

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

**Determinación de bacterias fitopatógenas asociadas a semillas  
de poroto ( *Phaseolus* spp) comercializadas por pequeños  
productores de la comuna de Valdivia (X Región).**

Tesis presentado como  
parte de los requisitos para optar  
al grado de Licenciado en Agronomía

**María Verónica Chacón Llanos**

Valdivia- Chile

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Luigi Ciampi P.

Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

---

PROFESORES INFORMANTES

Laura Bohm S.

Ing. Agr.

---

Ricardo Fuentes P.

Ing. Agr., M. Sc.

---

*A mi padre, por estar siempre*

*A mi madre, que desde otra dimensión ríe*

*A mi hija Claudia, con mis disculpas*

*A Mónica, por sus desvelos*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar y en forma especial al profesor Sr. Luigi Ciampi P. por su incondicional y constante apoyo en la ejecución de esta tesis , por transmitir y compartir conocimientos que son invaluable, y por ser como es. También agradecer el apoyo y paciencia de mis profesores informantes Sr. Ricardo Fuentes y Sra. Laura Bohm, quienes siempre tuvieron una especial disposición a mis requerimientos.

Son muchas las personas que de una u otra manera me alentaron y ayudaron a terminar con esta etapa inconclusa, gracias a mis grandes amigas Mónica y Gloria, a Nancy Andrade por su exitosa insistencia, a mi amado padre que también promovió y además apoyó esta decisión.

No quiero olvidar a nadie que influyó en el desarrollo de este trabajo, al personal del Laboratorio de fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, Hortencia, Don Ramón, Sylvia, Ingrid. A Julie, que con mucha dulzura me sacó de incontables apuros en mi limitada capacidad computacional; a la querida "Tante", que entre bromas y retos cariñosos le dio un especial sabor a los "trámites" académicos.

Un especial reconocimiento al personal del Laboratorio de Fitopatología del Servicio Agrícola y Ganadero en Lo- Aguirre, Santiago, donde se llevó a efecto gran parte de la fase experimental de este trabajo, a Carolina Ureta, Gabriela Campos, Mercedes Ñiancucho, M<sup>ñ</sup> Eugenia Murillo, J. Carlos Espinoza y en especial a Ernesto Vega por lograr con paciencia y profesionalismo que en una semana y dos días realizara todos los análisis que requería para esta tesis.

Finalmente, agradezco a mi hija Victoria por su disposición y resignación en compartir su tiempo con el que tuve que destinar al término de esta etapa.

**INDICE DE MATERIAS**

Capitulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	El cultivo del poroto en Chile	3
2.2	Enfermedades del poroto	4
2.3	Enfermedades bacterianas del poroto transmitidas por semillas	4
2.3.1	El tizón común bacteriano ( <i>X.c.pv. phaseoli</i> )	5
2.3.1.1	Síntomas	6
2.3.1.2	Ciclo y epidemiología	7
2.3.1.3	Control	8
2.3.2	El tizón del" halo" ( <i>P.s.pv. phaseolicola</i> )	9
2.3.2.1	Síntomas	10
2.3.2.2	Ciclo y epidemiología	10
2.3.2.3	Control	11
2.3.3	Mancha café bacteriana ( <i>P.s.pv. syringae</i> )	12
2.3.3.1	Síntomas	13
2.3.3.2	Ciclo y epidemiología	14
2.3.3.3	Control	15
2.4	Métodos de diagnóstico e identificación de bacterias fitopatógenas en semillas	15
2.4.1	Métodos de detección directa	15
2.4.2	Métodos de detección indirecta	16
2.4.2.1	Extracción	16

Capítulo		Página
2.4.2.2	Aislamiento en medio de cultivo	16
2.4.2.3	Identificación morfológica, fisiológica y bioquímica	17
2.4.2.4	Pruebas de patogenicidad	18
2.4.2.5	Técnicas serológicas	19
2.4.2.6	Técnicas moleculares	20
3	MATERIAL Y METODO	22
3.1	Ubicación del ensayo	22
3.2	Material	22
3.2.1	Laboratorio de fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile	22
3.2.1.1	Material de vidrio	22
3.2.1.2	Material biológico	22
3.2.1.3	Equipos de laboratorio	23
3.2.1.4	Otros materiales	23
3.2.1.5	Medios de cultivo	23
3.2.2	Laboratorio de bacteriología del Complejo de laboratorios y Estación Cuarentenaria Lo-Aguirre del Servicio Agrícola y Ganadero	23
3.2.2.1	Material de vidrio	23
3.2.2.2	Material biológico	23
3.2.2.3	Equipos de laboratorio	23
3.2.2.4	Otros materiales	24
3.2.2.5	Medios de cultivo	24
3.2.2.6	Reactivos	24
3.3	Método	24

Capítulo		Página
3.3.1	Recolección de muestras de semillas de poroto en la comuna de Valdivia	25
3.3.2	Procesamiento de las muestras	25
3.3.3	Aislamiento de bacterias fitopatógenas en extractos de semillas de poroto	26
3.3.4	Identificación de bacterias fitopatógenas	26
3.3.5	Pruebas de virulencia	28
3.3.5.1	Pruebas de virulencia en vainas de porotos verdes	29
3.3.5.2	Pruebas de virulencia en plantas de porotos	31
3.3.5.3	Reaislamiento	33
4	PRESENTACION DE RESULTADOS	35
4.1	Caracterización de las muestras de semillas de porotos colectadas en la comuna de Valdivia	35
4.2	Procesamiento de las muestras	38
4.3	Aislamientos obtenidos a partir de los extractos salinos de semillas de poroto	41
4.4	Identificación de las colonias bacterianas obtenidas	43
4.5	Pruebas de laboratorio para la identificación de <i>Pseudomonas fluorescentes</i> fitopatógenas de porotos	46
4.6	Resultados de las pruebas de virulencia	48
4.6.1	Pruebas de virulencia en vainas verdes de porotos	49
4.6.2	Pruebas de virulencia en plantas de porotos	50
4.7	Reaislamiento de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	52
5	DISCUSION DE RESULTADOS	54

Capítulo		Página
6	CONCLUSIONES	70
7	RESUMEN	71
	SUMMARY	73
8	BIBLIOGRAFIA	75
	ANEXOS	84

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro		Página
1	Pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación entre <i>P.s.pv. syringae</i> y <i>P.s.pv.phaseoli</i>	28
2	Descripción de las muestras de semillas de porotos colectadas en la Comuna de Valdivia	36
3	Caracterización morfológica de las muestras de granos de semillas de porotos colectadas en la Comuna de Valdivia	38
4	Peso promedio de 250 granos de semillas y volumen promedio de bufer salino utilizado en la extracción de bacterias fitopatógenas de 10 muestras de semillas de porotos colectadas en la Comuna de Valdivia	39
5	Número total de colonias bacterianas obtenidas sobre medio KB a partir de las 10 muestras de semillas de porotos de la Comuna de Valdivia	42
6	Número total por dilución de colonias oxidasa negativo y Gram negativo sobre medio KB	44
7	Número total de colonias <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescentes presentes en las muestras de semillas de porotos	46
8	Resultados de las pruebas de utilización de carbono, lévano y esculina en las cepas de <i>Pseudomonas Syringae</i> 3,4,6 y 10	48

Cuadro	Página
9      Resultados de la prueba de virulencia en vainas verdes de poroto con cuatro cepas de <i>P.s.pv. syringae</i>	49
10     Resultados de la prueba de virulencia en plantas de poroto con cuatro cepas de <i>P.s.pv.syringae</i>	51

**INDICE DE FIGURAS**

Figura		Página
1	Esquema secuencial que ilustra las pruebas de virulencia realizadas en vainas verdes de poroto utilizando cultivos puros bacterianos identificados como <i>Pseudomonas</i> o <i>Xanthomonas</i>	30
2	Esquema secuencial que ilustra las pruebas de virulencia realizadas en plantas de poroto utilizando cultivos puros de aislamientos identificados como <i>Pseudomonas</i> o <i>Xanthomonas</i>	32
3	Esquema demostrativo de los pasos seguidos en la presente investigación para identificar bacterias fitopatógenas asociadas a semilla de <i>P. vulgaris</i> L.	34
4	Características morfológicas de las muestras de semillas de porotos colectadas en 10 localidades de la comuna de Valdivia	37
5	Extracción de bacterias fitopatógenas a partir de las muestras de semillas de poroto remojadas en buffer salino.	40
6	Reacción Gram positivo (KOH) y oxidasa positivo en colonias bacterianas aisladas en medio KB a partir de semillas de poroto y descartadas como probable fitopatógenas	43
7	Placas de agar B de King (A), bajo luz ultravioleta y B bajo luz normal	45

Figura		Capítulo
8	Reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco var. Samsung inoculadas con la cepa 3,4,6 y 10 de <i>Pseudomonas fluorescentes</i>	47
9	Vainas de poroto inoculadas con la cepa 3 de <i>P.s. pv. syringae</i>	50
10	Plantas de poroto inoculadas con la cepa 3 de <i>P.s.pv. syringae</i> , agua destilada y testigo absoluto	52

**INDICE DE ANEXOS**

Anexo		Página
1	Medio B de king	85
2	Medio MT (Leche-Tween 80)	85
3	Medio LPGA (Levadura- Peptona-Glucosa-Agar	86
4	Medio base Ayers	87
5	Medio esculina	87
6	Medio LPS- Sucrosa o Levano	88
7	Escala de opacidad de Mac-Farland	89
8	Peso semilla y volumen de buffer salino calculado para el proceso de extracción	90
9	Datos diarios de temperatura media medidos entre enero de 2002 y marzo del 2003 y temperatura media histórica	92
10	Datos diarios de precipitación medidos entre enero de 2002 y marzo del 2003 y precipitación histórica	93
11	Datos diarios de humedad relativa medidos entre enero del 2002 y marzo del 2003 y humedad relativa histórica	94

## 1 INTRODUCCION

En Chile, el poroto ( *Phaseolus spp.*) constituye el tercer cultivo de importancia económica, con una superficie sembrada de 25.870 ha en la temporada 2002-2003 y se destaca como una de las principales fuentes de proteína vegetal en la dieta alimenticia nacional.

En el ámbito nacional, la Décima Región es considerada la zona límite más austral donde la producción de este cultivo es destinada a la comercialización. El año 2000 registra una superficie estimada de 96 ha, de las cuales 38 ha son destinadas a la producción de porotos granados y 58 ha para la de verde. Esta especie constituye una de las principales hortalizas en la pequeña y mediana agricultura de esta zona. Dentro de esta región, la comuna de Valdivia, presenta un activo comercio local de esta hortaliza, concentrándose la mayor parte de la producción en las zonas aledañas a la ciudad. Esta actividad está orientada al consumo en verde y granado para el comercio local interno, utilizando como semilla, la propia producción .

En sus aspectos fitosanitarios, este cultivo, es afectado por un complejo de enfermedades entre las cuales destacan: las que afectan a la raíz producidas por hongos, los mosaicos causados por virus y las manchas o “halos” inducidos por bacterias .Estas últimas son de común ocurrencia en esta zona. Sin embargo, existe poca claridad respecto a la identidad del agente causal de las manchas o “halos” de origen bacteriano observados en este cultivo en esta comuna.

Se describen tres bacterias fitopatógenas asociadas a este cultivo que producen “manchas” o “halos”: *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E.F. Smith) Dowson. *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (van Hall) y *Pseudomonas*

*syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young *et al* siendo todas estas transmitidas por semillas. A pesar que en Chile se describe la presencia de las dos primeras, no se han realizado estudios en la comuna de Valdivia que permitan determinar la calidad fitosanitaria de la semilla de poroto que se comercializa en esta ciudad respecto a la presencia de estos patógenos.

Esta tesis, postula como hipótesis general que en muestras de semillas de porotos aparentemente sanas, obtenidas en la comuna de Valdivia hay presencia de bacterias fitopatógenas.

Por las razones anteriormente expuestas el objetivo general del presente trabajo de investigación es:

- Determinar la calidad fitosanitaria de semillas de porotos que se comercializan en la zona respecto a la presencia de bacterias fitopatógenas transmitidas por éstas.

Los siguientes son los objetivos específicos:

- Recolectar muestras de porotos y describir su estado morfológico y varietal
- Aislar bacterias fitopatógenas de semillas de porotos basados en la metodología descrita por el "Internacional Seed Testing Association" (ISTA)
- Efectuar pruebas bioquímicas y fisiológicas para la identificación de las especies involucradas.
- Evaluar en plantas y vainas de porotos pruebas de virulencia con los aislamientos definidos como patógenos.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 El cultivo del poroto en Chile.

En Chile, el poroto es el cultivo más importante entre las leguminosas de grano, tanto por la superficie que ocupa como por los ingresos que genera, ya sea como producto de consumo interno (grano seco, granado y vaina verde) o de exportación. Además, se destaca por el gran valor alimenticio del grano, el cual contiene 20 a 25% de proteína, cerca de 60% de hidratos de carbono y además minerales tales como calcio, fósforo y hierro entre otros (SOCIEDAD QUÍMICA Y MINERA DE CHILE - SOQUIMICH, 1985).

Según el Censo Agropecuario para la temporada 2002-2003, el cultivo de porotos en Chile alcanzaba una superficie de 25.870 ha (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA- INE, 2003). De acuerdo a Ramos (1985), citado por PAREDES (1998) el cultivo se extiende desde Coquimbo por el norte hasta la IX Región por el sur. A pesar que la temperatura mínima adecuada de germinación y desarrollo del frejol común es de 15°C, (KOOISTRA, 1971), los porotos "payares" y "coyundas" toleran temperaturas mas bajas que el poroto común. Sus semillas son capaces de germinar a 9°C lo que ha permitido que se cultiven en zonas mas australes del país, siendo la provincia de Llanquihue el límite sur del país donde esta leguminosa puede ser cultivada (KRARUP, 1981).

Según la OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS-ODEPA (2003) la Décima Región es considerada la zona límite más austral del país donde la producción de este cultivo es destinada a la comercialización, registrando el año 2000 una superficie estimada de 96 ha, de las cuales 38 ha son destinadas a la producción de porotos granados y 58 ha para la producción de poroto verde.

## 2.2 Enfermedades del poroto

Los hongos y bacterias son de extraordinaria importancia ya que afectan drásticamente la producción de granos de porotos. Provocan grandes pérdidas en la calidad de este producto por los siguientes conceptos: disminución de la calidad germinativa, aumento de la temperatura del grano e inducción de reacciones de rancidez, aumento de la tasa respiratoria y contaminación por toxinas (ESTÉVEZ, 1994).

Según GIACONI (1988), en Chile el poroto es afectado por varias enfermedades producidas por hongos, virus y bacterias fitopatógenas, entre las cuales se destacan: fusariosis, mosaico común, mosaico amarillo, rizoctoniasis, antracnosis, bacteriosis común, roya, oidio, alternariosis, tizón ceniciento, esclerotiniosis y otras. Al respecto SOQUIMICH (1985), señala que las enfermedades causadas por virus son consideradas las de mayor relevancia en la producción del cultivo del poroto en Chile.

## 2.3 Enfermedades bacterianas del poroto transmitidas por semillas.

La semilla es uno de los principales medios de distribución y diseminación de los patógenos bacterianos que afectan al poroto. En la actualidad se reconoce que sólo unas pocas semillas infectadas por bacterias pueden provocar pérdidas considerables, principalmente en zonas húmedas (ALVAREZ *et al.*, 1979).

Según SAETTLER (1991) las principales enfermedades bacterianas del poroto transmitidas por semilla corresponden al: tizón común bacteriano (*Xanthomona campestris* pv. *phaseoli*), el tizón del halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) y la mancha café bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*). Estas tres patologías presentan un impacto importante en la producción mundial de porotos. Al respecto, se han realizado considerables esfuerzos para su control, principalmente a través de los programas de

producción de semillas libres de estos agentes. Estimaciones realizadas por SCHWARTZ (2001) señalan que en Estados Unidos (Colorado), las pérdidas en la producción (incluyendo tamaño y calidad de semillas) pueden alcanzar hasta un 100%. En especial cuando persisten condiciones ambientales adversas durante los estados tempranos del cultivo y a floración. El mismo autor señala, que la siembra de semilla no certificada, contribuye a la gravedad de estas enfermedades, debido a la capacidad de estos patógenos de ser transmitidos por la semilla.

**2.3.1 El tizón común bacteriano (*Xanthomona campestris* pv. *phaseoli*).** El tizón común bacteriano afecta el follaje y vainas del poroto y es considerado el principal problema de este cultivo en la mayoría de las áreas de producción del mundo. Durante períodos extensos de climas cálidos y húmedos esta enfermedad puede ser altamente destructiva causando pérdidas en la producción y calidad de la semilla (SAETTLER, 1991).

Según VENETTE y LAMEY (1998) por ser una enfermedad altamente contagiosa puede provocar fácilmente epidemias, las que pueden ocasionar pérdidas superiores al 75% del potencial de rendimiento. Por su parte, IRIGOYEN y GARBAGNOLI (1997), señalan que en condiciones de humedad y temperatura elevadas, unas pocas semillas infectadas con bacterias (sólo 0,5%) pueden iniciar una epidemia.

SAETTLER (1991), señala que esta enfermedad se desarrolla cuando se siembra semilla contaminada de poroto, cuando se realiza la siembra en campos con historial de la bacteria y cuando el clima es consistentemente cálido y húmedo.

En Chile esta enfermedad se determinó por primera vez en 1968 (PINTO, 1969) y desde entonces se ha constatado como un problema poco frecuente u

ocasional y es requisito establecido para la internación de porotos. Se recomienda su vigilancia en localidades con alta humedad ambiental y altas temperaturas (ACUÑA, 1989).

La bacteria es un bacilo Gram negativo, aerobico, móvil mediante un flagelo polar, oxidasa negativa o débil, catalasa positiva, no produce indol e hidroliza el "Tween 80", produce ácido a partir de arabinosa, celobiosa, galactosa, glucosa, manosa y trehalosa , también produce H<sub>2</sub>S, proteólisis de la leche e hidrólisis del almidón. Las colonias jóvenes en placas de agar suelen ser lisas, redondas con bordes enteros y apariencia mucóide. La pigmentación amarilla debido a la xantomonadina (pigmentos amarillos no solubles en agua) constituye una de sus principales características, pero no es determinante en la identificación ya que existen cepas no pigmentadas y ocasionalmente mutantes no coloreados (BRADBURY, 1984; NOVAL, 1991a y SAETTLER, 1991).

2.3.1.1 Síntomas. Los síntomas aparecen inicialmente en las hojas como manchas acuosas las que posteriormente llegan a ser necróticas provocando lesiones café secas de forma irregular con bordes amarillo claro. Estas lesiones alcanzan sobre los 10 mm de diámetro y frecuentemente se presentan en los márgenes de las hojas. Similares manchas acuosas se forman sobre las vainas agrandándose posteriormente a lesiones secas circulares con bordes café rojizos. En condiciones húmedas se puede observar un exudado bacteriano amarillento sobre éstas. La semilla que se desarrolla a partir de las vainas infectadas puede abortar o arrugarse y decolorarse a medida que va madurando (SHERF, 1979; DILLARD y LEGARD, 1991). Sobre las semillas de poroto blanco los síntomas son más evidentes, presentándose manchas sobre la cubierta de la semilla o restringidas al área del hilum. La semilla severamente afectada exhibe una baja germinación y vigor (SAETTLER, 1991).

2.3.1.2 Ciclo y epidemiología. Existen varios tipos de inóculos primarios involucrados en el inicio del tizón común bacteriano. La semilla contaminada es considerada el mas importante medio de sobrevivencia de esta bacteria, pudiendo sobrevivir interna o externamente sobre la semilla (SAETTLER y PERRY, 1972) y constituye la principal fuente de inóculo primario a nivel mundial y un efectivo medio para la diseminación local y a larga distancia de este patógeno (SAETTLER, 1991).

Según DILLARD y LEGARD (1991), los residuos de plantas enfermas de poroto pueden también servir como fuente de inóculo y la bacteria sobrevive mejor en restos presentes sobre la superficie del suelo que aquellos enterrados en él. Al respecto, MORALES y GRANADA (1989) señalan que la habilidad de esta bacteria de crecer epifíticamente sobre tejido vegetal susceptible y resistente podría ser epidemiológicamente importante ya que serviría para aumentar el inóculo antes de la infección. Estudios mencionados por DILLARD y LEGARD (1991) indican, además, que este patógeno se encuentra como organismo epífita asociado a varias malezas de la familia Chenopodiaceas.

Una vez que el patógeno es introducido a una nueva región vía semilla contaminada, la bacteria permanece en latencia hasta el inicio de la germinación de la planta (DILLARD y LEGARD, 1991). Posteriormente, se desplaza vía xilema, provocando manchas y exudados en hojas y vainas. A partir de estas lesiones, la bacteria se disemina en forma secundaria por las gotas de agua de riego o lluvia transportadas por el viento, equipos contaminados, personas o animales, penetrando directamente la planta a través de los estomas o heridas (SHERF, 1979; DILLARD y LEGARD, 1991). La enfermedad es favorecida por altas temperaturas y humedad y la producción del cultivo es más afectada si la enfermedad se desarrolla antes del llenado de vainas (DILLARD y LEGARD, 1991).

2.3.1.3 Control. La principal practica de control de esta enfermedad corresponde a la utilización de semillas libre del patógeno las cuales deben ser inspeccionadas durante su proceso de producción (SAETTLER, 1991). Al respecto VENETTE y LAMEY (1998) recomiendan la utilización de semilla certificada la cual ha sido evaluada para tizón bacteriano.

Una práctica de control recomendada es el tratamiento de la semilla con productos químicos. HOWARD (2000) señala que en las últimas décadas los productores de Canadá han utilizado la estreptomicina como tratamiento a la semilla para el control del tizón común bacteriano y que el fungicida zineb 80WP o sulfato de cobre se pueden utilizar con eficacia para substituir la estreptomicina en el tratamiento de desinfección de semillas.

Otra medida de manejo corresponde a la utilización de termoterapia para la desinfección de semillas. Al respecto, KOLEV (1984) citado por MAUDE (1996) señala que un tratamiento exitoso para el control de *X. c. pv. phaseoli* en semillas de poroto es la mantención de éstas a baja humedad (45-55% HR) por cortos períodos (22-32 hrs) a temperaturas cercanas a los 60 °C.

Otras prácticas de control mencionadas son la rotación de cultivo por al menos dos años entre siembras de poroto, eliminación de malezas o plantas voluntarias y utilización de variedades de *Phaseolus vulgaris* resistentes al patógeno (SAETTLER, 1991).

Si bien no se ha encontrado una reacción de inmunidad a la infección existen muchas líneas de frejol que son resistentes y sufren muy poca o ninguna disminución en el rendimiento (MORALES y GRANADA, 1989). Estudios realizados por estos autores en Colombia señalan como tolerantes a la variedad Frijolica P-11 y como resistentes las líneas Bac 112 y Bat 1318.

Mientras que SCHUSTER y COYNE (1981) señalan que *P. acutifolius* es una fuente de resistencia a esta enfermedad.

**2.3.2 El tizón “halo” (*Pseudomonas syringae* pv, *phaseolicola*).** Este patógeno ataca el follaje y vainas del poroto y es considerada un importante problema para este cultivo a nivel mundial. Es muy destructiva en climas templados donde existe presencia del inóculo (SAETTLER, 1991). Según SHERF (1979) por las características de desarrollo de esta enfermedad en condiciones climáticas frías y húmedas se recomienda utilizar semillas provenientes de zonas secas, medida que disminuye las graves pérdidas producidas por este patógeno. En los últimos años el uso de semilla certificada en E.E.U.U. ha disminuido considerablemente este problema. No obstante, una semilla contaminada en 16.000 es suficiente para causar una severa epidemia bajo condiciones climáticas favorables ( DILLARD y LEGARD, 1991).

En Chile esta enfermedad fue reportada el año 1972, en una huerta casera de porotos de la ciudad de Valdivia (DUBIN y CIAMPI, 1974) Posteriormente fue detectada en 1993 en algunos semilleros de porotos de exportación de la VIII región. Actualmente, es una enfermedad cuarentenaria y su ausencia es un requisito para la comercialización mundial de semillas de frejol, debido a que, bajo condiciones ambientales favorables, un pequeño número de semillas infectadas puede ser suficiente para provocar una epidemia (ACUÑA, 1993).

La bacteria es un bacilo Gram negativo, móvil mediante uno o varios flagelos polares, aerobico estricto, oxidasa negativo, catalasa positivo, arginina dehidrolasa negativo, produce pigmentos fluorescentes (pioverdinas) en medio de cultivo bajo luz ultravioleta. Además, es capaz de utilizar D-gluconato, L-arabinosa, sucrosa, succinato, D-β-hidroxitbutirato, trans-aconitato, L-serina y L-ρ-hidroxi benzoato. ( NOVAL, 1991b)

Las colonias en medio de cultivo son de coloración blanco crema. La bacteria exhibe variación en su virulencia. Entre los hospederos susceptibles experimentalmente se señalan diversas especies del género *Phaseolus*, tales como *P. polyanthus* y *P. polystachyus* entre otras y además las especies *Macroptilium atropurpureum* y *Pueraria lobata* (SAETTLER, 1991).

2.3.2.1 Síntomas. Los síntomas son visibles varios días después de la infección como pequeñas manchas acuosas en las hojas inferiores, apareciendo un halo amarillento alrededor de los puntos de penetración. En el caso que existan varias hojas infectadas, la planta desarrolla una clorosis sistémica, la cual es muy evidente a temperaturas entre 18 y 23°C (SAETTLER, 1991).

Sobre los tallos de las plantas afectadas por la bacteria se producen manchas acuosas deprimidas, longitudinales, que se transforman en estrías rojizas. Cuando se presenta infección en los nudos, el tallo puede sufrir estrangulamiento y quiebre (ACUÑA, 1993).

Los síntomas en vainas consisten de pequeñas manchas de color café rojizo y aspecto acuoso. A medida que éstas maduran y se tornan amarillas, las lesiones pueden permanecer verdes exhibiendo un exudado bacteriano (SAETTLER, 1991).

Las semillas se pueden infectar a través del hilum presentando lesiones en los tejidos vecinos a las suturas ventral y dorsal. Se observan decoloradas y/o arrugadas (en variedades de color claro el cambio de coloración de la testa es más evidente) (ACUÑA, 1993).

2.3.2.2 Ciclo y epidemiología. La enfermedad es más evidente bajo condiciones climáticas frías y lluviosas temprano en la estación (VENETTE y LAMEY, 1998). La semilla de poroto es considerada la más importante fuente de inóculo de

esta enfermedad; el patógeno puede sobrevivir por mas de cuatro años en la semilla contaminada y también en residuos de plantas enfermas de la temporada anterior (DILLARD y LEGARD, 1991 ).

Las bacterias presentes en las lesiones de plantas infectadas son diseminadas a los tejidos de las plantas sanas por la salpicadura de lluvia, agua de riego, equipos, personas y animales (SAETTLER, 1991).

El patógeno penetra a la planta a través de los estomas o heridas durante períodos de alta humedad relativa (ACUÑA, 1993). Aunque la enfermedad normalmente se desarrolla entre los 18 y 23°C temperaturas superiores a éstas inhiben el desarrollo de halos y clorosis sistémica (DILLARD y LEGARD, 1991).

2.3.2.3 Control. Puesto que esta enfermedad es diseminada por la semilla, el uso de cultivares certificados, es la más importante medida de prevención. También se recomienda la rotación de cultivo de 2 a 3 años. En suelos con antecedentes de la enfermedad se aconseja la eliminación de todos los desechos del hospedero (SHERF, 1979 ).

Otras medidas de control son: evitar el exceso de humedad en las hojas para reducir la diseminación de la enfermedad y la aradura profunda del rastrojo a la cosecha para favorecer la destrucción de la bacteria (SHERF, 1979). Este mismo autor indica que no existen variedades de porotos verdes resistentes a esta enfermedad. Sin embargo, la rojo "Redkote" producido en Cornell ha presentado una buena tolerancia a la raza más común del patógeno. Al respecto, un estudio realizado en Bulgaria por KIRYAKOV (2001) concluye que la resistencia de los cultivares de porotos a este patógeno no es siempre estable, debido a la aparición de nuevas razas más virulentas de la bacteria.

Si bien, SHERF (1979) señala que la aplicación de compuestos de cobre presenta algún control sobre este patógeno, cuando estos son aplicados a los primeros signos de la enfermedad, un estudio reciente realizado por MAHMOUD (2002), demostró que la severidad de esta enfermedad en hojas de porotos disminuye con el aumento en la edad de la planta como resultado de la aplicación de bacterias antagonistas (*P. fluorescens*, *P. putida*, y *Streptomyces aureofaciens*) siendo este control superior al obtenido con la aplicación de compuestos de cobre (hidróxido de cobre 53.8% y carbonato oxiclورو sulfato de cobre 21%).

Finalmente, otras prácticas de control de la enfermedad son: desinfección de semillas con bactericidas (estreptomina y kasugamicina) (ACUÑA, 1993) y la aplicación de calor seco a la semilla por 1 día a 60°C la cual erradica la enfermedad sin afectar la germinación del grano (MAUDE, 1996).

**2.3.3 Mancha café bacteriana del frejol (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*).** Esta enfermedad ha sido informada como un problema grave en Estados Unidos y Brasil, provocando serias pérdidas en la producción de porotos verdes y secos (SAETTLER, 1991).

Las pérdidas debido a este patógeno no están bien documentadas y son difíciles de estimar. Sin embargo, cuando las condiciones son favorables a la bacteria éstas pueden ser elevadas. Globalmente, este patógeno causa más pérdidas de las que en general se consideran (SMITH *et al.*, 1992).

Antes de 1980 en Estados Unidos esta enfermedad no era considerada un problema de importancia económica. Posteriormente se ha constituido en un caso recurrente que puede provocar serias pérdidas en la producción. Esta enfermedad frecuentemente ocurre después que se ha desarrollado una gran

población epifítica de la bacteria. Sin embargo, las infecciones severas puede que no se desarrollen hasta después que se presenten lluvias. La ausencia de síntomas no significa que la bacteria no esté presente (DILLARD y LEGARD 1991).

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, y se encuentra presente en Chile, asociada a un amplio rango de hospederos (BRADBURY, 1986).

El agente causal es un bacilo Gram negativo, aeróbico, móvil por medio de un flagelo multitrucoso, produce pigmentos fluorescentes y es arginina dihidrolasa negativa. Utiliza los siguientes compuestos: betaina, N-caprilato, N-caprato, N-caproato, citrato, D-gluconato, glutarato, D-L glicerato, glicerol, D-L  $\beta$  hidroxibutirato, meso-inositol, isoascorbato, L-prolina, sorbitol, sucrosa y meso-tartrato. Presenta un crecimiento máximo a los 28-30°C y colonias color crema traslúcidas. Los aislamientos patógenos producen una bacteriocina conocida como syringacina W-1 en las plantas hospederas (SAETTLER, 1991).

Entre los cultivos señalados como hospederos BRADBURY (1986) menciona: acelga, limón, zapallo, lechuga, lupino, tomate, muchas especies de porotos, haba, arvejas y soya entre otros. Sin embargo, sólo los aislamientos obtenidos de porotos son patógenos a éstos (SAETTLER, 1991). Al respecto DILLARD y LEGARD (1991) señalan que la bacteria puede causar daño sobre muchos tipos de plantas, pero sólo una forma única de ésta, provoca la mancha café bacteriana en poroto, existiendo además formas epifíticas que crecen sobre porotos verdes y secos, sin causar la enfermedad.

2.3.3.1 Síntomas. El síntoma foliar inicial de la enfermedad son pequeñas manchas café acuosas, ovales, que posteriormente dan origen a manchas café necróticas de alrededor de 3 a 8 mm de diámetro, con un delgado margen

amarillo difuso (DILLARD y LEGARD 1991; MESSIAEN *et al.* 1994). El tejido de estas lesiones puede ocasionalmente desprenderse dándole a la hoja una apariencia de “tiro de munición” (SAETTLER, 1991). Posteriormente, las lesiones pueden agrandarse y confluir dando a las hojas una apariencia necrótica (DILLARD y LEGARD 1991). Las lesiones en los tallos se observan ocasionalmente cuando el patógeno se desarrolla en forma sistémica (SAETTLER, 1991)

Si la infección se presenta temprano en la estación pueden desarrollarse manchas café bronceadas sobre las vainas, las que pueden llegar a doblarse y enrollarse en estos sitios de infección (DILLARD y LEGARD 1991).

2.3.3.2 Ciclo y epidemiología. Este patógeno puede multiplicarse y sobrevivir sobre numerosas especies cultivadas y no cultivadas, las cuales constituyen la fuente de inóculo primario para la infección de porotos (VENETTE y LAMEY, 1998). SAETTLER, (1991) agrega que es transmitido por la lluvia y por el contacto entre hojas húmedas. Además, el riego por aspersión es un eficiente método de diseminación. El patógeno puede también diseminarse en el campo a través de la maquinaria, animales o personas que transitan (DILLARD y LEGARD 1991).

La bacteria puede también sobrevivir sobre la semilla en forma latente, por lo que lotes de estas no certificadas pueden llevar la infección, e introducirla a nuevas áreas. Por otro lado, los residuos del cultivo constituyen la fuente de inóculo para la temporada siguiente (DILLARD y LEGARD 1991). Al respecto, un estudio realizado por LEGARD y HUNTER (1990) demostró que las malezas no constituyen una fuente de inóculo de este patógeno, siendo los residuos del hospedero una importante fuente para esta enfermedad.

2.3.3.3 Control. Según VENETTE y LAMEY (1998), debido a la similitud en la epidemiología y diseminación del tizón común y tizón del halo, las prácticas de control de estos patógenos son también aplicables para el control de la mancha café bacteriana. Al respecto SAETTLER (1991) recomienda el control de plantas voluntarias hospederas que puedan servir como reservorio de la bacteria. Así mismo, se recomienda la aplicación de bactericidas en base a cobre para controlar la dispersión del patógeno y las poblaciones epifíticas. De igual modo, se debe utilizar semilla certificada y variedades tolerantes o resistentes a la enfermedad.

## **2.4 Métodos de diagnóstico e identificación de bacterias fitopatógenas en semillas.**

El diagnóstico de bacterias fitopatógenas integra la información aportada por los síntomas, con la detección bacteriológica del organismo responsable de la enfermedad. Encierra en muchos casos, ciertas dudas, que una metodología cada vez más compleja y específica pretende reducir al mínimo. La identificación de bacterias se basa en características que los miembros del género o especie poseen y que otros grupos no tienen (LOPEZ y CAMBRA, 1995).

Según SCHAAD (1989) existen dos métodos básicos que pueden ser utilizados para detectar bacterias fitopatógenas en semillas, estos son clasificados en métodos directos e indirectos.

**2.4.1 Métodos de detección directa.** Estos son definidos como aquellos donde la bacteria es detectada en la semilla sin una etapa de extracción. Dentro de este, el más utilizado corresponde a las pruebas de crecimiento de semillas en invernadero o campo. Sin embargo, ya que el porcentaje de éstas contaminadas con bacterias es normalmente muy bajo (0,1% o menos) se requieren un gran número de semillas para realizar este diagnóstico. Este

proceso encarece el sistema y consume mucho tiempo, dificultándose, además, la expresión de síntomas de la enfermedad por las condiciones ambientales y presencia de otros agentes fitopatógenos (SCHAAD, 1989).

**2.4.2 Métodos de detección indirecta.** Estos involucran la detección de la bacteria desde un extracto de la semilla, el aislamiento en medio de cultivo y la identificación morfológica, fisiológica y bioquímica, pruebas de patogenicidad, técnicas serológicas y moleculares (SCHAAD, 1989; MAUDE, 1996).

2.4.2.1 Extracción. Las bacterias son extraídas desde la semilla en un medio líquido, pudiendo utilizarse: agua destilada estéril, varios tipos de buffers o medios líquidos de enriquecimiento. Generalmente, el buffer salino estéril es el medio líquido más utilizado. Este proporciona una protección a la célula bacteriana. En la mayoría de los métodos de extracción el volumen y agitación del medio líquido, así como la duración y la temperatura del lavado son críticos en la recuperación de la bacteria (ROTH, 1989; MAUDE, 1996).

Los medios de extracción enriquecidos pueden ser usados cuando la densidad del inóculo es baja o cuando la bacteria es de crecimiento lento. Sin embargo este procedimiento puede provocar un aumento de las bacterias contaminantes (ROTH, 1989).

2.4.2.2 Aislamiento en medio de cultivo. La bacteria es obtenida sembrando pequeños volúmenes del medio de extracción sobre un medio de agar general o semiselectivo (MAUDE, 1996). El aislamiento tiene por objeto estimar la composición cuantitativa y cualitativa de la bacteria presente y obtener colonias bacterianas separadas para cada tipo. Cada colonia procederá generalmente de la multiplicación de una sola célula y constituirá un cultivo axénico o clon utilizable para su estudio y caracterización. El medio de cultivo debe aportar a

cada célula todos los elementos minerales y orgánicos que esta necesita en condiciones favorables (LOPEZ y CAMBRA, 1995).

Entre los medios generales utilizados para el aislamiento de bacterias del genero *Xanthomonas* y *Pseudomonas* fluorescentes LÓPEZ y CAMBRA (1995), recomiendan el medio LPGA ( Levadura- Peptona- Glucosa y Agar) y el medio King B (KB) respectivamente. Por su parte, el protocolo para la detección de tizones bacterianos en semillas de poroto elaborado por el International Seed Testing Association (ISTA,1999) señala como medios semiselectivos a utilizar para el aislamiento de *X. c. pv. phaseoli* el medio XCP1 ( *Xanthomonas* Cristal violeta - Peptona), el medio MT (Leche-Tween 80), y el medio general KB para el aislamiento de *P. s. pv phaseolicola*.

2.4.2.3 Identificación morfológica, fisiológica y bioquímica. Una vez aislada la bacteria esta es identificada, determinando inicialmente las características de la célula bacteriana mediante tinción de Gram, la presencia de flagelos mediante tinción y observación al microscopio óptico o electrónico (MAUDE, 1996).

Las características de las colonias pueden también orientar el diagnostico. Su aspecto, forma y color permiten en muchos casos una aproximación a su identificación. La presencia de pigmentos puede ser indicativa de una determinada especie y ser utilizada como carácter complementario en el diagnostico (LOPEZ y CAMBRA, 1995).

Los pigmentos fluorescentes a la luz ultravioleta de algunas especies de *Pseudomonas* (pioverdinas difusibles en medio KB) son de gran ayuda en su identificación. Mientras que los pigmentos amarillos tipo xantomonadinas producidas por bacterias del género *Xanthomonas* son de gran utilidad taxonómica. Por su parte, las características bioquímicas y fisiológicas de las bacterias fitopatógenas se basan en las pruebas clásicas de utilización de

determinadas sustancias y acidificación o alcalinización de medio de cultivo. Una de ellas es la utilización de la glucosa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, así como la utilización de diferentes fuentes de carbono para su crecimiento (LOPEZ y CAMBRA, 1995).

2.4.2.4 Pruebas de patogenicidad. La identificación del patógeno a partir de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas dan un diagnóstico presuntivo que requiere ser confirmado por pruebas de patogenicidad (STEAD, 1992 citado por MAUDE, 1996).

La patogenicidad es la característica más importante de las bacterias fitopatógenas, por lo que su verificación resulta imprescindible en su identificación. Además, la comprobación de los postulados de Koch exige la inoculación artificial, en huéspedes sanos, la observación de los síntomas en las plantas inoculadas y el reaislamiento del patógeno a partir de las plantas con síntomas (LOPEZ y CAMBRA, 1995).

Entre los métodos de inoculación MAUDE (1996) señala que pueden utilizarse partes de las plantas hospederas o plantas enteras cultivadas *in vitro*. Para su inoculación, se pueden utilizar el medio de extracción o el cultivo puro, y la aplicación puede efectuarse por medio de inyección, aspersión o por abrasión de hojas.

Por otra parte, LOPEZ y CAMBRA (1995), señalan que es importante considerar la concentración del inóculo bacteriano, el que debe ser adecuado a los distintos tipos de bacterias. Estos deberán ser jóvenes (de 24 a 72 h), ya que es importante usar cultivos en la fase exponencial de crecimiento en la cual existe la mayor actividad enzimática y producción de toxinas. Esto confiere las condiciones ambientales más adecuadas a la planta para el desarrollo de la enfermedad.

Finalmente, otro método que puede ser utilizado para obtener un indicio de la naturaleza fitopatógenas de las bacterias, es la reacción de hipersensibilidad en tabaco u otras especies no afectadas por la bacteria a inocular. Esta reacción corresponde a una respuesta rápida de defensa de la planta frente a patógenos incompatibles inoculados con jeringa en los espacios intervenales de las hojas. Este proceso provoca una necrosis y desecamiento brusco en el parénquima de la zona inyectada (KLEMENT *et al.*, 1964).

Entre las bacterias fitopatógenas que provocan este tipo de reacción HILDEBRAND *et al.* (1994) y LOPEZ y CAMBRA (1995), señalan a especies de *P. fluorescentes* (*P. syringae* (grupo 1), *P. viridiflava*, *P. cichorii* y algunas razas de *P. marginalis*), algunas especies del género *Xanthomonas* y las especies de *Erwinia* causantes de marchitez.

2.4.2.5 Técnicas serológicas. Estas técnicas se basan en los principios inmunológicos de los antígenos (bacterias u otros agentes) inyectados en mamíferos, estimulando la producción de anticuerpos los cuales se unen al antígeno (MAUDE, 1996). Estos productos específicos son posteriormente utilizados *in vitro* para poder detectar, identificar y estudiar estos microorganismos (FISAC, 1991).

Según FRANKEN y VAN VUURDE (1990) entre los métodos serológicos más utilizados para la detección e identificación de bacterias transmitidas por semillas se encuentran: la aglutinación, doble difusión, ELISA e inmunofluorescencia.

Los métodos de aglutinación fueron las primeras técnicas utilizadas para detectar *P.s. pv. phaseolicola* en semillas de poroto (GUTHRIE *et al.*, 1965; TAYLOR, 1970) y para la detección de *X. c. pv phaseoli* en semillas de poroto en Estados Unidos (SAETTLER, 1971). Sin embargo, estos métodos presentan

una baja sensibilidad y consumen una gran cantidad de anticuerpos (LOPEZ y CAMBRA, 1995). Por su parte, el ELISA es el método preferido para la detección de fitopatógenos en semillas. Numerosos 'kit' han sido desarrollados para detectar las infecciones en las semillas, dando a los productores un indicador del estado sanitario de sus semillas (BALL y REEVES, 1992, citado por MAUDE, 1996). Al respecto, VAN VUURDE *et al.* (1983) desarrollaron ensayos de ELISA de rutina para la detección de *P. s. pv. phaseolicola* y *X. c. pv. phaseoli* en semillas de poroto.

Finalmente, la inmunofluorescencia que involucra el reconocimiento bajo el microscopio de luz ultravioleta del antígeno unido al anticuerpo también ha resultado ser un buen método de detección de bacterias fitopatógenas en semillas de porotos. Un estudio desarrollado por MALIN *et al.* (1983) demostró que esta técnica es capaz de detectar una semilla de poroto infectada con *X. c. pv. phaseoli* en 10.000 semillas, obteniéndose también buenos resultados en la detección de *P. s. pv. phaseolicola* (FRANKEN y VAN VUURDE, 1990).

2.4.2.6 Técnicas moleculares. Estas técnicas se basan en el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la bacteria, siendo más adecuadas para una tipificación y detección específica (LOPEZ y CAMBRA, 1995). Entre las más utilizadas, MAUDE (1996) señala, el uso de sondas de ADN y la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

La hibridación con sondas de ácidos nucleicos consiste en genes que codifican factores de virulencia RNA ribosomal o segmentos de ADN. Estos son únicos para un patógeno en particular y proporciona la especificidad necesaria para la detección de un patógeno en una muestra (PROSEN *et al.* 1993).

Un estudio realizado por SCHAAD *et al.* (1989) demostró que las sondas de ADN que llevan un fragmento de un gen para la producción de

faseolotoxinas de *P.s. pv. phaseolicola* son confiables. Se utilizan para la detección e identificación de colonias a partir de cultivos o extractos de la maceración de vainas con lesiones de tizón del halo, donde existen un gran número de células presentes. Sin embargo, PROSEN *et al.* (1993) señala que estas sondas carecen de la sensibilidad necesaria para la detección directa de bajas poblaciones del patógeno o para detectarlo cuando existen altas poblaciones de bacterias saprofitas, mientras que la amplificación de secuencias de ADN por medio de la PCR permite la detección de un pequeño número de bacterias.

Según este último autor, la amplificación de los genes de faseolotoxinas mediante la PCR, ha resultado ser un método exitoso para la detección de *P. s. pv. phaseolicola* en semillas contaminadas de porotos. Esta es una técnica altamente sensible y específica para su diagnóstico. Sin embargo, no permite diferenciar entre células bacterianas vivas y muertas lo cual puede tener una gran implicancia en las regulaciones fitosanitarias. Para resolver este problema SCHAAD *et al.* (1995), introdujeron una modificación a la PCR ("BIO-PCR") en la que los extractos de la semilla son sembrados en un medio de agar, lavando posteriormente los cultivos y sometiendo los lavados a la PCR. Este método modificado mejora la detección del patógeno en la semilla y reduce la posibilidad de detectar células bacterianas muertas o ADN libre.

### 3 MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Realización del estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral en la ciudad de Valdivia y en el Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Complejo de Laboratorios y Estación Cuarentenaria Lo Aguirre del Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura, República de Chile, ubicado en la ciudad de Santiago.

#### 3.2 Material

A continuación se describirán los materiales utilizados en los dos lugares donde se realizaron los ensayos.

**3.2.1 Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.** En este laboratorio se realizó la recepción, conteo, separación y embalajes de las submuestras para su posterior análisis en el Laboratorio SAG- Lo Aguirre. Además, se realizaron las pruebas de patogenicidad y reaislamientos de las bacterias fitopatógenas que se obtuvieron.

3.2.1.1 Material de vidrio. Placas Petri (9 y 14 cm de diámetro), tubos de ensayo (13 mL), matraces aforados (500, 1000 y 2000 mL), pipetas graduadas, probetas graduadas y vasos precipitados graduados.

3.2.1.2 Material biológico. Semillas de poroto (*P. vulgaris*) de variedades no establecidas obtenidas desde siete localidades de la zona de Valdivia; se utilizó también 20 kg de tierra proveniente de la Estación Experimental Santa Rosa y la misma cantidad de arena de río.

3.2.1.3 Equipos de laboratorio. Autoclave manual, autoclave automático (Deutsch-Neumann, Modelo 10308), destilador de agua, estufa de cultivo (Mettler), cámara de flujo laminar (LabConco, Modelo 3613-00b), vortex (Lab-line, Modelo 1291), espectrofotómetro (Sequoia-Turner, Modelo 320), refrigeradores.

3.2.1.4 Otros materiales. Agua destilada, alcohol, algodón hidrófilo y cardado, asa de siembra, bisturí, bandejas plásticas, bolsas de papel y plástico, micropipetas, papel absorbente, papel aluminio, "Parafilm", papel de envolver, pinzas y puntas de pipeta

3.2.1.5 Medios de cultivo: Se utilizó el medio de cultivo King B (KB, Anexo 1).

**3.2.2 Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Complejo de Laboratorios y Estación Cuarentenaria Lo Aguirre del Servicio Agrícola y Ganadero.** En este laboratorio se desarrolló la etapa de aislamiento de bacterias a partir de las 10 muestras de semillas de porotos.

3.2.2.1 Material de vidrio. Placas Petri (9 cm), tubos de ensayo tapa rosca (15 mL), matraces Erlenmeyer graduados(1000 y 2000 mL), porta y cubre objetos.

3.2.2.2 Material biológico. Semillas de poroto, plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* var. Samsung.

3.2.2.3 Equipos de laboratorio. Autoclave semiautomático de carga horizontal (Oppici ,Modelo HC-38-90-06 1P), destilador de agua, estufa de cultivo, cámara de flujo laminar (Nuair-biological safety, Modelo Nonu-425-400E, serie 21), vortex (Thermolyne, Modelo 37600), plato térmico, (pHmetro Jenway, Modelo 3310), refrigerador, balanza analítica (Sartorius Laboratory, Modelo L220s),

agitador magnético (Thermolyne Nuova Stirplate) y agitador horizontal (Kottermann 4020).

3.2.2.4 Otros materiales. Agua destilada, alcohol, algodón hidrófilo, asa de siembra, bandejas plásticas, barras magnéticas, bisturí, bolsas plásticas 30x40 cm, dispensador 1-10 ml, filtros de nitrocelulosa Whatman 25 mm de diámetro 0.2µm, jeringas desechables, micropipetas, papel absorbente, papel de aluminio, "Parafilm", papel de envolver, pinzas, portafiltro 25 mm diámetro, puntas de pipeta.

3.2.2.5 Medios de cultivo. Se utilizaron los medios de cultivo King B (KB, Anexo 1), Milk Tween (MT, Anexo 2) y Levadura -Peptona -Glucosa -Agar (LPGA, Anexo 3), medio base Ayers (Anexo 4), medio esculina (Anexo 5) y medio LPS-sucrosa o Lévano (Anexo 6). Todos estos medios se confeccionaron de acuerdo a los procedimientos descritos por KLEMENT (1990) y SCHAAD (1994).

3.2.2.6 Reactivos. Reactivo oxidasa (0.1 g. de dihidroclorhidrico- tetrametil-parafenilendiamino. en 10 ml de agua); Buffer salino estéril, preparado con 0.85g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada; Reactivo KOH (Gram alternativo) descrito por SCHAAD (1994) que consta de 0.3g de hidróxido de potasio (KOH) en 10 ml de agua destilada; Cristal violeta; Soluciones escala opacidad Mac- Farland (Anexo 7).

### **3.3 Método**

La metodología que se utilizó en esta investigación se describirá en forma cronológica y esta basada en el protocolo analítico para la detección de bacterias fitopatógenas presentes en semillas de poroto, descrito por el International Seed Testing Association (ISTA, 1999). Además, todas las

pruebas microbiológicas que se realizaron en las diferentes etapas se basan en la metodología descrita por SCHAAD (1994).

**3.3.1 Recolección de muestras de semillas de poroto en la comuna de Valdivia.** Entre los meses de enero y mayo del año 2003, se colectaron 10 muestras de semillas de porotos de 8 ecotipos o variedades provenientes de seis distintas localidades de la comuna de Valdivia, correspondientes a la cosecha de la temporada 2002 (Cuadro 2). Cada muestra consistió de 1.100 granos de semillas los cuales fueron transportadas al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile realizando una caracterización morfológica de cada muestra. Posteriormente se procedió a separar cada muestra en cuatro grupos o submuestras de 250 semillas cada una, manteniéndose en almacenaje 100 granos de semillas para evaluaciones de patogenicidad posteriores. Todas las submuestras fueron rotuladas y colocadas al interior de bolsas de papel, para ser posteriormente llevadas al Laboratorio de Bacteriología Vegetal SAG-Lo Aguirre para su procesamiento.

**3.3.2 Procesamiento de las muestras.** En el Laboratorio de Bacteriología Vegetal SAG-Lo Aguirre, se procedió en primer lugar a registrar el peso de cada una de las submuestras, para luego colocarlas identificadas en bolsas de polietileno.

A cada submuestra en su respectiva bolsa plástica se le agregó una solución de extracción de buffer salino estéril (0,85 gr. NaCl en 100 ml de agua destilada estéril) en una relación 1:1,5 (p/v) y se procedió a homogenizarlas manualmente. Posteriormente, fueron llevadas a refrigeración a 4°C por 18 horas, al cabo de este período, se colocaron en un agitador horizontal durante 1 h a temperatura ambiente, para finalmente realizar los aislamientos de bacterias fitopatógenas a partir de la solución de extracción de cada una.

3.3.3 Aislamiento de bacterias fitopatógenas en extractos de semilla de poroto. A partir de las soluciones de extracción de cada submuestra se tomó 1 mL con micropipeta estéril, realizando cuatro diluciones seriadas en tubos con 9 mL de agua destilada estéril ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ). De cada uno se realizó siembras de 100  $\mu$  L con una micropipeta estéril en duplicado sobre placas Petri que contenían los siguientes medios de cultivo: KB, LPGA y MT totalizando 24 aislamientos por cada submuestra para los 3 medios de cultivo utilizados. Las siembras se realizaron con un asa de vidrio estéril esparciendo los 100  $\mu$  L de cada dilución en cada placa sobre toda la superficie del medio de cultivo.

Posteriormente las placas se incubaron en una estufa de cultivo a 28°C durante 48 h para proceder a realizar a continuación el recuento de colonias bacterianas desarrolladas y la identificación de las bacterias obtenidas sobre los tres medios de cultivo.

3.3.4 Identificación de bacterias fitopatógenas. Para discriminar la presencia de colonias bacterianas fitopatógenas de otras desarrolladas en los aislamientos de los tres medios de cultivo utilizados, se procedió a realizar a todas las colonias la prueba de la oxidasa y Gram (KOH), seleccionando como probables fitopatógenas aquellas colonias que resultaron negativas a ambas pruebas y descartando las que resultaron positivas.

Para determinar la presencia de bacterias del genero *Xanthomonas* se observó sobre el medio MT si existía desarrollo de colonias que presentaran un halo a su alrededor producido por la hidrólisis del Tween 80, y sobre el medio LPGA la presencia de colonias amarillas, de bordes lisos y mucoides.

Para la identificación de bacterias del genero *Pseudomonas* se realizó la detección de pigmentos fluorescentes en medio KB bajo luz ultravioleta (366

nm). Las colonias que produjeron estos productos fueron seleccionadas como probables *Pseudomonas* fitopatógenas y fueron caracterizadas morfológicamente de acuerdo a su color, forma, tipo de bordes, opalescencia y textura.

Posteriormente, se realizaron tinciones con cristal violeta para determinar la morfología de la bacteria y su movilidad. Aquellas colonias de coloración blanco crema opalescente, de bordes lisos y bacilos móviles, fueron seleccionadas como probables *P. syringae*, siendo confirmada su identidad, con la reacción de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Samsung) descrita por SCHAAD (1994). Esta consistió en la inoculación con una jeringa estéril, en cuatro diferentes partes de la suspensión bacteriana sospechosa (ajustada al tubo N°2 según escala de MacFarland), en los espacios intervenales de las hojas de una planta de tabaco. Todas aquellas colonias que produjeron necrosis en la zona de inoculación dentro de un lapso de 24 h, fueron positivas a esta reacción e identificadas como *P. syringae*, procediendo posteriormente a la identificación de los patovares *syringae* y *phaseoli* de esta especie. Para ello se utilizó la prueba de levano y esculina y la utilización de inositol, manitol, eritritol, sorbitol y tartrato como fuente de carbono en medio Ayers, de acuerdo a lo descrito por NOVAL (1991b) y SCHAAD (1994). Todas pruebas bioquímicas que permiten la identificación de ambos patovares basados en las reacciones descritas (Cuadro 1).

**CUADRO 1 Pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación entre *P. s. pv. syringae* y *P. s. pv. phaseoli***

PRUEBAS BIOQUIMICAS	REACCION ESPERADA	
	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseoli</i>
Producción de Levano	+	+
Hidrólisis de Esculina	+	-
Utilización de:		
Inositol	+	-
Manitol	+	-
Eritritol	+	-
Sorbitol	+	-
Tartrato	-	-

Fuente: Adaptado de NOVAL (1991b) y SCHAAD (1994)

+ Prueba positiva

- Prueba negativa

Finalmente, todas aquellas colonias bacterianas que fueron identificadas como probables especies fitopatógenas a poroto, fueron mantenidas como cultivos puros sobre medio KB. Así fueron transportadas al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile en la ciudad de Valdivia para la realización de las pruebas de virulencia.

**3.3.5 Pruebas de virulencia.** Se realizaron dos diferentes pruebas de virulencia con las cepas de bacterias identificadas como probables fitopatógenas. Para ello se usaron vainas de porotos verdes y plantas de porotos. En ambas se utilizaron suspensiones bacterianas de cada cepa preparadas en agua destilada estéril a partir de colonias de 24 h de cultivo, ajustada en un

espectrofotómetro a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm equivalente a  $1 \times 10^8$  ufc/ml.

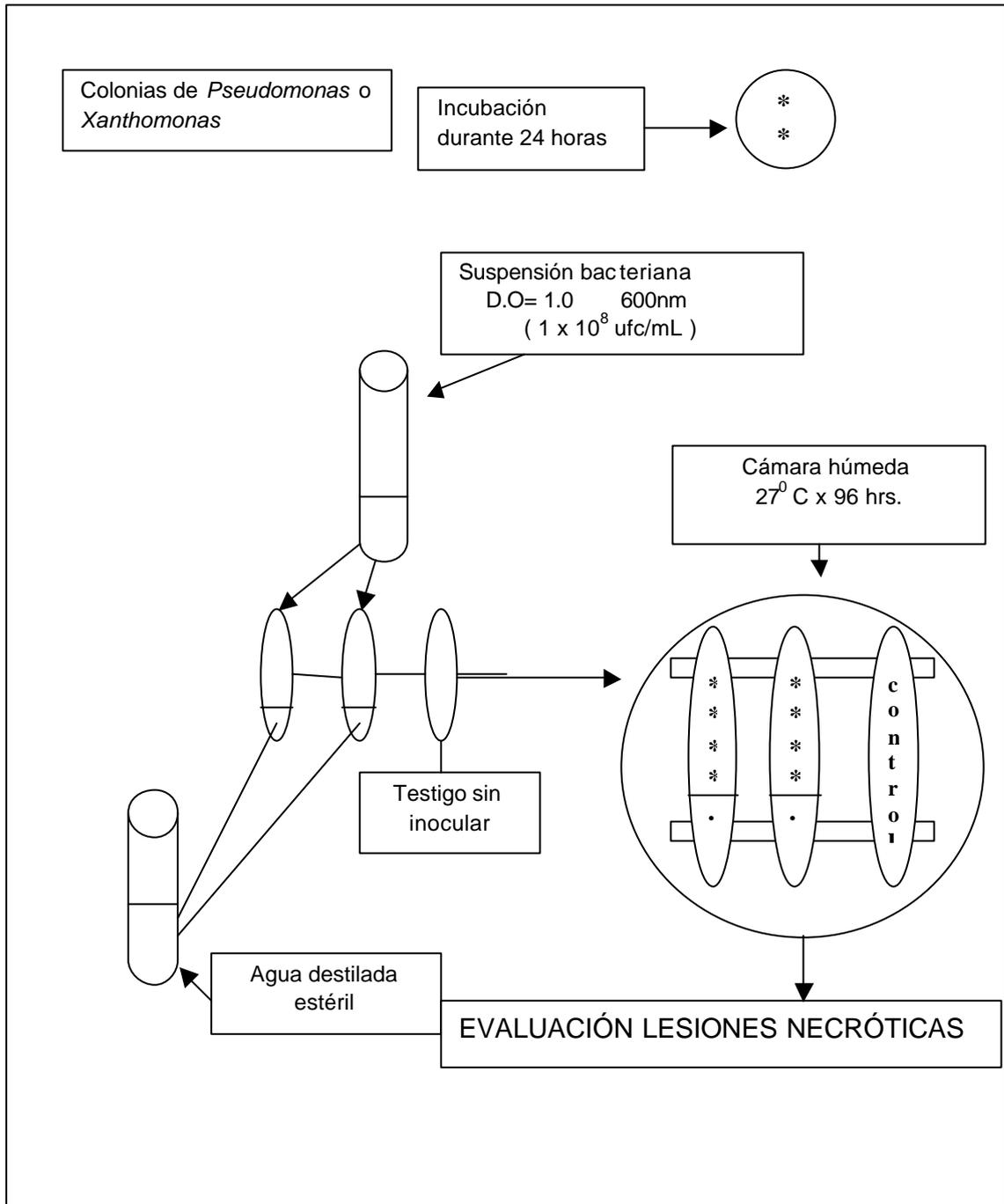
3.3.5.1 Prueba de virulencia en vainas de porotos verdes. Se adquirieron en un supermercado local vainas de porotos verdes y se seleccionaron aquellas aparentemente sanas. Es decir, que no presentaban síntomas y/o signos de enfermedad. Estas fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas en una solución de NaHOCl producto comercial “Clorinda” al 2% durante 3 min. Posteriormente, fueron enjuagadas en agua destilada estéril y secadas superficialmente con una toalla de papel absorbente estéril. Se seleccionaron tres vainas por cada cepa bacteriana a evaluar, las cuales se inocularon con una jeringa estéril de la siguiente forma:

Vainas 1 y 2: Sección superior (de inserción del pedúnculo) 4 puntos de inoculación equidistantes con 5  $\mu$ L de suspensión bacteriana y sección inferior 2 puntos de inoculación equidistantes con 5  $\mu$ L de agua destilada estéril.

Vaina 3: Sin inoculación (vaina control sin puntos de inoculación)

Las tres vainas fueron colocadas al interior de una cámara húmeda estéril. Esta se confeccionó con una placa Petri de 18 cm de diámetro conteniendo papel filtro humedecido con agua destilada en el fondo de la placa y sobre este, dos asas de vidrio para apoyar las vainas. La cámara se incubó en estufa de cultivo a 27° C durante 96 h (Figura 1).

Transcurrido este periodo se procedió a observar la presencia de lesiones necróticas en las zonas de inoculación, realizando posteriormente a partir de estas mismas el reaislamiento de la bacteria inoculada, en un medio de cultivo específico para estas.



**FIGURA 1** Esquema secuencial que ilustra las pruebas de virulencia realizadas en vainas verde de poroto utilizando cultivos puros bacterianos identificados como *Pseudomonas* o *Xanthomonas*.

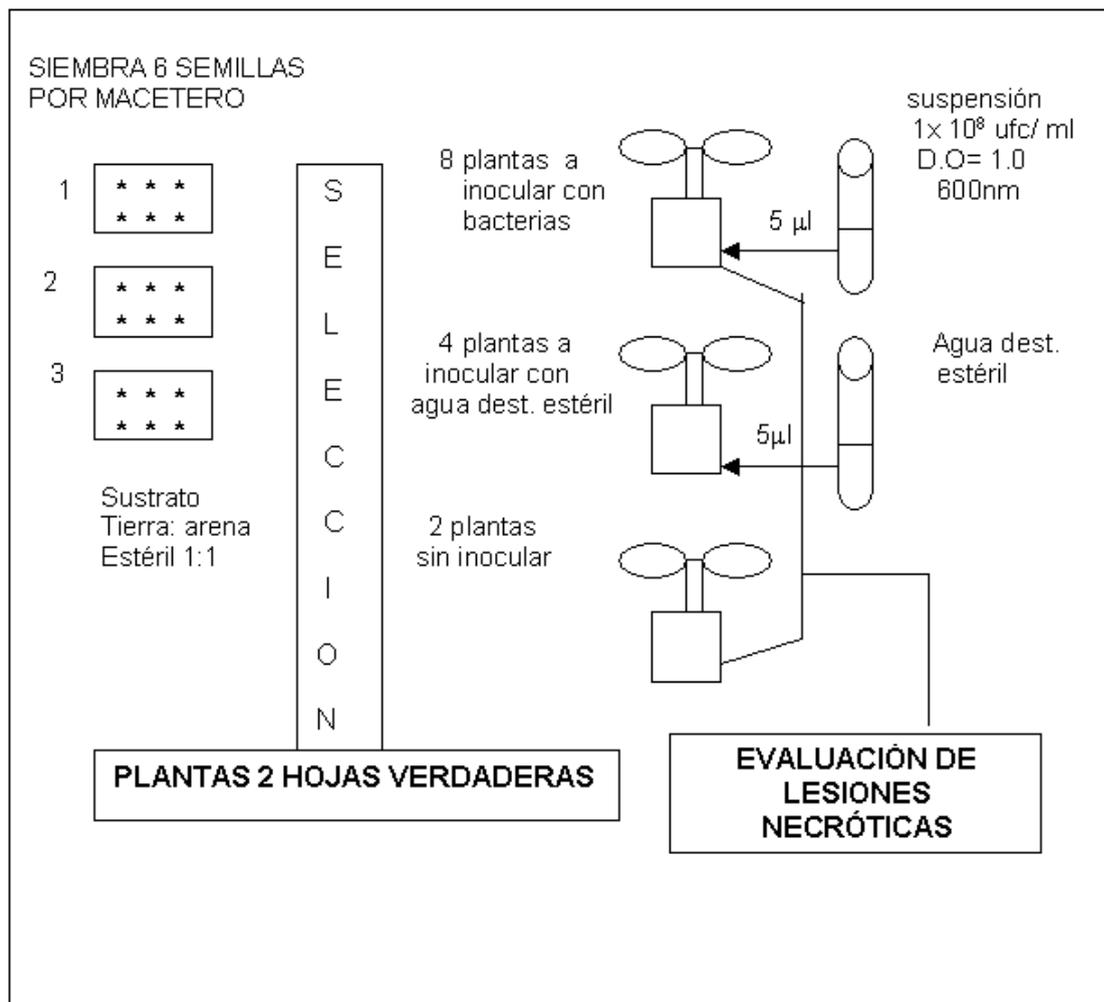
3.3.5.2 Prueba de virulencia en plantas de poroto. Para esta prueba se utilizaron las semillas de poroto provenientes de las mismas muestras desde las cuales se obtuvo el aislamiento de la cepa bacteriana. Estas habían sido mantenidas en almacenaje (3.3.1 Material y Método) en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Austral de Chile.

Se seleccionaron 18 granos de semillas aparentemente sanos para cada cepa bacteriana a evaluar, estos fueron sembrados en forma equidistante en tres maceteros disponiendo seis semillas en cada uno. Se utilizaron maceteros plásticos de 1 kg, previamente desinfectados con etanol al 70%, conteniendo una mezcla de tierra y arena (1:1) esterilizada por tindalización (tres esterilizaciones consecutivas en autoclave a 100°C por una hora al día)

Una vez sembradas las semillas en los maceteros, estos se mantuvieron a temperatura ambiente y luz natural sobre mesones ubicados en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, realizando riegos periódicos con agua corriente a capacidad de campo para favorecer la germinación de las semillas. Al momento que las plantas emergidas alcanzaron el estado de dos hojas verdaderas, se procedió a su inoculación con las cepas bacteriana a evaluar de acuerdo al procedimiento que se indica a continuación:

Del total de plantas desarrolladas en los tres maceteros se seleccionaron 12 plantas que presentaban los tallos más engrosados para facilitar su inoculación. De estas se seleccionaron ocho, las cuales se inocularon pinchando el tallo bajo el punto de inserción de las dos hojas con una jeringa estéril que contenía la suspensión de la cepa bacteriana. Las otras 4 fueron utilizadas como testigos inoculándolas de la misma forma con agua destilada estéril. Las restantes emergidas se utilizaron como testigo absoluto sin inocular.

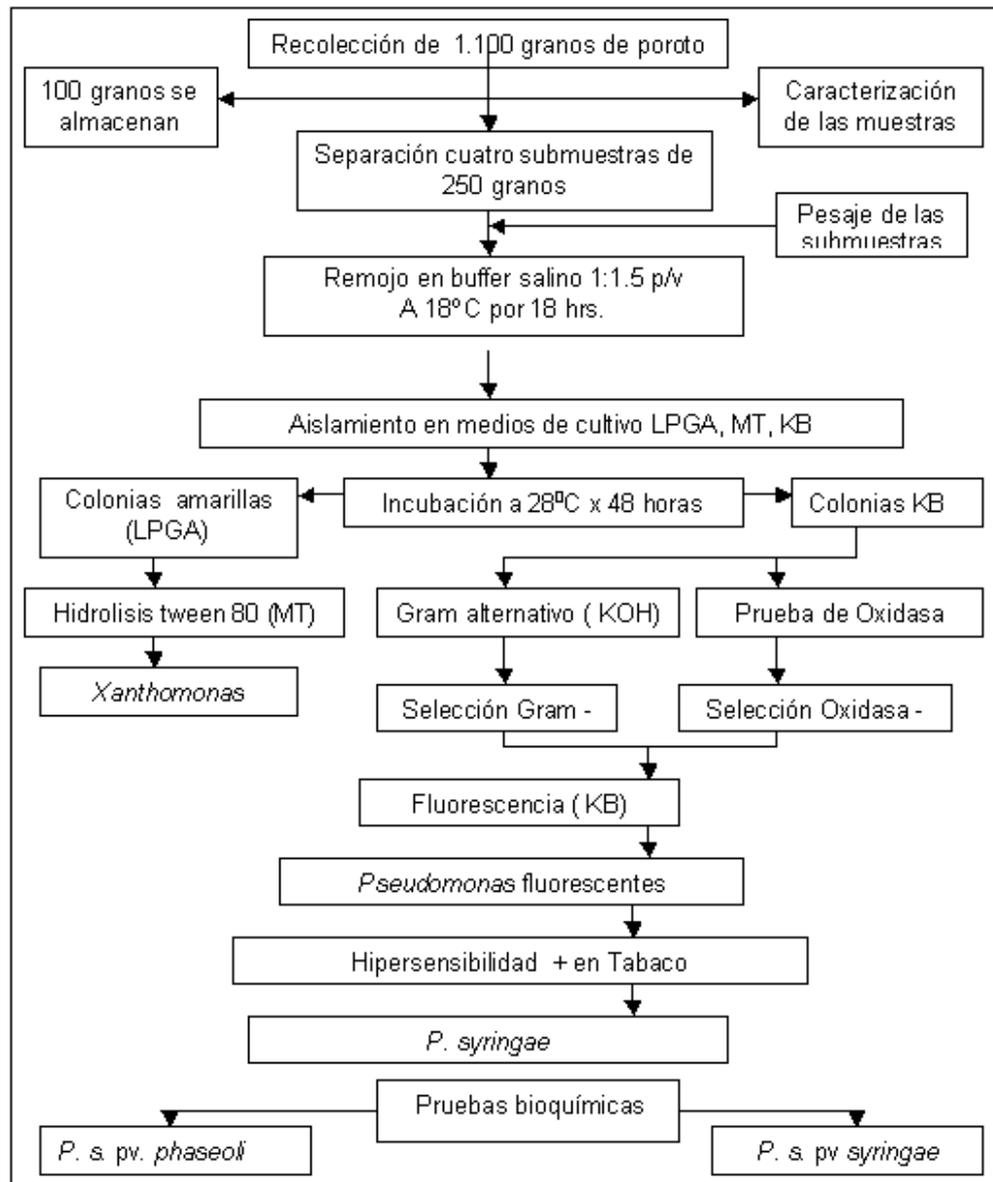
Una vez realizado este procedimiento, se observó periódicamente el desarrollo de lesiones necróticas en aquellas plantas inoculadas con las cepas bacterianas, realizando posteriormente a partir de las lesiones desarrolladas el reislamiento de la bacteria en medio de cultivo (Figura 2).



**FIGURA 2** Esquema secuencial que ilustra las pruebas de virulencia realizadas en plantas de poroto utilizando cultivos puros de aislamientos identificados como *Pseudomonas* o *Xanthomonas*.

3.3.5.3 Reaislamiento. A partir de las lesiones necróticas presentes en las vainas y plantas inoculadas, se procedió a reaislar en medio de cultivo utilizando el medio KB. Para este propósito se realizó un macerado del tejido infectado en agua destilada estéril, procediendo a sembrar una asada por estrías en placas Petri con este medio de cultivo, incubando las placas en estufa de cultivo a 27°C durante cinco días, después de este período se compararon las características originales de las colonias inoculadas con las que resultaron de la siembra.

En la Figura 3 se esquematiza y resume los pasos desarrollados en la presente investigación.



**FIGURA 3** Esquema demostrativo de los pasos seguidos en la presente investigación para identificar bacterias fitopatógenas asociadas a semilla de *Phaseolus* spp.

## 4 PRESENTACION DE RESULTADOS

**4.1 Caracterización de las muestras de semillas de porotos colectadas en la comuna de Valdivia.** Se colectaron un total de 10 muestras de semillas que comprendían ocho diferentes ecotipos de poroto provenientes de seis distintas localidades de la comuna de Valdivia. De estas, 3 provenían del predio Santa Rosa de la Universidad Austral en el sector norte de la ciudad de Valdivia y 3 de la localidad de las Gaviotas en el sector sur de la ciudad. Las restantes fueron obtenidas en forma individual del sector Cayumapu (sector norte de la ciudad), Santa Barbara (sector este de la ciudad), de la Isla del Rey y Cabo Blanco (sector oeste de la ciudad).

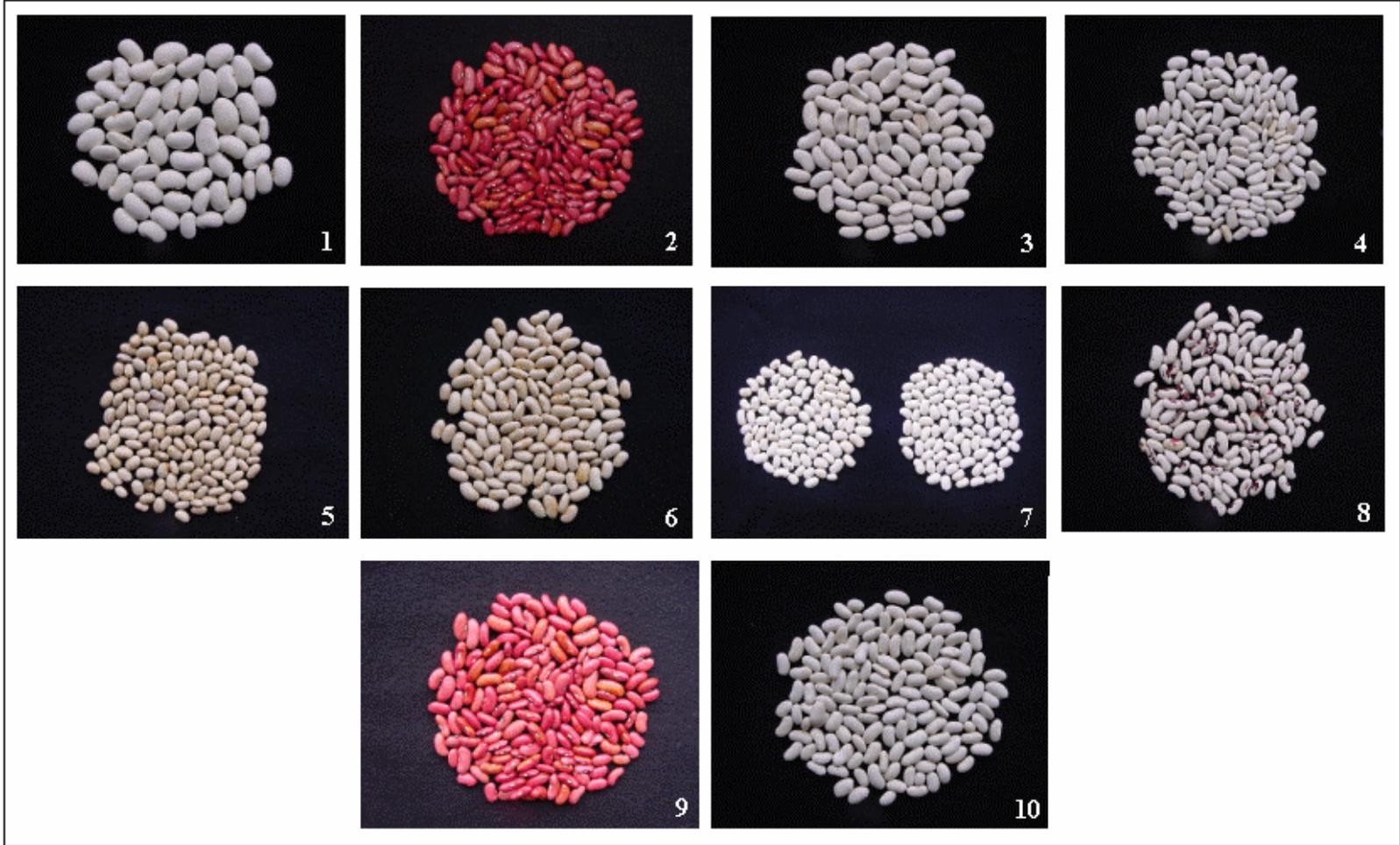
De las 10 muestras colectadas, se obtuvieron un total de 8 variedades o ecotipos diferentes destacando tres muestras del ecotipo “coyunda” provenientes de tres distintas localidades y dos líneas de selección provenientes del Programa de Mejoramiento Genético de la Estación Experimental Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile.

En el Cuadro 2 se describen el origen y ecotipos de las muestras de porotos colectadas en estas seis localidades, base del estudio de esta tesis.

Al realizar la caracterización morfológica de estas muestras se determinó diferencias marcadas en la coloración, tamaño y forma de los distintos ecotipos colectados, y el ecotipo coyunda no presentó ninguna diferencia morfológica en sus tres distintas localidades de origen. En la Figura 4 se aprecian las características morfológicas de las 10 muestras de semillas de porotos colectadas.

**CUADRO 2 Descripción de las muestras de semillas de porotos colectadas en la Comuna de Valdivia**

Nº	Lugar de origen		Ecotipo
	Muestra	Productor	
1	Guillermo Valenzuela	Cayumapu	Pallar
2	Universidad Austral	Sta. Rosa	Línea selección 204
3	Olga Pineda	Cabo Blanco	Coyunda
4	Nelly Barrientos	Sta. Barbara	Coyunda
5	Pascual Morales	Las Gaviotas	Apolo
6	Carlos Soto	Isla del Rey	Bayo
7	Universidad Austral	Sta. Rosa	Arroz
8	Nelson Ramirez	Las Gaviotas	Para verde
9	Universidad Austral	Sta. Rosa	Línea selección 3
10	Nelson Ramirez	Las Gaviotas	Coyunda



**FIGURA 4** Características morfológicas de las muestras de semillas porotos colectadas en 10 localidades de la comuna Valdivia

Las características de cada ecotipo se presenta el Cuadro 3. En este, es posible apreciar el color, la forma y tamaño promedio de cada uno de los ecotipos recolectados.

**CUADRO 3 Caracterización morfológica de las muestras de granos de semillas de porotos colectadas en la Comuna de Valdivia.**

Nº muestra	Ecotipo	Características morfológicas del grano de semilla		
		Color	Forma	Tamaño Promedio
1	Pallar	Blanco	Reniforme	2.0 x 0.9 cm
2	Línea selección 204	Granate	Reniforme	1.4 x 0.6 cm
3	Coyunda	Blanco	Reniforme	1.5 x 0.7 cm
4	Coyunda	Blanco	Reniforme	1.5 x 0.6 cm
5	Apolo	Café claro	Reniforme	1.3 x 0.5 cm
6	Bayo	Cafe claro	Reniforme	1.2 x 0.7 cm
7	Arroz	Blanco	Oval	0.6 x 0.4 cm
8	Para verde	Blanco -morado	Reniforme	1.3 x 0.5 cm
9	Línea selección 3	Granate	Reniforme	1.3 x 0.6 cm
10	Coyunda	blanco	Reniforme	1.5 x 0.8 cm

En el Cuadro 3 se observa que el ecotipo Pallar presenta el mayor tamaño de grano, mientras que arroz el menor. Por otra parte, los restantes ecotipos presentan cifras similares y solo varían en el color de la testa.

#### **4.2 Procesamiento de las muestras.**

En las 10 muestras de semillas de porotos colectadas no se detectaron ni síntomas ni signos atribuibles a posibles agentes fitopatógenos asociados a éstas, observándose todas aparentemente sanas.

En el Cuadro 4 se presentan los valores de las 10 muestras de semillas de porotos analizadas, basado en estos se obtuvo el volumen promedio de buffer salino utilizado para la extracción de las bacterias presentes en cada una de estas muestras. Este correspondió a 1, 5 veces el peso de la semilla con el propósito de mantener una relación constante peso/volumen de cada muestra.

**CUADRO 4 Peso promedio de 250 granos de semillas y volumen promedio de buffer salino utilizado en la extracción de bacterias fitopatógenas de 10 muestras de semillas de porotos colectadas en la comuna de Valdivia.**

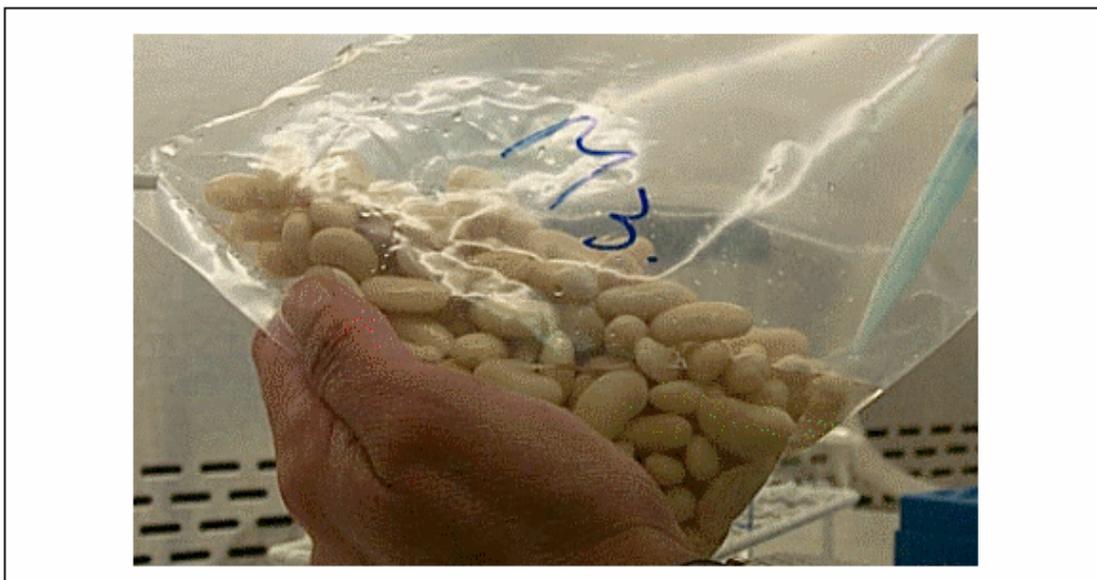
	Numero de la muestra									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peso de 250 granos de semillas (gr)	197,7	108,1	140,9	148,4	132,5	130,1	57,8	126,8	113,4	115,5
Volumen de buffer salino (mL)	296,6	162,1	211,4	222,6	198,7	195,2	86,6	190,3	170,1	173,3

Del Cuadro 4 se concluye que la muestra 1 presenta el mayor peso promedio de 250 granos de semillas. También es coincidente con el mayor tamaño de las semillas, las que corresponden al ecotipo "Pallar" descrito en el Cuadro 3. Por otra parte, la muestra 7 presenta el menor peso promedio de 250 granos correspondiendo esta al ecotipo arroz descrito en el Cuadro 3. Las muestras 3, 4 y 10 corresponden al ecotipo Coyunda, sin embargo, la muestra 10 presenta un menor peso promedio en relación a las muestras 3 y 4 del

mismo ecotipo. Los restantes ecotipos analizados presentan valores intermedios en el peso promedio de los 250 granos de semillas.

El detalle de los pesos y volúmenes de buffer obtenidos en cada una de las submuestras y muestras analizadas se presentan en el Anexo 8.

Cabe señalar que finalizado el periodo de remojo de las semillas de todas las submuestras en el buffer salino, no se visualizó diferencias en la coloración y consistencia de los extractos obtenidos en cada una de ellas. En la Figura 5 se aprecia la aplicación de buffer salino a una de las submuestras procesadas.



**FIGURA 5 Extracción de bacterias fitopatógenas a partir de las muestras de semillas de poroto remojadas en buffer salino. (No se observan alteraciones en la consistencia del buffer).**

#### **4.3 Aislamiento obtenidos a partir de los extractos salinos de semillas de porotos.**

De acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.3 de Material y Método, se procedió a determinar a las 48 y 72 h, la presencia de colonias bacterianas en los aislamientos realizados sobre los distintos medios de cultivos utilizados.

Sobre el medio LPGA no se obtuvo crecimiento de colonias bacterianas en ninguno de los extractos de todas las submuestras y muestras analizadas, sin observarse además desarrollo de ningún tipo de microorganismo sobre este medio de cultivo.

Sobre el medio MT (semiselectivo para bacterias del género *Xanthomonas*) solo se desarrollaron colonias bacterianas a partir de los aislamientos de la muestra 3 (submuestra 1 y 3). Estas se caracterizaban por presentar una coloración blanquecina que no corresponde a la descrita para las colonias del género *Xanthomonas*. Al realizarles además la prueba de la oxidasa, todas éstas resultaron positivas, siendo descartadas como probables fitopatógenas para este estudio. Por lo que se concluyó que todos los aislamientos realizados sobre este medio de cultivo resultaron negativos.

Finalmente, el medio KB permitió detectar un mayor número de colonias bacterianas, las cuales se observaron a las 48 h de crecimiento sobre este medio de cultivo. Del total de muestras analizadas sobre este medio, sólo la muestra N°5 no presentó desarrollo. En el Cuadro 5 se presentan el total de colonias bacterianas obtenidas en todas las diluciones, a partir de los extractos de las 10 muestras analizadas.

**CUADRO 5 Número total de colonias bacterianas obtenidas sobre medio KB a partir de las 10 muestras de semillas de poroto en la comuna de Valdivia**

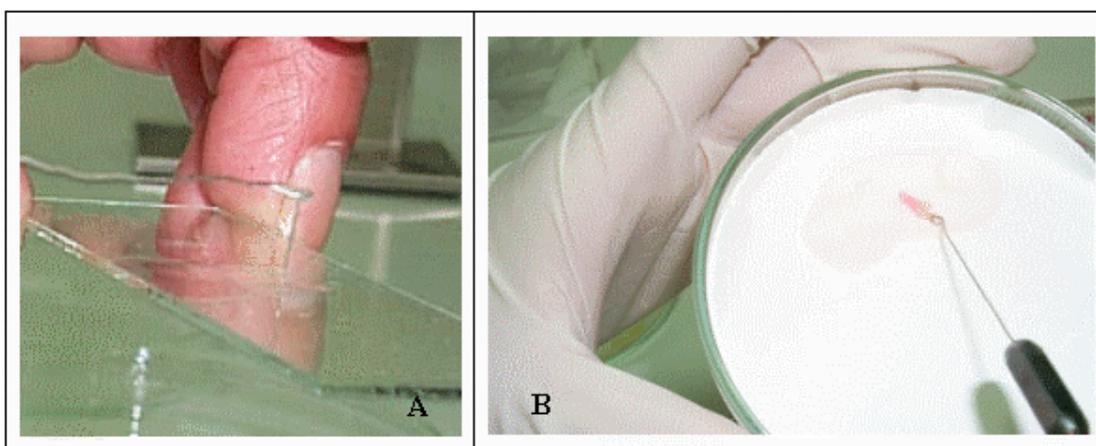
Nº muestra	Nº de colonias bacterianas por dilución			
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	3	2	1	0
2	59	5	0	0
3	CM	63	22	3
4	CM	78	27	1
5	0	0	0	0
6	CM	82	25	6
7	46	19	6	2
8	7	1	0	0
9	68	22	5	0
10	6	5	4	0

CM= Contaminación masiva

En este cuadro se observa que las muestras 3, 4 y 6 presentan el mayor número de colonias bacterianas desarrolladas, obteniéndose en la dilución  $10^{-1}$  un gran número (contaminación masiva) lo que imposibilitó su conteo. Por otra parte, las muestras 1, 8 y 10 presentan un escaso número de bacterias asociadas a la semilla. Cabe señalar que en el recuento de colonias desarrolladas en cada dilución y muestra en duplicado se contabilizaron todas las colonias presentes. En algunas diluciones se presentaron más de un tipo de colonias, por lo cual se procedió más adelante a separarlas en base a su reacción a la prueba de la oxidasa y Gram alternativo.

#### 4.4 Identificación de las colonias bacterianas obtenidas.

Todas las colonias bacterianas obtenidas en medio KB (Cuadro 5) fueron sometidas a la prueba de la oxidasa y Gram (KOH), a excepción de las placas con contaminación masiva presentes en la dilución  $10^{-1}$  (muestras 3, 4 y 6). Todas aquellas colonias que resultaron oxidasa + y Gram + positivas fueron descartadas como probables bacterias fitopatógenas para este estudio (Figura 6)



**FIGURA 6** Reacción Gram Positivo (KOH) (A) y oxidasa positivo (B) en colonias bacterianas aisladas en medio KB a partir de semillas de poroto y descartadas como probables fitopatógenas.

De acuerdo a los resultados descritos anteriormente, se seleccionaron sólo aquellas colonias que resultaron oxidasa negativas y Gram negativas como probables fitopatógenas. El número de colonias por dilución que presentaron estas dos características se presenta en el Cuadro 6.

De acuerdo a los resultados presentados en el Cuadro 6, las colonias bacterianas desarrolladas a partir de las muestras 2 y 8 fueron descartadas en

estas pruebas, por lo que ambas muestras de semillas resultaron negativas a bacterias fitopatógenas. Por su parte las muestras 1, 7, 9 y 10 presentaron solo algunas colonias bacterianas sospechosas, mientras que otras colonias presentes en estas muestras fueron descartadas.

**CUADRO 6 Número total por dilución de colonias oxidasa negativo y Gram negativo sobre medio KB**

Nº muestra	Nº de colonias Gram negativas y oxidasa negativa por dilución			
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	0	1	0	0
2	0	0	0	0
3	CM	63	22	3
4	CM	78	27	1
5	0	0	0	0
6	CM	82	25	6
7	26	4	2	0
8	0	0	0	0
9	31	5	0	0
10	3	1	0	0

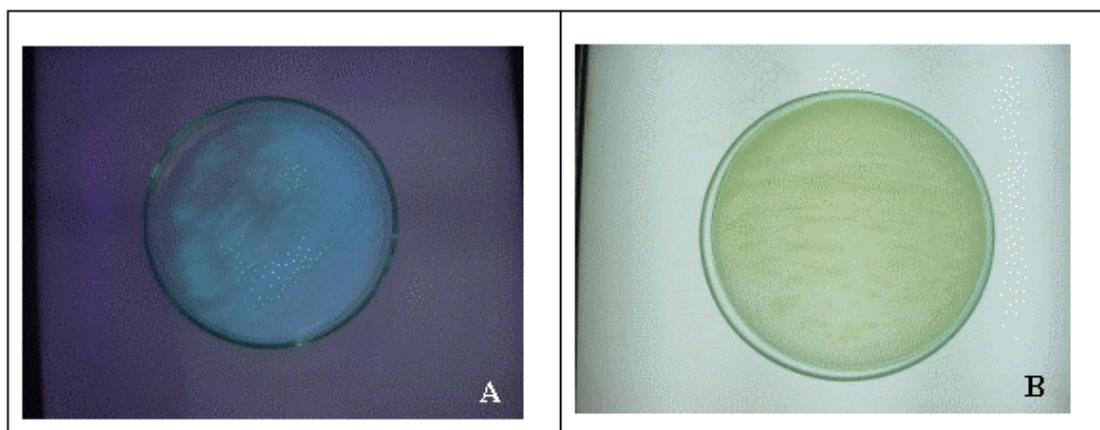
CM= Contaminación masiva

Finalmente las muestras 3, 4 y 6 siguen presentando el mismo número de colonias bacterianas sospechosas ya que todas éstas resultaron ser Gram negativas y oxidasa negativa quedando todas seleccionadas para las pruebas de identificación posteriores.

Posteriormente, continuando con el proceso, a todas las colonias seleccionadas sobre medio KB (Gram negativas, oxidasa negativas), se les practicó la prueba de fluorescencia con el objeto de identificar aquellas

pertenecientes al género *Pseudomonas* productoras de pigmentos fluorescentes.

En la Figura 7 se presenta la producción de pigmentos fluorescentes sobre medio KB en aquellas colonias de *Pseudomonas* seleccionadas como probables fitopatógenas.



**FIGURA 7** Placas de Agar B de King. Bajo luz ultravioleta (A) y bajo luz normal (B).

En el Cuadro 7 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de fluorescencia sobre medio KB para las colonias oxidasa y Gram negativas obtenidas sobre este medio de cultivo.

Los resultados obtenidos en esta prueba, permitieron determinar que todas las colonias bacterianas presentes en las muestras 3, 4, 6 y 10 son productoras de pigmentos fluorescentes y todas fueron identificadas como *Pseudomonas* fluorescentes. Todas presentaban, además, las mismas características morfológicas caracterizándose por su coloración blanco crema opalescente y bordes lisos. Al realizarles la tinción con cristal violeta, se observaron en todas las preparaciones bajo microscopio bacilos móviles. Basado en estos resultados se procedió a seleccionar un aislamiento de

*Pseudomonas* fluorescente del total de colonias de cada una de las cuatro muestras, nominándose estas como cepas números 3,4,6 y 10 las cuales fueron utilizadas para las pruebas de identificación posteriores.

**CUADRO 7 Número total de colonias *Pseudomonas* spp. fluorescentes presentes en las muestras de semillas de poroto.**

Nº muestra	Nº de colonias productoras de pigmentos fluorescentes			
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	CM	63	22	3
4	CM	78	27	1
5	0	0	0	0
6	CM	82	25	6
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	3	1	0	0

CM= Contaminación masivas

#### **4.5 Pruebas de laboratorio para la determinación de *Pseudomonas* fluorescentes fitopatógenas de porotos.**

A partir de los cultivos puros de 24 h de edad de las cuatro cepas de *Pseudomonas* fluorescentes (3, 4, 6 y 10), se realizaron las pruebas de hipersensibilidad en tabaco de acuerdo a lo descrito en el punto 3.3.4 del Material y Método. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que las cuatro cepas evaluadas provocaron la reacción de hipersensibilidad en tabaco la cual fue caracterizada por la presencia de lesiones necróticas circunscritas a

los puntos de inoculación de las hojas, después de 24 h de inoculación tal como se aprecia en la Figura 8.



**FIGURA 8** Reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco var. Samsung inoculadas con la cepa 3, 4, 6 y 10 de *Pseudomonas fluorescentes*. (Notese el colapso de tejidos alrededor de la zona de inoculación).

Basado en estos resultados se comprobó que las cuatro cepas obtenidas de las muestras 3, 4, 6 y 10 corresponden a *Pseudomonas syringae*.

Con el objeto de determinar los patovares de las cuatro cepas de *P. syringae* identificadas en las muestras 3, 4, 6 y 10 se realizaron pruebas bioquímicas de utilización de fuentes de carbono, y las pruebas de levano y

esculina (3.3.4 Material y Método) En el Cuadro 8 se presentan los resultados de estas pruebas.

**CUADRO 8 Resultados de las pruebas de utilización de carbono, levano y esculina en las cepas de *Pseudomonas syringae* 3, 4, 6 y 10.**

Pruebas	Reacción			
	Aislamientos de <i>P.syringae</i>			
	3	4	6	10
Producción de Levano	+	+	+	+
Hidrólisis de Esculina	+	+	+	+
Utilización de :				
Inositol	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Tartrato	-	-	-	-

+ = Reacción positiva    - = Reacción negativa

Los resultados obtenidos en estas pruebas bioquímicas demuestran que las cuatro cepas de *P. syringae* utilizadas en este ensayo (3, 4, 6 y 10) presentan las mismas reacciones. Todas corresponden a *P. s. pv. syringae* de acuerdo a las características descritas en estas pruebas por NOVAL (1991b) y SCHAAD (1994) para este patovar y definidas en el Cuadro 1 del Material y Método

#### 4.6 Resultados de las pruebas de virulencia.

Las cuatro cepas de *P. syringae* pv. *syringae* identificadas (3,4, 6 y 10), fueron mantenidas como cultivos puros y llevadas al Laboratorio de Fitopatología Vegetal de la Universidad Austral de Chile en la ciudad de

Valdivia, para realizar las pruebas de virulencia en vainas verdes y plantas de poroto (3.3.5 Material y Método).

**4.6.1 Pruebas de virulencia en vainas verdes de poroto.** Una vez realizada la inoculación de las vainas verdes de porotos con las cuatro cepas de *P.s. pv. syringae* (3, 4, 6 y 10) se evaluó la presencia de lesiones necróticas a las 96 h sobre los puntos de inoculación (3.3.5.1 Material y Método). En el Cuadro 9 se presentan los resultados de esta prueba para cada una de estas cepas. En este se indica la reacción obtenida en dos vainas con cuatro puntos de inoculación con inóculo y dos puntos de inoculación con agua destilada estéril y la respuesta de una vaina intacta sin inocular (control).

**CUADRO 9 Resultados de la prueba de virulencia en vainas verdes de poroto con cuatro cepas de *P. s. pv. syringae*.**

Cepa <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Vaina 1		Vaina 2		Vaina 3 Intacta
	Con inóculo	Sin inóculo	Con inóculo	Sin inóculo	
3	++++	- -	++++	- -	-
4	++++	- -	++++	- -	-
6	++++	- -	++++	- -	-
10	++++	- -	++++	- -	-

+ = Presencia de lesiones necróticas

- = Ausencia de lesiones necróticas

Los resultados obtenidos en esta prueba demostraron la virulencia de las cuatro cepas de *P.s. pv. syringae* sobre vainas verdes de porotos, en todos los casos fue posible observar que las cuatro cepas de este patógeno produjeron lesiones necróticas de coloración café de tamaño similar (aproximadamente 1 cm de diámetro) en todos los puntos de inoculación, tal como se observa en la Figura 9.



**FIGURA 9** Vainas de porotos inoculadas con la cepa 3 de *P. syringae* pv. *syringae*. (Se aprecia lesiones necroticas y nivel de virulencia en los cuatro puntos de inoculación de la vaina 1 y 2 ).

En la Figura 9 los dos puntos de inoculación con agua destilada estéril (testigos) de la vaina 1 y 2 no arrojaron presencia de lesiones necróticas. La misma situación fue observada en la vaina 3 sin inocular utilizada como testigo absoluto demostrándose la ausencia de este patógeno. La misma reacción y respuesta, fue observada en las cuatro cepas evaluadas.

**4.6.2 Pruebas de virulencia en plantas de poroto.** Una vez realizada la inoculación de las plantas de porotos con las cuatro cepas de *P.s. pv. syringae* (3, 4, 6 y 10) de acuerdo a lo descrito en el punto 3.3.5.2 Material y Método se evaluó la presencia de lesiones necróticas en los puntos de inoculación con el

patógeno. Al cabo de los 13 días posteriores a la inoculación se constató la presencia de lesiones necróticas en los puntos de inoculación con las cepas bacterianas. En el Cuadro 10 se presentan los resultados obtenidos en las pruebas de virulencia realizadas en plantas de porotos.

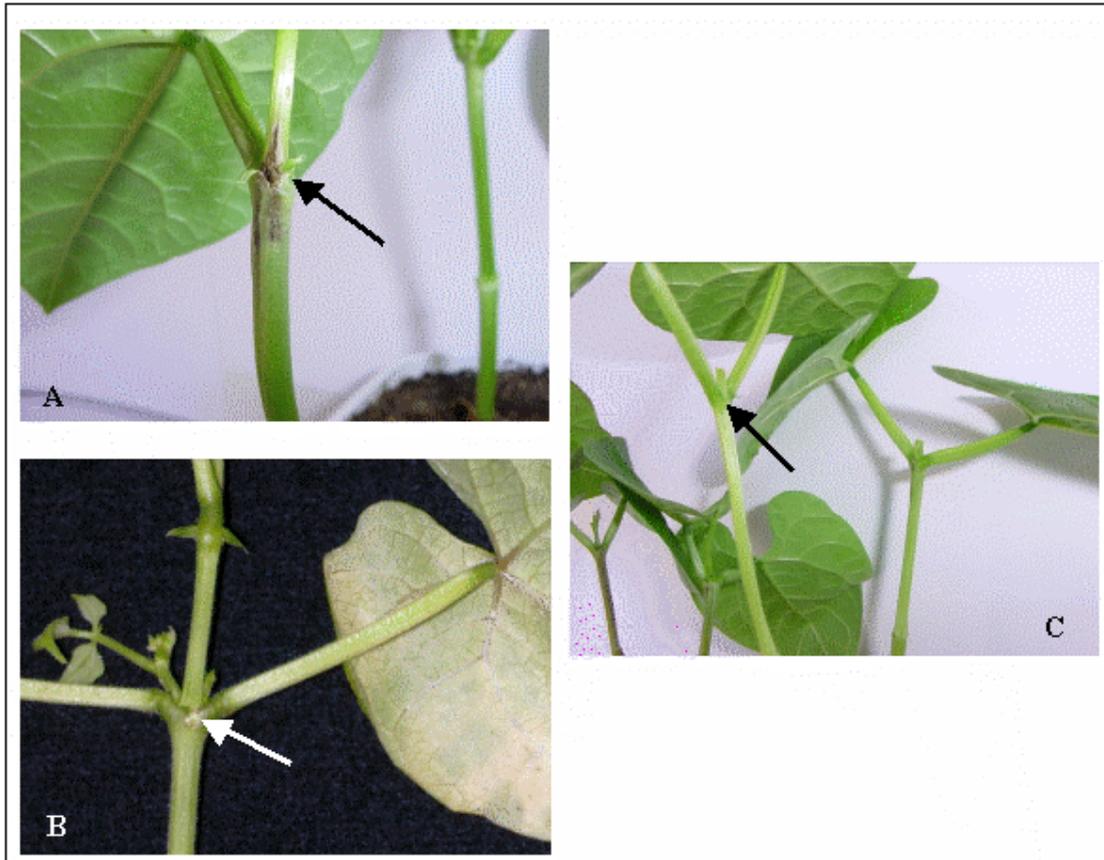
**CUADRO 10 Resultados de la prueba de virulencia en plantas de poroto con cuatro cepas de *P. S. pv. syringae***

Cepa <i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Plantas con inóculo								Plantas sin inóculo				Plantas intactas	
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	1	2
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+ = Presencia de lesiones necróticas

- = Ausencia de lesiones necróticas

En el Cuadro 10 se puede observar que las cuatro cepas de *P.s. pv. syringae* dieron reacción positiva, la cual se tradujo en la producción de manchas necróticas de color café alrededor de los puntos de inoculación. La inoculación de cuatro plantas con agua destilada estéril, dio reacción negativa, no observándose en ninguna de ellas necrosis en o en los alrededores del punto de inoculación. Las dos plantas utilizadas como testigos absolutos (plantas intactas) tampoco presentaron síntomas de la enfermedad (Figura 10).



**FIGURA 10** Plantas de porotos inoculadas con la cepa 3 de *P. s. pv syringae*, agua destilada estéril y testigo absoluto. (Se aprecia lesiones necróticas en el punto de inoculación con la cepa (A), ausencia de necrosis en el punto de inoculación con agua destilada (B) y ausencia total de lesiones en el testigo absoluto (C)).

#### 4.7 Reaislamiento de *P. s. pv. syringae*.

A partir de las lesiones necróticas producidas por la cepa 3, 4, 6, y 10 de *P.syringae* pv. *syringae* sobre las vainas y las plantas de poroto se realizaron aislamientos desde el tejido afectado sobre medio KB. A partir de estos aislamientos y al cabo de 5 días de incubación a 27<sup>0</sup> C se desarrollaron

colonias blancas, opalescentes, de bordes lisos, productoras de pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta, Gram y oxidasa negativa determinándose que estas características y las propiedades bioquímicas de estas colonias corresponden a las descritas para las cepas inoculadas. De esta forma, se comprobó que las lesiones necróticas observadas sobre vainas y plantas de porotos fueron producidas por las cuatro cepas de *P.s. pv. syringae* aisladas en este estudio, verificándose su virulencia y confirmándose su identidad.

## 5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cultivo del poroto en la comuna de Valdivia, constituye una actividad agrícola relevante para el pequeño productor. Es así como en las seis localidades muestreadas de esta comuna fue posible obtener semillas de poroto de pequeños productores (Cuadro 2). Según los dueños de los predios muestreados, esta semilla corresponde en la mayoría de los casos, a producción propia y multiplicada por muchos años por ellos mismos.

Cabe destacar que la producción de porotos para verde y seco está arraigada en la actividad agrícola familiar de esta comuna, tanto para el autoconsumo o también como una fuente de ingreso familiar alternativa. Esto se logra utilizando como semilla aquella obtenida de la propia cosecha o del intercambio entre los productores de esta zona, abasteciéndose excepcionalmente del mercado formal de semillas (KRARUP, 1980 y LITTLE,R<sup>1</sup>)

Lo anterior constituye un riesgo fitosanitario para este rubro, ya que la falta de renovación de semillas y el uso de los granos cosechados como semilla facilitarían la perpetuación de problemas fitosanitarios asociados a esta. Esto queda demostrado por los resultados obtenidos, los que señalan la presencia de bacterias fitopatógenas en las muestras analizadas ( Cuadro 8).

A este respecto, ALVAREZ *et al.* (1979) señalan que la semilla es uno de

---

<sup>1</sup> LITTLE,R.2003.Ing.Agr. INDAP, VALDIVIA. Comunicación personal

los principales medios de distribución y diseminación de enfermedades bacterianas que afectan al poroto. Constituyéndose estas patologías, como uno de los principales problemas fitosanitarios de este cultivo.

Según SCHWARTZ (2001), la siembra de semilla no certificada de poroto contribuye a la gravedad de las enfermedades bacterianas, debido a la capacidad de estos patógenos de ser transmitidos por la semilla. Lo anterior, se torna más grave, puesto que la semilla puede estar contaminada, sin síntomas aparentes, y de esta forma, la infección es latente y pasa desapercibida. En este trabajo se analizó un conjunto de muestras asintomáticas, todas provenientes de pequeños agricultores, de ellas cuatro resultaron contaminadas con bacterias fitopatógenas.

Existe poca información respecto a la presencia de bacterias fitopatógenas transmitidas por semillas que afectan los cultivos de porotos en la zona de Valdivia. Al respecto un estudio realizado por DUBIN y CIAMPI (1974) señala la presencia de *Pseudomonas phaseolicola* en huertas caseras de la ciudad de Valdivia, la cual fue aislada a partir de plantas con síntomas de halo sobre las hojas. La enfermedad habría estado presente por varios años en esta localidad y su origen estaría asociado a semilla local de diversas procedencias de la zona de Temuco. Anteriormente sólo *Xanthomonas phaseoli* habría sido observada en esta zona pero es posible que estas dos bacterias fitopatógenas hayan estado presentes en esta localidad (PINTO, 1969). En esta ocasión, estas dos especies no fueron detectadas, a pesar que los métodos de aislamiento e identificación habrían revelado su presencia.

En la actualidad, sólo se contaba con identificaciones de bacterias fitopatógenas basado a partir de plantas con síntomas de la enfermedad. La

condición fitosanitaria respecto a estos patógenos en la semilla de esta zona hasta ahora no se había realizado.

Si se considera la importancia de la semilla como posible fuente de inóculo de estas enfermedades y el impacto económico que estas tienen sobre la producción de este cultivo, es de vital importancia conocer la condición sanitaria de la semilla respecto a la presencia de estos patógenos.

Determinar la presencia de estos agentes en la semilla previo a la siembra permitiría aplicar medidas de control oportunas que eviten la diseminación de estas enfermedades en esta zona, privilegiando como medida de control la utilización de semillas libre del patógeno, las cuales han sido inspeccionadas durante su proceso de producción (SAETTLER, 1991).

Por lo anterior, este trabajo de tesis, tuvo como objetivo principal determinar la presencia de enfermedades bacterianas asociadas a la semilla de poroto producida en la comuna de Valdivia durante la temporada 2002-2003.

El presente trabajo consistió preliminarmente en la recolección de diez muestras de la comuna de Valdivia, detectándose diferentes variedades y ecotipos locales de porotos utilizados en esta zona (Cuadro 3) destacando el ecotipo "Coyunda" como el más común en esta zona.

Existe mucha confusión respecto a la identidad de las variedades de porotos utilizadas en Chile. Según GIACONI (1990) existe una enorme cantidad de variedades que, además, son conocidas bajo diferentes denominaciones según las zonas en que se cultivan. Por lo anterior, es probable que algunos de los ecotipos y variedades caracterizadas morfológicamente en este trabajo y nominadas de acuerdo a la información proporcionada por los propios productores (Cuadro 3) sean conocidas en otras zonas bajo otra identidad. A

modo de ejemplo se puede señalar que la variedad “Apolo” descrita en la muestra 5 no correspondería morfológicamente a la variedad original producida por INIA, la cual se caracteriza por presentar una forma aplastada y coloración café rosácea con estrías (GIACONI, 1990).

Las muestras de semillas de porotos utilizadas en este estudio no presentaban síntomas ni signos evidentes de posible daño producido por bacterias fitopatógenas. Estas se observaron aparentemente sanas. Esto no significó que las semillas estuvieran libres de estos patógenos. Al respecto Baker (1972) citado por MAUDE (1996) señalan que las bacterias y hongos fitopatógenos transmitidos por semilla pueden o no mostrar síntomas sobre éstas.

Según Lelliot (1988) citado por MAUDE (1996) en *X. c. pv. phaseoli*, la infección sistémica de la planta puede llegar al interior de la semilla sin la producción de síntomas externos de la enfermedad. Mientras que en *P. s. pv. syringae* la bacteria puede también sobrevivir sobre la semilla de porotos, por lo que lotes de semilla no certificada pueden llevar la infección e introducirla a nuevas áreas en forma inadvertida (DILLARD y LEGARD, 1991).

Por lo anterior, el método de aislamiento de bacterias fitopatógenas a partir de los extractos de semilla en buffer salino aplicados en este trabajo (Cuadro 4), resulta más confiable para la detección y prevención de estos agentes. Esto es comparado con la observación y aislamiento directo a partir de síntomas presentes en las semillas, ya que en este último caso pudieran no detectarse infecciones latentes presentes en las muestras a analizar. Esta situación quedó corroborada al visualizar los extractos de las diez muestras de semillas analizadas ( Figura 5), ya que ninguno de ellos manifestó alteraciones en su consistencia o turbidez que hicieran presumir la presencia de bacterias

fitopatógenas en las muestras analizadas. A pesar de ello, se detectaron bacterias fitopatógenas en cuatro de las diez muestras.

La utilización de estos extractos para el aislamiento de bacterias fitopatógenas de porotos, permitió comprobar la ausencia de bacterias del género *Xanthomonas* en las diez muestras analizadas. El uso del medio semiselectivo MT permitió aislar bacterias en un rango restringido. Según GOSZCZYNSKA y SERFONTEIN (1998), sobre este medio, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (= *X.c. pv. phaseoli*, ISTA, 1999) produce colonias amarillas, circulares no fluorescentes, con dos zonas que rodean la colonia, una gran zona clara debido a la hidrólisis de la caseína y otra pequeña debido a la hidrólisis del tween 80; colonias con estas características no fueron aisladas en este estudio, lo que no implica que pudieran estar presentes en la zona, solo que no estaban en las muestras analizadas, por ello se hace necesario tomar un mayor número de localidades para el análisis.

Cabe señalar además, que sobre este medio de cultivo, sólo se desarrollaron colonias bacterianas oxidasa positiva en una de las muestras analizadas (muestra 3), las cuales fueron descartadas como probables fitopatógenas, ya que no existen bacterias oxidasa positivas fitopatógenas de porotos (BRADBURY, 1986).

La fuerte inhibición en el desarrollo de colonias bacterianas sobre este medio de cultivo, estaría asociada a la presencia de tres antibióticos en la formulación del medio (cephalexina, cicloheximida y vancomicina) cuyo espectro de acción está dirigido a la inhibición de bacterias Gram positivas, sin ejercer un efecto inhibitorio sobre las colonias Gram negativas de *X. campestris* pv. *phaseoli*. De acuerdo a estos antecedentes la utilización del medio MT resulta ser un sustrato efectivo para una discriminación rápida y selectiva de la presencia de *X. c. pv. phaseoli* en extractos de semillas de porotos.

Una situación similar se presentó en los aislamientos realizados sobre medio LPGA, en el cual del total de muestras analizadas, no se desarrollaron, colonias bacterianas de ningún tipo. Este medio de cultivo también fue utilizado para el aislamiento y diferenciación de colonias de *X. c. pv. phaseoli*, si bien es definido como un medio general para bacterias, sobre este medio de cultivo *X. c. pv. phaseoli* exhibe su forma más característica<sup>1</sup>.

Con relación a este punto, es importante resaltar que en esta tesis, sólo se analizó las semillas guardadas y seleccionadas por el agricultor, las cuales estaban aparentemente sanas. Sin embargo, se desconoce o no se tienen antecedentes sobre la incidencia de bacterias durante el cultivo en la misma temporada.

Respecto a lo anterior, cabe destacar que según los datos proporcionados por el Instituto de Geociencias de la Universidad Austral de Chile para la temporada 2002 - 2003, a temperatura (Anexo 9), precipitación (Anexo 10) y humedad relativa (Anexo 11), fueron normales, con valores similares a los de las medias históricas.

Así mismo, las condiciones de almacenamiento de las semillas fueron las habituales en agricultores cuidadosos, en bodegas libres de humedad, sobre o en sacos de tela, alejados del suelo, con el fin de no exponerlas a ataques de hongos.

---

<sup>2</sup>VEGA, E. 2003. Ing. Agr. Laboratorio SAG Lo Aguirre. Comunicación Personal

Es sabido y conocido que el agricultor, por instinto, realiza una selección de semillas basado en criterios de calidad, descartando vainas enfermas. Por lo tanto, la ausencia de *X. c.pv. phaseoli*, puede explicarse por dos aspectos, uno, la selección que hace el productor, y dos, que la incidencia de la enfermedad en la temporada haya sido baja, ya que como se dijo anteriormente esta se encuentra identificada en la zona desde 1968 (PINTO, 1969).

Por lo anterior, el no desarrollo de colonias bacterianas en todas las muestras analizadas sobre medio LPGA, corroboró lo observado en el medio MT, comprobando definitivamente la ausencia de *X. c. pv. phaseoli* en todas las muestras de semillas analizadas en este estudio.

Una situación diferente se obtuvo en los aislamientos realizados sobre medio KB. La utilización de este medio, tuvo como objetivo detectar la presencia de pigmentos fluorescentes. Esta propiedad constituye una característica fenotípica para la identificación de especies fitopatógenas del género *Pseudomonas* (NOVAL, 1991b). Dentro de estas especies, se reconocen como fitopatógenas de porotos *P. s. pv. syringae* y *P. s. pv. phaseolicola* (SAETTLER, 1991).

La producción de pigmentos fluorescentes (pioverdinas o sideróforos) se hace evidente cuando estas bacterias crecen sobre medios pobres en hierro como el medio KB (NOVAL, 1991b). Las pioverdinas son cromopéptidos, compuestos de bajo peso molecular que se producen en condiciones limitantes de disponibilidad de hierro y son utilizados por estas bacterias para su adquisición, actúan como sideróforos que sirven para captar y transportar hierro al interior de la célula (MONTESINOS y BELTRA, 1995). Estos pigmentos son de color verde amarillento solubles en agua y por lo tanto difusibles en medio KB, con una fluorescencia bajo luz ultravioleta (alrededor de 400 nm) que varía de blanco a verde azulado (NOVAL, 1991b).

Si bien el medio KB permitió diferenciar colonias productoras de sideróforos fluorescentes, este medio de cultivo carece de compuestos inhibidores (antibióticos) que le confieran propiedades selectivas. Por lo cual, sobre este medio de cultivo se desarrollaron un gran número de colonias bacterianas en todas las muestras analizadas, a excepción de la muestra número 5, donde no se obtuvieron colonias bacterianas.

Para discriminar cuáles de las colonias obtenidas en los aislamientos sobre medio KB (Cuadro 5) podrían corresponder a *Pseudomonas* fitopatógenas, se realizaron las pruebas de oxidasa y Gram (KOH).

La prueba de Gram alternativo (KOH), o método de Ryce, es un método más rápido que el Gram tradicional sin el uso de colorantes. La pared de las bacterias Gram negativas, cuando entran en contacto con la solución KOH, se disuelven o rompen, ya que son más permeables que las Gram positivas, por su menor cantidad de péptidoglicanos. El DNA libre, es muy viscoso, lo que produce, un hilo que puede ser observado a simple vista (Figura 6 B).

Esta prueba permite clasificar las cepas en dos grandes grupos, Gram positivo y Gram negativo. No obstante, es importante tener la seguridad de trabajar sobre cultivos puros, sin presencia de elementos extraños, los que pueden complicar las pruebas posteriores ( KUNSTMANN, 2004).

Según el test o prueba de la oxidasa, que discrimina entre grupos oxidasa positiva y negativa, la especie *P. Syringae* , se ubica entre las de oxidasa negativa, por lo que esta prueba se constituye como de importancia para discriminar dentro del universo de colonias obtenidas.

Esta prueba se basa en la detección de la enzima oxidasa, la que al encontrarse en presencia de oxígeno atmosférico, citocromo C y el reactivo

oxidasa (N, N- dimetil-1,4-dicloruro de difenilnamonio), oxidan el reactivo oxidasa formando indofenol. Una prueba positiva se evidencia por la coloración rojo de la colonia al depositar una gota del reactivo sobre una colonia determinada, una negativa, no existe cambio.

Los resultados de estas pruebas permitieron descartar un gran número de colonias oxidasa positivas y Gram positivas, cuyas características no corresponderían a *Pseudomonas* fitopatógenas de poroto (BRADBURY, 1986), descartándose como fitopatógenas, todas las colonias bacterianas obtenidas en las muestras numero 2 y 8 (Cuadro 6).

Las restantes colonias seleccionadas fueron sometidas a la prueba de fluorescencia sobre medio KB, resultando productoras de sideróforos fluorescentes, las colonias bacterianas de las muestras 3,4,6 y 10 (Cuadro 7), todas estas colonias presentaron las mismas características morfológicas y estas correspondieron a las descritas para bacterias fluorescentes del Género *Pseudomonas* (NOVAL, 1991b).

De acuerdo a esto, se seleccionó la cepa más grande y definida, de cada una de estas cuatro muestras, las cuales fueron sometidas a la prueba de hipersensibilidad en tabaco. Esta prueba es muy utilizada para la identificación de *Pseudomonas* fluorescentes fitopatógenas (KLEMENT, 1982).

Según KLEMENT *et al.* (1964) la inducción de síntomas de hipersensibilidad en plantas de tabaco se debe a un mecanismo de defensa frente a organismos fitopatógenos, el cual sólo se presenta cuando existe un sistema incompatible huésped-patógeno. Los patógenos inducen en las plantas resistentes o en aquellas que no son sus huéspedes, un rápido colapso de las células adyacentes a su punto de penetración (reacción de hipersensibilidad),

por lo cual esta respuesta sólo se presenta en aquellas bacterias con propiedades fitopatógenas y no en aquellas de tipo saprófito.

En este estudio los síntomas de hipersensibilidad en tabaco se visualizaron a las 24 h posterior a la inoculación y se caracterizaron por la presencia de una desecación del tejido confinada al punto de inoculación, el cual se presentó con las cuatro cepas seleccionadas (Figura 8). Según GOODMAN y NOVACKY (1994) esta reacción sólo se produce cuando el tabaco es inoculado con bacterias incompatibles.

La prueba de hipersensibilidad en tabaco es muy útil para determinar *Pseudomonas* fluorescentes y no fluorescentes en particular. En otras especies como por ejemplo *Xanthomonas*, a pesar que también provoca esta reacción, ella no es necesaria, ya que existen pruebas previas que definen su identidad en forma certera (colonias amarillas, Gram negativo, oxidasa negativa, hidrolisa el almidón e hidrolisa el Tween 80, entre otras).

Basado en los resultados de esta prueba y de acuerdo a los procedimientos de identificación descritos por LELLIOT *et al.* (1966), SANDS (1980) y SCHAAD (1989) se concluyó que las cuatro cepas de este estudio corresponden a *Pseudomonas* del grupo fluorescente de la especie *syringae*.

El nombre de *Pseudomonas syringae* fue inicialmente aplicado para nombrar aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes fitopatógenas procedentes de *Syringa vulgaris*. Posteriormente se ha utilizado para nombrar este tipo de cepas aisladas de otros huéspedes (MONTESINOS y BELTRA, 1995).

Este patógeno produce enfermedades (manchas, tizones y canchales) sobre todo tipo de plantas: frutales de carozo y pepita, especies hortícolas,

ornamentales y forrajeras, presentándose además sobre la superficie de las plantas como un constituyente mas de la flora epífita (NOVAL, 1991b).

En el grupo de *P. syringae* existen muchas variantes patogénicas (patovares) que infectan leguminosas (ARCILA y TRUJILLO, 1989). El término patovar se usa para referirse a una cepa o conjunto de cepas con características iguales o similares, pero diferenciadas a nivel infrasubespecífico de otras cepas de la misma especie o subespecie en base al rango de patogenicidad para una o mas especies de plantas huéspedes (MONTESINOS y BELTRA , 1995).

Para el poroto se describen dos patovares en este grupo *P.syringae* pv *syringae* y *P.syringae* pv. *phaseolicola* (ARCILA y TRUJILLO, 1989). *P.syringae* pv *syringae* presenta un amplio rango de hospederos entre los que figuran el poroto, mientras que *P.syringae* pv. *phaseolicola* esta mas restringida a esta leguminosa (SAETTLER, 1991).

Para diferenciar a cual de estos dos patovares, pertenecen las cuatro cepas de *P.syringae* (3,4,6, y 10) aisladas en las muestras de porotos de este estudio, se realizaron las pruebas bioquímicas del levano y esculina y la utilización de algunos azucares como fuentes de carbono (Cuadro 8). Si bien existen otras pruebas bioquímicas para la identificación de patovares de *P.syringae* , éstas constituyen las de rutina y confiabilidad utilizadas en el Laboratorio SAG Lo Aguirre para la certificación fitosanitaria de semillas de porotos nacionales.

Según los protocolos aplicados en la mayoría de los Laboratorios de Bacteriología Vegetal, la producción de levano a partir de sacarosa es una de las pruebas claves que permite establecer diferencias entre las especies de *Pseudomonas* fluorescentes patógenas y saprófitas de poroto. Esta prueba

constituye un componente de la prueba LOPAT (levano, oxidasa, papa, arginina y tabaco) utilizada para la diferenciación de *Pseudomonas* fluorescentes patogénicas entre las cuales se encuentran *P. syringae* (LELLIOT *et al.* 1966). El levano es un polímero de la fuctosa producido por la acción de la enzima levano-sacarasa sintetizada por las bacterias al utilizar la sacarosa como fuente de carbono (NOVAL, 1991b).

La producción de este polímero en las cuatro cepas en estudio fue evidente al observar la presencia de colonias abombadas y mucosas sobre el medio con sacarosa, estas características sólo la presentan los aislamientos de *P. syringae* virulentos a porotos (ERCOLANI *et al.*, 1974)

Por su parte la prueba de la esculina y la utilización de los azúcares (inositol, manitol, eritritol, sorbitol, y tartrato) como fuentes de carbono fueron utilizadas como pruebas definitivas para la diferenciación de patovares de *P. syringae*. (NOVAL, 1991b). La prueba de la esculina permitió detectar la producción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa la cual hidrolizó a este compuesto, reaccionando con el fierro y produciendo complejos negruzcos, los cuales fueron visualizados en las cuatro cepas estudiadas.

Entre los dos patovares de *P. syringae*, solo *P. syringae* pv. *syringae* da positiva a esta prueba.

Los resultados obtenidos en todas estas pruebas demostraron que las cuatro cepas aisladas (3,4,6 y 10) corresponden a *P. s.* pv. *syringae* de acuerdo a las reacciones descritas para este patovar (SCHAAD, 1994, NOVAL, 1991b).

Si se analiza todo este proceso de identificación se concluye que el trabajo bacteriológico es complejo, laborioso y no está exento de dificultades, ya que

este debe ser realizado siguiendo una secuencia dada. Esta permitió ir descartando mediante medios selectivos, características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas específicas, aquellas bacterias que no reunían las características descritas para las definidas como fitopatógenas de porotos.

Si bien se detectaron numerosas colonias bacterianas asociadas a las muestras de semillas analizadas, muchas de ellas correspondían a flora saprófita normal de la semilla. No obstante, la identificación de colonias de *P.s. pv. syringae* en cuatro de las diez muestras de semillas de porotos analizadas, demostró la eficacia del protocolo ISTA utilizado para detectar estas poblaciones a partir de semillas aparentemente sanas las cuales se encontraban infectadas en forma latente.

Aunque todas las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas realizadas demostraron que las cuatro cepas aisladas correspondían a la bacteria *P.s. pv. syringae* reconocida como fitopatógena, se verificó su poder patógeno en vainas verdes y plantas de porotos. Esta última prueba resultó imprescindible en la identificación bacteriana para dar cumplimiento a los postulados de Koch, los cuales exigen la inoculación artificial de la bacteria en huéspedes sanos, la observación de los síntomas en el tejido inoculado y el reaislamiento de la bacteria inoculada a partir del tejido con síntomas (LOPEZ y CAMBRA, 1995).

Tanto en vainas verdes, como en plantas de porotos, las cuatro cepas de *P.syringae pv. syringae* (cepas 3,4,6 y 10 ) produjeron necrosis del tejido inoculado (Cuadro 9 y 10), demostrando claramente el poder patogénico de estas cepas (Figura 9 y 10). Todas estas lesiones presentaban las mismas características de coloración y tamaño, lo que indicaría que las cuatro cepas analizadas presentaban similares rangos de virulencia.

Cabe señalar que este estudio no contempló la evaluación de grados de virulencia de las cepas aisladas ya que se consideró que la realización de éstas constituían la implementación de ensayos específicos para estos propósitos, los que escapaban a los objetivos planteados para este estudio. No obstante, sería recomendable a futuro realizar este tipo de ensayos.

La ausencia de lesiones en las vainas y plantas utilizadas como testigo con agua destilada estéril demostró la efectividad del método de inoculación aplicado. Mientras que la ausencia de lesiones en los testigos absolutos corroboró que el material vegetal utilizado en estas pruebas estaba libre de contaminación.

Es importante destacar además que las cuatro cepas de *P.s. pv. syringae* presentaron la misma capacidad de inducir lesiones tanto en plantas como en vainas, lo que demuestra que no existirían diferencias en la susceptibilidad a este patógeno entre los distintos órganos de la planta. Este es un factor a considerar en los mecanismos de resistencia a este patógeno.

Finalmente, el reaislamiento de las cepas inoculadas a partir de las lesiones necróticas desarrolladas en las vainas y plantas de porotos fue la prueba concluyente que demostró que estas lesiones fueron provocadas por las cepas de *P.s. pv. syringae* inoculadas y aisladas desde las muestras de semillas de porotos 3,4,6 y 10 colectadas en las localidades de Cabo Blanco, Sta Barbara, Isla del Rey y Las Gaviotas respectivamente.

El hecho que *P. s. pv. syringae* haya sido aislado desde semillas de porotos provenientes de diferentes localidades de la comuna de Valdivia muy distantes unas de otras, demuestra que este patógeno se encuentra ampliamente distribuido en esta comuna; no obstante la bacteria no se detectó en todas las localidades muestreadas en este estudio, lo que puede ser

atribuido a un número insuficiente de muestras o a la ausencia momentánea de este patógeno en estas localidades.

Cabe señalar que este estudio abarcó la temporada 2002-2003 y no necesariamente las condiciones fueron favorables para la infección y desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, es recomendable que estudios de esta naturaleza, debieran repetirse en varias otras temporadas, de manera tal de involucrar todas las posibilidades climatológicas que permitan la expresión de esta enfermedad. Así mismo se deberían incorporar un mayor número de productores y muestras a analizar lo que permitiría definir cuantitativamente el grado de incidencia y distribución de este patógeno en esta zona.

Si se considera que diversos autores (AGRIOS, 1997; CIAMPI, 2002), señalan que una enfermedad en plantas, es el resultado de un hospedero genéticamente dispuesto, un medio ambiente favorable y un patógeno con características óptimas para la infección, el desarrollo de la mancha café en los futuros cultivos de porotos originados de las semillas infectadas en forma latente con *P.syringae* pv. *syringae* (muestras 3,4,6 y 10) identificadas en este estudio, dependería solo de que se den las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad en la próxima temporada. Esta situación reviste un gran riesgo fitosanitario ya que la ausencia de síntomas de enfermedad en esta semilla, no permite que el agricultor dimensione el potencial daño que significaría su utilización como semilla.

Todas las pruebas bioquímicas, fisiológicas y de patogenicidad que se desarrollaron en este estudio, permitieron determinar la identidad de las bacterias fitopatógenas presentes en las semillas de porotos de la comuna de Valdivia. La prueba de la oxidasa y tinción de Gram discriminó sobre su posible rol como patógeno de porotos. Las características de las colonias (fluorescencia

o presencia de halos en medio de cultivo) permitió definir el género al que pertenecían (*Pseudomonas* o *Xanthomonas*). La hipersensibilidad en tabaco definió el nombre de la especie y las pruebas fisiológicas y bioquímicas el patovar al cual pertenecían. Finalmente las pruebas de patogenicidad y reaislamiento (Postulados de Koch), verificaron su poder patogénico y confirmaron su identidad como fitopatógenas de porotos.

## 6 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis, se puede concluir lo siguiente:

- Se acepta la hipótesis general, que en muestras de semillas de porotos aparentemente sanas, obtenidas en la comuna de Valdivia la temporada 2002-2003, hay presencia de bacterias fitopatógenas.
- De las diez muestras analizadas, el 40% de ellas tenían presencia de bacterias asociadas a la semilla.
- De acuerdo a las pruebas bioquímicas y postulados de Koch aplicados a los cultivos puros determinados, se pudo establecer la presencia de *Pseudomonas syringae*pv. *syringae*.
- En estas mismas muestras no se detectó, en esta temporada, especies asociadas a la semilla como *Pseudomonas* y *Xanthomonas* que sí están descritas para la región.
- Se detectó por primera vez en la comuna de Valdivia el agente *P. syringae* pv. *Syringae* en cuatro muestras.

## 7 RESUMEN

El poroto es una leguminosa altamente nutritiva y constituye una buena fuente de proteína en la dieta. La producción de poroto en la comuna de Valdivia (X) Región), está cobrando una relevada importancia para la pequeña y mediana agricultura.

Uno de los problemas que inciden en la calidad fitosanitaria de la semilla, es el uso de ella cuando es producida en la temporada anterior y en el mismo predio, sin tratamiento de ningún tipo.

Entre las enfermedades que afectan al poroto, las diferentes bacteriosis pueden ser una causa importante de pérdida en el posterior cultivo (*Xanthomonas* spp. Y *Pseudomonas* spp.).

Los objetivos del presente trabajo de tesis fueron determinar la presencia de bacterias fitopatógenas en muestras de semillas de poroto recolectadas en la comuna de Valdivia e identificarlas mediante pruebas de laboratorio y crecimiento en cámara de cultivo.

Se recolectaron diez muestras de semilla en distintos lugares de producción de la comuna de Valdivia. Estas se sometieron a los análisis de laboratorio validados en Chile por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Estos incluyeron: prueba de oxidasa, Gram, fluorescencia bajo luz ultravioleta, hipersensibilidad en tabaco, producción de lévano, hidrólisis de esculina, utilización de manitol, sorbitol, eritritol, y L- tartrato como fuente de carbono. Se utilizaron medios de cultivos generales tales como King B y LPGA (Levadura-Peptona- Glucosa-Agar) y semiselectivos como el medio Milk Tween.

Finalmente se realizaron pruebas de patogenicidad en vainas y plantas de porotos desde donde la bacteria fue re-aislada.

Los resultados determinaron por primera vez la presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* para cuatro de las diez muestras. Sin embargo, en estas mismas muestras no se detectó otras especies de *Pseudomonas* o *Xanthomonas*

Si bien todas las muestras de semilla no presentaban signos de enfermedad, se identificó una de las tres bacterias fitopatógenas asociadas a semillas. Esta evidencia muestra la necesidad de contar con una técnica rápida y eficiente para detectar este tipo de enfermedades en todas las zonas agrícolas. Esto debe ser independiente del nivel de producción, ya que su importancia es siempre relevante para las varias bacteriosis factibles de ser transmitidas por la semilla en poroto.

## SUMMARY

Bean is a highly nutritive legume crop and represent a good protein source for a balanced diet. Actually, bean production is having a great relevance for small and medium size farmers in the Valdivia province, Xth Region of Chile.

One of the main problems that affect the phytosanitary condition of bean seeds is its own use, specially when is produced during the previous season, in the same field and without any disease control treatment.

Among the plant diseases present and that affect beans and that may cause severe damage are the several kinds of bacterial pathogens included in the *Xanthomonas* and *Pseudomonas* genera.

The objectives of this thesis work were to investigate the presence of bacterial plant pathogens in seed bean samples collected in the Valdivia province and tho fully diagnose them using laboratory and growing cabinet tests.

Ten seed samples were recollected from several places from were bean is being produced in the Valdivia province. These were subjected to laboratory assays validated in Chile by the legal phytosanitary authorothy -the Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)-. These tests were: Oxidase test, Gram stain, fluorescence under U.V. light, tobacco hypersensitivity, levan production, esculin hydrolisis, utilization of mannitol, sorbitol, erhytritol, and L-tartrate as sole carbon source. Special media were used such as King's medium B, and LPGA (Glucose Peptone Yeast Agar), and the semiselective medium Milk Tween. Finally, pathogenicity tests were conducted on bean pods and plants from were bacteria were re-isolated.

Results indicated by first time the presence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on four out of ten bean samples. However, from these same samples no other *Pseudomonas* or *Xantomonas* species were detected.

Nevertheless that all bean seed samples did not show any external disease symptoms, it was demonstrated that one bacterial specie was found associated to symptomless seeds. This evidence shows the requirement of a fast and efficient test to detect these kind of pathogens in our agricultural system. This must be done independently of the kind of farmer, because there is a great importance in the way of how these bacterial agents are transmitted through seeds.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- ACUÑA, R. 1989. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Informativo Fitosanitario Año VIII N° 2. Servicio Agrícola y Ganadero, Departamento de Diagnostico y Vigilancia, División Protección Agrícola. Santiago, Chile. 2p.
- ACUÑA, R. 1993. *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Burkh). Informativo Fitosanitario Año X N° 6. Servicio Agrícola y Ganadero, Departamento de Diagnostico y Vigilancia, División Protección Agrícola. Santiago, Chile. 2p.
- AGRIOS, G. 1997. Plant pathology. Academic Press. San Diego. USA. 635p.
- ALVAREZ, E.; VANEGAS, G. y VICTORIA, J. 1979. Transmisión por semillas de bacterias fitopatógenas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Colombia. Acta Agronómica (Colombia) 29(1-4): 11-20.
- ARCILA, M. y TRUJILLO, G. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causante de la mancha marrón de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) infectando semillas de tapiramo (*Phaseolus lunatus* L.). Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay Venezuela) 15:235-242.
- BRADBURY, J. 1984. Genus II. *Xanthomonas* Dowson. In: Krieg (ed). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol I. Baltimore, USA. William and Wilkins. pp: 199-210.
- BRADBURY, J. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. London, UK. CAB International Mycological Institute. 332p.

- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (INE). 2003. Censo Agropecuario. (On line).< <http://www.ine.cl/16-agrope/xls/cas9.xls>> (11 dic.2003).
- CHILE, OFICINA DE PLANIFICACIÓN AGRÍCOLA (ODEPA). 2003. (On line). < <http://www.odepa.cl> > (11 dic.2003).
- CHILE, SOCIEDAD QUÍMICA Y MINERA DE CHILE (SOQUIMICH). 1985. Agenda del salitre. Santiago, Chile. Universitaria. 1056 p.
- CIAMPI, L. 2002. Introducción a la patología vegetal. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, Chile. Nuova Firenze. 232p.
- DILLARD, H. y LEGARD, D. 1991. Vegetable crops. Bacterial Diseases of Beans. Fact Sheet N° 729.50 (On line). Department of Plant Pathology, NYS Agricultural Experiment Station at Geneva, Cornell University. <[http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/factsheet/Beans-\\_Bacterial.htm](http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/factsheet/Beans-_Bacterial.htm)> (02 dic. 2003).
- DUBIN, H. y CIAMPI, L. 1974. *Pseudomonas phaseolicola* en Chile. Fitopatología (Perú) 9(2): 91-92.
- ERCOLANI, G.; HAGEDORN, D.; KELMAN, A. y RAND, R. 1974. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. Phytopathology (EEUU) 64(10):1330-1339.
- ESTÉVEZ, A. 1994. Pérdidas de grano en almacenamiento. Alimentos (CHILE) 18(1): 48-52.

- FISAC, R. 1991. Serología. In: Andres, M.; Arias, M y Bello, A.(eds). Manual de laboratorio, diagnóstico de hongos bacterias y nemátodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp:313-364.
- FRANKEN, A. y VAN VUURDE, J. 1990. Problems and new approaches in the use of serology for seedborne bacteria. *Seed Science and Technology* (Suiza) 18:415-426.
- GIACONI, V. 1988. Cultivo de hortalizas. 7ª ed. Santiago, Chile. Universitaria. 308p.
- GOODMAN, R. y NOVACKY, A. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens . A resistance phenomenon. American Phytopathological Society APS Press. St. Paul. Minnesota. USA. 244p.
- GOSZCZYNSKA, T y SERFONTEIN, J. 1998. Milk-tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv.*syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods* 32:65-72.
- GUTHRIE, J.; HUBER, D. y FENWICK, H. 1965. Serological detection of halo blight. *Plant Disease Reporter* (EEUU) 49:297-299.
- HILDEBRAND, D.; SCHROTH, M. y SANDS, D. 1994. *Pseudomonas*. 2ª ed. In: Schaad, N. (ed). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.. Minnesota, USA. APS pp: 60-80.

- HOWARD, R. 2000. Productos de reemplazo para la estreptomina. (On line). Cultivadores del Pulso de Alberta. Arroyos (403) 362-1328 <<http://www.pulse.ab.ca/newsletter/2000spring/strep.html-7k>> (18 dic. 2003).
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 1999. Detection of bacterial blight in field bean. Central Seed Laboratory. Seed-borne Disease Unit. Canadian Food Inspection Agency. Laboratory Services Division, Ottawa, Canadá. Fact Sheet SOP SD82010. 8p.
- IRIGOYEN, E. y GARBAGNOLI, C. 1997. Bacteriosis común del poroto (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ([E.F. Smith] Dowson): Detección, Infección y Transmisión por semilla. Fitopatología (Perú) 32(3): 166-172.
- KIRYAKOV, I. 2001. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* races in North-Eastern Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science 7(3): 313-318. (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 20023006105.
- KLEMENT, Z.; FARKAS, G. y LOVREKOVICH, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology (EEUU) 54:474-477.
- KLEMENT, Z. 1982. Hypersensitivity . In: Mount, M. y Lacy, G. (eds). Phytopathogenic Prokaryotes. Vol 2. Academic Press. New York. USA. pp: 149-177.
- KOOISTRA, E. 1971. Germinability of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at low temperature. Euphytica ( Inglaterra) 20:208-213.

- KRARUP, A. 1981. Antecedentes de leguminosas de grano y sus posibilidades en el sur de Chile (X región). Instituto de Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. Serie A 11. 20p.
- KUNSTMANN, J. 2004. Determinación de subespecies de *Erwinia carotovora* (Dye) may como agentes causales de "podrición blanda" en cala (*Zantedeschia* spp.) Tesis Ing. Agr.. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 92p.
- LEGARD, D. y HUNTER, J. 1990. Pathogenicity on bean of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* recovered from the phylloplane of weeds and from bean crop residue. *Phytopathology* (EEUU) 80: (10): 938-942.
- LELLIOT, R. ; BILLING, E. y HAYWARD, A. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Applied Bacteriology* (EEUU) 29:470-489.
- LOPEZ, M. y CAMBRA, M. 1995. Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas.. In: Llorer, G.; Lopez, M.; Trapero, A y Bello, A. (eds). *Patología Vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología. Gráfica Papallona. Madrid, España. pp: 587-625.
- MAHMOUD, S. 2002. Evaluation of some biocontrol agents and copper compounds in controlling halo blight disease of beans caused by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Annals of Agricultural Science of Cairo* 47(1): 407-415. (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 20023131177.

- MALIN, E.; ROTH, D. y BELDEN, E. 1983. Indirect immunofluorescens staining for detection an identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. Plant Disease (EEUU) 67:645-647.
- MAUDE, R. 1996. Seedborne diseases and their control. Principles and practice. CAB International. Oxford, UK. 280p.
- MESSIAEN, C.; BLANCARD, D.; ROUXEL, F. y LAFON, R. 1994. Enfermedades de las hortalizas. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 576p.
- MONTESINOS, E. y BELTRA, R. 1995. Las bacterias fitopatógenas. In: Llorer, G.; Lopez, M.; Trapero, A y Bello, A. (eds). Patología Vegetal. Sociedad Española de Fitopatología. Gráfica Papallona. Madrid, España. pp: 491-513.
- MORALES, E. y GRANADA, G. 1989. Determinación de poblaciones epífitas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* sobre diferentes variedades de frijol. Fitopatología (Perú) 24(1): 13-18.
- NOVAL, C. 1991a. Género *Xanthomonas*. In: Andres, M.; Arias, M y Bello, A.(eds). Manual de laboratorio, diagnóstico de hongos bacterias y nemátodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp:285- 312.
- NOVAL, C. 1991b. Género *Pseudomonas*. In: Andres, M.; Arias, M y Bello, A.(eds). Manual de laboratorio, diagnóstico de hongos bacterias y nemátodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp:241-283.

- PAREDES, C. 1998. Determinación de la calidad de dos cultivares de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) de consumo interno, comercializados en la ciudad de Valdivia. Tesis Lic. Agr. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. 54p.
- PINTO, A. 1969. Bacteriosis o tizón común del frejol en Chile. Agricultura Técnica ( CHILE) 1: 14-19.
- PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N. y SCHAAD, N. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction- based amplification of a phaseolotoxin gene region. Phytopathology (EEUU) 83(9):965-970.
- ROTH, D. 1989. Review of extraction and isolation methods. In: Saettler, A.; Schaad, N. y Roth, D. (eds). Detection of bacteria in seed and other planting material. APS Press. Minnesota, USA. pp:3-8.
- SAETTLER, A. 1971. Seedling injection as an aids to identifying bean blight bacteria. Plant Disease Reporter (EEUU) 55:703-706.
- SAETTLER, A. y PERRY, S. 1972. Seed-transmitted bacterial diseases in Michigan navy (pea) beans. *Phaseolus vulgaris*. Plant Disease Reporter (EEUU) 56:378-381.
- SAETTLER, A. 1991. Diseases caused by bacteria. In: Hall, R. (ed). Compendium of bean diseases. USA. The American Phytopathological Society Press. pp:29-31.
- SANDS, D.; SCROTH, M. y HILDEBRAND, D. 1980. *Pseudomonas*. In: Schaad, N. (ed). Laboratory guide for identification of the plant

- pathogenic bacteria . St. Paul Minnesota, USA. American Phytopathological Society. pp:36-44.
- SANDS, D. 1990. Physiological criteria-determinative tests In: Klement, Z.; Rudolph, K. y Sands, D. (eds). Methods in Phytobacteriology. Budapest, Hungría. Akadémiai Kiadó,. pp: 132-143.
- SCHAAD, N. 1989. Detection and identification of bacteria.. In: Saettler, A.; Schaad, N. y Roth, D. (eds). Detection of bacteria in seed and other planting material. Minnesota, USA APS . pp:9-16.
- SCHAAD, N.; AZAD, H.; PEET, R. y PANOPOULOS, N. 1989. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by a DNA hybridization probe. Phytopathology (EEUU) 79: 903-907.
- SCHAAD, N. 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.2ª ed. Minnesota, USA. APS 164p.
- SCHAAD, N.; CHEONG, S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E. y PANOPOULOS, N. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. Phytopathology (EEUU) 85(2):243-248.
- SCHUSTER, M. y COYNE, D. 1981. Biology, epidemiology, genetics and breeding for resistance to bacterial pathogens of *Phaseolus vulgaris*. Horticultural Review ( Canada) 3:28-58.
- SCHWARTZ, H. 2001. Bacterial diseases of beans. Fact Sheet N° 2.913. (On line). Colorado State University Cooperative Extension <<http://www.ext.colostate.edu>> (10 nov. 2003).

- SHERF, A. 1979. Vegetable Crops. Bacterial Blights of Beans. Page N° 729.10 (On line). Cooperative Extension New York State Cornell University <  
[http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheet/Beans-\\_Bactlights.htm](http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheet/Beans-_Bactlights.htm)> (18 dic. 2003).
- SMITH, I.; DUNEZ, J.; LELLIOTT, R.; PHILIPS, D. y ARCHER, S. 1992. Manual de enfermedades de las plantas.. Madrid, España. Mundi Prensa . 671p.
- TAYLOR, J. 1970. Bacteriophage and serological methods for identification of *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh) Dowson. Annals of Applied Biology ( Inglaterra) 70:191-197.
- UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, UACH. Archivos meteorológicos. Universidad Austral de Chile, Instituto de geociencias, Facultad de Ciencias, Valdivia, Chile.sp.
- VAN VUURDE, J.; VAN DEN BOVENKAMP, G. y BIRNBAUM, Y. 1983. Inmunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine test for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. Seed Science Technology (Suiza) 11: 547-559.
- VENETTE, J. y LAMEY, H. 1998. Dry Edible Bean Diseases. (On line). North Dakota State University Cooperative Extension <  
<http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/rowcrops/pp576w.htm-33k>> (18 dic. 2003).

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 MEDIO KING B.

Ingredientes	Cantidad
Proteasa peptona	20.0 g
Fosfato de potasio ( $K_2H PO_4$ )	1.5 g
Sulfato de magnesio Heptahidratado ( $SO_4Mg+ 7H_2O$ )	1.5 g.
Agar	15.0 g.
Glicerol	15.0 g.
Agua destilada	1.0 L.

Preparación: Se pesan todos los ingredientes, se le agrega el agua destilada, se ajusta a pH 7.2 y se esteriliza en autoclave a  $121^0$  C por 20 minutos.

## ANEXO 2 MEDIO MT ( Leche-Tween 80).

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ )	0.25 g.
Proteasa peptona N° 3	10.0 g.
Bacto agar	15.0 g.
Tirosina	0.5 g.
Leche en polvo descremada	10.0 g.
Tween 80	10.0 mL
Cephalexin	80.0 mg (2.0 mL)
Cycloheximida	200.0 mg (2.0 mL)
Vancomycina	10.0 mg (1.0 mL)
Agua destilada y desionizada	1.0 L

**Preparación:** Se pesan todos los ingredientes excepto el Tween 80 y antibióticos. Se agrega el agua destilada y desionizada, se calienta para disolver y se autoclava a 121 °C por 15 minutos. Los antibióticos se esterilizan por filtración y se agrega a la solución a una temperatura de 50 °C junto al Tween 80, se mezcla y se vierte en placa.

Los antibióticos se preparan de la siguiente manera:

**Cephalexin:** se disuelve 0.4 gramos en 10 mL 0.4% de NaOH , se esteriliza por filtración y se agrega 2 mL por litro.

**Cyclohexamida:** se disuelve 1 gramo en 10 mL 75% de metanol, se esteriliza por filtración y se agrega 2 mL por litro.

**Vancomicina:** Se disuelve 0.1 gramos en 10 mL de agua destilada, se esteriliza por filtración y se agrega 1 mL por litro.

#### ANEXO 3 MEDIO LPGA ( Levadura- Peptona- Glucosa- Agar).

Ingredientes	Cantidad
Extracto de Levadura	5.0 g.
Bacto peptona	5.0 g.
Glucosa	10.0 g.
Agar	20.0 g.
Agua destilada	1.0 L

**Preparación:** Se pesan todos los ingredientes, se agitan y disuelven a 80 °C y se esterilizan a 120 °C por 20 minutos.

## ANEXO 4 MEDIO BASE AYERS.

Ingredientes	Cantidad
$\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$	1.0 g.
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g.
$\text{Mg}_4 \text{SO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g.
Azul de bromotimol (Solución 1.6%)	1.0 g.
Agar	12.0 g.
Agua destilada	1.0 L

Preparación: Se pesan los ingredientes menos el bromotimol, se agita con calor y se ajusta a pH 7.0 – 7.2, luego se agrega el bromotimol, se esteriliza a 121<sup>0</sup> C por 15 minutos. A este medio base se le agrega las soluciones acuosas de los compuestos orgánicos(fuente de carbono), esterilizadas por filtración, añadiendo de tal forma al medio base, que la concentración final de los azúcares sea del 0.5%.

## ANEXO 5 MEDIO ESCULINA.

Ingredientes	Cantidad
Bacto peptona	10.0 g.
Citrato férrico amoniacal	0.7 g.
Esculina	1.0 g.
Agar	20.0 g.
Agua destilada	1.0 L

Preparación: Se pesan, mezclan y calientan los ingredientes hasta disolución, se ajusta a pH 7.2, se reparte en tubos de ensayo cantidades de 6 mL y se esteriliza en autoclave a 115<sup>0</sup> C por 15 minutos.

## ANEXO 6 MEDIO LPS – SUCROSA O LEVANO

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	2.0 g.
Bacto peptona	5.0 g.
Na Cl	5.0 g.
Sacarosa	50.0 g.
Agar	20.0 g.
Agua destilada	1.0 L

ANEXO 7 ESCALA DE OPACIDAD DE MAC- FARLAND. Esta escala se basa en la comparación de la opacidad de la suspensión bacteriana a testar, con la opacidad de tubos patrones que se preparan mezclando las dos soluciones como se indica en la tabla.

Tubo	Nº	Solución A (ml)	Solución B (ml)	Nº Bacterias/ ml
1		0.01	9.99	$3 \times 10^7$
2		0.05	9.95	$1.5 \times 10^8$
3		0.1	9.9	$3 \times 10^8$
4		0.15	9.85	$4.5 \times 10^8$
5		0.2	9.8	$6 \times 10^8$
6		0.3	9.7	$9 \times 10^8$
7		0.4	9.6	$1.2 \times 10^9$
8		0.5	9.5	$1.5 \times 10^9$
9		0.6	9.4	$1.8 \times 10^9$
10		0.7	9.3	$2.1 \times 10^9$
11		0.8	9.2	$2.4 \times 10^9$
12		0.9	9.1	$2.7 \times 10^9$
13		1.0	9.0	$3 \times 10^9$

## ANEXO 8. PESO SEMILLA Y VOLUMEN DE BUFFER SALINO

CALCULADO PARA EL PROCESO DE EXTRACCIÓN.

MUESTRA	SUBMUESTRA	PESO SEMILLAS (g)	VOLUMEN BUFFER SALINO (ml)
1	1	194.5	291.7
	2	200.5	300.7
	3	197.5	296.2
	4	198.2	297.3
2	1	108.3	162.5
	2	109.6	164.4
	3	108.2	162.3
	4	106.1	159.1
3	1	139.1	208.6
	2	142.3	213.5
	3	141.7	212.5
	4	140.6	210.9
4	1	151.8	227.7
	2	145.3	217.9
	3	151.9	227.8
	4	144.6	216.9
5	1	123.5	185.2
	2	133.5	200.2
	3	135.3	203.0
	4	137.5	206.2
6	1	136.3	204.5
	2	137.7	206.5
	3	137.5	206.2
	4	108.9	163.3

Continuación Anexo 8.

MUESTRA	SUBMUESTRA	PESO 250 SEMILLAS (g)	VOLUMEN BUFFER SALINO (ml)
7	1	65.4	98.1
	2	56.2	84.3
	3	55.0	82.5
	4	54.5	81.8
8	1	131.1	196.6
	2	130.0	195.0
	3	126.5	189.8
	4	119.8	179.7
9	1	112.1	168.1
	2	110.2	165.3
	3	114.7	172.0
	4	116.4	174.6
10	1	116.7	175.0
	2	115.8	173.7
	3	114.3	171.5
	4	115.2	172.8

ANEXO 9 Datos diarios de temperatura media medidos entre enero de 2002 a marzo del 2003 y temperatura media histórica

DÍA	TEMPERATURA MEDIA 2002												TEMPERATURA MEDIA 2003		
	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR
1	18,7	20,7	12,0	13,0	11,3	7,9	2,3	7,2	14,1	12,7	11,1	15,6	18,2	16,9	16,5
2	15,8	20,2	13,7	15,0	11,6	8,4	2,0	8,7	14,9	10,5	11,6	17,5	17,6	17,5	16,5
3	17,5	17,7	15,6	15,5	13,6	8,9	6,7	5,9	11,7	11,6	14,0	17,4	17,4	17,6	19,5
4	19,5	16,8	14,9	15,5	11,9	7,9	6,5	4,9	14,5	11,7	15,8	13,0	16,6	17,6	18,9
5	18,3	23,1	10,8	15,3	14,1	8,4	10,6	5,5	12,0	9,8	14,6	13,9	16,5	16,5	19,7
6	16,3	15,6	16,6	13,2	11,7	8,9	6,0	10,2	13,5	9,5	12,6	17,1	19,3	15,1	21,9
7	16,3	17,2	14,8	11,3	11,9	8,5	3,7	10,4	13,4	9,3	12,3	17,9	17,1	16,1	21,1
8	16,3	16,9	14,3	11,4	13,1	10,2	7,8	10,6	14,8	9,9	11,7	17,7	15,0	15,1	20,1
9	16,1	16,6	12,0	11,8	13,0	6,1	8,5	10,4	10,0	11,4	11,9	17,1	17,6	19,4	16,6
10	18,5	15,8	11,6	9,2	12,2	3,8	3,7	11,2	12,6	11,3	13,3	15,3	16,3	17,5	17,3
11	18,4	14,5	14,4	10,5	12,7	4,0	8,2	9,4	15,6	12,0	13,0	16,3	17,5	18,5	16,1
12	15,9	14,8	11,4	14,7	14,3	6,8	10,5	9,9	15,6	13,4	12,7	16,5	16,0	18,4	15,4
13	14,5	15,2	13,9	13,9	12,6	5,6	8,8	9,5	15,1	13,2	13,8	15,5	15,7	17,5	13,7
14	18,8	15,9	14,9	11,3	13,6	3,4	9,8	10,2	12,7	13,0	12,9	16,3	18,2	14,7	15,3
15	21,2	17,6	13,4	13,1	11,6	5,8	11,3	11,4	17,4	11,7	13,0	16,0	17,1	15,6	13,9
16	22,1	15,3	15,2	14,6	10,1	6,6	8,0	12,3	11,7	10,6	13,9	14,8	16,4	15,8	16,1
17	23,4	15,5	14,1	9,2	7,2	6,9	7,4	11,3	13,7	9,8	13,3	12,3	13,0	13,4	16,0
18	21,3	20,0	13,3	8,4	9,2	11,4	6,6	10,3	14,2	10,3	13,0	12,7	12,8	14,0	16,3
19	18,3	22,6	13,0	10,1	6,0	12,1	10,7	7,9	11,4	10,1	11,6	14,7	15,1	11,2	16,9
20	20,4	24,7	16,0	10,1	8,7	10,2	11,9	8,2	14,2	10,2	11,3	14,5	14,2	15,5	11,4
21	19,5	23,9	15,6	8,7	6,4	6,9	6,8	7,9	15,9	10,2	12,1	14,8	16,4	19,6	16,4
22	16,7	20,7	14,2	11,3	11,3	4,8	8,7	9,9	16,0	12,9	13,0	12,4	14,8	19,6	17,1
23	19,1	18,1	14,0	10,9	13,2	4,1	7,1	12,4	14,6	11,2	14,3	11,0	14,1	17,0	14,3
24	18,1	14,5	11,9	11,8	10,0	3,9	8,0	12,8	15,0	12,5	15,0	14,3	17,1	15,4	16,7
25	17,2	15,0	11,7	11,4	13,1	10,0	9,9	10,4	16,0	11,6	14,3	16,0	16,6	15,3	15,6
26	15,9	15,4	10,8	8,1	11,1	8,0	10,8	18,9	16,6	9,5	14,5	15,8	16,2	14,9	16,9
27	17,3	14,7	14,3	8,3	6,0	6,2	6,8	12,3	16,6	8,8	12,3	13,6	19,0	12,9	15,5
28	16,7	12,4	14,3	11,1	6,0	5,2	8,9	10,3	17,1	10,5	15,4	15,9	16,8	12,7	14,3
29	16,2	14,8	10,5	5,3	6,0	6,0	9,6	7,7	14,0	14,2	16,4	14,0	16,0	17,1	17,1
30	14,9	15,4	11,2	7,0	4,1	10,7	7,7	7,7	15,2	12,4	14,8	16,6	17,3	14,4	14,4
31	17,3	16,3			10,0		6,2	9,1		10,6		16,5	16,0		13,8
TOTAL															
MED ME	18,9	17,6	13,9	11,7	10,7	7,2	7,8	9,6	14,4	11,2	13,3	16,4	16,8	16,0	16,6
MEGIA															
16 AÑOS	17,8	16,7	14,8	12,1	10,2	8,2	7,7	8,4	9,6	11,7	13,8	16,8	16,7	14,8	14,8



J. BORRERO C.  
ASISTENTE DE LABORATORIO

FUENTE: Estación Meteorológica Instituto de Geociencias. Universidad Austral de Chile.

ANEXO 10 Datos diarios de precipitación medidos entre enero de 2002 a marzo del 2003 y precipitación histórica.

DÍA	PRECIPITACION 2002												PRECIPITACION 2003		
	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR
1	3.2	3.3	0.5	0	5.7	11.0	0	0	0	24.5	41.0	0	0	0.9	0
2	0	0	3.4	11.7	12.5	0	0	0	0	70.0	8.5	0	0	13.5	0
3	0	0	7.5	9.4	34.4	27.3	8.7	0.9	0.3	0.3	0.0	0	0	1.4	0
4	0	0.3	0.6	0	0.4	29.5	0.1	0	22.9	20.4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	23.2	0	0.5	6.2	11.3	0	0	0	0	0
6	0	0	16.6	19.1	0	44.1	0	31.6	19.5	37.5	0.0	0	0	1.9	0
7	0.6	0	1.2	39.4	0	31.0	0	28.1	0.4	17.5	18.2	0	0	0	0
8	22.7	0	4.1	3.6	0	16.6	0.2	39.0	6.2	0.6	18.8	0	0	0	0
9	1.3	0	31.8	0	0	41.7	0	11.1	0.6	21.2	2.4	0	0	0	0
10	0	0.2	0	0	0.4	0	0	22.2	11.1	1.8	0	0	0	0	0.8
11	0	0	0	1.2	2.9	0	7.2	1.7	4.9	25.0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	3.6	39.7	0	2.2	0.5	4.4	155.7	7.1	0	0	0	0
13	0.8	0	64.8	0	1.1	0	1.0	7.3	9.9	62.4	20.9	0	0	0	0
14	0	0	53.4	0	15.6	0	0.6	1.3	0.2	9.7	67.5	0	0	0.6	11.3
15	0	0	24	0	51.3	0	11.3	2.6	14.5	11.4	0	10.3	0.6	0.3	0.3
16	0	0	16.5	0	4.4	0	0.3	0.9	7.6	0.3	1.9	0	1.9	0	0
17	0	4.1	0.9	16.4	0.2	0	0.1	31.2	36.5	0	51.7	0	1.4	0	0
18	0	0	0	0.3	3.2	24.0	0	0.0	16.5	14.6	1.9	5.3	0	2.6	0
19	0	0	0	0.9	11.7	37.6	44.3	0.7	2.5	3.0	12.4	31.0	9.8	0	9.1
20	0	0	0	3	1.7	14.7	59.6	0.6	10.5	0.7	15.2	0.7	3.4	0	7.5
21	0	0	1.8	0.1	0.7	0.7	25.3	0	1.8	0	2.7	2.9	6.4	0	0
22	0	0	0.3	5.5	21.1	0	21.3	16.4	0.0	0	0	11.5	0	0	0
23	0	0	1.8	0.9	57.0	0	16.5	64.6	0.0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	7.9	31.1	12.7	0	28.7	46.3	25.7	1.3	0	27.4	0	0	0
25	0	3.4	11.9	14.4	21.2	1.2	22.5	7.9	0.6	12.3	0.1	10.0	0	0.6	0
26	0	55.6	0.5	1.6	23.6	11.8	17.7	4.4	0.9	3.1	16.6	9.4	0	9.2	36.4
27	0	0.5	0	6.2	17.7	6.2	8.3	35.9	0.5	0	0	0.2	15.6	0	1.1
28	0	22.8	21.1	3.7	14.4	15.5	33.1	16.4	1.1	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0.9	1.7	0.0	4.2	7.7	3.1	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0.7	9.9	0.3	0	4.4	0.3	27.7	0	0	0	6.4	0	0
31	0.1	0	0	0	17.6	0	0	0	0	0.6	0	0	0.5	0	0
TOTAL	36.7	90.2	269.0	163.3	370.7	363.4	319.3	381.5	236.7	604.7	287.1	111.6	48.0	31.6	65.5
MED ME															
MEDIA															
82 ANOS	62.6	59.3	83.1	155.6	338.1	385.4	375.0	298.4	189.1	149.7	104.5	89.1	42.6	59.3	83.1



J. G. FORNARO C.  
ASISTENTE DE LABORATORIO

FUENTE: Estación Meteorológica Instituto de Geociencias. Universidad Austral de Chile.

