

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**CONTROL BIOLÓGICO Y ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO
EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) CON *Pseudomonas fluorescens***

ANP15S

DIRECCIÓN ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA

RODOLFO ROBERTO GAONA RAMÍREZ

886281

CHAPINGO, MÉXICO., MARZO DE 1999.



**CONTROL BIOLOGICO Y ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris* L) CON *Pseudomonas fluorescens* ANPI5S**

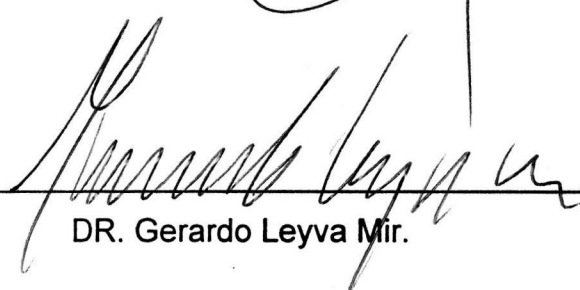
Tesis realizada por Rodolfo Roberto Gaona Ramírez bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

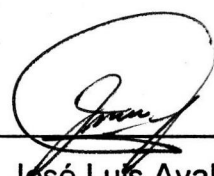
DIRECTOR:


Dra. María Cristina López Fuentes.

ASESOR:


DR. Gerardo Leyva Mir.

ASESOR:

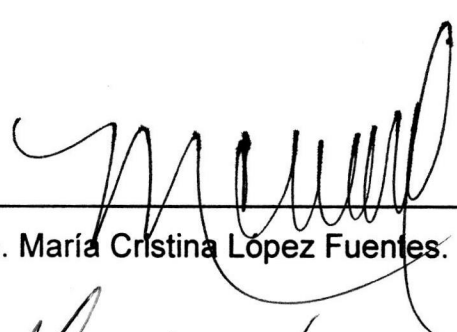

M.C. José Luis Ayala Orduño.

33947

CONTROL BIOLOGICO Y ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris* L) CON *Pseudomonas fluorescens* ANPI5S

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Rodolfo Roberto Gaona Ramírez autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE: _____


Dra. María Cristina López Fuentes.

ASESOR: _____


DR. Gerardo Leyva Mir

ASESOR: _____


M.C. José Luis Ayala Orduño.

DATOS BIOGRÁFICOS

Rodolfo Roberto Gaona Ramírez, nació en Tunja, Boyacá Colombia, el 21 de Diciembre de 1965. Su educación tuvo lugar en el Colegio de Boyacá; obtuvo el título de Bachiller académico en el Colegio Cooperativo "Zoilo Medina López" de Tunja en 1984; se le otorgó el título profesional como Ing. Agrónomo en 1993 por parte de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC). En 1993 comienza a ejercer su profesión en la Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria (U.M.A.T.A.) de Ramiriquí (Boy.), continuando en 1994 en la U.M.A.T.A. de San Eduardo (Boy.). Entre 1994 y 1997 hace parte del Cuerpo Técnico de Investigación de la Fiscalía General de la Nación entidad que lo distinguió con tres ascensos, allí atendió asuntos del fuero común y participó en las tareas pertinentes a delitos ecológicos y asuntos ambientales. En Agosto de 1997 inicia sus estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, México.

AGRADECIMIENTOS

Al selecto grupo de profesores de la Maestría en Protección Vegetal de la UACH por impartir sus valiosos conocimientos.

A la Dra María Cristina López por la dirección del trabajo de investigación.

Al Dr. Gerardo Leyva Mir por sus oportunas recomendaciones en la presente investigación.

Al M.C. José Luis Ayala por su amplia disposición en el beneficio del presente trabajo.

Al Dr. Nahúm Marbám Mendoza por su apoyo en la coordinación de mis estudios.

Al Ing. Agrónomo Horacio K. Osada Velázquez por su decidido y desinteresado apoyo en la fase estadística de esta investigación.

A los Sres. Plinio Acero Bernal, Fernando Neiza Otalora, Antonio Neíza O. Jeronimo Gil O. por su confianza depositada en mí.

A mis colegas Augusto Camara, Victor Tello, Raúl Medrano, Ana María Blanco, Noel Rodriguez, Manuel Deras, Nicolas Callejas, Noel Reyes.

Al Dr. Hector Lagunes M. por su continuo apoyo durante mi estancia en México.

Al instituto Colombiano de Crédito Educativo en el Exterior (ICETEX) por el crédito otorgado para realizar esta maestría.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

Con todo cariño, respeto y admiración a mi madre Dolores Ramírez.

*Con la satisfacción de haber cumplido otra importante meta en la vida
a mis Hermanas Martha, Angela, Cecilia y como ejemplo a mi hermano
menor Guillermo Antonio.*

A mis amigos por su lealtad y confianza.

A tí Eliana.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. El cultivo de frijol en México	4
2.1.2. Origen y domesticación	4
2.1.3. Problemas relevantes al cultivo de frijol	5
2.1.4. Descripción del género <i>Pseudomonas</i>	6
2.2 Tizón de halo del frijol (<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>phaseolicola</i>)	6
2.2.1 Lesiones	7
2.2.2. El control	7
2.3. Tizón común del frijol (<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i>)	8
2.3.1. Distribución geográfica e importancia del tizón común	8
2.3.2. Descripción de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i>	10
2.3.3. Severidad del tizón común	10
2.3.4. Epidemiología de <i>X. Campestris</i> pv <i>phaseoli</i>	11
2.3.5. Sintomatología del tizón común	11
2.3.6 Control del tizón común	12
2.4. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	12
2.4.1. Antecedentes	12
2.4.2. Características	13
2.4.3. Importancia	13
2.5. Los sideróforos	13
3. MATERIALES Y METODOS	26

3.1. Materiales	26
3.1.1-Lugar del experimento	26
3.1.2. Material biológico	26
3.1.2.1. Vegetal	26
3.1.2.2. Microorganismos	27
3.1.3. Material de laboratorio e invernadero	27
3.1.3.1. Medios de cultivo	27
3.1.4. Otros materiales	28
3.2. Métodos	28
3.2.1. Diseño experimental	28
3.2.2. Variables de respuesta para el diseño 1	29
3.2.3. Variables de respuesta para el diseño 2	30
3.2.3.1 Evaluación de la severidad	30
3.2.4. Cultivo de plántulas	30
3.2.5. Suspensiones e inoculaciones	31
3.2.6. Análisis de la información	32
4. Resultados y discusión	33
4.1. Estimulación del crecimiento del frijol con <i>Pseudomonas fluorescens</i> ANP15S	33
4.1.1. Análisis Diseño experimental 1. Longitud radicular	33
4.1.2. Análisis Diseño experimental 1. Peso fresco radicular	34
4.1.3. Análisis Diseño experimental 1. Peso seco radicular	35
4.1.4. Análisis Diseño experimental 1. Longitud a la base de los cotiledones	36
4.1.5. Análisis Diseño experimental 1. Longitud al ápice	37
4.2. Control Biológico – Diseño 2	38
4.2.1. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad	38
4.2.1.1. Efecto de <i>P.fluorescens</i> ANP15S frente a <i>P. syringae</i> y a <i>X. campestris</i> pv <i>phaseoli</i> en primeras hojas trifoliadas	39
4.2.2. Curva de progreso de las enfermedades	40
5. CONCLUSIONES	46
6. BIBLIOGRAFÍA	47
7. APÉNDICE	55

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁG
1.Reacción de algunas variedades de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cultivadas en el altiplano de México, inoculadas con una cepa de <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	9
2. Diseño de experimentos	29
3. Análisis de varianza para la longitud radicular del frijol	33
4. Análisis de varianza, peso fresco radicular	34
5. Análisis de varianza, peso seco radicular	35
6.Análisis de varianza longitud a la base de los cotiledones	36
7. Análisis de varianza, longitud al ápice	37
8 Comparación de medias de ABCPE de los tratamientos 1,2,5,6	39
9. Comparación de medias ABCPE Tratamientos 3,4,7,8	40
10.Modelos epidemiológicos que se ajustaron a las curvas de progreso.	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
1. Comparación de medias, longitud radicular	34
2. Comparación de medias, peso fresco radicular	35
3. Comparación de medias peso seco radicular	36
4. Comparación de medias longitud a la base de los cotiledones	37
5. Comparación de medias de la longitud al ápice	38
6. Curva del progreso de la enfermedad <i>P.s. pv. phaseolicola</i> (T2)	43
7. Curva del progreso de la enfermedad <i>P.s. pv. phaseolicola</i> (T4)	43
8. Curva del progreso de la enfermedad <i>X. c. pv. phaseoli</i> (T5)	44
9. Curva del progreso de la enfermedad <i>X. c. pv. phaseoli</i> (T6)	44
10 Curva del progreso de la enfermedad <i>P.fl.+ X.c. pv. phaseoli</i> (T7)	45
11. Curva del progreso de la enfermedad <i>X. c. pv. phaseoli</i> (T8)	45

RESUMEN

Para probar si *Pseudomonas fluorescens* ANP15S, ejerce control biológico sobre las bacterias fitopatógenas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (tizón de halo), *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (tizón común), y si hay estimulación del crecimiento en las plántulas, se desarrolló la presente investigación en laboratorio e invernadero. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, donde la unidad experimental fue una planta de frijol por maceta; la variedad utilizada fue Negro 8025 y las cepas bacterianas ya mencionadas, a concentraciones de 3×10^7 cel/ml para todos los casos; además, las variables utilizadas fueron longitud hipocotiledonar y epicotiledonar, peso radicular y porcentaje de severidad. El tratamiento de semilla con *Pseudomonas fluorescens* ANP15S mostró ventajas estadísticamente significativas ($\alpha = 0.05$) en la estimulación del crecimiento y mejor efecto protector contra el ataque de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* que para *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*. La protección de semillas de frijol por bacterización podría ser una alternativa para el control biológico microbial.

Palabras clave: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*, estimulación, control biológico, frijol.

ABSTRACT

An investigation in greenhouse and laboratory conditions was carried out to test the performance of *Pseudomonas fluorescens* ANP15S as biological control agent against the bean bacterial *P. syringae* pv. *phaseolicola* (halo blight) and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (common blight), and to test the hypothesis that *P. fluorescens* ANP15S also stimulates the growth of bean seedlings. A completely randomized experimental design was used, the experimental unit consisted of one bean plant per pot with ten replicates. In all cases, the plants were inoculated with a bacterial suspension of 3×10^7 cells/ml. Evaluated variables were hypocotyl and epicotyl length, root weight of bean plants, as well as disease severity. Seed treatment reduced infection of bean with *P. syringae* pv. *phaseolicola* but not so with *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ($\alpha = 0.05$). Bean seed protection with *P. fluorescens* ANP 15S might be an alternative biocontrol agent of bean pathogenic bacteria.

Key Words: *Pseudomonas fluorescens* , *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, stimulates, biological control, bean.

1. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para México es de gran importancia por ser éste país uno de sus centros de origen, por formar parte de la dieta básica de millones de personas y por la actividad económica generada. Algunos de sus problemas fitosanitarios son las enfermedades causadas por las bacterias *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (tizón de halo) y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (tizón común) entre otras, por lo que las semillas y plantas son tratadas en ocasiones con productos químicos. Sin embargo existen rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (RPCP) las cuales se encuentran naturalmente en el suelo, que podrían ser una alternativa para estimular el crecimiento natural y para impedir el ataque a este cultivo por algunas bacterias; mediante la colonización de semillas en el proceso de la bacterización. Este método no solamente protege semillas de numerosos cultivos, sino también estimula el crecimiento de la planta.

En esos últimos años se tiene conocimiento de que el medio microbiológico de las semillas en particular ha sido poco estudiado, y por otra parte se ha

demostrado que las semillas pueden ser colonizadas por numerosos microorganismos que ejercen en estas una presión de tipo nutritivo. También los efectos dañinos de ciertas bacterias u hongos del suelo ya se ha demostrado que las semillas pueden ser colonizados por numerosos microorganismos que ejercen en éstas una presión de tipo nutritivo. También los efectos dañinos de ciertas bacterias u hongos del suelo ya se ha demostrado que causan una presión parasitaria, con efectos en pérdidas irreversibles.

La bacterización tiene por objetivo prevenir y reparar los accidentes naturales en una semilla con una población bacteriana benéfica; las bacterias más utilizadas para este fin son *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*, encontradas en la rizósfera y en el rizoplaneo. Ciertas cepas de *Pseudomonas* han mostrado tener un efecto estimulante en el crecimiento de las plantas y de proteger a la vez el sistema radicular contra el ataque de patógenos.

Las RPCP pueden intervenir en todos los estados de germinación, gracias al fenómeno de la antibiosis, además su multiplicación rápida le permite colonizar nichos ecológicos; presentándose así dichas bacterias en un ambiente estratégico donde hay competencia con patógenos agresores y por lo tanto hay

producción de moléculas protectoras como la pseudobactina o pioverdina entre otras. Los objetivos que se persiguen en la presente investigación, son los siguientes.

1. Demostrar el efecto de *Pseudomonas fluorens* ANP15S para evitar la contaminación por bacterias como *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* en plántulas de frijol.
2. Determinar cuantos *Pseudomonas fluorens* ANP15S estimula el crecimiento de plantulas de frijol.

La hipótesis que se plantea es la siguiente: La bacterización de semillas de frijol con el uso de *Pseudomonas fluorens* ANP15S podría evitar la contaminación por bacterias fitopatógenas como *P. syringae* pv *phaseolicola* y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*, y estimular el crecimiento de las plantas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo de frijol en México

Para el año de 1997 se produjeron alrededor de 965.055 ton de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), en una superficie de 1 615,000 ha (Anónimo, 1998), con un rendimiento promedio de 600 kg/ha. Esta leguminosa constituye una de las principales fuentes de nutrientes básicos para las familias mexicanas.

2.1.2 Origen y domesticación

Según Van y Voisest (1991), a finales del siglo XIX los científicos reconocieron como centro de origen del frijol común al nuevo mundo; lo anterior fue basado en observaciones de restos arqueológicos del Perú y del sudoeste de los Estados Unidos. Contrario a lo sugerido por otros científicos como Lineo quien afirmaba que *P. vulgaris* era originario de la India.

Hay tres aspectos de las poblaciones de frijol silvestre sobre los cuales se discuten los procesos de domesticación: características morfológicas de formas silvestres, distribución geográfica de las formas silvestres y las relaciones genéticas entre los cultivares y las formas silvestres (Van y Voisest, 1991). En

México, en el Estado de Chihuahua se desarrollan en altitudes oscilantes entre 500 y 2000 m.s.n.m., con lluvias anuales entre 500 y 1800 mm. En el Códice Mendocino son señalados los tributos que los pueblos sometidos debían entregar al emperador azteca Moctezuma Xocoyotzin II; se estima que recibía, aproximadamente 5000 ton de frijol cada año, además de otros productos agrícolas (Van y Voysest, 1991).

2.1.3. Problemas relevantes al cultivo del frijol

El frijol se cultiva desde los 50 hasta los 2600 m.s.n.m. y desde los 16° a los 30° de latitud norte, en distintos nichos ecológicos, por lo que la producción tiene limitantes de carácter variado (Acosta, 1994). La mayor limitante es la sequía sobretudo en la región semiárida del altiplano en donde se cultiva el 65% de la superficie sembrada a nivel nacional, así mismo se incrementa con los suelos pobres en materia orgánica y nutrientes. En otras regiones como Veracruz y Chiapas los problemas que limitan el rendimiento del frijol son las enfermedades como la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), la roya (*Uromyces appendiculatus* var *appendiculatus*, el tizón común (*Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*), el tizón de halo (*Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*), las virosis (mosaico común y dorado) , y las pudriciones de raíz (*Fusarium* sp, *Rhizoctonia* sp , *Pythium* sp.) (Rosales, 1998 comunicación personal).

Otros problemas que afectan al cultivo del frijol son las plagas y maleza (Bautista *et al*, 1992; Campos, 1987), el uso inadecuado de fertilizantes, insecticidas, la baja densidad de plantas por unidad de superficie. Entre los problemas de índole socioeconómico están: precio de sustentación muy bajo y falta de créditos oportunos).

2.1.4. Descripción del genero *Pseudomonas*

Bastones rectos o curvos, Gram negativos, con dimensiones 0.5 a 1 X 1.5 a 4 µm. Se desplazan por medio de uno a muchos flagelos polares. Muchas especies son habitantes comunes del suelo, o ambientes marinos y de agua dulce. La mayoría de las especies patógenas de este genero infectan a las plantas y solo algunas de ellas a los animales y al hombre. Algunas especies fitopatógenas como *Pseudomonas syringae* se les denominan fluorescentes debido a que al crecer en un medio nutritivo, con bajo contenido de hierro, producen pigmentos fluorescentes de color verde-amarillo con capacidad de difundirse (Agrios, 1996). Serotipos flagelares se han descrito tales como H1 y H2, donde el serotipo H1 fue dominante en 8 cepas de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Guillorit-Rondeau *et al*, 1996).

2.2. Tizón del halo del frijol (*Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*)

Descubierto por primera vez en Estados Unidos en 1962 (López, 1994)

2.2.1 Lesiones

La enfermedad puede ser observada a lo largo del desarrollo de la planta de frijol, la infección se presenta en hojas, tallos, vainas y semillas. Las semillas contaminadas externa o internamente germinan, con desarrollo de lesiones en cotiledones y hojas primarias. Las lesiones redondas, irregulares y exudados se forman en cotiledones amarillentos y manchas café rojizo rodeadas por un halo amarillento desde las primeras hojas, las plantas severamente infectadas en esta etapa no crecen y mueren.

Los síntomas en vainas son de color verde oscuro a café rojizo redondos como semejando manchas con una pequeña depresión en el centro, las semillas infectadas presentan síntomas de arrugamiento en su testa (Bewley y Black, 1994). Esta enfermedad es típica de plántulas y el inóculo primario se obtiene por medio de la semilla (López, 1994).

2.2.2 El control

El control se puede realizar con los siguientes métodos:

Utilizar semilla sana, desinfección de semilla en hipoclorito de sodio, manejo adecuado de residuos de cosecha, aspersiones de Kasugamicina o compuestos a base de cobre sobre las plantas.

2.3. Tizón común del frijol (*Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*).

El primer registro del tizón común en México data de los años cuarenta, época en que la enfermedad se presentó en la mayoría de las variedades de frijol Canario, sembradas en el Campo Experimental de Pabellón, Aguascalientes (Anónimo, 1946). Por la importancia que fue adquiriendo la enfermedad en el altiplano Crispin *et al.* (1976) seleccionaron variedades con resistencia a la enfermedad, mediante inoculaciones de la bacteria en plantas cultivadas en invernadero y en campo. Con relación a la variación patogénica se tienen algunos de los casos en donde se realizaron inoculaciones y se estableció la reacción (Cuadro 1).

2.3.1. Distribución geográfica e importancia del tizón común.

El tizón común del frijol es inducido por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, el cual se encuentra distribuido en regiones de los estados de Puebla, Tabasco, Hidalgo, México, Veracruz, Chiapas, Tlaxcala, Nayarit, Querétaro, Sinaloa, Michoacán, Oaxaca, Guerrero, Morelos, San Luis Potosí, Colima, Tamaulipas y Nuevo León (Navarrete, 1996). La temperatura y humedad desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad, la bacteria puede sobrevivir en el campo en los residuos de cosechas, y en el suelo durante el invierno; se ha estimado que la semilla infectada puede causar daños cuantiosos, ya que un 0.2% de las mismas puede ocasionar una epifitía, la bacteria puede ser diseminada rápidamente por medio del agua de riego o

de lluvia; *X. campestris* pv *phaseoli* produce un polisacárido extracelular en medio de cultivo y en el hospedante, por lo que logra sobrevivir a periodos prolongados (López, 1994).

Cuadro 1. Reacción de algunas variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), cultivadas en el altiplano de México, inoculadas, con una cepa de *X. campestris* pv *phaseoli*.

Variedad	Severidad	Reacción
Negro Queretaro ^c	8.0	S
Flor de Junio ^c	6.5	S
Bayo Mecentral ^c	5.7	I
Michoacán ^c	5.3	I
V-8025 ^M	5.3	I
Apaseo 67 ^M	5.2	I
Michoacán 91 ^c	5.2	I
Flor de Mayo guía ^c	5.0	I
Negro perla ^M	4.7	I
Bayo 107 ^M	4.3	I
Flor de Mayo Grande ^c	3.8	I
Jalisco 40A ^c	2.5	R

DMS(0.05)=1.813

C= criolla, M= mejorada, R=resistente, I=intermedia, S=susceptible. Inoculadas por corte de navajas (Adaptado de Navarrete, 1996).

2.3.2. Descripción de *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*.

Es una bacteria Gram negativa, que mide 0.4-0.7 micras de diámetro por 0.6-2.6 micras de largo, es móvil con un solo flagelo polar y aeróbica. En el medio de cultivo las colonias son convexas, de color amarillo brillante y producen un ácido como producto metabólico con varios azúcares; tienen actividad lipolítica e hidrolizan gelatina, caseína y almidón (Anónimo, 1992; Schaad, 1994).

Audy *et al.* (1994) han establecido un mapa de restricción para un fragmento Pz de plásmido de ADN de 3.4 kb de *X. Campestris* pv *phaseoli*, los fragmentos seleccionados fueron subclonados y se determinaron las secuencias parciales de los fragmentos del nucleótido para fracciones de iniciadores ricos en Guanina + Citosina compatibles, ésto para la detección por reacción en cadena de la polimerasa de la bacteria del tizón común del frijol.

2.3.3. Severidad del tizón común

En trabajos realizados a nivel de campo, se determinaron para los años 1990, severidad del 20% y para 1991 del 15%; el área bajo la curva de la intensidad del tizón común no fue afectada por las variedades y fuentes de nitrógeno, puesto que ambos factores fueron bastante homogéneos en la tasa de incremento de la severidad a través del tiempo, principalmente en las etapas fenológicas finales del frijol y probablemente debido a la pérdida del follaje por senescencia foliar más que por una disminución de la severidad

(Pedroza,1993). Pedroza y Alvarado (1995) mencionan que la cantidad de tizón común (ABCPE=1459% días) fue mayor en las dosis medias y altas de fósforo (45 y 90 kg/ha) y una tasa relativa de incremento máxima ($r=0.012$ unidades/día), en la variedad de frijol Pinto Jamaica.

2.3.4. Epidemiología de *X. campestris* pv. *phaseoli*

Xanthomonas campestris pv *phaseoli* es considerado un patógeno de condiciones subtropicales, su desarrollo es favorecido por temperaturas de 16°C a 26°C y por humedad relativa mayor del 80%. Cuando se conjugan estas condiciones ambientales en presencia de hospedantes susceptibles, ocurren epidemias de tizón común. En México, la dispersión primaria de *X. campestris* pv *phaseoli* se incrementa porque la mayoría de los productores utiliza como semilla el grano que producen, o bien, porque después de una mala cosecha adquieren grano para usarlo como semilla para la siembra, máxime si la regulación de intercambio entre regiones no se realiza (Navarrete,1996).

2.3.5. Sintomatología del tizón común

Los síntomas de tizón común se manifiestan primero en hojas en forma de manchas translúcidas de aspecto acuoso, esas manchas tienen su origen en la invasión de los estomas las cuales no sobrepasan 1 mm de diámetro, pasando de clorosis hasta necrosis, la cual generalmente se inicia en el borde de las hojas y puede invadir gran parte de las mismas. En vainas se observan pequeñas manchas de color pardusco o rojizo que a menudo se unen cuando

éstas se encuentran verdes. En los tallos, así como en los peciolos foliares, se observan motas o rayas de aspecto acuoso, al avanzar la enfermedad a veces produce tumoraciones en el tallo. No es frecuente el daño en vainas y tallos. En la semilla se presenta arrugamiento a diferentes grados y su coloración depende de la extensión de la infección (Kiraly *et al*, 1974; López, 1994, Agrios 1996).

2.3.6. Control del tizón común

Según López (1994), el uso de variedades resistentes, densidades óptimas de siembra, la eliminación de residuos de cosecha, la rotación de cultivos por tres años o más, producción de semilla en épocas o áreas libres de enfermedad, uso de agroquímicos, y su integración reducen la presencia de tizón común.

2.4. *Pseudomonas fluorescens*

2.4.1. Antecedentes

En cuanto al efecto protector, inducido por *Pseudomonas fluorescens*, Kiraly *et al*. (1974) hacen referencia a la inhibición viral en células vivas y muertas de *Pseudomonas tabaci*. Dentro de las especies de bacterias saprófitas asociadas en plantas se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, y *P. aeruginosa*, principalmente; el medio clásico de separación de las dos primeras ha sido el de tetralosa y la licuefacción de gelatina (positivo para *P. fluorescens*

y negativo para *P. putida*), aunque luego se han caracterizado por biovars (Schaad 1994).

2.4.2. Características

Bacilos Gram negativos producen un pigmento denominado fluorescina detectado por el medio de B de King e iluminado con luz ultravioleta, pigmento soluble en agua; en agar, a 37 °C no crece, produce una reacción alcalina en leche, y ácido a partir de glucosa, los nitratos se reducen a nitritos y amonio pero se produce indol; la licuefacción de la gelatina infundibuliforme, el tiempo de generación dependiendo de la temperatura y el medio puede ser de 35 min. (Howell y Stipanovic, 1979 ; Alexander, 1994; López, 1994).

2.4.3. Importancia

Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* son habitantes naturales del suelo y las raíces , promueven la germinación y el crecimiento de las plantas, es el caso del maíz donde hubo incremento significativo en la germinación ante el trauma de daño por heladas (Hofte, 1991).

2.5. Los sideróforos

Se les considera como moléculas portadoras de hierro de bajo peso molecular y son propios de organismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos (Neilands,

1982). Uno de los sideróforos más conocidos y estudiados es la pseudobactina, a cuya estructura se le considera como un hexapéptido lineal, L-lys-D-threo-B-OH-Asp-L-Ala-O-allo-Thr-L- ala-D- N⁶-OH-Orn en el cual N⁶-OH de ornitina, es cíclico con el grupo carboxilo C terminal y el grupo amino N de la lisina ligada a una quinoleína derivada fluorescente. En la estructura del cristal de pseudobactina férrica está formada confusamente, consta de una unidad asimétrica que contiene 26 moléculas de agua; la fórmula general de la pseudobactina (C₄₂H₅₇N₁₂O₁₆Fe-13H₂O), de aquí se establecen las estrategias útiles para la promoción del vegetal y/o las del control de microorganismos fitopatógenos, esto conlleva la inoculación de suelos con RPCP como *Pseudomonas* B10 o la aplicación de sideróforos como la pseudobactina al suelo (Teintze *et al.*, 1981b).

A bacterias como *Pseudomonas* B10 fue posible determinarles la estructura del sideróforo pseudobactina A, por medio de la resonancia magnética nuclear RMN, asimismo se detectó pseudobactina en la peptona proteasa N°3 contenida en el medio. La producción de sideróforos comienza típicamente justo antes de entrar las células en la fase estacionaria y continua luego de haber alcanzado dicha fase. La única diferencia entre pseudobactina y pseudobactina A es que en esta última se saturaron los carbonos tres y cuatro de la quinolina derivada, mientras que en la pseudobactina es insaturada en esas posiciones (Teintze y Leong, 1981a). Los sideróforos aparte de su alta afinidad pueden actuar como factores en la germinación y el crecimiento y en algunos casos como potentes antibióticos. Los primeros compuestos fueron

obtenidos a partir de aislamientos del hongo *Ustilago sphaerogena* y mostraron estimular el crecimiento de microorganismos que requerían quelatos de hierro. Hacia 1950, se descubrió que el ferricromo y otros compuestos de hierro en cultivos de organismos con bajo contenido de este elemento (Neilands, 1981).

El hierro se considera que está involucrado en algunos estados críticos en el metabolismo, y los microbios tienen múltiples sistemas de adquirirlos; el sistema de alta afinidad está comprendido por los sideróforos y los receptores combinados asociados con la membrana. Los sideróforos en las especies de *Pseudomonas* son piocelina, pioverdina, pseudobactina y ferribactina, conforman complejos octaedrales en los cuales el hierro metálico d^5 está coordinado y es de rápido intercambio. El agrobactin fue aislado de la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens* (Neilands, 1981).

Con inoculaciones de *P. fluorescens-putida* hechas a las semillas de papa, remolacha y rábano se han obtenido incrementos significativos en la producción, hasta de un 144% en pruebas de campo (Kloepper *et al.*, 1980 b). En experimentos de laboratorio se comprobó la antibiosis de las cepas A1, BK1, TL3B1, B10 aisladas del peridermo de las raíces de papa, contra *Erwinia carotovora* bacteria que ocasiona pudrición y alteración de la semilla, además en el medio de cultivo B de King, se comprobó que había antibiosis contra *Escherichia coli* K-12AN193 la cual no produce el sideróforo enterobactina, esto sugiere por lo tanto que en las condiciones de deficiencia de hierro las R.P.C.P. produjeron los sideróforos fluorescentes (Kloepper *et al.*, 1980a). A nivel de

laboratorio, Gielser (1994) indica que se detectaron especies de *Pseudomonas* fluorescentes como potenciales antagonistas microbiales de *Rhizoctonia solani* causante de la mancha castaña , donde mostraron alto nivel de antagonismo.

La colonización de raíces por *Pseudomonas* fluorescentes, según Zdor y Anderson (1992), se ha correlacionado con el control de enfermedades para el caso de frijol *Phaseolus vulgaris*, en donde se observó la alteración de las respuestas de defensa una vez inoculado. Los efectos sistémicos de inoculación radical con *Pseudomonas putida* aislamiento Corvallis, *P. tolaasii* (P9A) y *P. aerofaciens* REW1-I-1, se observaron en hojas de frijol de 14 días de edad. El gel de poliacrilamida SDS de la electroforesis demostró que los niveles de ciertas proteínas solubles en ácido incrementaron los extractos en las hojas de las plantas inoculadas con REW1-I-1, pero no en P9a ni en *P. putida* indujeron síntomas de una respuesta hipersensitiva en hojas de tabaco, cotiledones de frijol. Fenoles y fitoalexinas se acumularon en los cotiledones expuestos a REW1-I-1 por 24 horas, pero ocurrieron cambios pequeños en los niveles de esos compuestos, aunque en las raíces de las plantas de 14 días, los niveles de esos dos compuestos no fueron altos.

Corbell *et al.* (1994) argumentaron la relación del gene *apd* mutante para la producción de antibiótico a partir de la cepa PF-5 de *Pseudomonas fluorescens* colonizadoras de raíces de plantas, pleiotrópicamente suprime la producción de un conjunto de metabolitos secundarios extracelulares incluyendo pyoluteorina, pirrolnitrina, 2-4 diacetylphoroglucinol, triptofano, componentes del cambio

oxidativo, HCN y proteasa del producto del gene *apd* contiene secuencias de la histidina y la proteoquinasa y el regulador de respuesta de los sistemas regulatorios de dos componentes. Sorprendente similitud fue establecida entre el nucleótido y la secuencia de amino ácidos pronosticada de *apd* y *lemA* un gene requerido para la patogenicidad *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. En otro trabajo el cósmido *Psp01* clonado de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* 3121 confirió un fenotipo paterno de avirulencia única en soja cuando fue expresado en *P. syringae* pv *glycinea* R4. *Psp01* mostró contener un alelo *avrD*, también como un segundo gene de avirulencia; el nuevo gene llamado *avr Pph C* es altamente homólogo y fenotípicamente idéntico a *avrC* previamente clonado en *P. syringae* *glycinea* raza cero. Los genes *avrD* se presentan ampliamente distribuidos entre los diferentes patovares de *P. syringae*, aunque previamente se han observado en *X. campestris*, este caso es el primer acontecimiento notado de genes de avirulencia múltiple en un plasmido único en *P. syringae* (Yucel et al, 1994).

La especificidad de algunos bacteriófagos, según Abdullah (1994), indica que de algunas cepas de *Pseudomonas solanacearum* pueden ser utilizadas para la diferenciación de algunos biovares de dicha bacteria en cultivos como papa y tomate; aunque todos esos fagos no pueden infectar otras especies de *Pseudomonas* probadas como es el caso de las aisladas del suelo *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*. A partir de *Erwinia herbicola* que se aisló de peral, en Israel, se produjeron sustancias *in vitro* que inhibieron el crecimiento de otras bacterias y hongos fitopatógenos. La aplicación de

suspensiones bacterianas suprimió el tizón temprano causado por *Alternaria solani* en el follaje de tomate; dicho experimento se tomó como de potencial biológico (Sujkowski *et al.*, 1994).

Por otra parte, los tratamientos de semilla de pepino con varias cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, suprimieron la antracnosis causada por *Colletotrichum orbiculare*, con base en esto se concluyó que hubo inducción de resistencia sistémica. Wei *et al.* (1991) confirmaron los estudios realizados por Van Peer *et al.* (1991), donde el control biológico de la marchitez por *Fusarium* en clavel por una cepa de *Pseudomonas* spp (RPCP) indujo resistencia, porque el patógeno fue espacialmente separado (inoculado el tallo) a partir de la colonización radicular de las RPCP. Además, Défago *et al.* (1990) señalan los mecanismos por los cuales las cepas CHAO de *P. fluorescens* proveen control biológico contra *Thielaviopsis basicola* en tabaco; mediante análisis mutacional y de complementación, lograron demostrar que la producción de HCN por la cepa CHAO explica por que ocurre el 60% de la actividad de control biológico y la proliferación de raíces.

Se reconocen dos tipos de control: el natural está asociado con características químicas y físicas que afectan la microbiología del suelo; y el inducido que es independiente del tipo de suelos y sí depende de las prácticas culturales en los cultivos. Las actividades antagonistas de *Pseudomonas* sp. pueden verse afectadas si el pH es alterado, la directa aplicación de microorganismos a la

semilla u otras partes de la planta les da una ventaja competitiva sobre los patógenos, los cuales deben competir para los mismos lugares y nutrientes necesarios para la infección, los microorganismos tienden a conservar la posesión de sus nichos cuando son confrontados por otros microorganismos agresivos (Milton *et al.*, 1982).

Tratamientos hechos a las semillas de remolacha azucarera con varias cepas de *Pseudomonas* spp dieron como resultado incrementos de 4 a 8 ton/ha en seis de ocho pruebas, con incrementos en azúcar con rangos de 955 a 1227 kg/ha (Milton *et al*, 1982).

2.5.1. Antagonismo

La hipótesis favorita sobre cómo la rizobacteria promueve el crecimiento de las plantas es que la colonización agresiva del sistema radicular resulta en un desplazamiento o exclusión de componentes deletéreos de la microflora cerca de las raíces. Una hipótesis alterna involucra la producción de sustancias promotoras del crecimiento, semejantes a las auxinas (Schroth *et al*, 1982).

Schroth y Hancock (1982) recaban que las *Pseudomonas* fluorescentes producen un rango de metabolitos secundarios, muchos de los cuales exhiben actividad antibiótica o fitotóxica. Los antibióticos pueden ser semejantes a la pirrolnitrina y fenazina de la clase heterocíclica que contienen nitrógeno. También producen un número de aminoácidos y péptidos, muchos de esos

metabolitos pueden actuar en la construcción de sideróforos (agentes transportadores del ión hierro III de alta afinidad), cuya acción puede ser la de inhibición de ciertos patógenos de las raíces de las plantas.

Las cepas de *Pseudomonas* sp fluorescentes aplicadas a las semillas de trigo suprimieron el mal de pie, bajo condiciones de campo e invernadero; en invierno y primavera, dichas cepas originalmente fueron aisladas de trigo en suelos naturalmente supresivos, con base en la selección antibiótica *in vitro* frente a *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* aislamiento 2-79, solos o con aislamientos 13-79, hubo control en cinco de seis campos probados con suelo infestado, y una alta producción, superior al 147% y menos enfermedad. La población de bacterias introducidas excedía de 10^6 colonias de cepa por unidad por 0.1 g de tejido radicular, tres semanas luego de la siembra. Además, *Pseudomonas fluorescens* Migula, aplicadas a semillas de algodón, controlaron ahogamiento de plántulas, ocasionado por *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum*.

Los micoparásitos aislados de *Trichoderma hamatum* han mostrado ser considerablemente promisorios para el control biológico de *Pythium* y *Rhizoctonia solani* en semillas y raíces de chícharos (Hubbard *et al.*, 1983). Se demostró que la colonización de semilla por *Pseudomonas* es ampliamente responsable para la deficiencia de *T. hamatum* como un protectante de semilla en los suelos de Nueva York, la adición de oxalato ferroso a esos suelos permite a *T. hamatum* proteger las semillas (Hubbard *et al.*, 1983).

Las plantas de frijol en desarrollo, con limitación de hierro desarrollan clorosis foliar, bajo esas condiciones los cambios también se presentan en las raíces, a menos Fe las plantas dicotiledoneas semejan una acumulación de ácidos; (Bienfait *et al*, 1983), quienes propusieron que los quelatos férricos son reducidos por un sistema de reducción en el plasmalema. Dos fracciones de actividad de aglutinación con respecto a *Pseudomonas* fluorescentes fueron detectados en raíces de tomate, trigo y de papa en componentes de peso molecular alto mayor a 10^6 daltones se aglutinaron aislamientos solamente saprofitos de *P. fluorescentes* y parece que están involucrados en la adherencia de *P. putida* Corvallis, a raíces de dichos cultivos (Glandorf *et al.*, 1994).

El desarrollo y la distribución espacial de microcolonias de *Pseudomonas* spp y *Bacillus subtilis* GB03 inoculadas solas o en combinación en semillas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) fueron observadas al microscopio electrónico de escaneo aportando que muchas microcolonias se desarrollan como entidades separadas en la superficie hendida de las células del opérculo y del perianto; así mismo, los patrones espaciales de colonización fueron completamente diferentes, dependiendo de la densidad del inóculo inicial, la superficie de la semilla fue cubierta con la superficie del inóculo para conseguir un tamaño de población detectable incrementando a 10^7 cfu por semilla, desarrollándose a partir de una densidad de inóculo a 10^4 cfu por semilla, de aquí la necesidad de diferenciar entre células vivas, dormantes y muertas. La

disponibilidad de nutrientes es el factor limitante en el tamaño de la población (Fukui *et al.*, 1994).

Las *Pseudomonas syringae* son habitantes comunes en hojas de diversas especies de plantas, pueden estar presentes en asociación epífita y/o patogénica (Hirano *et al.*, 1994). En hojas de frijol las poblaciones epífitas de *P. syringae* sirven como una fuente inmediata de inóculo para la enfermedad bacteriana de la mancha castaña (Hirano *et al.*, 1994).

(Howell y Stipanovic (1980), señalan que la cepa Pf5 de *Pseudomonas* fluorescentes produjo dos antibióticos, uno llamado pirrolnitrin el cual es activo contra *R. solani* y otros hongos no phycomicetes, pero no inhibe el desarrollo de *Pythium ultimum*, aunque el otro antibiótico obtenido fue pioluteorín el cual es activo contra *P. ultimum*, pero no contra *R. solani*. El pioluteorín es adsorbido e inactivado por el suelo y esto puede deberse a la presencia de hidroxilos orto a los carbonilos, habiendo una reacción de quelatos entre pioluteorín y los metales del suelo. Además, la bacteria en gran número puede producir pioluteorín en suelo estéril y con fuente disponible de nutrientes, éstos dos antibióticos por lo tanto coadyuvan a una mejor sanidad en las plántulas de algodónero. Asimismo, se registra un incremento en la estolonización en el cultivo de papa asociado a una colonización por RPCP aisladas de las raíces de apio y de varios cultivares de papa, las cepas fueron A1 y B10 inoculadas alcanzando un rango de 4×10^2 hasta 9.6×10^5 cfu-cm⁻¹; dos semanas después

de la emergencia, las tasas fueron desde 25 hasta 550% (Kloepper *et al.*, 1980 b).

2.5.2. Las bacteriocinas

La definición de las bacteriocinas está dada por Nomura (1967), como las sustancias no replicativas, bactericidas compuestos de proteínas, las cuales son producidas por ciertas cepas de bacterias y que son activas contra algunas otras cepas de las mismas bacterias o que estén relacionadas estrechamente; esas sustancias comprenden algunos compuestos de bajo peso molecular hasta componentes proteínicos semejantes a los bacteriófagos de alto peso molecular. Por otra parte, Bradley (1967) clasificó las bacteriocinas en dos grupos: uno comprende las bacteriocinas termoestables de bajo peso molecular, sensitivas a la tripsina, y otro grupo de alto peso molecular resistentes a la tripsina; la nomenclatura puede depender del huésped ejemplo las agrocinas de *Agrobacterium*, las siringacinas de *Pseudomonas syringae*. Otro caso es la bacteriocina 84 producida por la cepa 84 de *Agrabacterium radiobacter* (Vidaver, 1976).

Los patógenos encuentran antagonistas de microorganismos de la rizosfera antes y durante la infección primaria y también durante la infección secundaria en las raíces. Los patógenos mayores producen las bien conocidas enfermedades vasculares con obvios síntomas y los patógenos menores son parásitos o saprófitos que dañan principalmente el tejido tierno como las

semillas, puntas de crecimiento y los síntomas de la enfermedad no son evidentes (Weller, 1988).

Dentro del proceso de la colonización de raíces Howie *et al.*, (1987) hipotetizaron que *Pseudomonas fluorescens* se presenta en dos fases; en la fase I la bacteria se une y son transportadas a los ápices radiculares, en la fase II la bacteria se dispersa localmente y prolifera hasta los límites del nicho en competición y supervivencia con organismos nativos. Estos procesos pueden aplicarse a otros sistemas de biocontrol, la evidencia para la fase I, se incluyen según Weller, 1988, las bacterias de diversos nichos ecológicos, como *P. fluorescens* 2-79 y Q 72-80 (agentes de biocontrol aisladas de raíces de trigo, *E. coli*, *P. syringae*, *X. Campestris*, *E. Carotovora* y *E. Herbicola*)

Las bacterias *Pseudomonas aurantica*, *P. fluorescens*, *P. olivares* y *P. putida* han tenido cualidades en el incremento del crecimiento vegetal (Anderson y Liberta, 1986), además; se han reportado algunas especies de *Pseudomonas* con capacidad de inhibir una variedad de hongos incluidos algunos patógenos de cultivos como *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma viride*, donde se enfatizó el potencial de la bacteria en la inhibición de patógenos del maíz y su posibilidad para llevarlo como agente biológico en la protección de semillas en el suelo.

Cuervo y Rivas (1997), señalan que las micorrizas (*Glomus manihotis*) y las rizobacterias (*Pseudomonas fluorescens*), promueven el crecimiento de las

plantas, por lo tanto el suelo es un lugar potencial para buscar y luego seleccionar dichos microorganismos con posterior uso en el mejoramiento de la producción. Algunas suspensiones acuosas de *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola* y *E. amylovora* fueron liofilizadas y posteriormente se dispersaron sobre flores de peral y manzano; además, se agregaron a la preparación microesferas fluorescentes de 1 μm de diámetro a una concentración de 1×10^7 microesferas/ml, luego se observaron los estilos y los estigmas donde se presentó colonización, y en menor grado fue el establecimiento de dichas bacterias para ensayos a nivel campo (Stockwell et al., 1998).

La aplicación de ácido salicílico indujo resistencia sistémica adquirida sobre tabaco. Los genes *pchA* y *pchB* los cuales codifican para la biosíntesis de ácido salicílico en *Pseudomonas aeruginosa* se clonaron en dos vectores de expresión y esos diseños fueron introducidos en dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* colonizando raíces. La introducción de los genes *pchA* en la cepa P3, la cual no produce ácido salicílico, tradujo a ésta cepa la capacidad de producir *in vitro* dicho ácido donde se desarrolló la habilidad de inducir resistencia sistémica en tabaco contra virus de la necrosis de tabaco (Maurhofer et al., 1998).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1. Lugar del experimento

El presente trabajo se realizó en un invernadero y en el laboratorio de Fitobacteriología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.

3.1.2. Material biológico

3.1.2.1. Vegetal

La semilla de frijol variedad 8025, fue derivada del cruzamiento entre Jamapa X Compuesto Negro Chimaltenango 2, variedades mejorada y criolla de México y Guatemala, respectivamente; las características son: color negro opaco, pequeño tipo Jamapa, hábito de crecimiento indeterminado tipo III, con una altura promedio de 40 cm. Su tiempo a floración es de 55 días en promedio y sus flores son de color morado; ésta variedad alcanza su madurez fisiológica entre los 95 y 100 días; el peso de 100 semillas es de 18 g.

En pruebas de rendimiento realizadas en los estados de México, Puebla y Tlaxcala, se han mostrado rendimientos de temporal desde 900 hasta 1784 kg/ha; mientras que con riego es posible obtener 2300 kg/ha. Además, esta variedad ha mostrado resistencia al ataque de enfermedad como las ocasionadas por *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc & Magn, y tolerancia al ataque de la roya *Uromyces appendiculatus* Pers.:Pers Unger var *appendiculatus* y con reacción intermedia a *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (Navarrete, 1996, Rosales, 1998). La semilla fue proporcionada por personal del INIFAP de Chapingo, México.

3.1.2.2. Microorganismos

Las cepas de bacterias *Pseudomonas fluorescens* ANP15S, *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Burk) Down causante del tizón de halo en frijol y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (Smith) causante del tizón común en el mismo hospedante provinieron del cepario del laboratorio de Fitobacteriología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.1.3 Material de laboratorio e Invernadero

3.1.3.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo (ver apéndice) fueron los siguientes:

- a) B de King.
- b) Papa-Dextrosa-Agar (PDA).

- c) MXP AGAR.
- d) MSP.
- e) Kado y Heskett (serie D) 4.
- f) Kado y Heskett (serie D) 5.

3.1.4. Otros materiales

Suelo estéril, macetas de plástico con capacidad de 1 kg, autoclave, estufa, refrigeradores, balanza analítica (marca OHAUS), cajas de Petri, tubos de ensayo, matraces, pipetas, agua estéril, reloj, cinta métrica, asa, reactivos, cámara fotográfica.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Diseño experimental

Para el análisis de los datos obtenidos se plantearon dos diseños experimentales completamente al azar (Cuadro 2), donde la unidad experimental fue una planta de frijol por maceta, y las observaciones en general fueron hechas a hojas cotiledonares, primeras trifoliadas, a la base de los cotiledones, al ápice y a las raíces.

3.2.2. Variables de respuesta para el diseño 1

Las evaluaciones para el diseño 1 se realizaron teniendo en cuenta la variable de respuesta longitud radicular en cm (LR), peso fresco radicular

Cuadro 2. Diseño de experimentos. Chapingo, México. 1998.

DISEÑO 1

TRATAMIENTOS	REPETICIONES
T1: Frijol+5ml de <i>P. fluorescens</i> ANP15S	10
T2: Frijol + <i>P. fluorescens</i> ANP15S X 2.5 Horas	10
T3 :Frijol + Agua (testigo)	10

DISEÑO 2

TRATAMIENTOS	REPETICIONES
T1: Frijol + <i>P. fluorescens</i> ANP15S + <i>P. syringae</i> pv <i>phaseolicola</i> [Hojas cotiledonares (H.C.)]	10
T2: Frijol + <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (H.C) (testigo)	10
T3: Frijol + <i>P. fluorescens</i> ANP15S + <i>P. syringae</i> pv <i>phaseolicola</i> (H.T.)	10
T4: Frijol + <i>P. syringae</i> pv <i>phaseolicola</i> (Hojas trifoliadas H.T.) (testigo)	10
T5: Frijol + <i>P. fluorescens</i> ANP15S + <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (H.C.)	10
T6: Frijol + <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (H.C) (testigo)	10
T7: Frijol + <i>P. fluorescens</i> + <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (H.T.)	10
T8: Frijol + <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (H.T.) (testigo)	10

en g (PFR), peso seco radicular en g (PSR), longitud a la base de los cotiledones en cm (LBC) y longitud al ápice en cm (LA) los días después de la siembra (D.D.S.) y sobre hojas cotiledonares (HC) y primeras hojas trifoliadas (HT).

3.2.3. Variables de respuesta para el diseño 2

3.2.3.1. Evaluación de la severidad

Se empleó una escala de daño (0-11) con base al método de Horsfall & Barralt donde la clase cero es cero severidad y la clase 11 es 100% de severidad (Campbell y Madden, 1990); con los valores porcentuales se realizó el análisis de los datos y se obtuvo la curva de progreso de la enfermedad, asimismo se llevó a cabo el cálculo del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), aplicando el programa MCM (Osada, 1990); y para el análisis estadístico de todos los datos se recurrió al paquete SAS®

3.2.4. Cultivo de plántulas

Se sembró una semilla por maceta, en suelo estéril aproximadamente 1 kg, en todos los experimentos se aplicó una lamina de riego uniforme, no hubo presencia de plagas, ni de enfermedades diferentes a las del propósito de esta investigación.

3.2.5. Suspensiones e inoculaciones

Para las cepas de bacterias correspondientes a (A) *Pseudomonas fluorescens* ANP15S, (B) *Pseudomonas syringae* pv *phasecolica* y (C) *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*, la obtención del inóculo se llevó a cabo desde cultivos de B. de King para A , y PDA para B y C respectivamente, incubados a 27°C durante 24 horas donde posteriormente se obtuvo una suspensión en agua estéril a una concentración de 3×10^7 cel/ml , tomando como base el método de Takatsy's (Király *et al*, 1974), para cada una respectivamente. La inoculación se realizó de la siguiente forma:

a) Diseño 1 Tratamiento 1 (D1T1). El 4 de marzo de 1998 se prepararon las suspensiones bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* ANP15S, de 24 horas de incubadas; una vez hecho lo anterior, la semilla fue sembrada a 1.7 cm y sobre ésta se inoculó con 5 ml de la suspensión bacteriana.

b) Diseño 1 Tratamiento 2 (D1T2). El 4 de marzo de 1998, fueron puestas bajo inmersión, para inoculación las semillas, por un periodo de 2.5 horas; posteriormente fueron sembradas en macetas.

c) Diseño 2 Tratamientos 1 y 4 (D2T1 y T4); Diseño 2 tratamientos 2 y 3 (D2T2 y T3). El 23 de abril de 1998 se procedió a realizar las suspensiones con cultivos de cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* ANP15S y *P. syringae* pv *phasecolica* de 24 horas de incubadas; las semillas se sometieron a inmersión por 2.5 horas en *P. fluorescens*, y posteriormente se dejaron en

inoculación por inmersión 24 horas en suspensión de *P. syringae* pv *phaseolicola*. La inoculación del testigo fue por 24 horas en suspensión de *P. syringae* pv *phaseolicola*. Luego fueron sembradas.

d) Diseño 2 Tratamientos 5 y 6 (D2T5 y T6); Diseño 2 Tratamientos 7 y 8 (D2T7 Yt8). El 4 de junio de 1998 se realizó la preparación de las suspensiones bacterianas de 24 horas de incubadas, la inoculación fue mediante inmersión de las semillas por 2.5 horas en *P. fluorescens* ANP15S; luego, éstas mismas semillas fueron puestas en contacto con la suspensión de *X. campestris* pv *phaseoli* por 24 horas. La inoculación del testigo fue por 24 horas en suspensión de *X. campestris* pv *phaseoli*.

3.2.6 Análisis de la información

Para todos los tratamientos planteados en los dos diseños experimentales se les aplicó la prueba de Tukey para comparar las medias, con un $\alpha=0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estimulación del crecimiento del frijol con *Pseudomonas fluorescens* ANP15S

4.1.1. Diseño experimental 1. Longitud radicular

El análisis de varianza reflejó diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos y donde la variable de respuesta fue la longitud radicular (Cuadro 3), igualmente al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, donde hubo una diferencia mínima significativa de 2.9458 (Figura 1).

Cuadro 3. Análisis de varianza para la longitud radicular del frijol, Chapingo, Méx. 1998.

Fuente	GL	SC	CM	Fc	Pr >F
Tratamiento	11	386.983666	35.18033	5.28	0.0010
Error	18	119.906000	6.661444		
Total	29	506.889666			
	R²	C.V.			
	0.76	15.6			

Significancia $\alpha = 0.05$

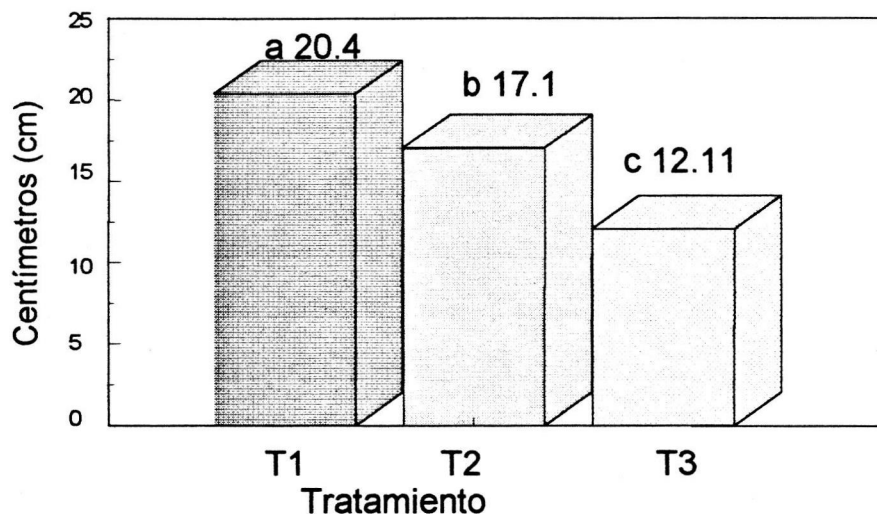


Figura 1. Comparación de medias, longitud radicular

4.1.2. Analisis diseño experimental 1, peso fresco radicular

El análisis de varianza para la variable peso fresco radicular mostró diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 4), así mismo ocurrió en la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, donde hubo una diferencia mínima significativa de 0.6116 (Figura 2).

CUADRO 4. Análisis de varianza peso fresco radicular, Chapingo, 1998

Fuente	GL	SC	CM	Fc	Pr>F
Tratamiento	11	19.098333	1.7362121	6.05	0.0004
Error	18	5.1686666	0.2871481		
Total	29	24.267000			
	R²	C. V.			
	0.79	31.71			

Significancia ($\alpha = 0.05$)

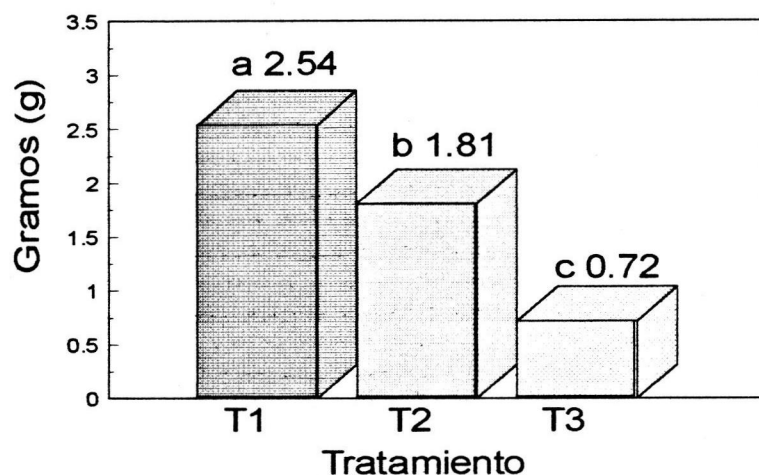


Figura 2. Comparación de medias peso fresco radicular

4.1.3. Analisis diseño experimental 1 - peso seco radicular

El análisis de varianza para la variable peso seco radicular, reflejó diferencias e significativas entre tratamientos (Cuadro 5) de la misma forma ocurrió el la prueba de comparación de medias Tukey donde hubo una diferencia mínima significativa de 0.0356 (Figura 3).

CUADRO 5. Análisis de varianza peso seco radicular, Chapingo, 1998

Fuente	GL	SC	CM	Fc.	P> F
Modelo	11	0.10031787	0.0091198	9.37	0.0001
Error	18	0.01751152	0.00097286		
Total	29	0.11782939			
	R²	C.V.			
	0.85	26.381			

Significancia ($\alpha=0.05$)

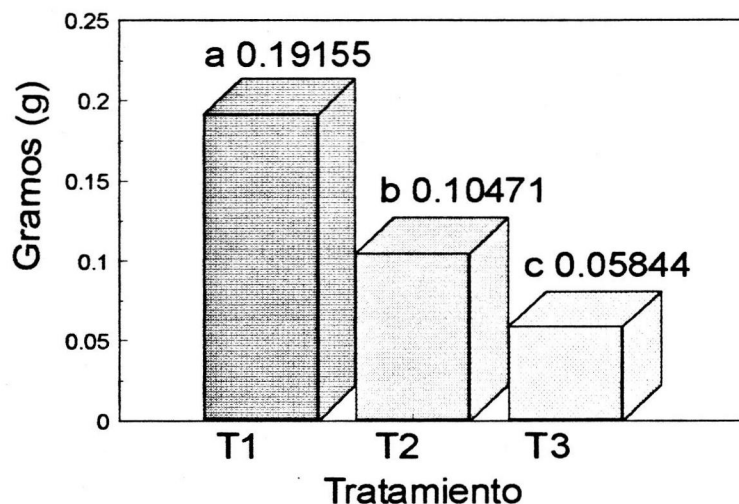


Figura 3. Comparación de medias peso seco radicular.

4.1.4. Análisis diseño experimental 1 - longitud a la base de los cotiledones

El análisis de varianza para la variable Longitud a la Base de los Cotiledones, resultó con diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 6), así mismo en la comparación de medias realizada mediante la prueba de Tukey, donde hubo una diferencia mínima significativa de 1.7263 (Figura 4).

CUADRO 6. Análisis de varianza longitud a la base de los cotiledones, Chapingo, 1998.

Fuente	GL	SC	CM	Fc	Pr>F
Tratamiento	11	250.21233	22.7465757	9.94	0.0001
Error	18	41.177333	2.28762963		
Total	29	291.389666			
	R²	C.V.			
	0.86	23.28			

Significancia ($\alpha=0.05$)

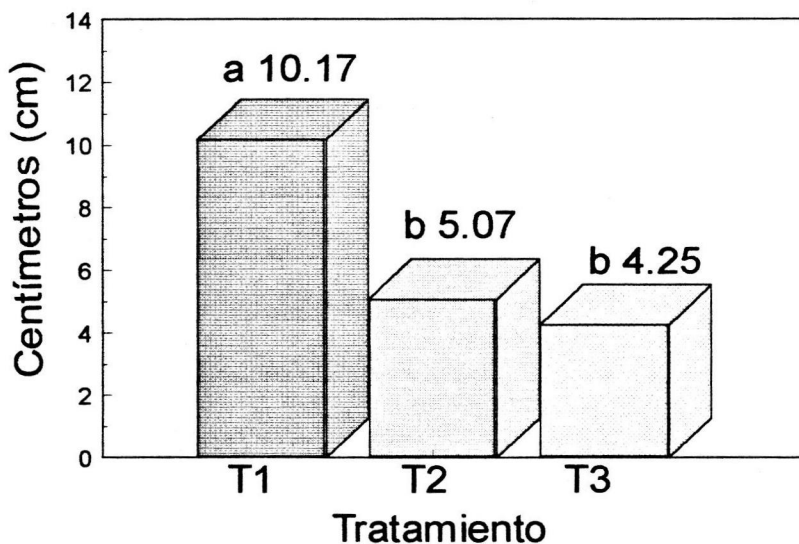


Figura 4. Comparación de medias longitud a la base de cotiledones

4.1.5. Analisis diseño experimental 1- longitud al ápice

El análisis de varianza para la variable respuesta Longitud al ápice, reflejó diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 7), así mismo ocurrió en la comparación de medias hecha mediante la prueba de Tukey, donde se obtuvo una diferencia mínima significativa de 2.1415 (Figura 5).

CUADRO 7. Analisis de varianza Longitud al ápice, Chapingo, 1998

Fuente	GL	SC	CM	Fc	Pr>F
Tratamiento	11	473.319000	43.029000	12.22	0.0001
Error	18	63.3640000	3.5202222		
Total	29	536.683			
	R²	C.V.			
	0.88	19.20			

Significancia ($\alpha=0.05$)

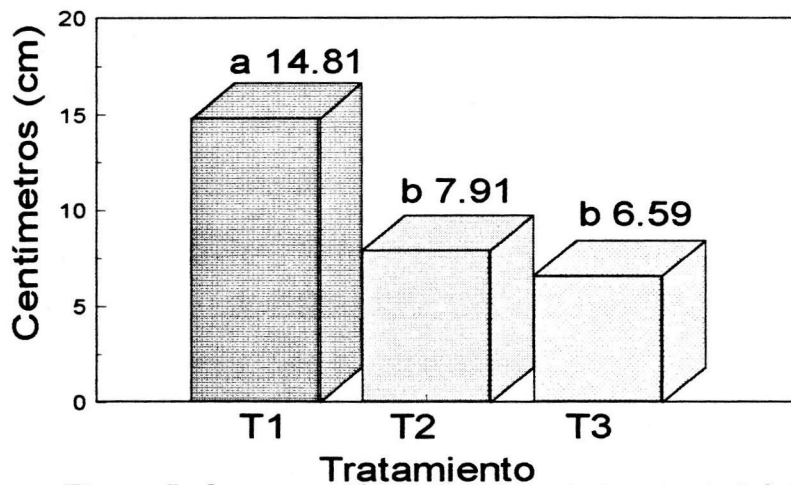


Figura 5. Comparación de medias de longitud al ápice

Del análisis general se puede mencionar que de los tres tratamientos, el que presentó un mejor comportamiento agronómico siempre fue el T1, y también desde el punto de vista estadístico para las variables longitud radicular, peso fresco radicular, peso seco radicular, longitud a la base de los cotiledones y longitud al ápice, esto significa que al inocular la semilla de frijol para la siembra con 5 ml de la suspensión de *Pseudomonas fluorescens* ANP15S. Estimula el crecimiento.

En lo que respecta al tratamiento T2 fue similar el comportamiento para las variables longitud radicular, peso fresco radicular y peso seco radicular, aunque para las variables la longitud a la base de los cotiledones y longitud al ápice no hubo diferencias significativas entre tratamientos y el testigo (T3); esto conlleva a pensar que el estímulo que la bacteria *P. fluorescens* ANP15S ejerce sobre la semilla de frijol es evidente, como también su relación directa con el crecimiento en el estado de plántula.

4.2. CONTROL BIOLÓGICO Diseño 2

Para evaluar el control biológico en los siguientes ocho tratamientos se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y se ajustaron las curvas de progreso de la enfermedad a los modelos epidemiológicos, teniendo como base los valores de la severidad y los periodos de tiempo en días después de la siembra (DDS).

4.2.1 AREA BAJO LA CURVA DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD

4.2.1.1 Efecto de *Pseudomonas fluorescens* ANP15S frente a *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* y a *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* en hojas cotiledonares de frijol

Para los tratamientos a las hojas cotiledonares, donde se probó el efecto de *Pseudomonas fluorescens* ANP15S frente a *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, y frente a *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* se pudo constatar que existen diferencias significativas entre tratamientos con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), teniendo el tratamiento T1 (frijol+*P. fluorescens* ANP15S + *P. syringae* pv *phaseolicola*) mejor respuesta, donde la severidad fue cero durante el periodo de evaluaciones (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de medias de ABCPE de los tratamientos 1,2,5,6. Chapingo, 1998

MEDIA	TRATAMIENTO
233.01	2 a
212.82	5 a
212.59	6 a
0.00	1 b

4.2.1.2. Efecto de *Pseudomonas fluorescens* ANP15S frente a *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* y a *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* en primeras hojas trifoliadas en frijol

Para los tratamientos donde se evaluaron las primeras hojas trifoliadas, se evidenció que no hubo diferencias entre tratamientos, aunque la severidad para el tratamiento T3 fue de cero (Cuadro 9). La explicación a este comportamiento puede estar relacionada con varios factores dentro de los cuales se puede destacar, la susceptibilidad intermedia del hospedante y la heterogeneidad en los datos registrados en las evaluaciones.

Cuadro 9 . Comparación de medias ABCPE tratamientos 3,4,7,8. Chapingo, 1998.

MEDIA	TRATAMIENTO
73.22	4 a
60.73	8 a
59.84	7 a
0.00	3 a

4.2.2. CURVA DE PROGRESO DE LAS ENFERMEDADES

Para los tratamientos de frijol + *P. fluorescens* ANP15S + *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* y frijol + *P. syringae* pv *phaseolicola* se realizaron ocho evaluaciones para cada uno a hojas cotiledonares, en T1 hasta el día 17 después de la siembra no se presentaron síntomas de daño foliar, mientras que a partir del día 11 sí se presentó en T2 daño en la lamina foliar de las hojas cotiledonares siendo ascendente desde esa fecha.

Al realizar el ajuste de la curva para T2 (Figura 6) se observó que el modelo logístico es el que mejor representó el desarrollo de la enfermedad (tizón de halo), tomando en cuenta el valor de R^2 (Cuadro 10).

Para el caso de los tratamientos T3 y T4, se realizaron seis evaluaciones a primeras hojas trifoliadas; en T3 la severidad fue de cero durante el periodo de evaluaciones, mientras que para T4 los primeros síntomas se presentaron a partir del día 14.

Al realizar el ajuste de la curva para T4 (Figura 7), se observó que el modelo monomolecular es el que mejor representó el desarrollo de la enfermedad (tizón de halo), tomando el valor de R^2 (Cuadro 10).

Para el caso de los tratamientos T5 y T6, se llevaron a cabo nueve evaluaciones a hojas cotiledonares, para los dos tratamientos se presentó daño en lámina foliar desde el día 11.

Al realizar el ajuste para T5 (Figura 8) y para T6 (Figura 9) se observó que el modelo monomolecular es el que mejor representó el desarrollo de la enfermedad (Tizón común) para T5 y para T6, tomando al valor de R^2 (Cuadro 10).

Para el caso de los tratamientos T7 y T8, se llevaron a cabo cinco evaluaciones a primeras hojas trifoliadas, la severidad se presentó en ambos casos desde el día 16.

Al realizar el ajuste para T7 (Figura10) y para T8 (Figura 11) se observó que el modelo monomolecular es el que mejor representa el desarrollo de la enfermedad (tizón común) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Modelos epidemiológicos que se ajustaron a las curvas de progreso, Chapingo, 1998.

TRATAMIENTO	R ²	MODELO	ECUACIÓN DE LA RECTA
1			
2	0.970117	L	$y = -17.64108 + 1.2822t$
3			
4	0.96979	M	$y = -1.054867 + 0.0846t$
5	0.920160	M	$y = -0.881257 + 0.0782t$
6	0.919789	M	$y = -0.882180 + 0.7834t$
7	0.910533	M	$y = -1.662661 + 0.1019t$
8	0.953519	M	$y = -1.240191 + 0.0783t$

L = logístico, M = monomolecular, t es tiempo (días después de la siembra).

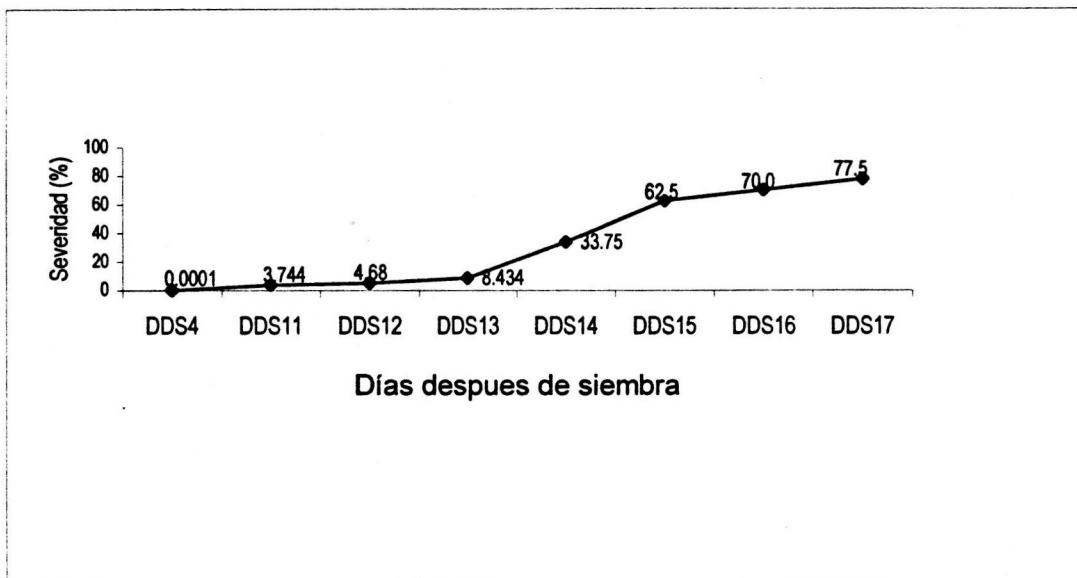


Figura 6. Curva del progreso de la enfermedad *P. s. pv phaseolicola* (T2)

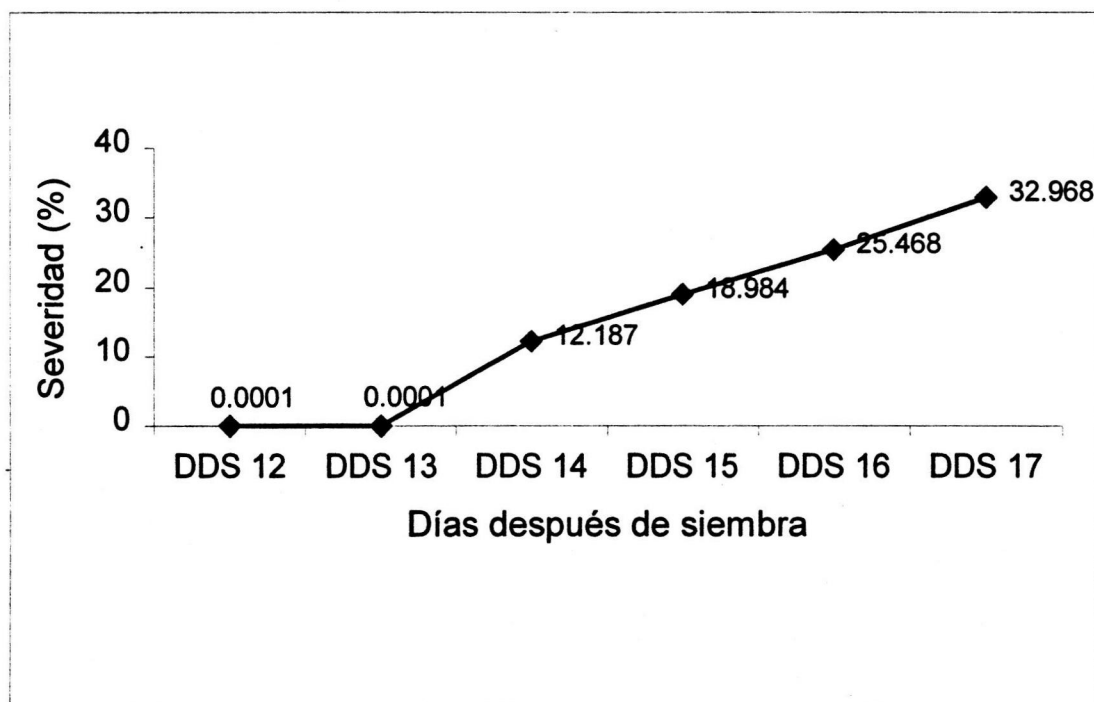


Figura 7. Curva del progreso de la enfermedad *P. s. pv phaseolicola* (T4)

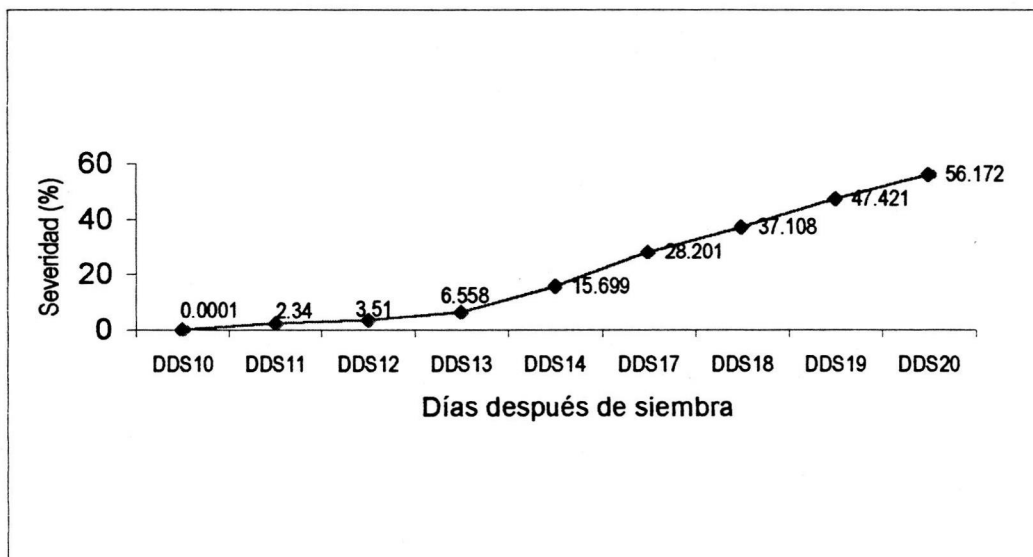


Figura 8. Curva del progreso de la enfermedad *P. fl. + X. campestris pv phaseoli* (T5)

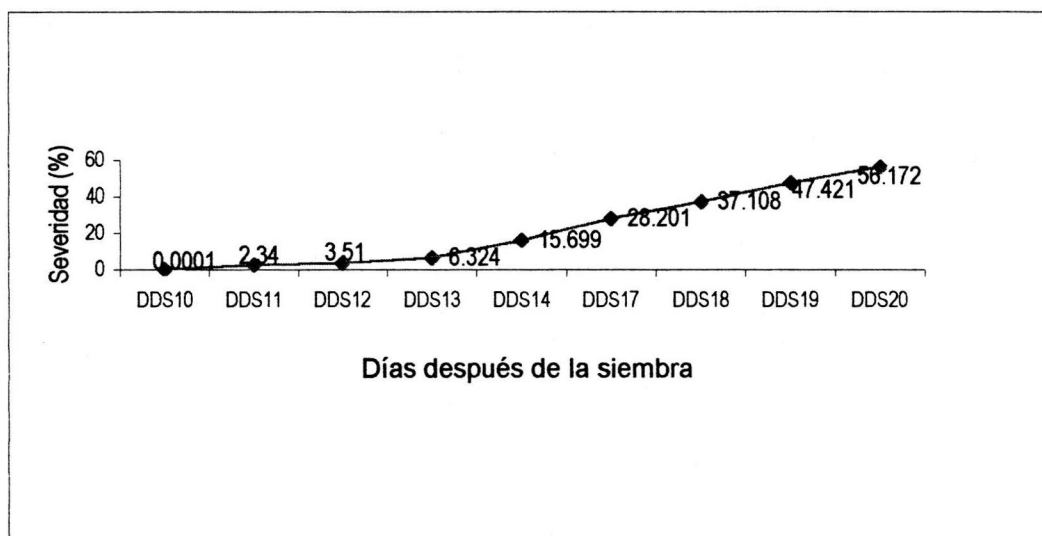


Figura 9. Curva del progreso de la enfermedad *X. campestris pv phaseoli* (T6)

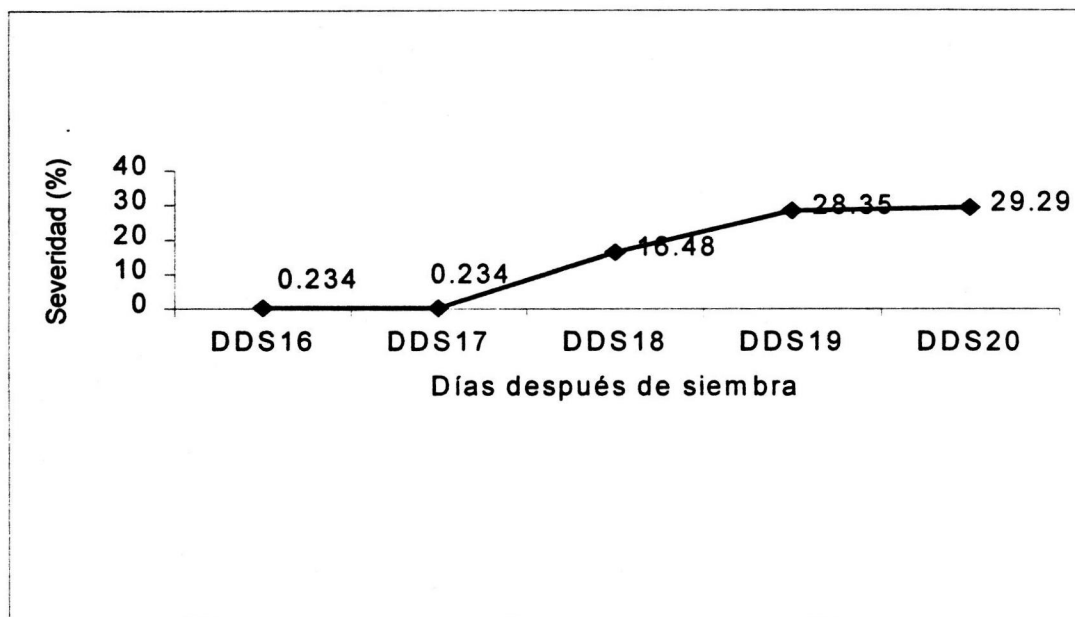


Figura 10 Curva del progreso de la enfermedad *P fl. + X. campestris pv. phaseoli* (T7).

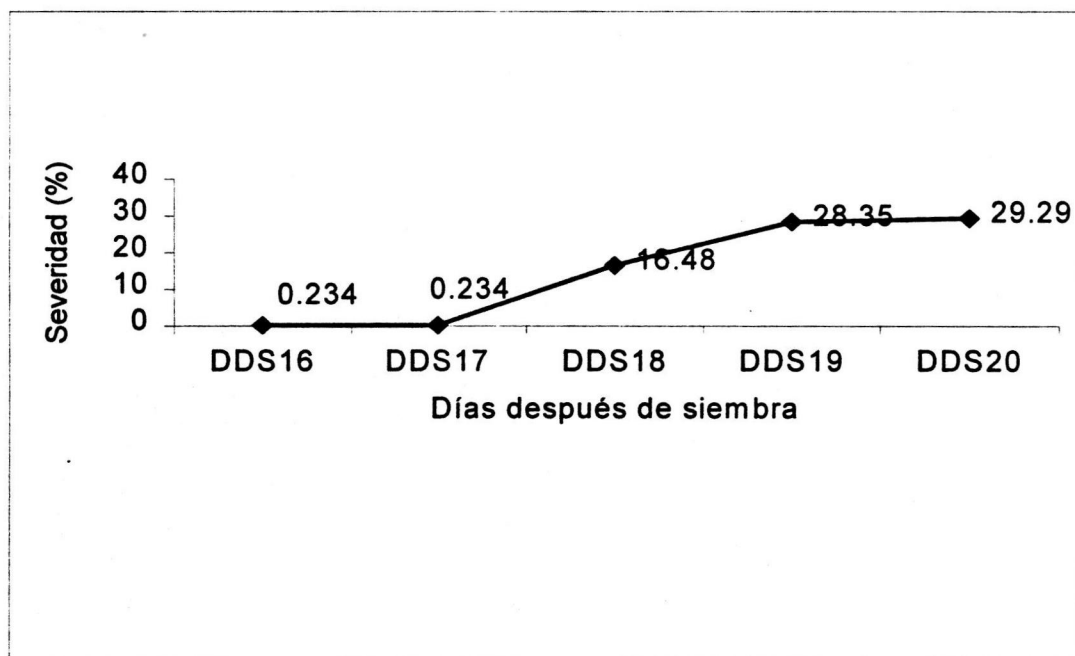


Figura 11.Curva del progreso de la enfermedad *X. campestris pv phaseoli* (T8)

5. CONCLUSIONES

Dentro de los límites establecidos en la presente investigación se concluye lo siguiente:

1. Existe efecto antagonista de *Pseudomonas fluorescens* ANP15S frente a *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, para la variedad de frijol Negro 8025 en los estados fenológicos comprendidos entre hojas cotiledonares y primeras hojas trifoliadas.
2. La variedad de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) 8025 es susceptible al ataque de las bacterias *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*.
3. *Pseudomonas fluorescens* ANP15S estimula el crecimiento de plántulas de frijol cuando la semilla es inoculada con 5 ml de suspensión bacteriana.
4. Al inocular semillas de frijol con suspensión de *Pseudomonas fluorescens* ANP15S por 2.5 horas se logra que su efecto estimule el crecimiento de las plántulas de frijol.
5. *Pseudomonas fluorescens* ANP15S no ejerció control biológico frente a la bacteria *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*.
6. La bacterización de semilla de frijol podría ser una alternativa de control biológico con respecto a los métodos regulares de protección química.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abdulah, H.1994.Specifity of bacteriophages of *Pseudomonas solanacearum*.
En abst. Phytopathology 84 No 10 1069.

Acosta, G.J.A.1994. Challenges in common bean research for biotechnology approaches. Perspectives from national programs: México. In W.M. Roca, T.E. Meller, M.A. Pastor Corrales and J. Tohme (eds) PROC 2ND Int Sci Meeting "*Phaseolus*". Beans advanced biotechnology research network. CIAT. Cali, Colombia pp12-222.

Agrios, G.N.1996. Fitopatología. Ed. Noriega. UTEHA, México. 838 pp.

Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. AG.T. Editor, S.A. México 491 p.

Anderson, R.C. and A.E. Liberta. 1986. Ocurrance of fungalinhibiting *Pseudomonas* on caryopses of *Tripsacum dactiloides* L. And its implication for seed survival and agriculture application. Journal of Applied Bacteriology 61:195-199

Anónimo, 1946. Libro de campo. Campo experimental Pabellon. Ags. INIA-SARH Pabellon Ags. México

Anónimo, 1992. Guia fitosanitaria para el cultivo del frijol, Serie Sanidad vegetal. Sistema de producción frijol en México.

- Anónimo, 1998. Anuarios estadísticos de la producción agrícola . SAGAR-México.
- Audy, P.A., A. Laroche, G. Saindon, C.Huang H. And R. Gilbertson L.1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* and *X. C. Phaseoli* var *fuscans*, using the polimerase chain reaction. *Phytopathology* 84:1185-1192.
- Bautista, M. N., A. Rosales S. y B. Dominguez R. 1992. Manejo fitosanitario de las hortalizas en México. Colegio de Postgraduados-SARH Centro de Entomología y Acarología-Chapingo, México 401 p.
- Bienfait, H.F., J. Bino R., M. Van der Blik A. , F. Dui ven voordn, and M. Fontaine J. 1983. Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe deficient *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant* 59:196-202.
- Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages an bacteriocins. *Bacterial Rev* 31:230-314.
- Burges, H.D., and N. W. Hussey.1971. Microbial control of insects and mites. Academic p. New York. 861 pp.
- Burr, T.J., N Schroth M., and T. Suslow.1978. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68:1377-1383.
- Campbell, C.L., and L. Maddem V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons. New York 532 p.
- Campos, A.J. 1987. Enfermedades del frijol. Ed. Trillas, México, D.F. 132 p.

- Corbell, N.A., J. Kraus, and J.E. Loper. 1994. Identification of a global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* PF-5 . In Abst. Phytopathology 84 No. 101-133.
- Crispín, A., Cifuentes, A.J. y J.Campos.1976. Enfermedades y plagas del frijol en México. Folleto de divulgación N° 39, INIA-SAG. México
- Cuervo, J. Y G.G. Rivas P. 1997. Biota rizosférica: Un recurso para promover el crecimiento y la protección de las plantas. Hoja técnica No. 21.En Manejo Integrado de Plagas No. 44. CATIE Turrialba, Costa Rica.
- Defago, G., C.H. Berling, U. Burger, D. Haas, G. Kahr, C. Keel, C. Voisard, P. Wirthner, and B. Wurthrich. 1990. Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*:Potential applications and mechanisms. Pages 93-108 in: Biológico control of soil-borne Pathogens. D Hornby, ed CAB International, Wallingford, U.K.
- El-Banoby, F.E. and K. Rudolph. 1979. Induction of water soaking in plant leaves by extracellular polysaccharides from phytopathogenic pseudomonadans and xanthomonadans. Physiological Plant Pathology 15:341-349.
- Fukui, R., E.I. Poinar, P. Bauer H., N. Schroth M., M.Hendson, X.L Wang, and G. Hancock J. 1994 Spatial colonization patterns, and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. Phytopathology 84:1338-1345.
- Gielser, L.J. and G. Yuen. 1994. Non-fluorescent *Pseudomonas* sp antagonistic to brown path. In abst. Phytopathology 84 No. 101-113.
- Glandorf, D.C., S.L.Ivander, J. Anderson, P.A. Bakker, and B. Schippers.1994. Agglutination, adherence, and root colonization by fluorescent

- pseudomonadans. Applied and Environmental Microbiology 60 No. 6 1726-1733.
- Guillorrit-Rondeau C., L.Malandrin, and R, Samson. 1996. Identification of two serological flagellar types (H1 and H2) in *Pseudomonas syringae* pathovars. European Journal of plant Pathology 102: 99-104.
- Hirano, S., K. Clayton M., and D. Upper C. 1994. Estimation of and temporal changes in means and variances of populations of *Pseudomonas syringae* on snap leaflets. Phytopathology 84: 934-940.
- Hofte M., J. Boelens, and W. Verstraete. 1991. Accelerated paper seed protection and promotion of seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strains 7NSK2 and ANP15. In Soil Biolog. Biochem. 23 No. 5 407-410.
- Howell, C., and D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69. 480-482.
- Howell, C., and D. Stipanovic. 1980. Suppression of Pythium-induced damping-off cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. Phytopathology 70:712-715.
- Howie, W., J.Cook, D. Weller. 1987. Effects of soil matrix potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive take-all. Phytopathology 77: 286-292.
- Hubbard, J., E. Harman, and Y. Hadar. 1983. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp on the biological control agent, *Trichoderma hamatum* on pea seeds. Phytopathology 73:655-659.

- Király, Z., Z. Klement, F. Solymosy, and J. Voros. 1974. Methods in plant pathology. Elsevier scientific publishing company New York. 509 p.
- Kloepper, J.N., J. Leong, M. Teintze, and N. Schroth. 1980 (a). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 855-886.
- Kloepper, J. W., N. Schroth, and D. Miller T. 1980(b). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70 :1078-1082.
- López, F. M. C. 1994. Los caminos de la fitobacteriología. Ed. Universidad Autónoma Chapingo- Chapingo ,México 216 pp.
- López, F. M. C. 1997 . Manual de prácticas de bacterias fitopatógenas . Dto. de Parasitología Agrícola U.A.Ch. Chapingo, México.
- Maurhofer, M., C. Reimann, P. Schmidli, S. Heeb, D. Haas, and G. Défago. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88:678-684.
- Mc. Cracken, A, and R. Swinburne T. 1979. Siderophores produced by saprophytic bacteria stimulants of germination of conidia of *Colletotrichum musae*. *Physiological Plant Pathology* 15: 331-340.
- Navarrete, M.R. 1996. Variación patogénica de *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (Smith) Dye en México y resistencia del frijol al tizón común. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados Montecillo-México 115 pp.

- Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.
- Neilands, J.B. 1982. Microbial develop proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.* 36:285-309
- Neilands J.B. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease .*Ann. Rev. Plant. Physiology* 37: 187-208
- Nomura, M. 1967. Colicins and related bacteriocins. *Annual Rev. Microbiology* 21:257-284.
- Osada V. H. K. 1990. Comparación de 6 esquemas de muestreo para determinar severidad de daño por roya (*Uromyces fabae* (Pers) De Bary y mancha chocolate (*Botrytis fabae* Sard) en haba (*Vicia faba* L.) y sus curvas de progreso en Chapingo México. Tesis profesional Dto. de Parasitología Agrícola UACH. Chapingo-México 69 p.
- Pedroza S.A. 1993. Efecto de variedades, densidades de plantas, dosis y fuentes de nitrógeno en la incidencia y severidad de las enfermedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de doctorado en ciencias. Col.Postgraduados- Montecillo México 138 p.
- Pedroza S.A. y M. López A. 1995. Respuesta al patosistema del frijol, usando diferentes variedades, tres dosis de fertilización fosfórica y dos sistemas de siembra. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 13 No. 2 117-122.
- Rosales, R. 1998. Comunicación personal CEAVAMEX-INIFAP. Chapingo México.

- Schaad, N.W. 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 2nd Edition. APS.Press, Min. USA. 164 p.
- Schroth, N.M., and G. Hancock . 1982. Disease suppressive soil and root-colonizing bacteria. Science 216: 1376-1381.
- Stockwell, V.O., B. Johnson K., and E. Loper J. 1998 Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. Phytopathology 88:506-513.
- Sujkowski, L.S. , Y. Ophhi, E. W. Fry, and V. Beers S. 1994 Antibiotic-producing strain of *Erwinia herbicola* as a potential biological control agent for *Alternaria solani*. In abst. Phytopathology.
- Teintze, M., and J. Leong. 1981 (a). Structure of pseudobactin A , a second siderophore from plant growt promotion *Pseudomonas* B10 . Biochemistry 20:6457-6462.
- Teintze M., M. Hossain B., L. Barnes C., J. Leong, and D. Van der Helm. 1981(b). Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. Biochemistry 20 : 6446-6457.
- Van P. R., J. Nieman G., and B. Schippers. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCS417r. Phytopathology 81:728-734.
- Van S. A. And O. Voysest. 1991. Common beans: research for crop improvement CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) . Cali Colombia.

- Vidaver, A.K. 1976. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins .Annual Rev. Phytopathology 14: 451-465.
- Wei, G., W. Kloepper J., and S. Tuzun 1991. Induction of sytemyc resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 81: 1508-1512.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathology 26 379-407.
- Weller, D. M., and J. Cook R. 1983. Suppression of take –all of wheat by see treatments with fluorescent Pseudomonads. Phytopathology 73: 463-469.
- Wewley, J.D., and M. Black .1994. Seeds physiology of development and germination. 2^a ed. Plenum . New York. 445 pp.
- Yucel, I., D. Slaymaker, C. Boyd, J. Murillo, J. Buzzell, and T. Keen N. 1994. Avr Pph C. An avrC homologue thas is closely linked to an avrD allele in *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* 3121. In abst. Phytopathology 84 No. 10 1081.
- Zdor, R.E. and J. Anderson A. 1992. Influence of root colonizing bacteria an the defense responses of bean. Plant and Soil 140: 99-107.

7. APENDICE

7.1 Medios de cultivo

a. Medio de cultivo B de King *et al*- agar KB

Para 1ltH₂O

Peptona proteasa N°3 Difco	20.0 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g
Agar	15.0 g
Glicerol	15.0 ml
PH= 7.2	

b. Papa - dextrosa - agar (PDA)

Papa en trozos	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g

c. MXP - Agar

Almidón (papa soluble)	8 g
Glucosa	1 g
Extracto de levadura	0.7 g
K ₂ HPO ₄	0.8 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
Bromuro de potasio	10 g
Metil violeta 2B	30 µl
Metil verde	60µl
Agar	15 g

d. MSP

Sucrosa	20 g
Peptona	5 g

K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25 g
Agar	20 g

e. Kado y Heskett serie D4 (*Pseudomonas*)

Glicerol	100 ml
Sacarosa	10 g
Caseína hidrolizada	1 g
NH_4Cl	5 g
Na_2HPO_4	2.3 g
Laurato de sodio	0.6 g
Agar	15 g

f. Kado y Heskett serie D5 (*Xanthomonas*)

Celobiosa	10 g
K_2HPO_4	3 g
NaH_2PO_4	1 g
NH_4Cl	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3 g
Agar	15 g

