

EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE VARIEDADES DE FRIJOL A LA MANCHA ANGULAR Y OTROS ESTUDIOS FISIOLÓGICOS SOBRE *Isariopsis griseola*

GASPAR A. SILVERA*

La técnica que demostró ser más eficaz para aislar *Isariopsis griseola* consistió en obtener las esporas de coremios muy esporulados, pasarlas a platos Petri con medio nutritivo semilíquido, agitando y aislando las esporas germinadas, a las 24 horas, pasándolas luego a tubos de ensayo. De esta manera, se conseguían fácilmente los cultivos puros, en algunos casos monospóricos, si se lograba transferir esporas aisladas germinadas. Raras veces se obtenían cultivos puros en la primera siembra en los platos Petri.

Para determinar el mejor medio nutritivo se ensayaron varios medios de extractos naturales, estos fueron: agar-raíces de zanahoria (17 gm agar, 200 gm raíces, agar-jugo V-8 (fórmula común), agar-hojas de frijol (12 gm, 300 gm) vainitas de frijol esterilizadas, PDA, PDA con 1% de extracto de hojas de frijol, agar-hojas de remolacha (12 gm, 300 gm), agar-semillas de frijol (12 gm, 150 gm) y agar-hojas de zanahoria (12 gm, 300 gm). En los medios de hojas de frijol, remolacha y zanahoria se agregaba o no un 1% de dextrosa.

Las siembras se hicieron de hojas enfermas colectadas en el invernadero, según la técnica descrita. Las apreciaciones sobre el crecimiento del hongo, en los distintos medios, se hicieron cualitativamente. Se estimaba cuál era el medio en que el hongo crecía mejor, según el diámetro y abundancia de las colonias, además de constatar la rapidez de la esporulación.

Los medios de agar-hojas de frijol y agar-semillas de frijol se estimaron como los mejores. En los otros medios probados el hongo crecía muy lentamente.

Para determinar la concentración más adecuada de estos dos medios, se prepararon ambos en las siguientes concentraciones, con y sin dextrosa y con 1.8% de agar:

1. agar-hojas de frijol:
 - a. 300 gm de hojas por litro.
 - b. 200 gm de hojas por litro.
 - c. 100 gm de hojas por litro.
 - d. 75 gm de hojas por litro.
2. agar-semillas de frijol:
 - a. 150 gm de semillas por litro.
 - b. 75 gm de semilla por litro.

La adición de dextrosa no influyó en una forma determinante en el crecimiento y esporulación. Las mejores concentraciones fueron la de agar-hojas de frijol con 300 gm de hojas y la de agar con 150 gm. de semilla de frijol por litro. En ambos medios se

estimó un crecimiento y esporulación satisfactorios, y más o menos abundante, a los 10 días. Se prefirió usar el medio de agar-hojas de frijol-dextrosa por su color verde amarillento que permitía una mejor observación de las colonias y un aislamiento más fácil.

Una vez encontrado el medio nutritivo satisfactorio, se procedió a la selección de una cepa que demostrara poseer rápido crecimiento y esporulación. Para ello se trabajó con el aislamiento hecho en Turrialba, en plantas cultivadas en el invernadero.

Es oportuno aclarar que en los medios en que se había cultivado anteriormente el *I. griseola*, su crecimiento y esporulación eran escasos o muy lentos. Tampoco se habían efectuado trabajos de selección de cepas esporulantes.

Se siguió la técnica empleada por Calpouzos (1), con *Cercospora musae*, que consistía en hacer cultivos de esporas en platos Petri con el medio líquido, agitando. Al aparecer las colonias se seleccionaban aquellas, o partes de aquellas, que esporularan más rápidamente y que a la vez tuviesen un buen crecimiento, transfiriéndolas nuevamente a platos Petri. En esta forma se hicieron 6 transferencias o "subcultivos" consecutivos, al cabo de los cuales se obtuvo una cepa que crecía abundantemente y esporulaba a los 7 días. A través de los subcultivos se encontraron dos tipos de colonias dominantes; unas cónicas, redondeadas, de superficie convexa, color negruzco, y otras de crecimiento uniforme sobre el medio, no circulares, y que formaban una capa felpuda en la superficie de color más claro, café grisáceo. La cepa obtenida por subcultivo poseía las características del segundo tipo, aunque siempre se formaban una que otra colonia redondeada. El manejo de este tipo de colonia es más fácil y además su crecimiento es mucho más rápido y abundante.

Después de disponer de la cepa y el medio nutritivo adecuado, se empezó la evaluación de la resistencia de las variedades de frijol del Banco de Germoplasma, del Programa de Cultivos Alimenticios del IICA.

Semillas tratadas con Arasán se germinaban previamente en platos Petri con papel húmedo, y se sembraron 4 plantas de cada variedad en macetas de arcilla o bolsas plásticas, en el invernadero. A los 16-18 días de edad, las plantas tenían las primeras hojas trifoliadas bien desarrolladas, procediéndose a la inoculación en el haz y el envés de esas hojas por medio de un atomizador conectado a una bomba portátil de presión-vacío, a 15 libras por pulgada cuadrada. El inóculo consistía en una suspensión de esporas en agua, con una concentración de 70-80,000 esporas/c.c.

* Estudiante graduado, Departamento de Fitotecnia y Suelos, Centro de Enseñanza e Investigación, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Turrialba, Costa Rica.

Para preparar el inóculo, se utilizaron cultivos de la cepa seleccionada en tubos de ensayo con agar-hojas de frijol dextrosa, de unos 12 días de edad. Con una aguja plana se extraía del medio la capa fungosa, que contenía la masa de coremios y esporas. El material obtenido se colocaba en una licuadora pequeña, agregando la cantidad de agua necesaria y poniendo en funcionamiento la licuadora por unos minutos. El líquido espeso resultante se filtraba por una capa de tela de gasa doble, recogiendo el filtrado en un vaso.

Se procuró que la concentración de la suspensión resultante fuese de unas 70-80,000 esporas/c.c., regulando la cantidad de agua y cantidad de cultivo usando un hematocitómetro.

Por lo general, con crecimiento fungoso abundante en 10 tubos y con unos 250 c.c. de agua, se obtenía suficiente inóculo para asperjar unas 175 plantas.

Las plantas inoculadas se llevaban en seguida a la cámara húmeda durante 48 horas, y luego eran trasladadas al invernadero.

Fue necesario efectuar dos lecturas en las plantas inoculadas; la primera a los 7-8 días y la segunda a los 10-11 días. La cepa utilizada demostró poseer una alta patogenicidad, por incitar síntomas severos en un lapso de 7-10 días. Debido a esta alta patogenicidad fue que se decidió efectuar las dos lecturas, con el fin de diferenciar las variedades en base tanto al grado de intensidad de los síntomas como al número de días que éstos tardaban en presentarse.

En la primera lectura, los síntomas foliares no estaban aún bien definidos, las manchas podían ser un poco difusas, aisladas o coalescentes. En las variedades más susceptibles, las manchas eran coalescentes, pudiendo presentar las hojas un ligero encorvamiento. La lectura se hizo separando los síntomas en tres categorías; sin manchas, con manchas aisladas y con manchas coalescentes. En algunos casos se diferenció un tipo de manchas incipientes, visibles como puntos acuosos en el envés de la hoja.

En la segunda lectura se establecieron las siguientes calificaciones:

1.—Altamente resistentes, variedades con hojas sin manchas; 2.—Resistentes, hojas inoculadas de color verde, no arrugadas, con menos de 60 manchas aisladas por hoja; 3.—Susceptibles, hojas con manchas aisladas en su mayoría o con algunas coalescentes, que

no llegaban a cubrir toda la hoja. Las hojas podían estar amarillentas y un poco arrugadas. No había defoliación al momento de la lectura; y 4.—Muy susceptibles, hojas cubiertas de manchas, coalescentes en su mayoría; en muchos casos ya había esporulación abundante. Ocurría defoliación o las hojas estaban muy próximas a caer.

Después de hechas las dos lecturas, se estableció la evaluación final de la resistencia, promediando ambas lecturas. En la primera lectura se consideró que las variedades que presentaban manchas aisladas poseían más resistencia que las que tenían manchas coalescentes, aun cuando esas mismas variedades podían ser clasificadas como muy susceptibles en la segunda lectura. En la evaluación final de la resistencia se clasificó la reacción de las variedades así: altamente resistentes, medianamente resistentes, susceptibles y altamente susceptibles.

En el Cuadro 1 puede apreciarse el juicio que se siguió para efectuar la clasificación al promediar las dos lecturas de los síntomas.

Siguiendo este criterio, se evaluó la resistencia de 530 variedades. La clasificación final de la resistencia de las variedades evaluadas fue la siguiente: 3.9% altamente resistentes (21 variedades); 46.6% medianamente resistentes (247 variedades); 27.5% susceptibles (146 variedades); 14.7% altamente susceptibles (78 variedades) y 7.1% con reacciones mezcladas (38 variedades).

Las variedades altamente resistentes fueron: S-29-N, S-67-N, Mex-56-N, Sal-66-N, Sal-209-N, Sal-219-N, Sal-222-N, Sal-223-N, Sal-224-N, Sal-227-N, 16-Guatemala-2226-B-32-VN, 18-Guatemala-5091, 31-Sal-Es-2873, IAN-9-VN, Mat-2-B, Mat-4-B-1, Jin-14-B, T-2-P, Morado Blanco, S-167-R, 58-R y 103-R. En este grupo de variedades altamente resistentes no hay ninguna que se pueda recomendar para su cultivo comercial en Costa Rica, pero la resistencia al hongo quizás podría incorporarse a variedades recomendables, por medio de cruzamientos.

Estudios fisiológicos realizados

1. Efecto de la temperatura en la formación de coremios. Se tomaron hojas de las variedades Mex-80-R, S-124-B y 50873-R, todas medianamente resistentes, a los 8 días de haber sido inoculadas artificialmente. Estas variedades presentaban manchas aisladas en las que empezaban a formarse los coremios, visibles como puntitos color café claro.

Cada hoja se cortó en 3 ó 4 partes, colocándolas en platos Petri acondicionados como cámaras húmedas. Se pusieron secciones de hojas de las tres variedades en incubadoras a 10, 15, 20, 25 y 30°C, efectuando observaciones posteriores con el microscopio estereoscópico para ver el desarrollo de los coremios. Para

CUADRO 1. CLASIFICACION SEGUN LOS SINTOMAS

	Calificaciones promediadas		Calificación Final
	Primera Lectura	Segunda Lectura	
Sin manchas	Altamente resistentes	Altamente resistentes	Altamente resistentes
Manchas aisladas	Resistentes	Medianamente resistentes	Medianamente resistentes
Manchas aisladas	Susceptibles	Medianamente resistentes	Medianamente resistentes
Manchas aisladas	Muy susceptibles	Susceptibles	Susceptibles
Manchas coalescentes	Susceptibles	Susceptibles	Susceptibles
Manchas coalescentes	Muy susceptibles	Altamente susceptibles	Altamente susceptibles

comprobar la esporulación se extrajeron coremios con una pinza muy fina, observándolos bajo el microscopio.

Puede concluirse que en 24 horas se han formado coremios ya en esporulación, a 15, 20 y 25°C, con un óptimo a 25°C. A 30°C los coremios se forman con conidióforos separados; solo después de 96 horas se han formado esporas adultas, con 3 septas, deformes y muy escasas. A 10°C los coremios formados son compactos; a las 96 horas hay una producción más o menos abundante de esporas adultas.

2. **Producción de esporas.** El objetivo fue determinar el tiempo necesario para la formación de esporas en coremios ya desarrollados.

Se tomaron hojas con manchas aisladas que tenían coremios muy esporulados. Utilizando aire a presión y un pincel suave, se quitaron las esporas de los coremios. Se marcaron con tinta china y 5 manchas por hoja, colocándolas en platos Petri acondicionados como cámaras húmedas y llevando cada hoja a distintas incubadoras a 15, 20, 25 y 30°C.

Para efectuar las lecturas se arrancaron 5-10 coremios de cada hoja con una pinza fina, observándolos bajo el microscopio.

De los resultados obtenidos puede establecerse que las esporas adultas se forman en 24 horas a 15, 20 y 25°C, con un óptimo de 25°C; la producción es muy abundante a las 36 horas a 15, 20 y 25°C, siempre con un óptimo de 25°C. A 30° las esporas formadas son anormales y deformes, desarrollándose sólo una de las tres septas que normalmente tienen las esporas, continuando en ese estado a las 96 horas.

Estos datos permiten adelantar que en condiciones favorables de alta humedad relativa, temperaturas inferiores a 15°C o mayores a 25°C tienden a retardar el desarrollo de la enfermedad.

3. **Efecto de la presencia de agua en la germinación de esporas.** Se trató de comprobar si las esporas

pueden germinar en ausencia de agua en estado líquido, aunque hubiese una alta humedad relativa.

Se preparó una suspensión concentrada de esporas, obtenidas en medio de cultivo. Se colocaron tres portaobjetos en platos Petri acondicionados como cámaras húmedas, en los cuales se depositaron gotas de la suspensión. En un tratamiento se colocó un plato en una incubadora a 20°C. En otro se evaporaron las gotas de la suspensión de esporas con un abanico, poniendo el plato en una cámara herméticamente cerrada que contenía una solución saturada de CaSO₄, con el fin de impedir la condensación, y llevando la cámara a la incubadora a 20°C.

Después de 3 horas se constató que las esporas en la cámara con CaSO₄ no habían germinado, pero que las esporas en la gota de agua habían germinado casi en su totalidad. A las 6 horas aún no había signos de germinación de las esporas en la cámara con CaSO₄, de lo que puede deducirse que las esporas sólo germinan en presencia de agua, aunque haya un 100% de humedad relativa.

4. **Efecto de la aereación en el crecimiento del hongo.** Para determinar si el hongo necesita aereación continua en medio de cultivo se realizó el siguiente experimento: en cuatro tubos de ensayo con tapones de algodón y con agar-hojas de frijol-dextrosa, se sembró el hongo frotando contra la superficie segmentos de un cultivo con muchas conidias. En otros cuatro tubos se sembró también el hongo, pero se sellaron los tapones de algodón con parafina derretida. Después de varios días, se constató que el hongo no crecía en los tubos sellados con parafina, mientras que en los otros el crecimiento era normal. Esto puede atribuirse a la ausencia de circulación del aire en una atmósfera cerrada.

Literatura Citada

1. Calpouzos, L. G. The sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen. Atkins Gardens and Research Laboratories. Cienfuegos, Cuba, 1955. 70 p.

PRODUCCION DE GRANO DE TRES COMPUESTOS DE FRIJOL Y DE LAS GENERACIONES POSTERIORES A SU FORMACION *

FLERIDA HERNANDEZ BONILLA **

Introducción

La poca diversidad genética en un cultivo lo expone a un mayor riesgo por ataque de las enfermedades a las cuales es susceptible. El frijol es una planta autógama y por consiguiente todas las varie-

dades y selecciones de este cultivo pueden considerarse como líneas puras (excepción hecha de las generaciones segregantes derivadas de cruzamientos artificiales, naturales o mutaciones). Alán (1), encontró que en la zona de Alajuela el cruzamiento natural en frijol varía en un ámbito de 0.20 a 0.05% y que éste disminuye conforme las plantas se siembran a menor distancia. Esta homocigocidad ha traído como consecuencia que las plantaciones sean muy atacadas por las enfermedades a las cuales son susceptibles los cultivares usados, habiéndose llegado a perder cosechas enteras (2).

* Parte de los datos presentados en este trabajo son tomados de la tesis de grado de la Srta. Ing. Elsa María Sáenz y el resto de investigaciones realizadas en la Estación Experimental "Fabio Baudrit Moreno" por el Ing. Guillermo Yglesias P. y por la Srta. Ing. Flérida Hernández a partir de junio de 1966.

** Técnico, Estación Experimental "Fabio Baudrit Moreno", Alajuela, Costa Rica.