no asperjadas, provenientes de semilla no inoculada.

Evaluación de los datos en el campo. Para el primer ensayo, la cosecha se efectuó cuando los ejotes aún estaban verdes. Para cada tratamiento y repetición se tomaron datos en los dos surcos sembrados con semilla sana, y aparte los dos con semilla inoculada. Una vez pesadas las plantas de cada dos hileras, se desvainaron y los ejotes se separaron por apreciación visual, en tres categorías: comerciales, intermedios y desechables. Se tomaron los siguientes datos para analizarlos estadísticamente:

1. Número y peso medio de planta
2. Número y peso medio de ejotes comerciales
3. Número y peso medio de ejotes intermedios
4. Número y peso medio de ejotes desechables
5. Número, peso y lesiones del total de ejotes

La cosecha del segundo ensayo se hizo en forma similar, excepto que ésta se efectuó cuando los ejotes y la semilla estuvieron completamente maduros y secos. Se analizaron los siguientes datos:

1. Número y peso medio de ejotes comerciales
2. Número y peso medio de ejotes no comerciales
3. Número y peso medio del total de ejotes
4. Peso medio de semilla de ejotes comerciales
5. Peso medio de semilla de ejotes no comerciales
6. Peso medio de semilla del total de ejotes

* Agrimicina 100. "Pfizer", producto para usos agrícolas que contiene 15% de estreptomina, 1.5% de oxitetraciclina y 83.5% de ingredientes inertes.

** Sulfato de dihidroestreptomina cristalina, "Squibb".

El análisis estadístico de los datos se efectuó en la computadora electrónica del Centro de Estadística y Cálculo del Colegio de Postgraduados.

Pruebas de invernadero

A. Aplicación de antibióticos y caldo bordelés. Se realizó un ensayo de aspersión de bactericidas en el invernadero en forma similar a los experimentos recién descritos: para cada tratamiento se usaron 3 macetas con un total de 10 plantas.

B. Detección y translocación de antibióticos en plantas. Se cultivaron en cajas de madera plantas jóvenes de frijol de la variedad Canario para determinar translocación de antibióticos en las siguientes formas:

- a. Sumergiendo las raíces por 10 minutos en soluciones de agrimicina (500 ppm) y sulfato de estreptomina (600 ppm).
- b. Inyectando al tallo 2 cc de los antibióticos en las dosis recién mencionadas.
- c. Aplicando una pasta a base de vaselina mas antibiótico a la parte media del tallo en una extensión de 2.5 cm.
- d. Asperjando sobre las hojas las dosis altas de antibióticos y caldo bordelés.

C. Para detectar la presencia de antibióticos o caldo bordelés en plantas tratadas, o para determinar directamente la actividad antibiótica de las soluciones usadas, se practicó el siguiente bioensayo: Se hizo una dilución 10^{-1} de una suspensión de *P. phaseolicola* de 36 horas de edad, con densidad óptica de 300. Se mezcló un ml de ésta con 20 ml de PDA líquido a 45°C en una caja de petri. Una vez solidificado el medio, se depositaron discos de 12.7 mm de diámetro, de hojas de frijol cortados con sacabocado, o de papel filtro*, conteniendo el antibiótico. La presencia de antibiótico se evidenciaría por una zona de inhibición de *P. phaseolicola* alrededor del disco.

Resultados

A partir de las diversas prácticas de inoculación de semilla en la variedad Canario, con el fin de obtener en el campo plántulas con infección severa y homogénea, se determinó que era suficiente sumergir la semilla entre 15 y 30 minutos en una suspensión de bacterias con una densidad óptica de 250 a 300, previo remojo en agua de la llave por 30 minutos.

Efectividad de los bactericidas en el campo. La infección de las plantas en el primer ensayo fue muy severa; las parcelas testigo y las plantas de los surcos sembrados con semilla inoculada, murieron todas, produciendo antes inóculo para infectar las plantas de surcos vecinos.

* Discos de papel filtro marca S & S (Schleicher & Schuell Co.) de 12.7 mm de diámetro.

En el segundo ensayo la infección ocurrió en una forma menos severa, permitiendo a la casi totalidad de las plantas terminar su ciclo, con diferente intensidad de ataque de *P. phaseolicola*, según el tratamiento recibido (Fig. 2).

El análisis estadístico del primer ensayo reveló diferencias altamente significativas entre tratamientos, respecto al peso promedio por planta, y significativas entre tratamientos en el peso promedio del total de ejotes. Mediante la prueba de Duncan (2), se determinó que para estos caracteres los mejores tratamientos fueron, agrimicina 500 ppm, y caldo bordelés (Cuadros 1 y 2). Los rendimientos mínimos obtenidos correspondieron a las dos parcelas testigo.

C U A D R O 1

Categorización de los tratamientos según la prueba de Duncan en función de los pesos promedio de cada planta cosechada en verde

PROMEDIOS DE PESO (gramos)	TRATAMIENTOS
93.41	Agrimicina 500 ppm
84.01	Caldo Bordelés
71.32	Agrimicina 200 ppm
67.68	Agrimicina 500 ppm + Caldo Bordelés
67.25	Estreptomina 300 ppm
60.77	Estreptomina 600 ppm + Caldo Bordelés
57.61	Estreptomina 600 ppm
40.22	Testigo a, semilla inoculada y no asperjada
28.42	Testigo b, semilla no inoculada, ni asperjada

Las medidas comprendidas en una misma línea son iguales estadísticamente (con 1% de error).

C U A D R O 2

Categorización de los tratamientos según la prueba de Duncan en función de los pesos promedio por ejote en verde

PROMEDIOS DE PESO (gramos)	TRATAMIENTOS
5.37	Agrimicina 500 ppm
5.29	Caldo Bordelés
5.26	Estreptomina 600 ppm + Caldo Bordelés
4.81	Agrimicina 500 ppm + Caldo Bordelés
4.65	Estreptomina 300 ppm
4.57	Estreptomina 600 ppm
4.53	Agrimicina 200 ppm
3.86	Testigo b, semilla no inoculada ni asperjada
3.73	Testigo a, semilla inoculada y no asperjada

Las medidas comprendidas en una misma línea son iguales estadísticamente (con 1% de error).

Para el peso promedio de semilla por ejote no comercial, se registraron diferencias significativas entre los surcos con semilla no inoculada, y los de semilla

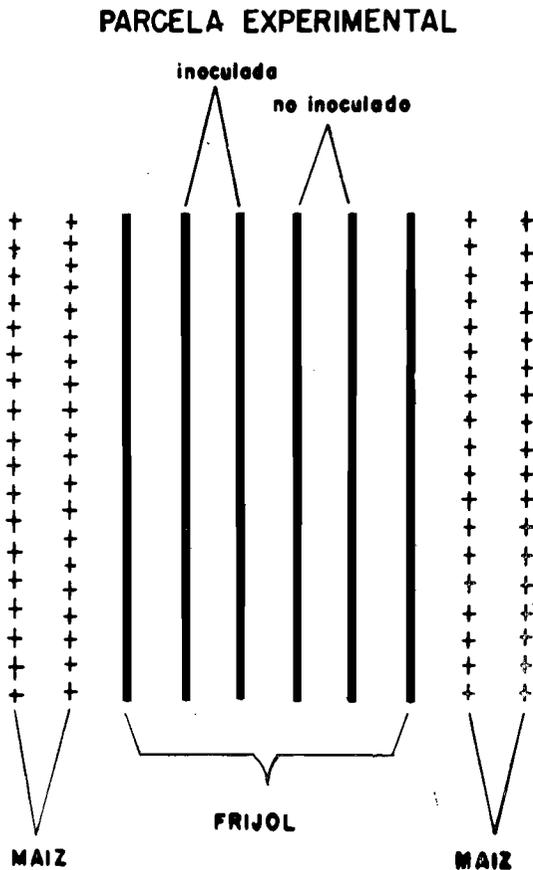


Fig. 1 Diseño de la parcela experimental con los surcos de protección de frijol y de maíz (+).

inoculada. Diferencias altamente significativas se registraron para el peso promedio del total de ejotes y para el peso promedio de ejotes no comerciales entre los surcos sembrados con semilla no inoculada y los de semilla inoculada.

En el segundo ensayo hubo diferencias significativas entre tratamientos respecto a los pesos promedio de ejote seco comercial, siendo el caldo bordelés el mejor tratamiento.

Para los demás caracteres analizados no se encontró diferencia significativa, pero la superioridad de rendimiento de los surcos de semilla no inoculada, sobre los de semilla inoculada, fue manifiesta.

Efectividad de los bactericidas en el invernadero y laboratorio. No se hizo el análisis estadístico en las plantas de invernadero, debido al número reducido y heterogéneo de plantas (aproximadamente 9) que quedaron al final del período vegetativo. Promediando el peso total de ejotes por planta dentro de cada tratamiento se obtuvieron los mejores rendimientos con los siguientes tratamientos en orden de importancia: 1) Agrimicina 500 ppm + Caldo Bordelés, 2) Testigo b, de semilla no inoculada ni asperjada y 3) Agrimicina 200 ppm.



Fig. 2 Plantas provenientes de semilla inoculada y que no recibieron ningún tratamiento. Nótese la clorosis y la rugosidad de los hojas superiores, así como el achaparramiento general de la planta.

Las pruebas de los tratamientos *in vitro* mostraron efectividad en varias escalas, siendo el caldo bordelés el que más inhibió el crecimiento de la bacteria, seguido por la combinación de caldo bordelés y agrimicina 500 ppm.

Se realizaron bioensayos para observar la inhibición de crecimiento de *P. phaseolicola*, causada por agrimicina y estreptomycin en cantidades crecientes, aplicadas al papel filtro. Los resultados indicaron que las zonas de inhibición fueron proporcionales a la concentración de cada antibiótico (Fig 3).

Se evidenció la translocación de antibióticos de las raíces al tallo o del tallo a las hojas, tanto en las plantas cuyas raíces se sumergieron en soluciones de antibióticos, como en las que el antibiótico se inyectó al tallo. La presencia en las hojas de los antibióticos y caldo bordelés, asperjados al follaje en condiciones de invernadero se detectó, aún después de ocho días.

Discusión y conclusiones

Quedó comprobada, en pruebas de laboratorio, invernadero y campo, la efectividad de la agrimicina 100 (500 ppm) contra *P. phaseolicola* y la enfermedad que causa, el tizón de halo. Sin embargo, por su alto precio sería dudosa la conveniencia económica de su empleo para el control práctico de la enfermedad. Se estima que el costo por hectárea de este antibiótico en 500 y 200 ppm oscilaría respectivamente alrededor de \$660.00 y \$213.00 (MN). Posiblemente con un número menor de aspersiones sería factible efectuarlo, al igual que la combinación de agrimicina 500 ppm, con el caldo bordelés.

La situación con el caldo bordelés es muy diferente, ya que el costo de aplicación por hectárea sería de \$ 140.00 (MN), y en cambio su efectividad

bactericida fue igual o superior a la de los antibióticos probados. Siendo éste el tratamiento más económico y de fácil preparación, se sugiere realizar pruebas adicionales en las que se trate de reducir al mínimo el número de aplicaciones necesarias y determinar la época adecuada para realizarlas derivando una medida económica para el control efectivo de esta bacteriosis. El pH de la mezcla es de vital importancia, ya que el cobre, a pesar de su fitotoxicidad, una vez neutralizado con la cal, fue tolerado por las plantas y los efectos fitotóxicos apenas fueron notorios.

La combinación de los distintos antibióticos en partes iguales con caldo bordelés no tendría objeto, no obstante sus efectos aditivos comprobados en el presente ensayo, puesto que el caldo bordelés por sí solo controlaría la enfermedad.

La inclusión de sulfato de estreptomina en este trabajo tuvo fines comparativos solamente, ya que su costo de \$ 2.70 (MN) por gramo, definitivamente imposibilita su uso para fines comerciales.

En pruebas de invernadero y laboratorio se verificó la translocación de agrimicina y estreptomina en plantas de frijol. Se puede presumir que algo de este

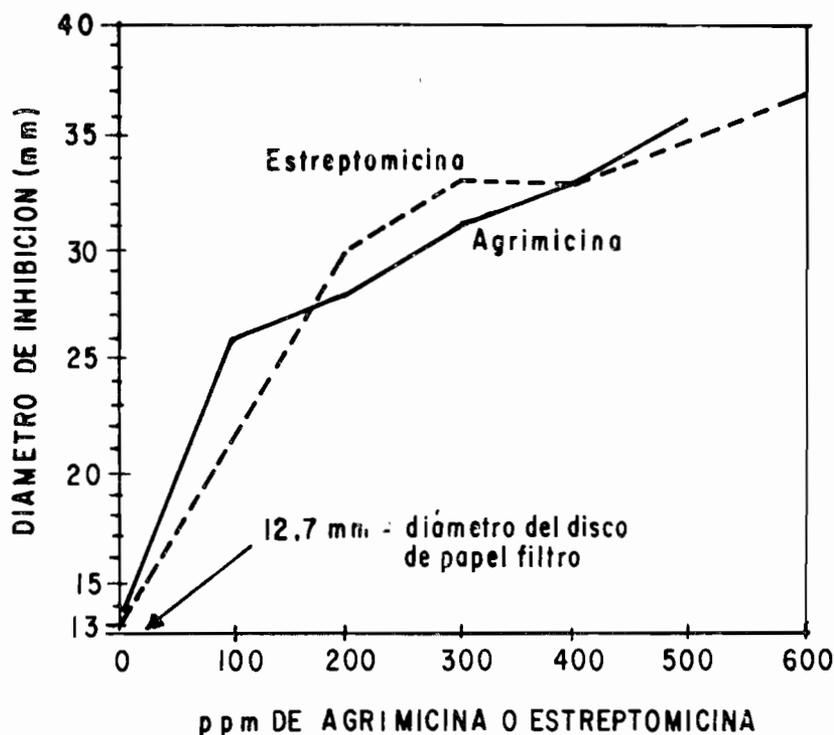


Fig. 3 Gráfica que muestra la inhibición de *P. phaseolicola* causada por la agrimicina y la estreptomina *in vitro*.

movimiento interno de antibióticos haya ocurrido a las plantas en el campo, ya que fueron sometidas a los diferentes tratamientos desde muy pequeñas.

Se determinó un método efectivo para obtener plantas de frijol con infección severa y uniforme tanto en invernadero como en el campo; consistente en sumergir las semillas, previamente remojadas, en agua corriente de 15 a 30 minutos en una suspensión concentrada de *P. phaseolicola*.

Las zonas de inhibición, causadas por caldo bordelés y los antibióticos sobre *P. phaseolicola* en los ensayos *in vitro*, tienen marcada proporcionalidad con los resultados de control de la enfermedad en el campo.

El número de fallas de plantas en el invernadero se puede atribuir a la virulencia de la cepa utilizada y a la abundante aspersión de cada uno de los tratamientos, que resultó en pronunciados efectos fitotóxicos.

Bibliografía

1. DOWSON, W. J. Plant diseases due to bacteria. Cambridge at the University Press. 1957. 231 p.
2. DUNCAN, D. B. "Multiple range and 'F' multiple test". *Biometrics*. (2) (1): 1-17. 1955.
3. ELLIOTT, CHARLOTTE. Manual of bacterial plant pathogens. Waltham, Mass. 1951. 186 p.
4. GORLENKO, M. V. Bacterial diseases of plants. II ed. Translated from Russian. Israel Program for Scientific. Translations Jerusalem. 1965. 258 p.
5. HEDGES, FLORENCE. "Experiments on the overwinter in the soil of bacteria causing leaf and pod spots of snap and lima beans". *Phytopathology*. (36): 677-678. 1946.
6. STAPP, C. Bacterial plant pathogens. Oxford Univ. Press. 1961. 292 p.
7. TÉLIZ, O. M. Y W. H. BURKHOLDER. "A strain of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas phaseolicola* and other bacterial plant pathogens". *Phytopathology*. (50): 140-141. 1964.
8. WALKER, J. C. Y P. N. PATEL. "Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo blight of bean". *Phytopathology*. (54): 140-141. 1964.
9. WILLIAMS, G. E. "Bean halo blight control with streptomycin sulphate". *Phytopathology*. (47): 538. (Abstr.) 1957.
10. ZAUMEYER, W. J. Y R. H. THOMAS. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S.D.A. Tech. Bull. No. 868. 1957, 255 p.