

MICROFLORA EN SEMILLAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

José B. Membreño², Mildred Zapata³, James Beaver⁴, Rusty Smith⁵

RESUMEN

Microflora en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Se estudió la microflora bacteriana presente en semillas de frijol y su relación con *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcp*), en 118 genotipos procedentes de VIDAC-98, INTA-Nicaragua, TARS-USDA e Isabela-P.R. Se utilizaron cinco métodos de aislamiento: semilla desinfectada con hipoclorito de sodio, semilla en caldo nutritivo refrigerada por una hora, dispersión de 0,1 ml de suspensión de semillas en medio sólido, siembra líquida de 1 ml de suspensión y semilla en caldo nutritivo, agitado y refrigerado por 24 horas. Se aislaron 104 colonias amarillas de 41 genotipos. Treinta y seis colonias fueron KOH positivo (Gram negativo), 68 negativo (Gram positivo) y 34 hidrolizaron almidón. Las colonias de pigmentación amarilla resultaron no patogénicas bajo condiciones de invernadero. Estas se identificaron con el sistema BIOLOG como: *Pantoea agglomerans* (25), *Xanthomonas campestris* (2), *Enterobacter agglomerans* (2), *Sphingomonas paucimobilis* (2), *Pseudomonas fluorescens* y *Flavimonas oryzihabitans*. En adición, los genotipos portaron colonias con pigmentación distinta a la amarilla. En las pruebas de antagonismo se identificaron colonias con actividad de deoxyribonucleasa y de antibiosis a *Xcp*. De éstas, 15 colonias inhibieron a *Xcp* significativamente. Se identificaron los hongos *Rhizoctonia solani*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus flavus*, *Rhizopus nigricans* y *Macrophomina phaseolina* en un 52,9 % del total de genotipos evaluados.

ABSTRACT

Microflora on bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). The bacterial microflora present and its relationship with *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcp*) were studied in bean seeds, on 118 genotypes coming from VIDAC - 98, INTA - Nicaragua, TARS - USDA and Isabela - P.R. Five isolation methods were used: seed decontaminated with sodium hypochlorite, seed treated with refrigerated nutrient broth for one hour, dispersion of 0.1 ml of suspension of seeds between solid, liquid sowing of 1 ml suspension and seed in nutritious, agitated broth and refrigerated by 24 hours. One hundred and four yellow colonies from 41 genotypes were isolated. Thirty-six colonies were positive KOH (Gram negative), 68 negative (Gram positive) and 34 were starch hydrolyzers. The yellow colonies were non-pathogenic under greenhouse conditions. These were identified with the BIOLOG system as: *Pantoea agglomerans* (25), *Xanthomonas campestris* (2), *Enterobacter agglomerans* (2), *Sphingomonas paucimobilis* (2), *Pseudomonas fluorescens* and *Flavimonas oryzihabitans*. In addition, the genotypes carried colonies with other pigmentations. Antagonistic colonies were identified with deoxyribonuclease activity and antibiosis to *Xcp*. Of these, 15 colonies inhibited *Xcp* significantly. The fungi were identified as: *Rhizoctonia solani*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus flavus*, *Rhizopus nigricans* and *Macrophomina phaseolina* in 52.9% of the total evaluated genotypes.



INTRODUCCION

Dentro del grupo de las leguminosas comestibles, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las más importantes debido a su amplia distribución en los cinco continentes y por ser complemento nutricional

importante en la dieta alimenticia principalmente en Centroamérica, Suramérica y el Caribe (López 1985).

En la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales productoras de frijol, y en especial en América Latina y África, las enfermedades bióticas son frecuen-

¹ Recibido para publicación el 2 de mayo del 2000. Presentado en la XLVI Reunión Anual del PCCMCA, San Juan, Puerto Rico, 2000. Producto del proyecto de Investigación de la Estación Experimental Agrícola Z-88A y de PROFRIJOL sobre el estudio de la variabilidad patogénica de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

² Departamento Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico-Mayagüez.

³ Departamento Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico-Mayagüez. E-mail: plant_zapata@hotmail.com.

⁴ Departamento Agronomía y Suelos, Universidad de Puerto Rico-Mayagüez.

⁵ Estación de Investigación de Agricultura Tropical-Mayagüez.

temente la limitación más importante de la producción (Pastor y Schwartz 1994). Entre las que afectan al cultivo de frijol se encuentra la enfermedad conocida como bacteriosis común causada por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye (*Xcp*) y su variante *fuscans* (*Xcpf*) (Saettler 1989, Beebe y Pastor 1991). Esta enfermedad se considera de gran importancia y es de amplia distribución mundial (Schwartz y Gálvez 1981, Schwartz y Pastor 1989). La reacción del frijol a la enfermedad causada por *Xcp* es afectada por el genotipo del hospedero (Cafati y Saettler 1980), por el método de inoculación (Leyna y Coyne 1985, Aggour 1987), por el aislamiento bacterial (Leyna y Coyne 1985, Zapata *et al.* 1985, Aggour 1987).

Se han encontrado diversos agentes que causan enfermedades en el frijol. Sin embargo, no todos tienen una distribución geográfica, prevalencia o importancia económica iguales. A pesar de la amplia distribución de algunos patógenos del frijol, éstos son más importantes en áreas donde las condiciones ambientales favorecen su supervivencia, multiplicación y diseminación.

La mayor fuente de inóculo primario para las enfermedades son semillas contaminadas interna y externamente (Saettler y Perry 1972). En la semilla el patógeno generalmente se encuentra en la testa pero también puede llegar a los cotiledones (López 1985). Programas de certificación para la producción y pruebas de semillas libres de patógenos son de gran ayuda, pero los brotes de *Xcp* y *Xcpf* persisten porque muchos productores siembran semillas de fuentes que no son consideradas libres del patógeno. El manejo de la enfermedad debe estar enfocado en el uso de semillas limpias del patógeno a través de la producción de semillas bajo un control de calidad.

El propósito de esta investigación fue estudiar la microflora existente en las semillas de frijol, reconocer los microorganismos presentes y el de evaluar la interacción de *Xcp* con microorganismos bacterianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, durante el año 1999. El estudio se desarrolló a nivel de invernadero y laboratorio de bacteriología en las diferentes evaluaciones.

Colección y selección de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

Se utilizaron fuentes diferentes para la obtención de cepas de *Xcp*, semillas de VIDAC-98 (92 líneas), INTA-Nicaragua (17 variedades), TARS-USDA, Puerto Rico (cinco líneas) e Isabela, Puerto Rico (cuatro variedades).

Aislamiento bacterial

Las semillas de 118 genotipos de frijol se examinaron en el laboratorio de bacteriología para detectar el grado de contaminación por bacterias fitopatógenas. Se realizó arreglo factorial con los 118 genotipos como un factor y cuatro métodos de aislamiento como el otro factor. El diseño experimental usado fue el de completamente aleatorizado (DCA) con cinco repeticiones representadas por semillas individuales.

En el método uno (m-1), se colocaron cinco semillas de cada uno de los genotipos, en platos Petri estériles con agar nutritivo. Las semillas fueron desinfectadas externamente, remojándolas por separado en hipoclorito de sodio al 5% y enjuagándolas tres veces con agua destilada estéril. Luego de la desinfección las semillas se colocaron en platos petri con agar nutritivo y se incubaron durante ocho días a 28°C.

Para los métodos dos, tres y cuatro, se preparó caldo nutritivo (N.B) diluido a 1/10 en agua destilada, colocando dos mililitros por ampolla, esterilizando por 15 minutos. Dentro de cada ampolla se colocaron cinco semillas sin desinfectar de cada uno de los 118 genotipos, se dejaron por un lapso de una hora en refrigeración a 4°C, con el propósito de obtener difusión de las bacterias al medio. Se utilizó caldo nutritivo de levadura y dextrosa (Y.D.A) en platos Petri, se agregó cicloheximida (Cyc) al 1% en dosis de 0,1%, para evitar el crecimiento de hongos que pueden estar en las semillas.

Las semillas se retiraron de las ampollas y se sembraron en platos Petri con Y.D.A + Cyc sólido siendo este el método de aislamiento dos (m-2). El método tres (m-3) consistió en obtener suspensión bacterial de N.B, de estas se dispersó 0,1 ml sobre Y.D.A + Cyc. El método cuatro (m-4) fue, de la misma suspensión bacterial y se agregó un mililitro en el fondo del plato Petri, agregando 15 ml de Y.D.A + Cyc líquido. Se incubaron a 28°C por ocho días. Se realizó la toma de datos a los cuatro, seis y ocho días, determinando la formación de colonias sospechosas de ser *Xcp*, otras colonias de bacterias y hongos presentes.

Las colonias de bacterias de colores amarillo translúcido, sospechosas de ser *Xcp*, se purificaron por tres veces en placas con medio de agar nutritivo a 28°C, se les realizó las pruebas de hidrólisis de almidón y la prueba de KOH al 3%. Se caracterizaron las otras colonias de bacterias siguiendo la recomendación de Schaad (1994). La identificación de géneros de hongos presentes en los diferentes genotipos se realizó siguiendo la clave de Barnett y Hunter (1998).

Prueba de patogenicidad

Para confirmar la patogenicidad se realizó un experimento a nivel de invernadero, utilizando las colonias purificadas de pigmentación amarilla y tres cepas de la colección de la Dra. M. Zapata como comparadoras patogénicas (144, 923 y 1044), en cuatro genotipos de *P. vulgaris* indicadores de patogenicidad (Arroyo Loro, E-150 EAP-9508-9 y Colorada del país). Se inocularon las plantas a los 14 días de sembradas en la primera hoja trifoliada, utilizando la punta de una presilla esterilizada y los cultivos de *Xcp* de 24 horas de crecimiento en agar nutritivo. Se usó un diseño completamente aleatorizado con dos variables, 40 cepas de *Xcp* y cuatro genotipos susceptibles con tres repeticiones. Se evaluó la severidad de la bacteriosis común a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación (ddi), utilizando la escala del 1-9 del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Schwartz 1989). Las plantas se desarrollaron bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. La humedad relativa fue mayor del 70 % y las temperaturas de 26-28°C. Se mantuvieron las plantas con un sistema de riego por goteo en el invernadero.

Se utilizó el sistema BIOLOG para la identificación de las bacterias. Se utilizaron en este estudio las colonias que resultaron positivo a la prueba de KOH, evidenciando ser gram negativas y que hidrolizaron el almidón.

Identificación de colonias de bacterias antagonistas

Se realizó una prueba de antagonismo “*in vivo*” en semillas de frijol. Las semillas se agitaron en caldo nutritivo NB 1/10 (25 semillas en 50 ml) por 24 horas a 150 RPM y 24 horas en refrigeración. Se sembraron en NA, realizando observaciones de crecimiento de colonias y efecto antagonistas. Se separaron las colonias que inhibían crecimiento de otras colonias, se purificaron y se realizó una prueba de DNase, para diferenciación de microorganismos por la actividad de oxirribonucleasa.

El diseño del experimento fue de BCA a nivel “*in vitro*”, utilizando 72 colonias de diferentes pigmenta-

ción de aislados de los cuatro métodos y prueba “*in vivo*” y tres cepas patogénicas de *Xcp* (P.R.484-a, Nica-09 y Nica-3) con cuatro repeticiones. Las colonias con 24 horas de crecimiento en medio nutritivo se sembraron en caldo nutritivo NB 1/10 en tubos de espectrofotómetro, a una longitud de onda de 590 nm a 50 % de transmitancia. De las cepas de *Xcp* se mezcló un mililitro de suspensión bacteriana en tubos con NA + dextrosa a 45°C virtiendolo en platos Petri. Se sembró 15 ml de suspensión de las bacterias prueba en los platos Petri con NA+dextrosa sólido en cuatro filtros (discos de papel en blanco de seis milímetros). Se incubaron a 28°C, realizando lecturas del efecto inhibitorio a las 24, 48 y 72 horas. Se evaluó crecimiento de la colonia inhibidora y la distancia de inhibición en milímetros. Las colonias prueba se identificaron en género y especie con sistema computarizado BIOLOG.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 104 colonias de bacterias de pigmentación amarilla, con aspecto mucoso en 41 genotipos. En los genotipos procedentes de TARS-USDA e Isabela P.R. se presentaron 100 % de colonias amarillas, INTA Nic 78 % y VIDAC-98 20% (Figura 1). El m-3 presentó la media más alta con seis colonias amarillas, mientras que m-4, m-2 y m-1 presentaron 5, 2 y 1, respectivamente. Los genotipos evaluados en las diferentes fuentes no mostraron diferencia significativa (Cuadro 1). Para KOH, 36 colonias fueron positivo (Gram negativa) y 68 negativo (Gram positiva) y 34 hidrolizaron almidón. Las colonias amarillas no mostraron virulencia en dos pruebas de patogenicidad realizadas a nivel de invernadero. Las bacterias identificadas fueron: *Pantoea agglomerans* (25), *Xanthomonas campestris* (2), *Enterobacter agglomerans* (2), *Sphingomonas paucimobilis* (2), *Pseudomonas fluorescens*, *Flavimonas oryzihabitans* y tres colonias no identificadas.

Todos los genotipos presentaron crecimiento de otras colonias de diferentes pigmentación. Los métodos

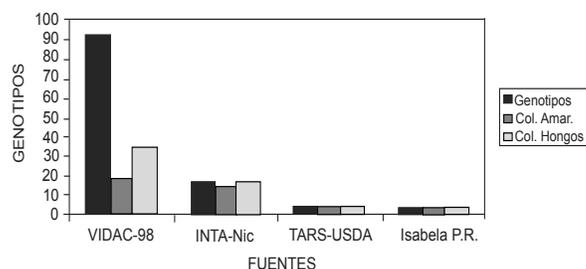


Figura 1. Número de genotipos evaluados en comparación al número de colonias de pigmentación amarilla y colonias de hongos presentes.

Cuadro 1. Promedio de colonias de pigmentación amarilla aisladas de diferentes fuentes de *P. vulgaris* utilizando cuatro métodos.

Métodos	Fuentes				ξ métodos
	VIDAC-98	TARS-USDA	Isabela P.R.	INTA-Nic	
m-1	1,2 b	1,6 b	1,8 b	2,1 c	1,6 b
m-2	1,6 b	2,2 b	3,5 b	2,9 c	2,3 b
m-3	5,1 a	7,2 a	7,0 a	7,4 a	6,3 a
m-4	4,8 a	6,4 a	5,5 a	6,1 b	5,5 a
ξ fuentes	3,2 a	4,4 a	4,4 a	4,6 a	

Promedios seguidos por una o más letras en común no difieren significativamente ($p = 0,05$) según prueba de Tukey.

tres y cuatro presentaron el mayor número de colonias de otras pigmentaciones en comparación a los métodos uno y dos (Cuadro 2). La presencia de un mayor número de colonias obtenidas con los métodos tres y cuatro se explica por que estos métodos requieren una mayor exposición de sustrato bacteriano sobre el medio, mientras que la semilla directa al medio no favorece el aislamiento de muchas bacterias debido a que el área de contacto es limitada.

Estudios epidemiológicos sobre la *Xcp* han mostrado que una semilla de frijol infestada de cada 1000 semillas es suficiente para ocasionar una enfermedad epidémica en el cultivo bajo condiciones de campo (Sutton y Wallen 1970).

Del total de 72 colonias inhibidoras de *Xcp* se mostraron diferencias estadísticas en crecimiento de la colonia y área de inhibición en 45 colonias. En el cuadro 3 se muestran 12 de las colonias que presentaron diferencias en área de inhibición con tres cepas de *Xcp* a nivel "in vitro". Las colonias inhibidoras presentaron crecimientos de 7,6 a 1,0 mm de longitud, en comparación con las colonias que no inhibieron. Las cepas de *Xcp* presentaron diferencias entre sí ($P < 0,05$) para la variable distancia de inhibición, siendo la cepa Nica-03 diferente a las cepas P.R.484-a y Nica-09. *Pseudomonas fluorescens* mostró la mayor área de inhibición para las tres cepas de *Xcp*. Las colonias prueba que presentaron ma-

yor área de inhibición mostraron las menores áreas de crecimiento, evidenciando la capacidad de competencia y de producción de sustancias antibióticas que poseen.

Se identificaron seis géneros de hongos: *Rhizoctonia solani*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus flavus*, *Rhizopus nigricans* y *Macrophomina phaseolina* en un 52,9 % del total de genotipos. El m-1 presentó las mayores colonias de hongos patogénicos sobre los demás métodos, esto se debe al contacto directo de la semilla con el medio y el no uso de ciclohexamida. Las semillas procedentes del VIDAC-98 mostraron 39 % de infección por hongos en comparación a las otras fuentes que presentaron 100 % de infección (Figura 1).

CONCLUSIONES

Existe gran variabilidad de bacterias y hongos en la semilla de frijol. Estas en su mayoría fueron identificados a nivel de género y especie.

El método de aislamiento por dispersión de 0,1 ml de suspensión de semilla en medio sólido presentó el mayor número de colonias de pigmentación amarilla.

Las colonias de pigmentación amarilla no mostraron virulencia en frijol.

Cuadro 2. Promedio de otras colonias de diferente pigmentación aisladas de diferentes fuentes de *P. vulgaris* utilizando cuatro métodos de aislamiento.

Métodos	Fuentes				ξ métodos
	VIDAC-98	TARS-USDA	Isabela P.R.	INTA-Nic.	
m-1	1,6 c	2,4 b	2,5 bc	2,3 b	1,8 c
m-2	3,1 b	3,0 b	2,0 c	3,1 b	3,1 b
m-3	3,8 a	5,8 a	4,5 ab	4,9 a	4,1 a
m-4	3,9 a	5,4 a	5,8 a	5,1 a	4,2 a
ξ fuentes	3,1 a	4,2 a	3,7 a	3,8 a	

Promedios seguidos por una o más letras en común no difieren significativamente ($P = 0,05$) según prueba de Tukey.

Cuadro 3. Reacción de colonias aisladas de semillas de frijol inhibidoras de crecimiento de cepas de *Xcp*.

Identificación	PR484-a		Nica-09		Nica-03	
	Dist.	Crec.	Dist.	Crec.	Dist.	Crec.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11,0 a	1,0 d	10,3 a	1,0 d	9,0 a	1,0 d
No identificadas	5,8 b	1,5 cd	6,8 bc	1,5 cd	5,7 b	1,3 d
<i>Pantoea agglomerans</i>	4,5 bc	1,5 cd	5,3 bc	1,7 bcd	3,1 c	1,4 d
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	3,7 bcd	1,7 cd	4,3 cd	2,0 bcd	2,3 c	1,3 d
Colonias "in vivo"	2,5 bcd	4,4 b	1,2 e	4,0 b	1,4 cd	3,7 ab
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2,5 bcd	1,8 cd	5,3 bc	1,5 cd	3,2 c	1,3 d
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1,0 cd	1,5 cd	7,2 b	2,0 bcd	1,3 cd	1,5 cd
Otras colonias	0,6 d	6,8 a	0,0 e	7,6 a	0,0 d	4,3 a
ξ cepas <i>Xcp</i>	3,0 a	2,5 a	3,4 a	2,5 a	2,2 b	2,3 a

Promedios seguidos por una o más letras en común no difieren significativamente (P= 0,05) según prueba de Tukey.

Leyenda: Dist.: Distancia de área de inhibición, Crec.: Crecimiento de colonia prueba.

Las semillas de INTA-Nic, Isabela P.R. y TARS-USDA presentaron mayor número de colonias amarillas y géneros de hongos.

Se detectaron colonias inhibidoras de *Xcp* de alta capacidad de competencia y con gran potencial biológico.

La diversidad de microorganismos (bacterias y hongos) presentes en las semillas indican la necesidad de proporcionar semillas libres de patógenos y alternativas de desinfección, para la siembras a nivel de campo.

LITERATURA CITADA

- AGGOUR, A. R. 1987. Genetics of and breeding for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Ph.D. Diss., University of Nebraska, USA. 141 p.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi (Fourth edition). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 218 p.
- BEEBE, S. E.; PASTOR, M. A. 1991. Breeding for disease resistance. In: Van Schoonhoven, A.; Voyses, O. eds. Common beans: research for crop improvement. Commonwealth Agricultural Bureau CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 561-610
- CAFATI, C. R.; SAETTLER, A. W. 1980. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Phytopathology* 70(7):638-640.
- LEYNA, H.; COYNE, D. 1985. The effect of inoculation methods, pathogenic variability and inoculum concentrations on reactions and genetics of resistance to isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in leaves and pods of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bean Improvement Cooperative* 28:70-71.
- LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHOONHOVEN, A. V. 1985. Frijol: Investigación y producción. CIAT, Colombia. 417 p.
- PASTOR, M. A.; SCHWARTZ, Y. H. 1994. Problemas de producción del frijol en los trópicos. Segunda Edición. CIAT, Colombia. 734 p.
- SAETTLER, A. W. 1989. Common bacterial blight. In: Schwartz, H.; Pastor, M. eds. Bean production problems in the tropics. 2nd. Ed. CIAT, Colombia. p.261-283.
- SAETTLER, A. W.; PERRY, S. K. 1972. Seed transmitted bacterial diseases in Michigan Navy (pea) beans *Phaseolus vulgaris*. *Plant Dis. Rep.* 56(5): 378-381.
- SCHAAD, N. W. 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2da Ed. APS PRESS, St. Paul, Minnesota, 158 p.
- SCHWARTZ, H. F.; GÁLVEZ, G. E. 1981. Bean production and pest constraints in Latin America. In: H. F. Schwartz and G. E. Gálvez (eds.). Bean production problems in the tropics. CIAT, p. 3-4.
- SCHWARTZ, H. F.; PASTOR, M. A. 1989. Bean production problems in the tropics, 2nd Ed. CIAT, Colombia. 726 p.
- SUTTON, M. D.; WALLEN, V. R. 1970. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *x phaseoli* var *fuscan* on bean in Southwestern Ontario, 1961-1968. *Canadian J. Bot.* 48:1329-1334.
- ZAPATA, M.; FREYTAG, G. F.; WILKINSON, R. 1985. Evaluation for bacterial blight resistance in beans. *Phytopathology* 75(9):1032-1039.