

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO PARASITOLOGÍA



Identificación Y Caracterización De La Marchitez Bacteriana De Los Frijoles Secos
Causada Por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*
(Collins & Jones, 1984).

Por:

FRANCISCO DE JESÚS IBARRA MOLINA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Octubre, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Identificación Y Caracterización De La Marchitez Bacteriana De Los Frijoles Secos
Causada Por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*
(Collins & Jones, 1984).

Por:

FRANCISCO DE JESÚS IBARRA MOLINA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Asesor Principal



M.C. Abiel Sánchez Arizpe
Coasesor



Dr. Epifanio Castro del Ángel
Coasesor



Dr. Jerónimo Landeros Flores
Coordinador de la División de Agronomía



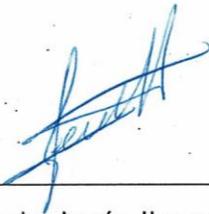
Saltillo, Coahuila, México

Octubre, 2022

Declaración de No Plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos: Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes. Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Francisco de Jesús Ibarra Molina.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por la oportunidad de forjarme como Ingeniero Agrónomo Parasitólogo.

A la **Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda** por sus consejos, tiempo y enseñanzas, así como las herramientas brindadas para la realización de este trabajo. Por su apoyo y amistad en la última fase de mi carrera universitaria.

DEDICATORIA

A MIS PADRES.

Sonia Guadalupe Molina Rovirosa y Jesús Díaz Villegas

Por ser ejemplos de vida frente a la adversidad, quienes han sido los motores primordiales para impulsar mi carrera universitaria y que, a su vez, me han dado consejos y enseñanzas para ser una persona de bien, con valores y responsabilidad.

A MIS HERMANOS

Marco Antonio Trujillo Molina y David Manuel Ibarra Molina por apoyarme, alentarme en mi carrera universitaria y el amor cálido que me han dado desde niños hasta la actualidad.

A MIS TÍOS

El ing. Juan Carlos Serrano Pozo y el ing. Miguel Ángel Coutiño Fernández, quienes son una gran inspiración como agrónomos y seres humanos.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	II
INDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE APÉNDICE 1.....	VI
ÍNDICE APÉNDICE 2.....	VII
RESUMEN	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo.....	3
1.2. Justificación	3
1.3. Hipótesis	3
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. Frijoles Secos.	4
2.2. Marchitez Bacteriana de los Frijoles Secos <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv <i>flaccumfaciens</i>	5
2.2.1. Clasificación Taxonómica (EPPO, 2011).....	5
2.2.2. Síntomas de la Enfermedad.....	6
2.2.3. Rango de Hospederos.....	8
2.2.4. Importancia Económica.....	9
2.2.5. Epidemiología.....	10
2.2.6. Supervivencia.....	12

2.3.	Caracterización de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv <i>flaccumfaciens</i>	14
2.3.1.	Aislamiento.....	14
2.3.2.	Tipos de Medios de Cultivo.	14
2.3.3.	Pruebas Bioquímicas.....	16
2.3.4.	Pruebas Preliminares.	18
2.3.4.1.	Tinción de Hans Christian Gram (1882).....	18
2.3.4.2.	Prueba de Ei Ryu KOH 3% (1938; 1940).....	19
2.3.4.3.	Prueba de Catalasa Gottstein (1893); McLeod y Gordon (1923).	19
2.3.4.4.	Prueba de Oxidasa Gordon y McLeod (1928).	20
2.3.4.5.	Prueba de Oxidación-Fermentación Hugh y Leifson (1953).	21
2.3.5.	Pruebas Fenotípicas.....	22
2.3.5.1.	Prueba de Movilidad.	22
2.3.5.2.	Hidrolisis de Gelatina Frazer (1926).	22
2.3.5.3.	Producción de Caseinasa.	23
2.3.5.4.	Hidrolisis de Esculina.....	24
2.3.5.5.	Prueba de Producción de Ácidos a Partir de Carbohidratos Dye (1968).....	24
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1.	Aislamiento de la bacteria.	25
3.2.	Caracterización de las Colonias.....	26
3.2.1.	Pruebas Bioquímicas Preliminares.....	26
3.2.2.	Pruebas Fenotípicas.....	27
3.3.	Postulados de Koch.	28
3.3.1.	Obtención de Plántulas.	28
3.3.2.	Inoculación.	28

3.3.3. Aparición de síntomas.....	29
3.3.4. Re aislamiento del inoculo.....	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
V. CONCLUSIONES.....	36
VI. RECOMENDACIONES.....	37
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	38
APÉNDICE 1.....	45
APÉNDICE 2.....	48
Medios de Cultivo diferenciales para <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv <i>flaccumfaciens</i>	49

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales hospederos de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	9
Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para caracterizar <i>Cff</i> por Bradbury, J. (1986).	16
Cuadro 3. Pruebas bioquímicas para caracterizar <i>Cff</i> por Schaad, N. (2001).....	17
Cuadro 4. Pruebas bioquímicas para caracterizar <i>Cff</i> por la EPPO (2011).....	17
Cuadro 5. Resultados de las pruebas realizadas a la cepa analizada.	31
Cuadro 6. Resultados de la inoculación y aislamiento de la bacteria en diferentes especies vegetales.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pared celular de Bacterias Gram positivas y negativas (Parada, 2018).....	18
Figura 2. Acción enzimática de la catalasa en peróxido de hidrógeno (UAAAN, 2022).....	19
Figura 3. Proceso de oxidación del tetra-metil-p-fenilediamina (Shields y Cathcart, 2010).....	20
Figura 4. Proceso de Hidrólisis de la Caseína (Leboffe & Pierce, 2010).....	23
Figura 5. Cepas de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumflaciens</i> extraídas de semillas de frijol.....	30
Figura 6. Tinción de Gram, vista al microscopio compuesto con el objetivo 100x.....	30
Figura 7. Síntomas de Frijol Mungo 10 días después de la inoculación con <i>Cff</i>	33
Figura 8. Amarillamiento y aparición de pústulas en hojas de Frijol Mungo.	33
Figura 9. Síntomas de <i>Cff</i> en planta de lenteja.	34
Figura 10. Semillas de frijol pinto infectadas con <i>Cff</i>	37
Figura 11. Semillas de frijol pinto.	37
Figura 12. Semillas sanas de frijol pinto con “Mancha de Lirio” presente.	37

ÍNDICE APÉNDICE 1

Figura 13. Síntomas provocados por <i>Cff</i> en soya.	45
Figura 14. Plantas de <i>Arachis hipogea</i> utilizadas para este experimento.	45
Figura 15. Síntomas provocados por <i>Cff</i> en Chícharo.	45
Figura 16. Síntomas provocados por <i>Cff</i> en Frijol ejotero.	45
Figura 17. Síntomas provocados por <i>Cff</i> en Alubias.	45
Figura 18. Síntomas provocados por <i>Cff</i> en Frijol negro.	45
Figura 19. Síntomas provocados por <i>Cff</i> en Frijol pinto.	46
Figura 20. Puntos de extracción de <i>Cff</i> en maíz.....	46
Figura 21. Puntos de extracción de <i>Cff</i> en Trigo.	46
Figura 22. Frijoles criollos del estado de Guanajuato.....	46
Figura 23. Semillas sanas de frijol del Estado de Guanajuato	46
Figura 24. Semillas enfermas con <i>Cff</i> en semillas del estado de Guanajuato.....	46
Figura 25. Semillas de frijol criollo del estado de Chiapas.	47
Figura 26. Semillas sanas provenientes del estado de Chiapas.	47
Figura 27. Semillas infectadas por <i>Cff</i> provenientes del estado de Chiapas.....	47
Figura 28. Semillas de Alubia.....	47
Figura 29. Semillas sanas de Alubias.	47
Figura 30. Síntomas de <i>Cff</i> en semillas de Alubias.....	47

ÍNDICE APÉNDICE 2

Cuadro 7. Medio Oxidación - Fermentación.....	48
Cuadro 8. Medio C Dye.....	48
Cuadro 9. Buffer de Fosfato Salino (PBS).....	49
Cuadro 10. Medio Caldo Nutritivo y extracto de Levadura (NBY).	49
Cuadro 11. Medio YPGA.....	50
Cuadro 12. Medio KB.....	50
Cuadro 13. Medio de Kelman.....	50
Cuadro 14. Leche desnatada Agar (Skim Milk Agar).	51
Cuadro 15. Medio de Prueba de Movilidad	51
Cuadro 16. Medio para la Prueba de Hidrolisis de Esculina.....	52

RESUMEN

Los frijoles secos son cultivos a los cuales se le consumen las semillas ya secas y que pertenecen a la familia Fabaceae, estos cultivos son importantes para la alimentación mundial, en México el cultivo más importante es el frijol común. Este cultivo es afectado por enfermedades bacterianas causantes de tizones, manchas y marchitamiento. Una de las bacterias que afectan al grupo de los frijoles secos es *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), que causa la enfermedad de la marchitez bacteriana en en Frijol Común y Soya, en otros cultivos como el Frijol Mungo, el Chícharo, Habas, Lentejas etc., la enfermedad es llamada como mancha bronceada.

Cff es una bacteria perteneciente a la familia Microbacteriaceae por lo que no forma esporas y tienen forma de bastoncillos cortos. Es una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, sus colonias tienen la particularidad de tener diferentes colores, ya sean amarillas, naranjas, rosas, violetas y rojas, siendo éstas últimas las que presentan más severidad en sus hospederos.

El objetivo principal de esta investigación fue la de identificar a la bacteria por métodos bioquímicos, así como la de caracterizar los síntomas en sus hospederos y en otras especies vegetales, para lo que se utilizó treinta y un muestras de semillas provenientes de Estados Unidos y de algunos estados de México. La extracción y caracterización de la cepa se realizó en el laboratorio de fitopatología del Departamento de Parasitología, el establecimiento e inoculación de las plantas tuvieron lugar en el invernadero del Departamento de Forestal, en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Se obtuvo una cepa de *Cff* de color naranja, catalasa positiva, hidrólisis de gelatina positiva, hidrólisis de caseína positiva. La cepa causó marchitez en 8 de las especies utilizadas para los postulados de Koch y en el trigo, maíz y cacahuate, se volvió a aislar después de los 20 días de la inoculación.

Palabras clave: Frijoles secos, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), Marchitez Bacteriana, Mancha bronceada.

I. INTRODUCCIÓN

Los frijoles secos son un grupo de cultivos pertenecientes a la familia de las fabáceas, que son aquellas semillas que se consumen ya secas como el Frijol común *Phaseolus vulgaris*, el Frijol Mungo *Vigna radiata*, las lentejas *Lens culinaria*, los chícharos *Pisum sativum*, etc. (FAO, 2015).

FAO (2015) mencionó que los frijoles secos son muy importantes para la dieta de personas que no cuentan con acceso a proteínas de origen animal, ya que estas cuentan con un nivel alto de estas sustancias, ricas en fibras solubles, así como otros nutrientes. También se hace mención de su importancia en el combate contra enfermedades no transmisibles como la diabetes, problemas cardiacos y la obesidad. Además, estos cultivos a menudo son utilizados por agricultores para autoconsumo, así como tener muchos beneficios en los campos en los que se cultivan.

El Frijol Común es un cultivo importante de la cultura gastronómica mexicana, ya que ha sido parte de ella desde épocas prehispánicas, siendo parte importante en el mestizaje junto a otras plantas nativas de México. En la actualidad el mexicano consume en promedio 9.9 kilogramos de este alimento anualmente (SAGARPA, 2017; SADER, 2019).

En México se han registrado 60 artrópodos plaga en frijol común: 59 insectos, y un ácaro, siendo los más importantes el Minador del frijol *Xenochalepus signaticollis*, Conchuela del frijol *Epilachna varivestis* Chicharrita del frijol *Empoasca kraemeri* (Mena, 2010). También se han registrado como principales enfermedades al Moho blanco o salivazo causada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, pudrición carbonosa (*Macrofomina phaseolina*), marchitez y pudrición seca de la raíz (*Fusarium oxysporum* y *F. solani*), pudrición de la raíz y cuello (*Rhizoctonia solani*), así como virosis con los virus mosaico común del frijol, mosaico amarillo del frijol transmitidos tanto por semilla como por pulgones y el virus mosaico dorado del frijol transmitido por mosquita blanca (SAGARPA, 2013). Schwartz & Harveson (2015) reportaron que las enfermedades bacterianas que afectan al frijol común son el tizón común del frijol causados por

Xanthomonas axonopodis pv. *phasoli*, el tizón del halo (*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*), la mancha café bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*), el tizón de fuscus (*Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*) y la marchitez bacteriana ó mancha bronceada causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff).

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* es el agente causal de la enfermedad de la marchitez bacteriana en frijol común *Phaseolus vulgaris* y Soya *Glycine max* y de la enfermedad de la mancha bronceada en el resto de sus hospederos (EPPO, 2011; Osdaghi *et al.*, 2020). El agente causal es cosmopolita, no solo encontrándose en su hospedero principal, el frijol común, si no en muchos otros cultivos y malezas causando síntomas o solo utilizándolos como reservorio (Harveson *et al.* 2015; Osdaghi *et al.* 2020). Otra cosa que la hace muy importante es su distribución, ya que se encuentra en África, América, Asia, Europa y Oceanía y por ende muchos países reportan su presencia en su territorio (EPPO, 2011).

1.1. Objetivo

Identificar y caracterizar cepas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens* en semillas de frijol *Phaseolus vulgaris* L. provenientes de semillas y granos de importación de Estados Unidos a México; Así como la patogenicidad dentro de la familia Fabaceae y Poaceae.

1.2. Justificación

Se tienen reportes *Curtobacterium flaccumfacien* pv. *flaccumfaciens*. Afectando a un amplio rango de hospedantes diferentes a la familia Fabaceae y Poaceae; por lo que toma mucha relevancia, ya que los integrantes de estas familias, están muy estrechamente relacionados; Además existen reportes de enfermedades de frijol que afectan a estos mismos cultivos. La mayoría de estos cultivos se consideran básicos para la alimentación alrededor del mundo.

1.3. Hipótesis

Curtobacterium flaccumfaciens pv *flaccumfaciens* puede afectar a otras especies de plantas como son las lentejas *Lens sculenta* y el cacahuate *Arachis hipogea*, así como utilizar de reservorio al maíz *Zea mays* y trigo *triticum aestivum*.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Frijoles Secos.

FAO (2016) mencionó que los frijoles secos son aquellas plantas pertenecientes a la familia Fabaceae, las cuales solo se incluyen las plantas que se utiliza la semilla seca para consumo y excluyendo a aquellas que la semilla solo se utiliza para siembra. Las especies más populares en el mundo son: Frijol Común *Phaseolus vulgaris*, Soya *Glicine max*, Chícaros *Pisum sativum*, Frijol Mungo *Vigna radiata*, Frijol Caupí *Vigna unguiculata* y las Lentejas *Lens culinaris*.

2.1.1. Importancia Económica de los Frijoles Secos.

FAO (2020) indicó que la producción mundial de frijoles secos en todo el mundo en el año del 2020 llegó a un total de producción de 89,821,452 toneladas, siendo la India el país con mayor producción, 23,368,478 de toneladas, seguido por Canadá con una producción de 8,166,500 toneladas y China, que ocupa el tercer lugar en la producción, teniendo este país un valor de 4,799,549 toneladas en ese año. México ocupó el lugar número 13 en la producción mundial de frijoles secos en ese año con un total de 1,341,275 toneladas. El frijol común y la soja fueron en ese mismo año, los cultivos con más volumen de producción en México, llegando a la cantidad de 1,302,089.48 de toneladas con un valor de \$18,851,929,134 de pesos (SIAP, 2020).

2.2. Marchitez Bacteriana de los Frijoles Secos *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens*.

2.2.1. Clasificación Taxonómica (EPPO, 2011).

Reino: Bacteria

Phylum: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Suborden: Micrococccineae

Familia: Microbacteriaceae

Género: *Curtobacterium*

Especie: *flaccumfaciens* Collins & Jones, 1984.

Sinonimos

Bacterium flaccumfaciens Hedges, 1922.

Phytomonas flaccumfaciens Bergey et al., 1923.

Pseudomonas flaccumfaciens Stevens, 1925.

Corynebacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* Dowson 1942.

Siguiendo la taxonomía más reciente *Cf* se divide en los siguientes patovares: *flaccumfaciens* (*Cff*) (Collins & Jones, 1984), *betae* (*Cfb*) (Collins & Jones, 1983), *oortii* (*Cfo*) (Collins & Jones, 1984), *poinsettiae* (*Cfp*) (Collins and Jones, 1984) e *ilicis* (*Cfi*) (Young et al., 2004).

2.2.2. Síntomas de la Enfermedad.

La marchitez bacteriana o mancha bronceada de las legumbres secas es causada por una bacteria Gram-positivo llamado *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens*. La enfermedad manifiesta una serie de síntomas, las cuales son áreas cloróticas y necróticas en las en niveles, acompañadas de una marchitez general en la planta, y en general permanente, que conlleva a la muerte de las plantas (Harveson *et al.*, 2015). El marchitamiento foliar y la clorosis en diversas áreas son los primeros síntomas en aparecer, lo cual lleva a un necrosamiento con un halo amarillo alrededor. En climas cálidos o periodos de estrés hídrico, llevan al marchitamiento de la planta debido a que la bacteria se encuentra en el sistema vascular, lo cual obstruye el movimiento del agua por el mismo. (Huang *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2013; Harveson *et al.*, 2015). Por eso, las plantas infectadas pueden recuperarse cuando la temperatura baja en la noche o durante los días nublados o húmedos. El desgarramiento o trituración de los tejidos necróticos de las hojas es común bajo la lluvia y se presenta viento y granizo, dando una apariencia irregular a las hojas con los síntomas (Osdaghi *et al.*, 2020).

Las plántulas y plantas jóvenes infectadas a menudo presentan una alta severidad y mortalidad, siendo mayor en plantas provenientes de semillas infectadas (Harveson & Schwartz, 2007; Harveson, 2013). Las plántulas que llegan a expresar los síntomas desde el cotiledón y la primera hoja trifoliada se mueren a los pocos días de la post-emergencia (Huang *et al.*, 2009; Harveson *et al.*, 2015). En inoculaciones artificiales bajo condiciones de invernadero, la marchitez de los cotiledones puede observarse los primeros síntomas de 4 a 8 días post-inoculación. La temperatura ambiental encima de los 30°Celsius mejora el crecimiento del patógeno en tejidos vasculares, conduciendo a la muerte repentina de plántulas pequeñas (Huang *et al.*, 2009).

Las plantas jóvenes afectadas en una etapa temprana usualmente mueren, y las que sobreviven permanecen atrofiadas, mostrando síntomas de coloración amarillenta y marchitez severa y no produce vainas fértiles (Osdaghi *et al.*, 2020).

Las plantas infectadas en etapas más tardías, desarrollan más lento los síntomas y menos severas. En este caso, los haces vasculares que están entre el tallo y la semillas se bloquean, reduciendo la transmisión del patógeno. (Harveson *et al.*, 2015). Se informó que el porcentaje de semillas de frijol común *Phaseolus vulgaris* que poseen síntomas de marchitez bacteriana en un campo dado varía de 0% a 25% en los campos productores de semillas en Canadá y en las parcelas de investigación en Nebraska (Harveson *et al.*, 2006; 2015).

Osdaghi *et al* (2020) observó que no había diferencias significativas de los síntomas de la enfermedad entre las diferentes especies de hospederos. En Frijol Caupí *Vigna unguiculata*, se observan márgenes cloróticos que rodean áreas necróticas más notables que en el Frijol Común, el Frijol Mungo *Vigna radiata* y Soya *Glicine max* tienen síntomas parecidos a lesiones doradas. La alta incidencia de la enfermedad en campos de Frijol Caupí y Frijol Mungo tiene como resultado que las plantas abultadas tengan un aspecto amarillento desde la distancia, mientras que en plantas de Frijol Común infectadas severamente tienden a verse cafesuscas desde la distancia. En Frijol Mungo, el marchitamiento general de las plantas es muy raro, mientras que la necrosis intervenal se ve como un café pálido a un color bronceado (Wood & Easdown, 1990). Los síntomas en la soya son parecidos, por eso la enfermedad es llamada “mancha bronceada” (Dunleavy, 1983; Wood & Easdown, 1990). En frijol común y caupí, se observa la defoliación de la planta y es afectada con la caída de las hojas en condiciones de ventisca, mientras que esto no es común en Frijol Mungo y Soya (Osdaghi *et al.*, 2020).

Cuando la planta infectada con el patógeno sobrevive y produce semillas maduras, éstas a menudo presentarán una decoloración como resultado de la infección y colonización de la bacteria, particularmente en variedades de semillas con coloraciones blanquecinas (Hagedorn & Inglis, 1986; Schwartz *et al.*, 2005; Harveson, 2013). Siendo la decoloración de la semilla un síntoma común de la enfermedad (Shwartz *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2009). Esto se debe ya que el patógeno se transmite dentro del sistema vascular de la planta huésped, la cubierta de la semilla puede mostrar una coloración amarilla, naranja, rosa o púrpura, mientras que las

partes exteriores de la vaina permanecen asintomáticas (Harveson, 2013). En infecciones severas, las flores también se arruinan y, bajo estas condiciones, la producción de semillas se reduce drásticamente (Wood & Eastdown, 1990).

Los síntomas de la marchitez bacteriana pueden ser confundidos con las caudadas por el patógeno del tizón común bacteriano *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* cuando ambos patógenos están en el mismo campo. Las lesiones de la marchitez bacteriana pueden verse entre venas, a menudo acompañadas de marchitez y muerte de las plantas infectadas. El marchitamiento y la muerte de las plantas son menos probables de ocurrir en el tizón común bacteriano, el tizón del halo y la mancha marrón causadas por *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, respectivamente (Schwartz *et al.*, 2005; Harveson & Schwartz, 2007).

2.2.3. Rango de Hospederos.

El frijol común *Phaseolus vulgaris* es considerado como el hospedero primario del patógeno de la marchitez bacteriana (Huang *et al.*, 2009) y siendo el hospedero más susceptible entre todos de los cultivos de importancia agrícola dentro de la familia Fabaceae (Harveson *et al.*, 2015; Osdaghi *et al.*, 2015a). Sin embargo, en otras áreas geográficas el impacto económico de la enfermedad en otras especies de frijoles secos puede ser tan alta como la observada en el frijol bacteriano (Wood & Eastdown, 1990). El rango de hospederos conocido del patógeno incluye:

Cuadro 1. Principales hospederos de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Nombre Común	Nombre científico
Frijol Común	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Frijol Adzuki	<i>Vigna angularis</i>
Lenteja Negra	<i>Vigna mungo</i>
Caupí	<i>Vigna unguiculata</i>
Zarandaja	<i>Lablab purpureus</i>
Frijolillo	<i>Phaseolus lunatus</i>
Frijol Mungo	<i>Vigna radiata</i>
Chícharos	<i>Pisum sativum</i>
Ayocote	<i>Phaseolus coccineus</i>
Soya	<i>Glycine max</i>
Espelón	<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i> <i>Zornia glabra</i>

(Dunleavy, 1983; Chavarro *et al.*, 1985; Schwartz *et al.*, 2005; Harveson & Vidaver, 2007; Osdaghi, 2014).

2.2.4. Importancia Económica.

La pérdida económica causada por la marchitez bacteriana es atribuida no solo a disminución sustancial de rendimiento neto del cultivo, sino también a la disminución de producto comercializable debido a apariencia, forma y tamaño de las semillas son factores determinantes para el precio de venta (Huang *et al.*, 2009). Por eso, en inspecciones visuales de campos de frijoles secos, cabe señalar que las semillas pueden infectarse incluso cuando las vainas se ven saludables (Harveson *et al.*, 2006).

2.2.5. Epidemiología.

Wood & Easdown (1990); Camara *et al* (2009) mencionaron que la epidemiología de la marchitez bacteriana es similar a la de otras enfermedades que se transmiten por semillas en hortalizas y cultivos anuales, refiriéndose a la semilla como reservorio e infección inicial de la bacteria. *Cutobacterium flaccumfacien pv flaccumfaciens* (*Cff*) es un patógeno vascular que coloniza sistemáticamente a sus plantas hospederas. Sobrevive en residuos de plantas y la infección puede provenir de semillas infectadas o puede ser introducida por raíces y hojas y aberturas físicas (EPPO, 2011). Se ha demostrado que las lesiones mecánicas producidas por *Meloidogyne incognita* es un mecanismo para la introducción del patógeno a las plantas (Schuster, 1959).

Las semillas contaminadas son consideradas como el principal método de introducción del inoculo de *Cff* en áreas que no presentaban la enfermedad con anterioridad (Saettler & Perry, 1972). El nivel de transmisión de semilla se ha reportado en los rangos de desde 6% al 70% en diferentes ensayos, pero la transmisibilidad del patógeno vía semilla depende de la planta hospedero y el tiempo de infección (Wood & Easdown, 1990; Camara *et al.*, 2009).

Las infecciones posteriores de las plantas a través de las partes aéreas o el follaje, cuando las vainas están maduras, es menos probable que estas se transmitan a las semillas. Esto probablemente se deba al hecho de que la infección de la semilla ocurre cuando *Cff* ingresa al óvulo a través de los elementos vasculares del funículo y el rafe o a través del micrópilo (Zaumeyer, 1932). Todas estas rutas de transmisión dentro de la planta entre el sistema vascular y las vainas se cierran después de que las vainas maduren o semimaduren (Nelson & Dickey, 1970). Además, que la tasa de transmisión en semillas de frijol común es mayor que la de otros hospederos del patógeno. Se ha demostrado que los cultivos de soya tienen una susceptibilidad del 0% al 1% transmisiones del patógeno por semilla, mientras que, en cultivos susceptibles de frijol,

en experimentos en invernadero, arriba del 70% de transmisión por semillas (Camara *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2018).

Cff puede sobrevivir aproximadamente 24 años de forma saprofita en semillas de frijol común almacenados a temperatura ambiente en el laboratorio (Burkholder, 1945). Schuster & Sayre (1967) aislaron cepas virulentas de *Cff* de pigmentación naranja de 15 años de antigüedad, y cepas de pigmentación purpura de 8 años de antigüedad, de semillas de frijol común mantenidas a 10° Celsius. La bacteria desarrolla una gruesa capa bacteriana debajo de la cubierta de la semilla o superficialmente en la superficie de la semilla (Hedges, 1926). Se han evaluado semillas de frijol común con síntomas usando el escaneo de un microscopio electrónico y también se ha visto películas cubriendo la superficie de la semilla. La proporción de decoloración en lotes de semillas de frijol seco en la temporada actual generalmente se correlaciona con el riesgo de brotes de enfermedades en la temporada de cultivo posterior (Osdaghi *et al.*, 2020). Hsieh *et al.* (2006) demostró que el grado de decoloración del tegumento afecta a la emergencia de la planta, su altura, incidencia de la enfermedad y la severidad de la marchitez bacteriana de las plantas. Aunque algunas de las plántulas derivadas de semillas con decoloración amarilla permanecen asintomáticas. *Cff* se puede detectar en tales plántulas 14 días después de la emergencia (Hsieh *et al.*, 2006).

La enfermedad aparece con más frecuencia en áreas con veranos calurosos, con mucha precipitación y condiciones ambientales húmedas. Los altos niveles de humedad de las hojas provocados por la lluvia o el riego por aspersión elevado se considera el factor principal que ayuda a la transmisión del patógeno de planta a planta dentro del campo (Schwartz *et al.*, 2005). La propagación de la enfermedad dentro de un campo se ve reforzada por granizadas, gotas de lluvia impulsadas por el viento, así como cualquier forma de daño físico causado durante las operaciones de campo, por ejemplo, en el muestreo, las labores culturales y la aplicación de agroquímicos (Harveson *et al.*, 2015).

El estrés ambiental, en especial la sequía y las temperaturas cálidas durante la luz del día, incrementa el progreso y la severidad de la marchitez bacteriana. La epidemiología

de la enfermedad contrasta con la del tizón del halo en Frijol Mungo y Frijol Común, en las condiciones más cálidas y secas son más propicias para el desarrollo de la enfermedad de la marchitez bacteriana, y las condiciones más frías y húmedas tienen más probabilidades de provocar epidemias de tizón de halo (Harveson & Schwartz, 2007; Noble *et al.*, 2019). Por lo tanto, las zonas con el ambiente más favorable para las infecciones de la enfermedad, son aquellas con veranos calurosos (>30° C) (Starr, 1981).

Harveson & Yonts (2007) han evaluado el efecto de diferentes sistemas de riego y prácticas de rotación de cultivos en la incidencia y severidad comparado a riego por aspersión y por surco. El tratamiento de riego por surco exhibe un efecto intermedio en los parámetros de la enfermedad y el rendimiento del cultivo, mientras que la plantas que crecieron bajo riego por aspersión tuvieron los problemas sanitarios más severos. La rotación de cultivos por parcelas también jugó un rol importante. Los frijoles secos sembrados después de una cosecha de maíz dieron como resultado una menor gravedad de la enfermedad y mejores rendimientos que los sembrados después de una segunda cosecha de frijoles secos (Harveson & Yonts, 2007; Harveson *et al.*, 2015).

2.2.6. Supervivencia.

La supervivencia de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* en suelo intacto bajo condiciones de campo varía entre 34 a 80 días en función de la temperatura y la humedad (Gonçalves *et al.*, 2017). Aunque Silva *et al.* (2012) mencionó que la bacteria puede sobrevivir en campo abierto de 9 a 16 días. Esto debido a la presencia de microorganismos antagonistas como son los actinomicetos. Los desechos y la paja de frijol común infestados son importantes en la hibernación de *Cff*. Las bacterias en desechos infestados que se encuentran en la superficie del suelo sobreviven mucho mejor que las bacterias en el desecho enterrado 20 cm (Schuster & Coyne, 1974). En Brasil, *Cff* sobrevive por encima de los 240 días en desecho de frijol

en la superficie del suelo y por 30 días cuando los residuos son enterrados a 20 cm en el suelo, esto debido a que *Cff* como muchas bacterias fitopatógenas no cuentan con esporas y también son inhibidas por microorganismos antagonistas y depredadores (Silva *et al.*, 2012). Aunque, el patógeno puede sobrevivir durante el invierno en residuos de plantas infectadas y también en malezas, no puede sobrevivir por un periodo largo de tiempo en el suelo después que los residuos de cosecha se han composteado (Schuster & Coyne, 1974; 1975).

La secuencia del genoma completo de la cepa más virulenta de *Cff* (P990) reveló la presencia de 1,4- β -xylanasa. Esta es una enzima responsable del rompimiento de la hemicelulosa, uno de los principales componentes de la pared celular. Además, estas enzimas degradan el polisacárido lineal xilano en xilosa, ayudando a la bacteria a sobrevivir en residuos de cosecha como saprofita en ausencia de un hospedero vivo. (Osdaghi *et al.*, 2020). Schuster & Coyne (1974) mostraron una correlación directa entre la virulencia de una cepa dada de *Cff* y las cepas que más tiempo sobreviven, donde las cepas que son más virulentas, son las más adaptadas para sobrevivir. Se ha observado que algunas especies de plantas no leguminosas, pueden albergar al patógeno en el invierno (Hall, 1991). Gonçalves *et al.* (2017) observó que, bajo las condiciones del campo brasileño, *Cff* coloniza cebada, avena negra, canola, raigrás, trigo y avena blanca donde estas especies de plantas son cultivadas durante el invierno en rotación con el frijol común. Todas las cepas aisladas de *Cff* de estas plantas presentan patogenicidad en frijol común. Se ha recomendado evitar cultivar frijol común en rotación con estas plantas en zonas donde ha habido la incidencia de la marchitez bacteriana. La bacteria también coloniza endófitamente tallos de plantas de trigo inoculadas con técnicas de herida o de pulverización (Silva *et al.*, 2012). Harveson *et al.* (2015) aislaron cepas naranja y amarillo patógenas de *Cff* de plantas de trigo infectados con la enfermedad de la paja negra. Las cepas patógenas de *Cff* también fueron aislados de plantas asintomáticas de berenjena, chile y tomate en Iran (Osdaghi *et al.*, 2018). por el contrario, se han aislado cepas altamente virulentas de *Cff* con pigmentos amarillos y rosas en asociación con infecciones de plantas de maíz

afectadas por el patógeno del marchitamiento de Goss, *Clavibacter nebraskensis* (Harveson *et al.*, 2015; Osdaghi, 2020).

2.3. Caracterización de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens*.

2.3.1. Aislamiento.

Seattler *et al.* (1989) indicó que, para realizar el aislamiento de bacteria a partir de semillas, se tiene que lavar estas con una solución de cloro (3-5%) y enjuagando tres veces con agua destilada, posterior a esto, se deja secar las semillas en sanitas de papel previamente esterilizadas. A continuación, las semillas se sumergen en un buffer de extracción, el cual puede ser de fosfato salino el cual debe de dejarse 24 horas antes de sembrarse en un medio de cultivo o un búfer de peptona, el cual debe dejarse en agitación durante una hora antes de sembrarse en un medio de cultivo.

2.3.2. Tipos de Medios de Cultivo.

El cultivo de bacterias *in vitro* requiere de crear el medio favorable nutricionalmente, para poder reproducirlas. Los medios de cultivo deben de tener fuentes de carbono y nitrógeno, minerales y vitaminas.

Entre la gran variedad de fuentes de carbono se pueden emplear algunos como son: Alcoholes, Carbohidratos, Glicoles, Glucósidos y Ácidos. Las fuentes de nitrógeno pueden ser a partir de sales minerales o de fuentes orgánicas como son los Aminoácidos, Extractos de Levadura o Péptidos. Las bacterias también necesitan metales, como todos los organismos, entre los que se encuentran el sodio, potasio, calcio, magnesio, manganeso, hierro, zinc, cobre, fosforo y cobalto. También las bacterias necesitan vitaminas para poder llevar a cabo su proceso metabólico, aunque

hay bacterias que son capaces de sintetizar las necesarias para este fin (Pelczar *et al*,1982: Rodriguez, 2001).

Rodriguez (2001) mencionó que los medios de cultivo se pueden dividir de acuerdo en su consistencia:

Líquido: Estos medios se utilizan para la multiplicación de la bacteria y almacenarlas para su uso posterior, un problema que se puede encontrar en este medio es la posible contaminación que no se puede detectar a simple vista.

Sólido: en estos medios se puede separar fácilmente las cepas bacterianas y a diferencia del medio de líquido, a este medio se le agrega un gelificante, como puede ser, agar o gelatina.

Semisólidos: Estos medios al igual que los sólidos llevan una parte gelificante, pero en menor cantidad, se utilizan para suspender la bacteria en ella y hacer ciertas pruebas necesarias como la de Hugh and Leifson o el medio C creado por Dye.

2.3.3. Pruebas Bioquímicas.

Los diferentes autores recomiendan las siguientes pruebas para caracterizar a las cepas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens*:

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para caracterizar *Cff* por Bradbury, J. (1986).

Curtobacterium		Acido a partir de carbohidratos	
Gram	+	Arabinosa	+
Motilidad	lento	Celobiosa	+
Gelatina	lento	Fructosa	+
Hidrolisis		Galactosa	+
acetato	+	Glucosa	+
piruvato	+	Glycerol	+
lactato	+	Inositol	+
<i>C. flaccumfaciens</i>		Mannosa	+
Crecimiento Aerobico	+	Maltosa	+
NaCl	7-9%	Melibiosa	+
Catalasa	+	Rallinosa	+
Rojo de Metilo	+	Sacarosa	+
Oxidasa	-	Xylosa	+
Tirosinasa	-	Adonitol	u
Ureasa	-	Melezitosa	u
Indol	-	Dextrina	-
H ₂ S a partir de Cysteina	+	Glicógeno	-
Nitrato	-	Inulina	-
Amoniaco a Partir de Peptona	-	Almdón	-

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas para caracterizar *Cff* por Schaad, N. (2001).

<i>Curtobacterium flaccumfciens pv flaccumfaciens</i>	
Movilidad	Variable
Pigmentación	Amarillo, Naranja o Rosa
CNS	Variable
TTC	+
Ribosa	Lento
Sorbitol	-
Acetato	+
Formato	-
Caseína	+
Esculina	+

Cuadro 4. Pruebas bioquímicas para caracterizar *Cff* por la EPPO (2011).

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	+
O/F Glucosa	O: + ; F: -
Catalasa	-
Oxidasa	-
Ureasa	-
Indol	-
Hidrolisis de Gelatina	+
Hidrolisis de Caseina	+
Acido a partir de Manosa	+
Acido a partir de Maltosa	+
Acido a Partir de Inulina	-
Acido a partir de Erytitrol	-
Acido a partir de Manitol	-
Acido a Partir de Inositol	+

2.3.4. Pruebas Preliminares.

2.3.4.1. Tinción de Hans Christian Gram (1882).

La tinción de Gram, es la técnica de tinción más importante en bacteriología, ya que divide a las bacterias en dos grandes grupos, las Gram positivas y las Gram negativas. Esta división se debe que estos grupos tienen distinta composición química en su pared celular, el primer grupo contiene una capa muy gruesa de mureína y peptidoglucano y al agregarle el colorante cristal violeta o azul de metilo, junto con una solución de yodo que actúa como mordente, generalmente Lugol, y en conjunto con los ácidos ribonucleicos de la célula, se crea un complejo que es resistente a los efectos solventes del alcohol. En cambio, el grupo de las Gram negativas tienen una capa más fina de peptidoglucanos y una capa externa de lipopolisacáridos, lipoproteínas y lípidos que no forman el compuesto con el colorante y la solución de yodo, provocando que se disuelvan con alcohol (Benson, 1976; Tripathi y Sapat, 2021).

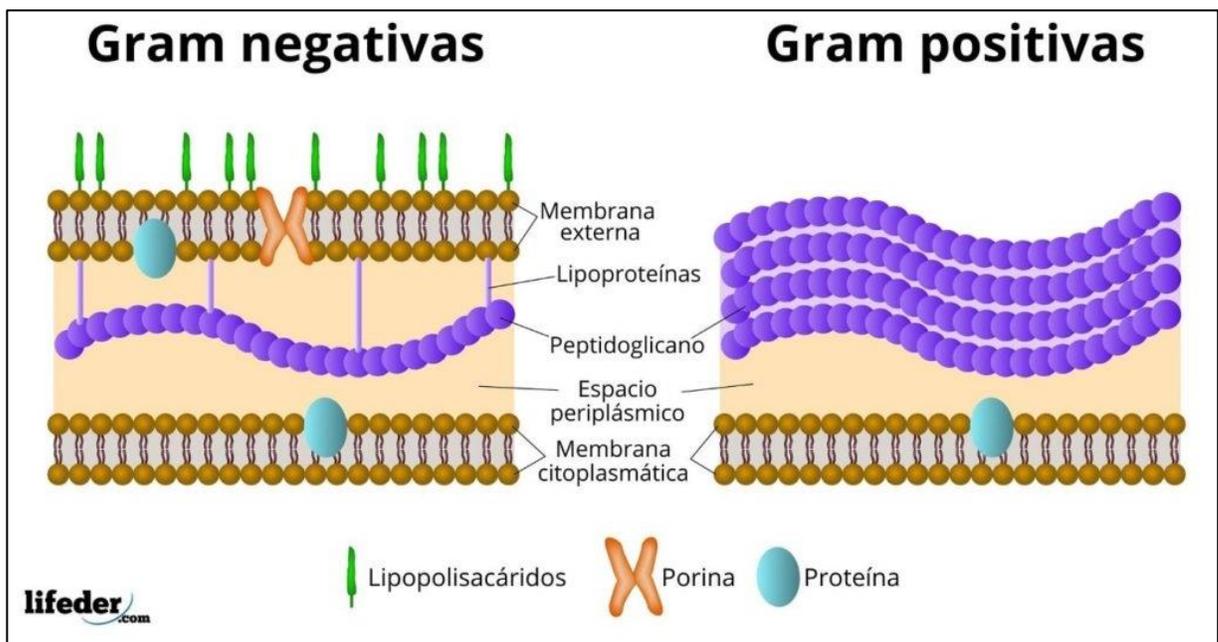


Figura 1. Pared celular de Bacterias Gram positivas y negativas (Parada, 2018).

2.3.4.2. Prueba de Ei Ryu KOH 3% (1938; 1940).

Esta prueba es complementaria o alternativa a la tinción de Gram, diferenciando las Gram positivas y Gram negativas y actuando en su pared celular, en la cantidad de peptidoglicano en esta. Al suspender la bacteria en una solución acuosa de KOH al 3%, la pared celular de la gran negativa se romperá, debido a la baja cantidad de peptidoglicano, liberando todo el material cromosómico viscoso. En cambio, la pared de las bacterias Gram positivas al tener una mayor cantidad de peptidoglicanos, no se romperá (PHE, 2019).

2.3.4.3. Prueba de Catalasa Gottstein (1893); McLeod y Gordon (1923).

Reiner (2010) mencionó que algunas bacterias son capaces de producir una enzima llamada catalasa, que les sirve como mecanismo de defensa, que les permite reparar o escapar de los daños oxidativos del peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Hay una correlación entre la patogenicidad de la bacteria y la concentración de esta enzima. La enzima al contacto con una solución acuosa de peróxido de hidrogeno al 3%, la transforma en agua y aire como productos, y así, provocando que simple vista, se aprecie un burbujeo. Para pruebas en bacterias anaeróbicas se necesita una concentración de 15%.

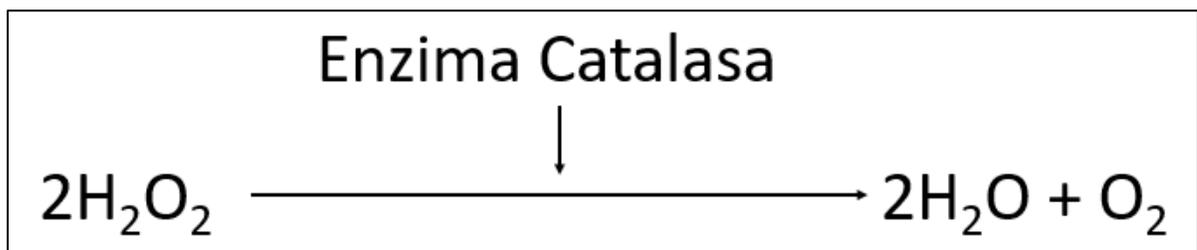


Figura 2. Acción enzimática de la catalasa en peróxido de hidrógeno (UAAAN, 2022).

2.3.4.4. Prueba de Oxidasa Gordon y McLeod (1928).

La prueba de oxidasa se utiliza para detectar la presencia del citocromo oxidasa, enzima que también puede ser conocida como indofenol oxidasa. Para ese propósito se utiliza soluciones que contienen diclorhidrato dimetil-*p*-fenilendiamida, así como la prueba de Kovács, que es más sensible, usando tetra-metil-*p*-fenilendiamida (Shields y Cathcart, 2010). Gaby y Hadley (1957) desarrollaron una prueba modificada utilizando oxalato de *p*-aminodimetilamina con α -naftol para detectar la enzima y tubos de ensayo. Shields y Cathcart (2010) indicaron que la bacteria que en la etapa final de la respiración bacteriana incluye una serie de componentes colectivos en la membrana conocida como cadena de transporte de electrones. El paso final en la cadena puede incluir el uso de la enzima citocromo oxidasa, esta cataliza la oxidación del citocromo C mientras este reduce el oxígeno a forma de agua. La prueba de oxidasa a menudo utiliza el reactivo diclorhidrato tetra-metil-*p*-fenilendiamina como un donador artificial de electrones para el citocromo *c*, si cambia de incoloro a un azul oscuro o un compuesto morado, azul de indofenol.

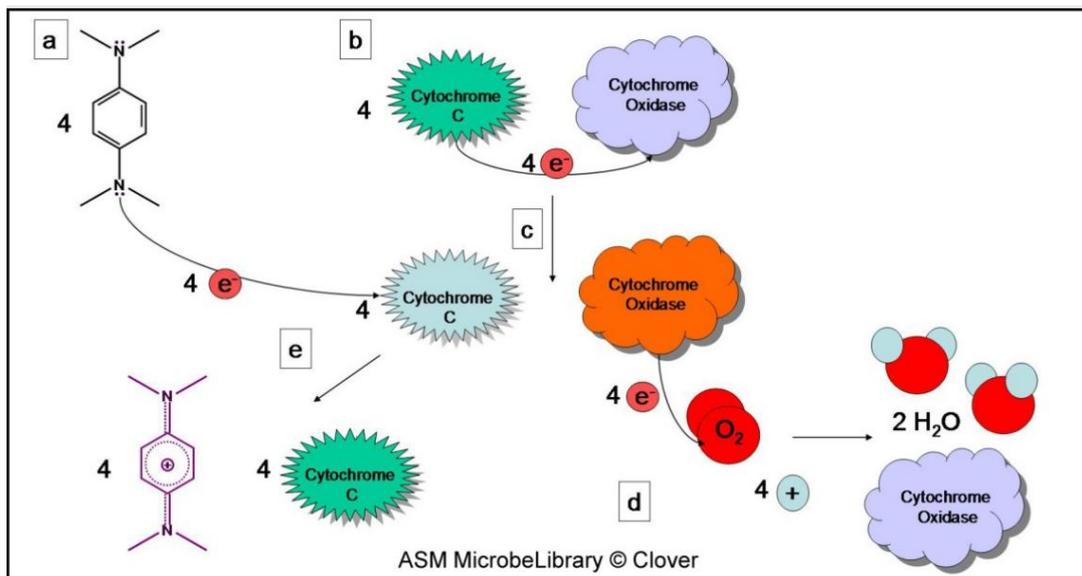


Figura 3. Proceso de oxidación del tetra-metil-*p*-fenilendiamina (Shields y Cathcart, 2010).

2.3.4.5. Prueba de Oxidación-Fermentación Hugh y Leifson (1953).

Hanson (2008) mencionó que la prueba de O/F es usado para determinar si las bacterias metabolizan carbohidratos oxidativamente, fermentativamente, o que no pueden metabolizar la glucosa empleada en el medio. Durante el proceso de anaeróbico de fermentación el piruvato es transformado en una variedad de ácidos. La alta concentración de ácido durante la fermentación torna el indicador azul de bromotimol que contiene el medio, de un color verde a amarillo, en presencia o ausencia de oxígeno.

Winn *et al.* (2006) determinó que las bacterias no fermentativas metabolizan glucosa mediante respiración aeróbica y por lo tanto solo producen un pequeño cúmulo débil de ácidos durante el ciclo de Krebs y Entner Doudoroff. El aumento de la concentración de glucosa en el medio aumenta la producción de estos ácidos débiles a un nivel que puede detectarse mediante el indicador azul de bromotimol. Para mejorar aún más la detección de estos ácidos débiles, este medio contiene una concentración reducida de peptonas. Esto reduce la producción de aminos del metabolismo de los aminoácidos, por lo tanto, reduce el efecto neutralizante de estos productos. Se agrega búfer de fosfato dipotásico para promover aún más la detección de ácido. Las bacterias que dan esta reacción en medios O/F son oxidativas.

2.3.5. Pruebas Fenotípicas.

2.3.5.1. Prueba de Movilidad.

Leboffe y Pierce (2010) señalaron que esta prueba está diseñada para comprobar la motilidad bacteriana, al ser un medio semisólido, la bacteria debe tener estructuras para locomoción, por lo general se utiliza del 1.5% al 0.4%. para ello, se toma un poco de la colonia bacteriana con una aguja recta, y después se introduce en en el medio de lo más lineal posible.

2.3.5.2. Hidrolisis de Gelatina Frazer (1926).

La prueba de hidrolisis de la gelatina detecta la habilidad de la bacteria para producir gelatinasa. Las gelatinasas son proteasas secretadas extracelularmente por algunas bacterias las cuales hidrolizas o digieren a la gelatina dando como resultado polipéptidos, el cual puede ser interferido por la misma enzima para convertirlos en aminoácidos. La bacteria es capaz de tomas estos aminoácidos para llevar a cabo su proceso metabólico (Leboff y Pierce, 2010).

De la Cruz y Torres (2012) indicaron que la hidrolisis de gelatina es detectada usando un medio nutritivo a partir de la misma. Este medio, que al ser solido gracias a la gelatina, pasa a estado líquido cuando hay actividad de la gelatinasa. Al pasar esto, si la prueba positiva se mete a un refrigerador, este no deberá regresar a su estado inicial, cuando la prueba es negativa si se vuelve a solidificar.

Se agrega 120 g de gelatina de grado bacteriológico a un litro de agua, se ajuta el pH a 7. Se agrega en tubos de ensaye y se esteriliza, después de que se enfría se mete al refrigerador (Schaad, 2001).

2.3.5.3. Producción de Caseinasa.

La caseína es una macromolécula proteica que no puede ser asimilada por la célula bacteriana, dado a que no puede pasar por la pared celular, para ello, la bacteria crea una exoenzima llama caseinasa, la cual, tiene la función de hidrolizar los enlaces peptídicos (CO-NH), dando como resultado peptonas, polipéptidos, dipéptidos y finalmente aminoácidos, los cuales ya pueden ser transportados a través de la pared celular (Brown y Smith, 2017).

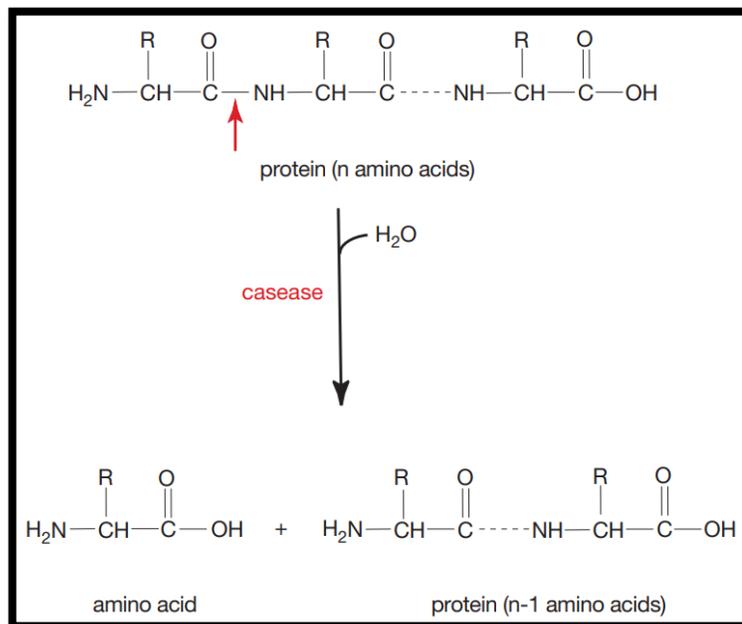


Figura 4. Proceso de Hidrólisis de la Caseína (Leboffe & Pierce, 2010).

El medio de cultivo utilizado para esta prueba es una suspensión coloidal, lo que hace que el medio sea turbio blanquecino, que contiene las moléculas de caseínas que son insolubles en agua. La caseína al pasar por la hidrólisis causada por la enzima caseinasa, se cristaliza y solubiliza en el agua, lo cual hace que el medio se vuelva transparente (Leboffe y Pierce, 2010; Brown y Smith 2017).

2.3.5.4. Hidrolisis de Esculina.

La esculina es un glucósido llamado β -glucosa-6,7 dihydroxycoumarin, producido por el árbol de la nuez de la India (*Aesculum hippocastanum*). Este compuesto puede ser hidrolizado enzimáticamente, dando como resultado dos productos, esculetina y glucosa. La esculetina en combinación con iones de hierro, producen una coloración café oscuro en el medio, se utiliza por lo general citrato de amonio férrico como indicador de esta reacción. Para bacterias anaerobias puede ser utilizado medios con indicadores de pH, esto porque la glucosa que se produce por la vía enzimática, puede ser utilizada por la bacteria, produciendo acidificación del medio (Stephen *et al.*, 1976).

2.3.5.5. Prueba de Producción de Ácidos a Partir de Carbohidratos Dye (1968).

Schaad *et al* (2001) indicaron que para esta prueba se necesita un medio credo por Dye en 1968, al cual, se le agrega un carbohidrato que la bacteria sospechosa sea capaz de metabolizar y, al hacerlo, el medio con un pH neutro (6.8) se vuelve ácido, cambiándolo de color gracias al indicador orgánico disuelto en él.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. El establecimiento de las plantas fue en el invernadero del Departamento de Forestal, que está ubicado en la misma universidad.

Se utilizaron 31 muestras de semillas de frijol para obtención de la bacteria, las cuales son provenientes de Estados Unidos hacia México, así como variedades locales y criollos.

3.1. Aislamiento de la bacteria.

Se tomaron 30 semillas de cada muestra, las cuales fueron tratadas por un triple lavado con hipoclorito de sodio al 1.8% (Cloralex 5%) y agua destilada estéril. Se colocaron en matraces de 150 ml, agregándoles buffer de extracción, de Fosfato Salino (conocido por sus siglas en inglés como PBS), a los cuales se les agregó 3 cm de la solución arriba del tope de las semillas y tapando la boca del matraz.

Se dejó en refrigeración a 6°C por 24 horas. Posteriormente, se utilizó un asa bacteriológica, sumergiéndola directamente en el buffer, y sembrando por estría seriada en una caja Petri con medio Caldo Nutritivo y Extracto de Levadura (NBY) (medio 1, apéndice 2), también, a esta solución se le hacen una dilución seriada a razón de 1×10^{-2} Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mililitro para su siembra en medio de cultivo, las cajas se llevaron a incubación a una temperatura de 26 C durante 24 horas.

3.2. Caracterización de las Colonias.

A las 24 horas se analizaron las cajas a simple vista y con ayuda de un microscopio estereoscópico, se localizaron colonias que coincidieron con la morfología colonial de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens*. Las cuales se resembraron por estría seriada con la finalidad de separar las colonias puras, éstas se incubaron por 24 horas.

3.2.1. Pruebas Bioquímicas Preliminares.

Las pruebas preliminares consistieron en hacer la tinción de Gram a las colonias que coincidían en la morfología de la bacteria, para asegurar que no venga contaminado con otras bacterias. Posteriormente, se realizó la prueba de Ryu, que consiste en poner en un portaobjetos una solución de KOH al 3% y con la ayuda de un asa bacteriológica, tomar una muestra de la colonia y frotarla en la gota de la solución, se levanta el aza de la gota tratando de ver si la viscosidad de la solución aumentó (Schaad, 2001; EPPO, 2011)

Para la prueba de oxidasa se utilizó una solución acuosa al 1 % de N,N,N,N tetrametil-p-fenilendiamina dihidrocloruro (test de Oxidada BD), la cual se agregó una gota en un papel filtro y se le frotó una muestra de la colonia, y se observa si hay cambio de color antes de un minuto. La siguiente prueba preliminar es la catalasa, la cual consistió en agregar una gota de peróxido de hidrogeno y se frotó una muestra de la colonia, para ver si formaban burbujas (EPPO, 2011; Osdaghi 2020).

La prueba de oxidación-fermentación se utilizó un medio específico en tubos de ensaye (apéndice 1), el cual se toma cuatro tubos (2 tubos test y 2 tubos testigo), de los cuales, a dos tubos se le sembraron una pequeña porción de la colonia, y a uno de ellos se le agregó aceite mineral estéril, y también a uno de los dos tubos restantes, se metieron a la incubadora por 24 horas, con el propósito de saber el tipo de reparación que tiene la bacteria (Schaad, 2001; Leboffe y Pierce, 2010).

3.2.2. Pruebas Fenotípicas.

Las pruebas fenotípicas utilizadas fueron las recomendadas por EPPO (2018) y Osdaghi (2020).

- Hidrolisis de Gelatina.
- Hidrolisis de Caseína.
- Hidrolisis de Esculina.
- Crecimiento en TTC.
- Prueba de Movilidad.
- Ácido a Parir de Inositol.
- Ácido a Partir de Manitol.
- Ácido a Partir de Almidón.

SAFRINET (2000) y Schaad *et al.* (2001) recopilaron los medios utilizados para llevar a cabo las pruebas fenotípicas, las cuales fueron utilizadas en este trabajo (Apéndice 2). También se modificaron y/o se ajustaron la prueba de motilidad y la prueba de hidrolisis de esculina, utilizándose las indicadas por Leboffe & Pierce, 2010 (Apéndice 2).

3.3. Postulados de Koch.

Los postulados de Koch, se desarrollaron con pruebas de patogenicidad, para lo cual, se utilizaron las siguientes especies de plantas y variedades:

- Cacahuete *Arachys hypogea*
- Chícharo *Pisum sativum*
- Frijol Mungo *Vigna radiata*
- Frijol Ejotero *Phaseolus vulgaris*
- Frijol Blanco *Phaseolus vulgaris*
- Frijol Negro *Phaseolus vulgaris*
- Frijol Pinto *Phaseolus vulgaris*
- Lenteja *Lens esculenta*
- Soya *Glycine max*
- Trigo *Triticum aestivum*
- Maíz *Zea mais*.

3.3.1. Obtención de Plántulas.

Se utilizaron charolas germinadoras de 200 cavidades usando peat moss como sustrato, el cual se esterilizó tres veces en la autoclave vertical por 20 minutos, de cada especie de vegetal se utilizaron 18 semillas. Una vez que germinaron las semillas, las plántulas se trasplantaron a vasos de unicel de 20 onzas que contienen peat moss, y se regaron cada dos días.

3.3.2. Inoculación.

En el laboratorio se preparó una solución bacteriana con la cepa ya identificada, para la cual, se utilizó la escala de McFarland, para llegar a una concentración de 1×10^8 UFC/ml. A continuación, con ayuda de una jeringa de insulina (1 ml BD), se inoculó la solución bacteriana (0.1 ml) en las primeras hojas enteras y la primera hoja trifoliada.

3.3.3. Aparición de síntomas.

A los dos días después de la inoculación se observaron las plantas para determinar si los síntomas empiezan a aparecer y se observara diariamente. Cuando los síntomas fueron videntes en las 8 plantas, se procedió a reaislar la bacteria, lo que consistió en tomar muestra del tejido enfermo y aplicarle un triple lavado con hipoclorito de sodio (Cloralex 6%) y agua destilada estéril, con la ayuda de un colador convencional escurriendo el exceso de líquido, se dejó la muestra en una bolsa de maceración, agregándole 5 ml de agua destilada estéril aproximadamente, para su maceración.

3.3.4. Re aislamiento del inoculo.

Una vez macerada la muestra, se procedió a hacer una siembra directa con la ayuda de un asa bacteriológica, con una estría seriada, y dejando en incubación a una temperatura de 26°C por uno o dos días según la muestra. Se purificaron las colonias que coincidían con la morfología colonial y color de la cepa original y se les corrieron las pruebas preliminares, la prueba de producción de hidrolisis de caseína, la hidrolisis de almidón y los carbohidratos. Y por último esas mismas sepas se reinocularon en plántulas nuevas de las plantas anteriormente señaladas para volver a identificar los síntomas y reaislar la bacteria por tercera vez.

El maíz, el cacahuate y el trigo tuvieron una modificación de estos procedimientos, ya que, a diferencia de las otras especies, a estos se le inoculó la bacteria con la misma concentración, pero para reaislar la bacteria, se esperó un lapso de 20 días, siguiendo la caracterización ya mencionada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras analizadas se seleccionaron las colonias circulares, lisas, planas o ligeramente convexas, opacas y ligeramente viscosas, con un margen entero, y de colores múltiples, las cuales van desde amarillo, naranja y rosa de acuerdo a EPPO (2011); Harveson (2013) y Osdaghi (2020) (Fig. 5)

La tinción de Gram, a la vista en el microscopio, se observaron bacilos cortos, azules violáceos que concuerda con Osdaghi (2020) (Fig. 6)



Figura 5. Cepas de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumflaciens* extraídas de semillas de frijol.

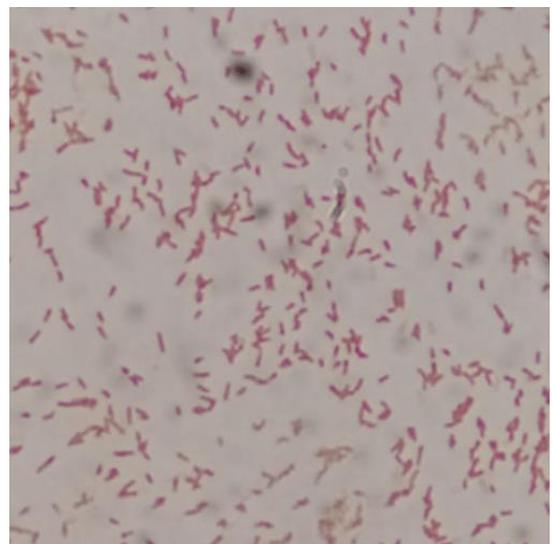
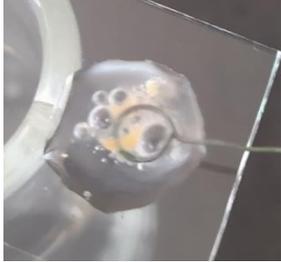
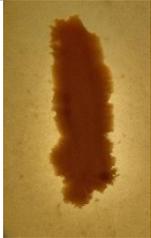


Figura 6. Tinción de Gram, vista al microscopio compuesto con el objetivo 100x.

Se presentan los resultados obtenidos de las pruebas fenotípicas hechas a las colonias en el cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados de las pruebas realizadas a la cepa analizada.

Prueba	Resultados	Imagen
Ryu KOH 3%	-	
Catalasa	+	
Oxidasa	-	
Oxidación- Fermentación	+ ; -	
Hidrolisis de Gelatina	+	
Crecimiento en TTC	+	
Prueba de Movilidad	+	

Hidrolisis de Esculina	+	
Hidrólisis de Caseína	+	
Ácido a Partir de Inositol	+	

Estos resultados concuerdan con lo que menciona Schaad (2001) y EPPO (2011) para llevar a cabo la caracterización de la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), la cual, produce la enzima catalasa, pero no la enzima oxidasa, tiene una respiración oxidativa y no fermenta, es tolerante al Cloruro de Tirfenil Tetrazolium (TTC), presenta movilidad, hidrolasa la esculina y la caseína, puede producir ácido a partir de Inositol, pero no de Manitol, y no puede hidrolizar el almidón.

Para las pruebas de patogenicidad, se registró el 100% de germinación en los hospederos utilizados, exceptuando la soya, que tuvo una germinación del 85%, esto lo explica el M.C. Adolfo García, el cual indica que es por la cantidad y tipo de aceite contenido en los cotiledones de la semilla de soya, estos se descomponen rápido afectado así a la germinación.

M.C. Adolfo García Salinas (profesor investigador de la UAAAN) comunicación personal

Los Síntomas de amarillamiento y necrosis aparecieron entre el quinto y sexto día después de inocular las plantas (Figura 3-7 del Apéndice 1), en las cuatro variedades de frijol común y el chícharo, esto concuerda con lo mencionado por Harveson *et al.* (2015) Gonçalves *et al.* (2017) y Osdaghi *et al.* (2020). En Frijol Mungo, además del marchitamiento presentó ampollas en el área inoculada (Figuras 7 y 8), estos síntomas no fueron descritos por Gonçalves (2017); Harveson *et al.* (2015) y Osdaghi *et al.* (2020), ellos citan, como síntomas de la enfermedad, solo el amarillamiento, seguido por el necrosamiento del tejido infectado y por último una marchitez general que lleva a la planta a su muerte. La aparición de las ampollas puede deberse a las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento fueron una temperatura de 26 a 30° Celsius con una humedad relativa alta.



Figura 7. Síntomas de Frijol Mungo 10 días después de la inoculación con *Cff.*



Figura 8. Amarillamiento y aparición de pústulas en hojas de Frijol Mungo.

Las plantas de lentejas *Lens sculenta* también desarrolló el síntoma típico de esta enfermedad, la marchitez en hojas (Figura 9). Los cuales aparecieron a los 5 días después de la inoculación concordando por lo mencionado por Osdaghi *et al.* (2015b).



Figura 9. Síntomas de *Cff* en planta de lenteja.

Las plantas de cacahuete *Arachis hipogea*, maíz *Zea mais* y trigo *Triticum aestivum*. no desarrollan síntomas, pero pasados 20 días después de la inoculación, se sembró el tejido circundante al área de inoculación, en el medio NBY y la bacteria creció se caracterizó nuevamente con las pruebas más características para esta bacteria, como es la tinción de Gram, oxidasa e hidrolisis de caseína Schaad, 2001; EPPO 2011 y Osdaghi *et al.*, 2020. Esto puede deberse a que la planta puede ser reservorio asintomático de la bacteria, tal como es el caso del maíz y el trigo reportadas por Harveson *et al.* (2015) y Gonçalves *et al.* (2017), así como otras especies vegetales reportadas con la misma condición, esto no concuerda con lo mencionado por Silva *et al.* (2012), ya que indica que la bacteria no sobrevive por más de 16 días en plantas no hospederas y, en estas tres especies se realsió la bacteria a los 20 días después de la inoculación.

Cuadro 6. Resultados de la inoculación y aislamiento de la bacteria en diferentes especies vegetales.

Especies y variedades	Reacción y reaislamiento
Cacahuete <i>Arachys hipogea</i>	- ; + (después de 20 días)
Chícharo <i>Pisum sativum</i>	+;+
Frijol Mungo <i>Vigna radiata</i>	+;+
Frijol Ejotero <i>Phaseolus vulgaris</i>	+;+
Frijol Blanco <i>Phaseolus vulgaris</i>	+;+
Frijol Negro <i>Phaseolus vulgaris</i>	+;+
Frijol Pinto <i>Phaseolus vulgaris</i>	+;+
Lenteja <i>Lens esculenta</i>	+;+
Soya <i>Glycine max</i>	+;+
Trigo <i>Triticum aestivum</i>	-;- (después de 20 días)
Maíz <i>Zea mais.</i>	-;+ (después de 20 días)

(-: Negativo; + Positivo)

La aparición de los síntomas concuerda con lo mencionado por Harveson *et al.* (2015) Gonçalves *et al.* (2017) y Osdaghi *et al.* (2020), siendo este el periodo aproximado de 6 a 8 días después de la inoculación. Los síntomas en la soya aparecieron hasta el día 11 después de la inoculación, esto puede diferir con lo indicado por la variedad y las condiciones ambientales que son diferentes a la de las localizaciones donde se publicaron los artículos de Harveson *et al.* (2015) y Osdaghi *et al.* (2020).

En las cuatro variedades de frijol común se observó que la variedad de frijol negro fue la que presentó mayor tolerancia a la enfermedad y la variedad que presentó mayor susceptibilidad a la misma fue la variedad pinto, esto coincide con lo descrito por Harveson *et al.* (2015). Navarrete y Acosta (2000) mencionaron el mismo caso en el tizón común bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

V. CONCLUSIONES

Se caracterizó la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, extraído de semillas de Frijol Común *Phaseolus vulgaris*.

El Frijol común (las cuatro variedades utilizadas para este experimento), la Soya, el Frijol Mungo, el Chícharo y la Lenteja presentaron los síntomas característicos de esta bacteria.

El maíz y el trigo son reservorios de *Cff* y no manifiestan síntomas, ya que conservaron la bacteria más tiempo que lo que puede sobrevivir fuera de sus hospederos

El cacahuate es un reservorio de dicha bacteria ya que sobrevive en su tejido, pero no manifiesta síntomas característicos de la enfermedad.

VI. RECOMENDACIONES

Para evitar la propagación de la enfermedad a campos libres de ella se recomienda revisar la sintomatología de la enfermedad en la semilla, especialmente en variedades de testa clara, dado que son las más evidentes y las más susceptibles a la enfermedad. Estas variedades presentan la coloración de la cepa de *Cff* con la que viene infectada, con un aspecto aceitoso, y deformación de la semilla Harveson *et al.* (2015), contrastando con “la mancha de lirio”, la cual es una mancha color naranja que se presenta alrededor del hilo de la semilla (Figura 12), fenómeno genético mencionado por el M.C. Adolfo García Salinas, profesor investigador de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. También se puede observar los síntomas de la enfermedad con otras variedades de frijol (Figuras 22-30 del Apéndice 1).



Figura 11. Semillas de frijol pinto.

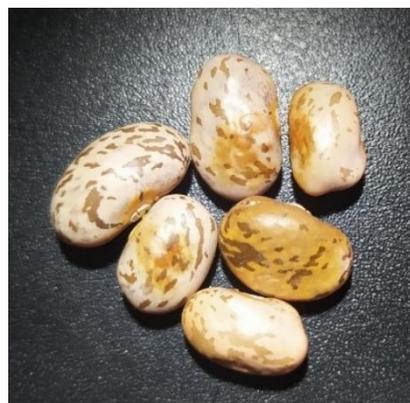


Figura 10. Semillas de frijol pinto infectadas con *Cff*.



Figura 12. Semillas sanas de frijol pinto con “Mancha de Lirio” presente.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Benson, H. (1976). Microbiological Applications: A Laboratory Manual In General Microbiology. Wm. C. Brown Company Publishers. Dubuque, Iowa, EUA.
- Bradbury J (1986) Guide to plant pathogenic bacteria. CABI Publishing,
- Brown, A. & Smith, H. (2017). Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual In General Microbiology. McGraw Hill, 14 edición, 267.
- Burkholder, W. (1945) The Longevity of the Pathogens Causing the Wilt of the Common Bean. *Phytopathology*, 35, 743–744.
- Camara, R., Vigo, S. and Maringoni, A. (2009) Plant to Seed Transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in a Dry Bean Cultivar. *Journal of Plant Pathology*, 91(3), 549–554.
- Chavarro, C., López, G. & Lenne, J. (1985) Characteristics and Pathogenicity of *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccunfaciens* (Hedges) Dows Causal Agent of Bacterial Wilt of *Zornia* spp. and its Effect on Production of *Z. glabra* CIAT 7847 and *Phaseolus vulgaris*. *Acta Agronomica*, 35, 64–79.
- CNRF (2018). Protocolo de Diagnostico: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Gabriel et al., 1989) Schaad *et al.*, 2007. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Estado de México, México.
- Collins, M. & Jones, D. (1984) Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 270–271.
- De la Cruz, T. & Torres, J. (2012). Gelatin Hydrolysis Test Protocol. American Society for Microbiology. E.U.A.
- Dunleavy, J. (1983) Bacterial Tan Spot, a New Foliar Disease of Soybeans. *Crop Science*, 23, 473–476.

- EPPO (2011) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin, 41, 320–328.
- FAO (2015). 2016 Año de Internacional de la Legumbres. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO (2020). Datos Estadísticos de Cultivos y Productos de Ganadería. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Gaby, W. & Hadley (1957) Practical Laboratory Test for the Identification of *Pseudomonas Aeruginosa*. Journal of Bacteriology. EUA.
- Gonçalves, R. *et al.* (2017) Alternative Hosts of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, Causal Agent of Bean Bacterial Wilt. European Journal of Plant Pathology, 148, 357–365.
- Hagedorn, D. & Inglis, D. (1986) Handbook of Bean Diseases. Madison, Wisconsin: University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension Publications.
- Hall, R. (1991) Compendium of Bean Diseases. St. Paul: The American Phytopathological Society, pp. 29–32.
- Hanson, A. (2008) Oxidative-Fermentative Test Protocol. American Society of Microbiology. EUA.
- Harveson, R. & Schwartz, H. (2007) Bacterial Diseases of Dry-edible Beans in the Central High Plains. Plant Health Progress.
- Harveson, R. & Vidaver, A. (2007) First Report of the Natural Occurrence of Soybean Bacterial Wilt Isolates Pathogenic to Dry Beans in Nebraska. Plant Health Progress.
- Harveson, R. (2013). The Multicolored Bacterium. American Phytopathological Society 16:14.
- Harveson, R. *et al.* (2006) New Outbreaks of Bacterial Wilt of Dry Bean in Western Nebraska Observed From Field Infections. Plant Disease, 90, 81.

- Harveson, R., Schwartz, H., Urrea, C. & Yonts, C. (2015) Bacterial Wilt of Dry-edible Beans in the Central High Plains of the US: Past, Present, and Future. *Plant Disease*, 99, 1665–1677
- Hedges, F. (1926) Bacterial Wilt of Beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges) Including Comparison with *Bacterium phaseoli*. *Phytopathology*, 16, 1–22.
- Hsieh, T., Huang, H. & Erickson, R. (2006) Bacterial Wilt of Common Bean: Effect of Seedborne Inoculum on Disease Incidence and Seedling Vigour. *Seed Science and Technology*, 34, 57–67.
- Huang, H. *et al.* (2009) Resurgence of Bacterial Wilt of Common Bean in North America. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31, 290–300.
- Leboffe, M. & Pierce B. (2010). *Microbiology Laboratory Theory and Application*, 3rd ed. Morton Publishing Company, Englewood, CO.
- Mena, J. (2010). Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades de Frijol en Zacatecas. INIFAP. Pag. 2-34.
- Moreira, R. *et al.* (2013). First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. Brazil.
- Navarrete, R. & Acosta, J. (2000). Resistencia Del Frijol Al Tizón De Halo En El Valle De México Y Progreso De La Enfermedad. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 23, 17–28
- Nelson, P. & Dickey, R. (1970) Histopathology of Plants Infected with Vascular Bacterial Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 8, 259–280.
- Noble, T. *et al.* (2019) Diagnosis and Management of Halo Blight in Australian Mungbeans: A review. *Crop & Pasture Science*, 70, 195–203.
- Osdaghi, E. (2014) Bacterial Wilt of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, a New Disease in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 96, S4.118.

- Osdaghi, E. *et al.* (2015a) Characterization, geographic distribution and host range of *Curtobacterium flaccumfaciens*: an emerging bacterial pathogen in Iran. *Crop Protection* 78, 185–192.
- Osdaghi, E. *et al.* (2015b) Characterization, geographic distribution and host range of *Curtobacterium flaccumfaciens*: an emerging bacterial pathogen in Iran. *Crop Protection* 78, 185–192.
- Osdaghi, E. *et al.* (2018) Epiphytic *Curtobacterium flaccumfaciens* Strains Isolated From Symptomless Solanaceous Vegetables are Pathogenic on Leguminous but not on Solanaceous Plants. *Plant Pathology*, 67, 388–398.
- Osdaghi, E., Young, A. & Harveson, R. (2020). Bacterial Wilt of Dry Beans Caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A New Threat From an Old Enemy. *Molecular Plant Pathology*. 21:605–621.
- Parada, R. (2021). Bacterias Gram negativas. Lifeder. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/bacterias-gram-negativas/>
- Pelczar, M., Reid, R. & Chan, E. (1982). *Microbiología*. McGraw Hill. Estado de México.
- PHE (2019). UK Standards for Microbiology Investigations: Potassium Hydroxide Test. Public Health England. Londres, Reino Unido.
- Reiner, k., (2010) Catalase Test Protocol. American Society for Microbiology. EUA.
- Rodriguez, M., (2001). *Manual para la Identificación de Bacterias Fitopatogenas*. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México.
- SADER (2019). La Importancia del Frijol en México. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Blog, Sitio web: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-importancia-del-frijol-en-mexico#:~:text=Los%20frijoles%20han%20formado%20parte,queso%2C%20epazote%2C%20entre%20otros.>
- Saettler, A. & Perry, S. (1972) Seed-transmitted Bacterial Diseases in Michigan Navy (pea) Beans, *Phaseolus vulgaris*. *Plant Disease Reporter*, 56, 378–381.

- SAGARPA (2013). Enfermedades que Afectan al Cultivo de Frijol, Ciclo Agrícola Otoño-Invierno 2013-2014. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Sitio web: [https://www.gob.mx/agricultura%7Csinaloa/articulos/enfermedades-que-afectan-al-cultivo-de-frijol-ciclo-agricola-otono-invierno-2013-2014#:~:text=Dentro%20de%20las%20principales%20enfermedades,ra%C3%ADz%20\(Fusarium%20oxysporum%20y%20F.](https://www.gob.mx/agricultura%7Csinaloa/articulos/enfermedades-que-afectan-al-cultivo-de-frijol-ciclo-agricola-otono-invierno-2013-2014#:~:text=Dentro%20de%20las%20principales%20enfermedades,ra%C3%ADz%20(Fusarium%20oxysporum%20y%20F.)
- SAGARPA (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030: Frijol Mexicano. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Primera edición.
- Schaad, N., Jones, J. & Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society Press.
- Schuster, M. & Coyne, D. (1974) Survival Mechanisms of Phytopathogenic Bacteria. Annual Review of Phytopathology, 12, 199–221.
- Schuster, M. & Coyne, D. (1975) Survival Factors of Plant Pathogenic Bacteria. Research Bulletin no. 268, USA: University of Nebraska, 53.
- Schuster, M. & Sayre, R. (1967) A Coryneform Bacterium Induces Purple-colored Seed and Leaf Hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other Leguminosae. Phytopathology, 57, 1064–1066.
- Schuster, M. (1959) Relation of Root-knot Nematodes and Irrigation Water to the Incidence and Dissemination of Bacterial Wilt of Bean. Plant Disease Reporter, 43, 27–32.
- Schuster, M.L. & Sayre, R.M. (1967) A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other leguminosae. Phytopathology, 57, 1064–1066.
- Schwartz, H. & Harveson, R. (2015). Diseases of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). American Phytopathological Society. Sitio web: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Bean.aspx>

- Schwartz, H. *et al.* (2005) Compendium of Bean Diseases, 2nd edition. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, pp. 50–52.
- Seattler, A., Schaad, N. & Roth, D. (1989). Detection of Bacteria in Seed and other Planting Material. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, EUA.
- Shields, P. & Cathcart, L. (2010) Oxidase Test Protocol. American Society of Microbiology. EUA.
- SIAP (2020). Estadística de la Producción Agrícola de 2020. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Silva, T. *et al.* (2012). Survival of *Curtobacterium Flaccumfaciens* Pv. *flaccumfaciens* in Soil and Bean Crop Debris. Journal of Plant Pathology. EUA.
- Soares, R. *et al.* (2018) Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean. Tropical Plant Pathology, 43, 376.
- Starr, M. *et al.* (1981). The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, pp. 1879–1887.
- Stephen, C. *et al.* (1976). Rapid Spot Test for the Determination of Esculin Hydrolysis. Journal of Clinical Microbiology. Pag. 180-184.
- Tripathi, N. & Sapra, A. (2021). Gram Staining. StatPearls Publishing. Wallingford, UK.
- Winn, W. *et al.* (2006). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, EUA.
- Wood, B.A. & Easdown, W.J. (1990) A New Bacterial Disease of Mungbean and Cowpea for Australia. Australasian Plant Pathology, 19, 16–21.
- Young, J. *et al.* (1996) Names of Plant Pathogenic Bacteria 1864–1995. Review of Plant Pathology 75, 721–763.
- Young, J. *et al.* (2004) Reconsideration of *Arthrobacter ilicis* (Mandel *et al.* 1961) Collins *et al.* (1982) as a Plant-pathogenic Species. Proposal to Amend the Authority and

Description of the Species. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 303–305.

Zaumeyer, W. (1932) Comparative Pathological Histology of Three Bacterial Diseases of Bean. *Journal of Agricultural Research*, 44, 605–632.

APÉNDICE 1



Figura 13. Síntomas provocados por *Cff* en soya.



Figura 16. Plantas de *Arachis hypogaea* utilizadas para este experimento.



Figura 17. Síntomas provocados por *Cff* en Chícharo.



Figura 18. Síntomas provocados por *Cff* en Frijol ejotero.



Figura 14. Síntomas provocados por *Cff* en Alubias.



Figura 15. Síntomas provocados por *Cff* en Frijol negro.



Figura 24. Síntomas provocados por *Cff* en Frijol pinto.

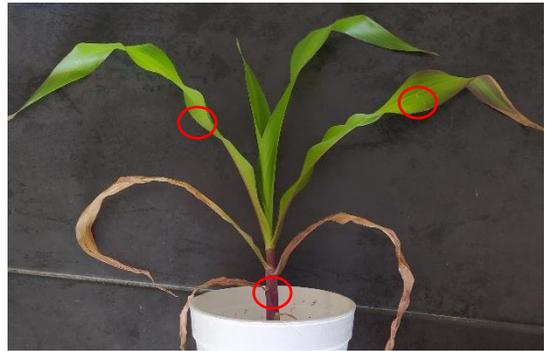


Figura 23. Puntos de extracción de *Cff* en maíz



Figura 22. Puntos de extracción de *Cff* en Trigo.

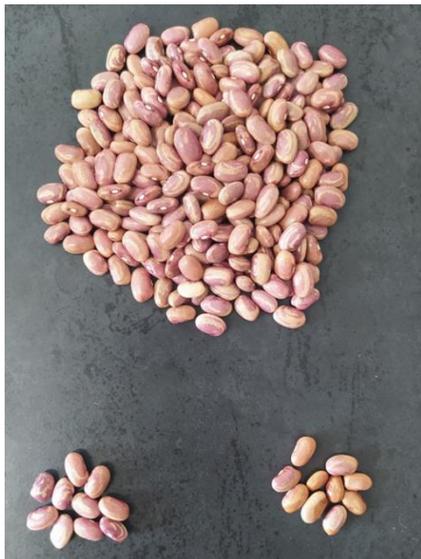


Figura 19. Frijoles criollos del estado de Guanajuato.



Figura 20. Semillas sanas de frijol del Estado de Guanajuato

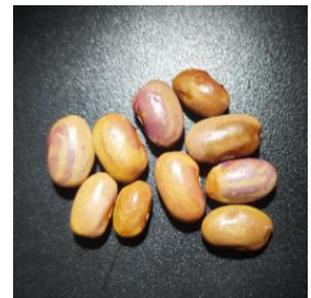


Figura 21. Semillas enfermas con *Cff* en semillas del estado de Guanajuato



Figura 27. Semillas de frijol criollo del estado de Chiapas.



Figura 26. Semillas sanas provenientes del estado de Chiapas.



Figura 30. Semillas infectadas por *Cff* provenientes del estado de Chiapas.



Figura 25. Semillas de Alubia.



Figura 29. Semillas sanas de Alubias.



Figura 28. Síntomas de *Cff* en semillas de Alubias

APÉNDICE 2

Cuadro 7. Medio Oxidación - Fermentación.

Reactivo	Cantidad por Litro
Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Agar	3.0 g
Azul de Bromotimol (1% solución acuosa)	3.0 g
Glucosa (10% solución acuosa)	10 g

Se ajusta el pH a 7.1 y se esteriliza a 121° C por 20 min. Se agrega la solución de glucosa esterilizada mediante filtración. El medio se vacía en tubos de ensaye estériles (Schaad *et al.*, 2001; CNRF, 2018).

Cuadro 8. Medio C Dye.

Reactivo	Cantidad por Litro
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ – 7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	5.0 g
Extracto de Levadura	1.0 g
Agar	12 g
Purpura de Bromocresol (1.5% solución de alcohol).	0.7 ml
Fuente de Carbón (Carbohidrato)	0.5 % (V/V)

Cuadro 9. Buffer de Fosfato Salino (PBS).

Reactivo	Cantidad por litro
NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15
KCl	0.2

Medios de Cultivo diferenciales para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens*

Cuadro 10. Medio Caldo Nutritivo y extracto de Levadura (NBY).

Reactivo	Cantidad por Litro
Glucosa	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.25 g
Caldo Nutritivo	8 g
Extracto de Levadura	2 g
Agar	15 g

Cuadro 11. Medio YPGA

Reactivo	Cantidad
Glucosa	10 g
Peptona	5 g
Extracto de Levadura	5 g
Agar	15 g

Cuadro 12. Medio KB.

Reactivo	Cantidad
Peptona	2
K ₂ HPO ₄ -3H ₂ O	0.15
MgSO ₄	0.15
Agar	1.5
Glicerol	1.5

Cuadro 13. Medio de Kelman.

Reactivo	Cantidad
Glucosa	2.4 g
Bacto-peptona	10 g
Casaminoacidos	1 g
Agar	15 g

Cuadro 14. Leche desnatada Agar (Skim Milk Agar).

Reactivo	Cantidad
Peptona de Caseina	5.0 g.
Extracto de Levadura	2.5 g.
Leche en polvo sin grasas	100 g.
Glucosa	1.0 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1.1 L.

Cuadro 15. Medio de Prueba de Movilidad

Reactivo	Cantidad
Agar	4.0 g
Cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio	0.05 g.
Agua Destilada	1.0 L

Cuadro 16. Medio para la Prueba de Hidrolisis de Esculina

Reactivo	Cantidad
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5 g.
K ₂ HPO ₄	0.5 g.
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g.
NaCl	5.0 g.
Extracto de Levadura	1.0 g.
Citrato de Amonio Férrico	0.05%
Esculina	0.1%
Agua destilada Esteril	800 mL.