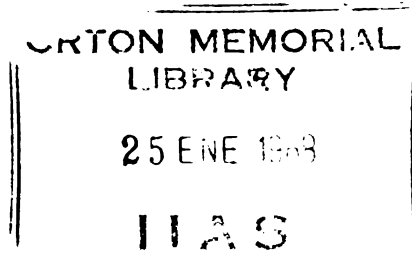


ESTUDIOS SOBRE LA PATOGENICIDAD DE Fusarium

oxysporum f. phaseoli EN EL FRIJOL

Por

Segundo L. Dongo D.

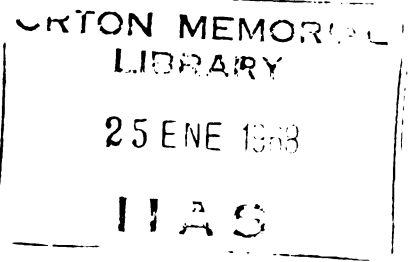


Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA
Centro de Enseñanza e Investigación
Turrialba, Costa Rica

Diciembre, 1967

ESTUDIOS SOBRE LA PATOGENICIDAD DE Fusarium

oxysporum f. phaseoli EN EL FRIJOL



Tesis

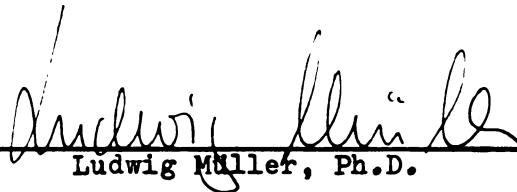
Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados
como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA

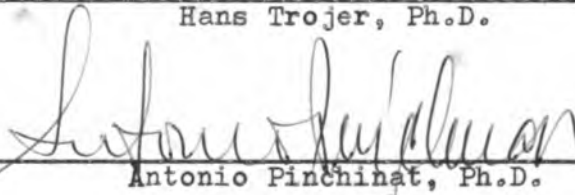

Ludwig Müller, Ph.D.

Consejero

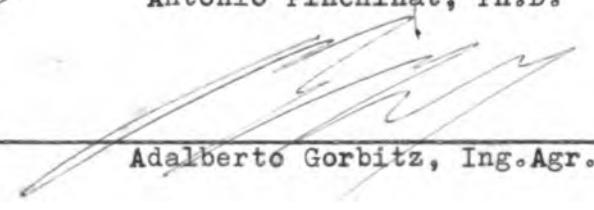


Hans Trojer, Ph.D.

Comité


Antonio Pinchinat, Ph.D.

Comité


Adalberto Gorbitz, Ing.Agr.

Comité

Diciembre, 1967

A mis padres
A mi esposa
A mis hijas

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su más sincero agradecimiento a su Consejero Principal, Dr. Ludwig Müller y demás miembros de su Comité, Drs. Hans Trojer y Antonio Pinchinat e Ing. Adalberto Gorbitz, así como a los Drs. Luis Carlos González y George Greene, por sus consejos y orientación durante el trabajo de tesis.

A la Agencia para el Desarrollo Internacional (AID) y Universidad de Carolina del Norte, quienes otorgaron la beca. Al Servicio de Investigación y Promoción Agraria (SIPA) del Perú, por haberle proporcionado la oportunidad de realizar estudios post-graduados.

BIOGRAFIA

El autor es de nacionalidad peruana. Realizó sus estudios universitarios en la Universidad Nacional Agraria, La Molina, Lima, graduándose de Ingeniero Agrónomo en el año 1957.

Desde enero de 1955 hasta la fecha, trabaja en el Departamento de Fitopatología de la Estación Experimental Agrícola La Molina, dependencia del Servicio de Investigación y Promoción Agraria (SIPA), Lima, Perú.

En setiembre de 1966 ingresó a la Escuela para Graduados del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, para realizar estudios de post-grado en Fitopatología, finalizando sus estudios en diciembre de 1967.

TABLA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
III. MATERIALES Y METODOS	9
A. Pruebas de Patogenicidad en Diferentes Variedades	9
1. Preparación del inóculo	9
2. Inoculación	10
3. Variedades	11
4. Pruebas de patogenicidad	12
B. Pruebas Preliminares del Mecanismo de Patogenicidad	13
Obtención del filtrado	14
1. Afrecho de trigo	14
2. Medio sintético	14
Pruebas con los filtrados	14
1. Prueba sin calentamiento	14
2. Prueba con el filtrado calentado	16
Observaciones registradas	16
IV. RESULTADOS	17
A. Comportamiento de Variedades de Frijol a Inoculaciones con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u>	17
B. Comportamiento de Variedades de Frijol al Filtrado Obtenido de Cultivar el Hongo en Diferentes Medios	30
V. DISCUSION	34
VI. CONCLUSIONES	38
RESUMEN	40
SUMMARY	42
LITERATURA CITADA	44

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro N^o</u>		<u>Página</u>
1	Comportamiento de variedades de frijol color rojo a inoculaciones con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad	21
2	Comportamiento de variedades de frijol color negro a inoculaciones con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad	22
3	Comportamiento de variedades de frijol color bayo a inoculaciones con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad	23
4	Comportamiento de variedades de frijol color variegada (frijoles pintos) a inoculaciones con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad	24
5	Comportamiento de variedades de frijol color blanco a inoculaciones con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad	25
6	Comportamiento de variedades de frijol a inoculaciones con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> en estado de clamidósporas	26
7	Comportamiento de variedades de frijol a filtrado obtenido de cultivar el hongo en afrecho húmedo esterilizado	32
8	Comportamiento de variedades de frijol a filtrado obtenido de cultivar el hongo en medio sintético	32

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA Nº</u>		<u>Página</u>
1	En primer plano: plantas con síntomas de marchitez y amarillamiento (izquierda), al lado de las plantas tolerantes (derecha). En la parte posterior hilera de plantas testigo	27
2	Forma progresiva de la enfermedad. A la derecha poco antes de su muerte	27
3	Plantas con síntomas de marchitez y amarillamiento (izquierda) junto a plantas de la misma variedad sin inocular (testigo)	28
4	Plantas con síntomas de enanismo, marchitez y amarillamiento (izquierda), junto a plantas de la misma variedad sin inocular (testigo)	28
5	Plantas mostrando defoliación con y sin amarillamiento	29
6	Número y largo de raíces laterales. Izquierda: planta susceptible inocular; centro: planta susceptible sin inocular; derecha: planta tolerante inocular	29
7	A la derecha: frascos Erlenmeyer conteniendo filtrado de 3, 6 y 9 días, obtenido de cultivar el hongo en afrecho de trigo húmedo esterilizado, se notan todas las plantas muertas; a la izquierda: el primer frasco conteniendo agua destilada esterilizada, el segundo frasco conteniendo filtrado del medio de afrecho húmedo esterilizado sin cultivo del hongo, se notan las plantas en su estado normal en ambos frascos	33

I. INTRODUCCION

La enfermedad del frijol (Phaseolus vulgaris L.), llamada Fusariosis, Amarillamiento, Marchitez o Podredumbre seca, es causada por el hongo Fusarium oxysporum Schlecht f. phaseoli Kendrick y Snyder. Es la enfermedad que en los últimos años está atrayendo más la atención de los investigadores dedicados al mejoramiento y estudio de las enfermedades de este cultivo, por representar los daños ocasionados pérdidas del 50 al 80 por ciento en algunos de los casos (10, 21).

Es posible combatir al patógeno con un tratamiento químico de la semilla en el momento de la siembra, pero solamente cuando el hongo va adherido a ella. Una vez que el cultivo se ha establecido en el suelo, el combate es prácticamente imposible. Por lo tanto, la medida más eficaz para la lucha contra la enfermedad consiste en utilizar variedades resistentes o tolerantes. Esto significa que la selección de variedades o líneas resistentes o tolerantes al F. oxysporum es un trabajo importante.

Un conocimiento claro y preciso del mecanismo de la patogenicidad y resistencia es de vital importancia, a fin de poder establecer el método de selección más adecuado. Pocas son las referencias que a la fecha se conocen sobre estudios realizados con este patógeno en frijol, mientras que en otros cultivos han sido efectuados muchos trabajos de esta naturaleza. Al respecto cabe destacar los estudios taxonómicos de Kendrick y Snyder (21) quienes describieron la enfermedad e indicaron que el patógeno del frijol es una forma de F. oxysporum especializada a este hospedero y que por tal razón se creó la forma Fusarium oxysporum f. phaseoli.

El objetivo de este trabajo es probar la patogenicidad del F. oxysporum f. phaseoli sobre diferentes variedades de frijol y estudiar en forma preliminar el mecanismo de inducción del "marchitamiento del frijol", producido por este hongo.

II. REVISION DE LITERATURA

En 1929 Harter (16) describió en pocas palabras una enfermedad vascular, causada por Fusarium, en campos de frijol en el valle de Sacramento, California. Los síntomas se caracterizaron por plantas enanas y amarillamiento de las hojas, acompañado de una casi completa invasión del sistema vascular por el hongo. Kendrick llamó luego (20) a la enfermedad "amarillamiento del frijol" ("Fusarium yellows of beans"). Demostró que los conidios del Fusarium son llevados en la semilla. Sin embargo, estos conidios no penetran a la semilla sino que se adhieren a la superficie de la cubierta seminal y son así transportados durante el acarreo. En 1942 Kendrick y Snyder (21) estimaron en 50 por ciento la pérdida ocasionada por la enfermedad en un campo de frijol en el valle de Sacramento, California. Además determinaron que el organismo causante era una forma especializada de F. oxysporum, específica de este hospedero, a la que denominaron F. oxysporum f. phaseoli. Echandi (10) opina que esta enfermedad se encuentra difundida en Costa Rica en todas las plantaciones de frijol sin causar mayores daños; pero menciona haber encontrado una plantación en la que la enfermedad fue severa y redujo la cosecha en un 80 por ciento. Armstrong y Armstrong (2, 3) hacen conocer que el F. oxysporum es el causante del "marchitamiento del frijol" en Carolina del Sur, y que algunos campos en los cuales se venía cultivando frijol continuamente por espacio de varios años, debían de ser abandonados por causa de la severidad de la enfermedad. Anotaron, además, que en sus investigaciones de potenciales de patogenicidad con aislamientos de Fusarium, causante del marchitamiento del frijol en Carolina del Sur, California e Inglaterra, no encontraron

diferencia con respecto a la patogenicidad en variedades de frijol. El mayor interés de estos autores en la patogenicidad de F. oxysporum fue el reconocimiento y la nomenclatura de razas.

Zaumeyer (38), en 1947 hizo referencia a la enfermedad del "amarillamiento del frijol", la cual había sido observada en Colorado, Idaho, y Montana, pero no la consideró como enfermedad importante. Más tarde (37) señaló que un aislamiento de F. oxysporum fue capaz de causar pudrición en raíces y vainas de frijol. Cardona (6) informó que la "podredumbre seca del frijol" en Colombia, es provocada por Fusarium solani f. phaseoli (Burk) Snyder y Hansen y también por F. oxysporum. Dengo (9) determinó en su estudio de patogenicidad con diferentes cepas de varias especies de Fusarium, todas aisladas de campos de frijol en el Perú, que el mayor grado de patogenicidad correspondió a las cepas de F. oxysporum.

Según Snyder y Toussoun (32) todos los nombres de la sección Elegans fueron puestos en una sola especie, Fusarium oxysporum. Esta especie contiene numerosos clones, todos unidos por la característica común de la forma conidial; pero son capaces de variar dentro de los límites de definición de especie. Estos clones, también llamados cepas de la especie F. oxysporum, son reconocidos como formas especiales de esta especie de acuerdo a su selectiva patogenicidad, o sea de acuerdo con el hospedero que parasitan.

Alexander (1) resaltó la capacidad de ciertas especies de Fusarium a formar clamidósporas para su supervivencia en el suelo, el cual aparentemente propicia la producción de estas clamidósporas. Shirley (30) señaló que la infección natural de la pudrición de raíces de frijol en el campo por F. solani ocurre principalmente en el estado de clamidóspora,

como ha sido demostrado por observaciones directas y por medio de inoculación artificial. Milton (26) opinó que las partes subterráneas de las plantas proveen los nutrientes necesarios para la germinación de las clamidósporas y fomentan así la iniciación del parasitismo.

Taylor (33) determinó que la intensidad de luz, edad y especie de hospedero, tipo y reacción del suelo (pH), humedad y temperatura del suelo, son factores que influyen cualitativamente en la población de hongos en el suelo que atacan las raíces de frijol. En todos los casos de aislamientos de patógenos, el F. oxysporum fue encontrado asociado con Cylindrocarpon radicicola; sin embargo, el F. oxysporum fue el más abundante. Virgin (34) estableció para el F. oxysporum de arveja como temperatura óptima para su desarrollo en el medio artificial papa-dextrosa-agar (PDA) 28°C y en el suelo de 24 a 28°C. Apparently no existió ninguna influencia de la temperatura del aire. Una humedad moderada del suelo, sin embargo, le es favorable, siendo más rápido su desarrollo en suelos húmedos que en suelos secos.

Garret (11), al referirse a las enfermedades de marchitez vascular, estableció que éstas son generalizadas y de gran importancia económica. Están confinadas taxonómicamente a diferentes formas parasíticas de F. oxysporum y a ciertas especies de Verticillium. El mismo autor determinó que los hongos de la marchitez vascular difieren de los parásitos primitivos del suelo, por la habilidad de penetrar dentro de la región vascular de las raíces jóvenes y encontrar así condiciones satisfactorias para su desarrollo.

Según Garret (11) la localización de la resistencia al marchitamiento vascular como mecanismo principal de la inducción de los síntomas

internos en las plantas infectadas, se puede deber a condiciones físico-químicas del líquido que se encuentra en los vasos. Este es desfavorable para el crecimiento de los hongos, reduciendo su desarrollo más que por la activa resistencia del xilema del hospedero. Estas condiciones desfavorables para el crecimiento de los hongos pueden consistir en concentraciones demasiado pequeñas de nutrientes esenciales o a una baja tensión de oxígeno. Burke y Linford (5, 24) determinaron que las raíces laterales juegan un papel importante en la resistencia del frijol y de la arveja a las pudriciones radicales.

Se han propuesto varias causas de la marchitez y al parecer hay controversia entre los investigadores en dar a conocer la verdadera causa en la manifestación de los síntomas internos de las plantas infectadas. Page (27) propuso dos mecanismos principales como posible causa de la expresión de síntomas en las enfermedades vasculares: 1) los patógenos inducen obstrucciones traqueales que causan un déficit de agua y pérdida de turgor, y 2) un sistema tóxico que inhibe ciertas funciones de la planta, tal como la respiración. Linford (23) llegó a la conclusión que la marchitez de arvejas puede resultar no de una disminución en el abastecimiento de agua, sino de una excesiva baja de retención del agua por el protoplasma de las hojas. Para Hursh (18) la marchitez no fue en sí un criterio adecuado para los característicos daños producidos por los hongos a los tejidos de las plantas. Él creyó que las sustancias tóxicas son llevadas en la corriente traqueal del tallo. Un mayor entendimiento de la naturaleza de estas reacciones depende de exhaustivos estudios de la célula en particular y de los tejidos que son directamente influenciados por los daños de sustancias presentes en los filtrados de los hongos. Gettlieb (13)

atribuyó la marchitez del tomate a una toxina presente en el filtrado traqueal del hospedero, toxina que incrementó la permeabilidad de las células de la planta. Gothoskar (14) concluyó que las enzimas pécticas producidas por los patógenos fueron el factor importante en causar la típica marchitez y cambio a color marrón del tejido vascular en plantas de tomate.

Winstead y Walker (36) han puntualizado que el color marrón en los tejidos y el taponamiento vascular en frijol y en otros cultivos, fue debido a la pectin-metil-esterasa. Sleeth (31) pensó que la formación de tulosas y el taponamiento de vasos tiene que ver con la presencia, cantidad y proximidad de los hongos a los haces vasculares infectados de algunas plantas. Tal taponamiento de vasos interfiere con el paso del agua en las plantas y cuando esto ocurre se produce la marchitez. Según Henrietta (17) las deformaciones de vasos en el xilema fueron debidas al avance del patógeno en el hospedero. Gümman (12) demostró que el ácido fusárico es capaz de causar la marchitez pero que este ácido no actúa solo sobre la planta hospedera, sino solamente en presencia de otras toxinas y sustancias. Dimond y Waggoner (7, 8) llegaron a la conclusión que los síntomas en las hojas de tomate son debidos a la presencia de una toxina denominada Licomarasmina, que modifica las células de las hojas y causa la pérdida de agua. Sin embargo, parece que los síntomas encontrados en la raíz, se deben más bien a polifenoles o alcohol etílico. Otros autores han supuesto que la marchitez puede deberse a presencia de goma en las células vasculares. Por lo que se sabe, en la literatura sobre el tema, el interés de los investigadores por conocer la verdadera causa de los síntomas de la marchitez debida a falla del sistema vascular es grande, pero hasta la fecha no hay uniformidad en determinar cuál de todas las

sustancias que han sido dadas a conocer es la verdadera responsable de la enfermedad y si este concepto es aplicable a todas las formas biológicas del F. oxysporum y las diferentes especies y variedades de plantas hospederas.

III. MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el laboratorio e invernadero de Fitopatología del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, en Turrialba, Costa Rica.

Comprendió dos partes. En la primera, se efectuaron pruebas de patogenicidad del hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli en diferentes variedades de frijol, las cuales se tomaron del germoplasma del Programa de Cultivos Alimenticios del IICA.

La segunda parte del estudio consistió en pruebas preliminares del mecanismo de patogenicidad con filtrados del hongo obtenidos al cultivar y desarrollar el mismo, tanto en afrecho de trigo húmedo esterilizado, como en un medio sintético líquido.

A. Pruebas de Patogenicidad en Diferentes Variedades

1. Preparación del inóculo

El mejor medio conocido para cultivar el Fusarium oxysporum, con abundante producción de conidios (esporas) y poco desarrollo micelial, es el de agar-frijol-glucosa, tal como lo ha descrito Marthur (25).

La cepa de Fusarium oxysporum Schlecht f. phaseoli Kendrick y Snyder, usada para estas pruebas, fue proporcionada por el Dr. E. Echandi, quien la aisló de plantaciones de frijol en Costa Rica, que presentaban síntomas de amarillamiento (10).

Para el medio de cultivo se tomaron 200 g de semillas de frijol de color rojo y se sometieron a cocción en agua destilada por un período de 2 horas en olla corriente. Se filtró la suspensión a través de una tela

de gasa. Se completó el volumen del líquido así obtenido a un litro y se le agregó 10 g de glucosa y, después de calentamiento, 20 g de agar. Se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Este medio se distribuyó a tubos de ensayo para cultivar el hongo.

a. Obtención de conidios

Después de inocular el hongo en el medio arriba descrito, se dejó para su desarrollo a la temperatura ambiente (unos 22°C en promedio) (19). Después de 10 días se desprendieron los conidios del hongo agregando al cultivo agua destilada y esterilizada. Mediante aza se raspó la parte superior del medio. Además de los conidios se desprendió en esta forma también una parte de micelio. La suspensión de conidios y micelio así obtenida, se filtró a través de una tela de gasa para separar la parte micelial de los conidios. Mediante cuentas con el hematocímetro se determinó el número de conidios en la suspensión. Según preparación este número fluctuó entre 1,200.000 a 1,300.000 conidios por milímetro.

b. Obtención de clamidósporas

El hongo fue inoculado en el mismo medio arriba mencionado contenido en los tubos de ensayo y dejado para el desarrollo y formación de clamidósporas por espacio de 30 días a la temperatura ambiente, como en el caso anterior.

2. Inoculación

Las semillas de frijol se pusieron a pregerminar en cajas plásticas (cámara húmeda) con papel de filtro mojado en el fondo y con tapa, con

el fin de acelerar la germinación. Al mismo tiempo se podía así eliminar aquellas semillas que eran contaminadas por patógenos. Después de 48 horas las semillas ya germinadas y seleccionadas se sembraron en macetas de barro en suelo previamente tratado con bromuro de metilo.

Para la inoculación se siguió el método descrito por Wells (35) para arvejas. Este consistió en extraer de las macetas las plántulas de 11 a 14 días de edad, lavar bien las raíces con un chorro de agua a presión y cortar las dos terceras partes del sistema radical con el objeto de facilitar la penetración del patógeno. Luego, así tratadas las plántulas, se sumergieron con el resto de las raíces en la suspensión de conidios por 30 segundos y nuevamente se sembraron en las mismas macetas. Las macetas así inoculadas se colocaron en un invernadero en el lugar donde recibieran luz adecuada y se regaron según necesidad.

3. Variedades

Se usaron 103 variedades de frijol proporcionadas por el Programa de Cultivos Alimenticios del IICA, coleccionadas en diferentes países de América. Entre estas variedades, 25 fueron de testa color rojo, 25 negro, otras 25 bayo, en 18 fue variegada (frijoles pintos) y en 10 la testa fue color blanco.

Para cada variedad se usaron 6 macetas (repeticiones) con 4 plantas en cada una, o sea un total de 24 plantas. De éstas se inocularon 16 y quedaron sin inocular 8. Sin embargo, estos testigos se les sometió igualmente a los tratamientos de extracción, lavado de las raíces con agua a presión y corte del sistema radical.

4. Pruebas de patogenicidad

a. Patogenicidad con conidios

La primera prueba incluyó todas las variedades. En ella se eliminaron aquéllas que mostraron síntomas típicos de la enfermedad, tales como amarillamiento y marchitez de las hojas, muerte violenta y enanismo marcado. Las variedades que resultaron tolerantes o ligeramente tolerantes, o sea aquéllas que no manifestaron los síntomas anteriores, fueron apartadas. Se tomaron semillas de estas variedades, las que se pusieron nuevamente a pre-germinar y desarrollar en macetas. Se les inoculó e igualmente en esta segunda prueba se eliminaron aquéllas que mostraron síntomas. A una tercera prueba se sometieron solamente aquellas variedades que no manifestaron síntomas de la enfermedad en la segunda prueba.

Los propósitos de la segunda y tercera inoculación fueron verificar si se trataba de una verdadera tolerancia o se debía el comportamiento simplemente a la falta de infección adecuada.

b. Patogenicidad con clamidósporas

Para la prueba de patogenicidad con el hongo en su estado de clamidóspera, se tomaron en cuenta tanto las clamidósporas que se hallaban formadas en conidios, como en el micelio. Al momento de hacer la cuenta con el hematocímetro se tomaron estas clamidósporas más las que se encontraban libres en la suspensión. El número de clamidósporas por milímetro en el líquido preparado para la inoculación, fluctuó entre 1,000.000 a 1,200.000.

Para esta prueba se utilizaron las variedades de frijol que resultaron tolerantes en las pruebas anteriores y algunas que reaccionaron como

susceptibles en la primera inoculación.

En todas las pruebas anteriormente descritas se tomaron partes del hipocótilo y de la raíz principal de las plantas que mostraron síntomas así como de aquéllas que no manifestaron ningún síntoma externo de la enfermedad. Estas partes de material fresco fueron colocadas en cajas Petrí que contenían un medio a base de papa-dextrosa-agar, con el fin de reaislar el hongo y cumplir así con uno de los Postulados de Koch.

B. Pruebas Preliminares del Mecanismo de Patogenicidad

Según la literatura consultada, los mejores medios para la obtención de filtrados del hongo F. oxysporum son afrecho de trigo húmedo esterilizado (14) y un medio líquido consistente de: 10 g de NH_4NO_3 , 5 g de KH_2PO_4 , 2,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 g de d-glucosa y 1.000 ml de agua destilada (27).

Para la inoculación de cada uno de los medios, previamente esterilizados en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, se utilizaron cultivos del hongo de 7 días de edad, desarrollados en medio agar-frijol-glucosa a 22°C . El inóculo consistió de una suspensión de conidios extraídos de los cultivos del hongo. Se tomaron 8 frascos Erlenmeyer de 500 ml. Cuatro de estos frascos contenían 250 ml del medio sintético y los cuatro restantes 25 g del afrecho. Todos los frascos recibieron 4 ml de la suspensión de conidios. Los frascos así inoculados se incubaron a 20°C durante 3, 6 y 9 días.

Obtención del filtrado

1. Afrecho de trigo

Se agregó a cada uno de los frascos 200 ml de agua destilada esterilizada y se removi6 el micelio. Se pas6 a trav6s de una tela de gasa con una capa de algod6n est6ril intermedia. Luego se centrifug6 a 3,200 rpm durante 10 minutos. La parte supernatante se filtr6 a trav6s de un filtro de esterilizaci6n Seitz y papel esterilizante a 25 libras de presi6n.

2. Medio sint6tico

Se filtr6 con tela de gasa y capa de algod6n intermedia, sin previa centrifugaci6n y se pas6 luego por el filtro de esterilizaci6n Seitz, igual que en el caso anterior.

Pruebas con los filtrados

1. Prueba sin calentamiento

Para esta prueba se us6 frascos Erlenmeyer de 125 ml. Los filtrados se vertieron en raz6n de 30 ml por frasco. Los tratamientos se distribuyeron en la forma siguiente: filtrado del hongo con desarrollo de 3, 6 o 9 d6as de edad; como testigos fueron usados en igual proporci6n filtrados de los medios (afrecho y sint6tico) sin desarrollo del hongo, como tambi6n frascos que conten6an solamente 30 ml de agua destilada esterilizada. Se usaron dos variedades de frijol: 'H-182-N', la que no mostr6 ning6n s6ntoma externo en las pruebas de inoculaci6n en invernadero y 'Mex.80-R';

la que sí manifestó síntomas intensos de amarillamiento, marchitez y muerte cuando fue inoculada con el hongo en su estado conidial. Las plántulas de frijol fueron desarrolladas por espacio de 7 días en macetas de barro que contenían suelo previamente tratado con bromuro de metilo y esterilizado en autoclave a 15 libras de presión durante 30 minutos. Estas macetas se mantuvieron a la sombra y se les regó con agua destilada.

A los 7 días las plántulas de frijol se extrajeron de las macetas, volteando la maceta hacia abajo y tratando de no dañar las plántulas y su sistema radical. Las raíces de estas plántulas fueron lavadas con chorro de agua a presión para quitar la tierra y en seguida se les enjuagó con agua destilada esterilizada, procurando no dañarlas durante este procedimiento. Una vez así obtenidas las plántulas de frijol, éstas fueron colocadas en los frascos Erlenmeyer de 125 ml y se tapó la boca de los frascos con tapón de algodón.

Para cada uno de los filtrados obtenidos al cultivar el hongo durante 3, 6 o 9 días en afrecho húmedo y en medio sintético, se emplearon 4 frascos en total, 2 por variedad de frijol, colocándose siempre en cada frasco una sola plántula. A una de estas plántulas se le cortó las dos terceras partes del sistema radical, la otra fue usada con todo su sistema radical. Se hicieron en total 3 repeticiones de estos tratamientos.

A todos los filtrados se les agregó antes de introducir las plántulas 5 gotas de una solución de acida de sodio al 0,5 por ciento para evitar contaminación de bacterias.

2. Prueba con el filtrado calentado

El filtrado se calentó en autoclave a 70°C durante 5 minutos. Los procedimientos seguidos en esta prueba fueron los mismos que se usaron con el filtrado sin calentar. Igualmente se usó las variedades de frijol 'H-182-N', y 'Mex.80-R'.

Observaciones registradas

Los síntomas aéreos de las plantas se observaron a los 11, 18 y 25 días después de la inoculación. Para simplificar, en los cuadros presentados aparecen solamente las observaciones que fueron tomadas a los 25 días. Las observaciones sobre necrosis y oscurecimiento del sistema vascular en la parte basal del tallo y en la raíz principal, así como el número y longitud promedio de raíces laterales y raicillas muertas por variedad se efectuaron a los 30 días.

En las pruebas realizadas con el filtrado del hongo calentado y sin calentar, los síntomas de marchitez y muerte de las plántulas de frijol se constataron a las 18, 36 y 60 horas de ser puestas en contacto con el filtrado.

IV. RESULTADOS

A. Comportamiento de Variedades de Frijol a Inoculaciones con Fusarium oxysporum f. phaseoli

Los resultados de este ensayo mostraron el grado de tolerancia o susceptibilidad de las 103 variedades de frijol estudiadas en condiciones de invernadero a los estados conidial y de clamidóspora del hongo Fusarium oxysporum.

Solamente 17 de las 103 variedades de frijol ensayadas no mostraron síntomas de la enfermedad al ser inoculadas con el hongo en estado conidial (Cuadros 1 a 5). Aún más, el número se redujo de 17 a 6 variedades, cuando el hongo fue usado en su estado de clamidóspora (Cuadro 6).

Las variedades de frijol 'S-475-P', 'Alto de la paloma', 'Sel.182-N', 'Comp.Chim-N', 'H-182-N' y 'Méx.198-B', que no manifestaron síntomas externos visibles en las pruebas de inoculación con el hongo al estado conidial, manifestaron sin embargo síntomas de amarillamiento y a veces marchitez en las pruebas de inoculación con el hongo al estado de clamidóspora (Cuadro 6).

Las plantas de frijol que no manifestaren síntomas externos visibles, tanto en las pruebas de inoculación con el hongo en estado conidial como de clamidóspora, fueron extraídas y examinadas para notar una posible invasión vascular. Se notó en el tejido vascular de la raíz principal y del hipocótilo un color marrón, el cual iba del marrón claro al oscuro. Partes de la raíz principal como también del hipocótilo que presentaban la descoloración marrón en el sistema vascular, fueron puestas en cajas Petri que contenían un medio a base de papa-dextrosa-agar. Fue posible

así reaislar de estas partes el hongo Fusarium oxysporum. El hecho de poder reaislar el hongo de las zonas que mostraron el color marrón nos dio la evidencia que si bien las plantas no manifestaron síntomas exteriores visibles, hubo en ellas penetración del hongo y ataque al sistema vascular de la planta. Por tal razón estas variedades no pudieron calificarse como verdaderamente resistentes al ataque del hongo, sino solamente como tolerantes.

Los síntomas que presentaron las plantas susceptibles inoculadas con el hongo en su estado conidial y de clamidóspora, fueron: pérdida gradual del color verde a amarillo, progresando rápidamente de las hojas inferiores hacia arriba en el tallo. Tal amarillamiento fue en muchos casos muy pronunciado, como se aprecia en la Figura 2. En algunas variedades el amarillamiento fue en forma de franjas o por zonas sin llegar a cubrir todo el limbo foliar. El amarillamiento intenso en las variedades de semilla con cubierta de color blanco se tornó a amarillo pálido después de unos días. Debilitamiento y doblamiento de los folíolos y de las hojas enteras hacia abajo, defoliación acrópeta gradual de la planta, acompañada con amarillamiento o no de las hojas (Figura 5), retención de las hojas secas, enanismo (Figura 4), marchitez con o sin amarillamiento y muerte violenta de las plantas, fueron las principales características observadas en la parte aérea. En la raíz principal apareció un color marrón oscuro a negrusco, lo cual se apreció también en el interior de la base del tallo. Este fenómeno fue frecuentemente acompañado por pudrición de raicillas y escaso número y desarrollo de las raíces laterales (Figura 6).

Como puede apreciarse en los cuadros de resultados, fue variable el comportamiento de tolerancia o susceptibilidad al ataque del hongo F.

oxysporum de las 103 variedades de frijol ensayadas y distribuidas en 25 de color rojo, 25 de negro, 25 de bayo, 18 de color variegado (frijoles pintos) y 10 de color blanco. En las variedades de color rojo, el porcentaje de tolerancia fue 28 por ciento, mientras que en los frijoles pintos se obtuvo el 22 por ciento; las variedades de color negro mostraron un 16 por ciento, siendo el porcentaje de tolerancia más bajo en las variedades blancas y de color bayo (5 y 4 por ciento respectivamente).

El síntoma más característico de la parte aérea de la planta fue el amarillamiento con o sin marchitamiento de las hojas y de la planta en general. El amarillamiento intenso fue más frecuentemente observado en las variedades de color blanco y bayo (Cuadros 3 y 5) y el de marchitez sin pérdida de color en sus hojas en las variedades de color negro (Cuadro 2). En cuanto al síntoma de enanismo de las plantas no se notó diferencia marcada entre los grupos de variedades. La defoliación no fue un síntoma muy común de las plantas susceptibles inoculadas, pero cabe señalar que dicho síntoma se hizo más presente en las variedades de color variegado (Cuadro 4). La muerte de las plantas después de haber manifestado síntomas de marchitamiento en sus hojas fue más notorio en las variedades de color blanco y bayo.

Cabe también resaltar la importancia del número y largo de las raíces laterales. El mayor número de raíces laterales existió en las plantas testigo: fluctuó entre 4 y 16 raíces laterales por variedad, mientras que en las plantas inoculadas fue de 1 a 14 raíces. Estos promedios fueron obtenidos de 16 plantas distribuidas en 4 macetas para el caso de las plantas inoculadas y de 8 plantas distribuidas en dos macetas para las plantas testigo, por variedad. La diferencia en cuanto al número y longitud

alcanzada por las raíces laterales en las variedades tolerantes y susceptibles inoculadas puede ser notada en la Figura 6. Pero no siempre las diferencias eran tan notorias como las que se aprecian en esta Figura. En muchos casos de variedades que se comportaron como no muy susceptibles al ataque del hongo, el número y largo de las raíces fue casi similar al de las variedades que mostraron tolerancia.

El largo de las raíces laterales fluctuó desde 9 hasta 60 cm en las plantas inoculadas y desde 18 hasta 60 cm en las plantas testigo, correspondiendo las mayores longitudes en la mayoría de los casos a las variedades tolerantes. Puede señalarse la variedad '32-Sal. Antioquia C. Sangretero', la cual mostró tolerancia al hongo en sus estados conidial y de clamidóspora; el largo alcanzado por sus raíces laterales tanto en las plantas que fueron inoculadas como en las testigo, fue en promedio unos 60 cm. Las variedades de color rojo y variegado, fueron las que mostraron poseer una mayor capacidad para producir el mayor número y largo de las raíces laterales.

El número y largo de las raíces laterales fue determinado solamente en aquellas raíces que mostraron un mayor engrosamiento. Es por esto que en los cuadros de resultados aparecen algunas variedades con promedio de una sola raíz. El número como la longitud de las raicillas no fue tomado en cuenta en el presente estudio.

El desarrollo en altura, conformación y color del follaje de las plantas inoculadas que mostraron tolerancia al hongo F. oxysporum por lo general fue el mismo que el observado en las plantas testigo, las que no recibieron inóculo fungoso (Figura 1).

CUADRO Nº 1. Comportamiento de variedades de frijol color rojo a inoculaciones con Fusarium oxysporum f. phaseoli en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad.

Variedades	Desarrollo de las plantas						Síntomas visibles en las plantas infectadas				
	Altura de la parte aérea (en cm)		Promedio del número de raíces laterales		Promedio del largo de raíces laterales (en cm)		Enanismo	Amarillamiento	Marchitez	Defoliación	Muerte
	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo					
Col. 109-R	15	20	3	6	20	18	x	x	x		
Sel. Pacuare	14	26	4	8	20	22	x		x		x
P.I. 163-555	20	36	6	10	22	28	x		x		x
Alto de la Paloma	28	29	7	9	20	23					*
Colorado	26	45	8	9	30	35	x	x	x		
Col. 132-R	14	32	4	6	22	28	x		x		
93-R	20	40	8	12	35	40	x		x		
Rojo Claro	30	80	6	6	30	35	x	x	x		
Rojo Chirripó C.	26	60	8	9	28	40	x	x	x		x
S-15-R	40	40	12	14	38	40					*
27-R	26	57	6	10	26	35	x	x		x	x
Méx.80-R	35	36	4	6	22	30		x	x	x	
Méx.81-R	9	40	3	7	20	26	x		x		x
59-R	38	40	8	9	40	45					*
38-R	45	45	8	10	35	38					*
103-R	12	36	2	5	22	26	x		x		x
21-R	35	36	10	10	38	42					*
105-R	36	40	8	10	36	40			x		
Carne 21-R	38	65	4	6	23	35	x	x	x		
Rojo Grande	20	21	10	11	30	35					*
S-402-R	18	35	3	9	22	30	x	x	x		x
409-R	14	36	1	6	30	28	x	x	x		x
H-51-R	20	45	3	8	32	36	x	x			x
Carne	40	45	6	8	30	32			x		
72-Sal.Ant. Sangretoro	30	40	12	12	60	60					*

*Plantas sin síntomas visibles.

CUADRO Nº 2. Comportamiento de variedades de frijol color negro a inoculaciones con Fusarium oxysporum f. phaseoli en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad.

Variedades	Desarrollo de las plantas						Síntomas visibles en las plantas infectadas				
	Altura de la parte aérea (en cm)		Promedio del número de raíces laterales		Promedio del largo de raíces laterales (en cm)						
	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo	Enanismo	Amarillamiento	Marchitez	Defoliación	Muerte
Turrialba 1	12	24	4	5	14	18	x		x		x
Sel. 207-N-2	14	28	6	6	20	26	x		x		
Col. 123-N	35	46	5	8	24	30	x		x		
Sel. 182-N	29	29	7	9	21	25					
Comp. Chim-N	28	29	6	8	18	20					
Jamapa	32	36	2	6	9	14			x		x
Guateian 6662	30	32	6	6	20	22			x		x
Sel. Excelente-N	12	25	4	8	18	24	x		x		x
Méx.29	45	45	5	6	21	26					
111-N	40	42	6	10	21	28			x	x	
H-182-N	75	75	7	8	18	19					
H-183-N	18	38	2	6	22	30	x		x	x	
97-N	10	28	5	9	12	25	x		x	x	
98-N	19	45	6	7	18	20	x		x	x	
95-N	9	35	2	8	21	32	x		x		x
S-18-N	19	22	5	9	18	22		x	x		
61-N	12	45	4	7	24	28	x		x		x
Méx.24-N-1	14	25	7	6	16	28	x		x		x
Méx. 72-N	26	30	3	5	16	22			x		x
Méx.60-N	18	45	6	10	28	35	x		x		
4-N-8	19	22	5	4	18	28		x	x		
S-89-N-2	12	45	5	8	25	32	x		x		
Méx. 22-N	18	35	4	7	22	36	x		x		
2-N	9	24	2	5	11	20	x		x		x
S-772-N	9	35	3	6	10	24	x	x			x

* Plantas sin síntomas visibles.

CUADRO Nº 3. Comportamiento de variedades de frijol color bayo a inoculaciones con Fusarium oxysporum f. phaseoli en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad.

Variedades	Desarrollo de las plantas						Síntomas visibles en las plantas infectadas				
	Altura de la parte aérea (en cm)		Promedio del número de raíces laterales		Promedio del largo de raíces laterales (en cm)						
	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo	Enanismo	Amarillamiento	Marchitez	Defoliación	Muerte
S-633-B	9	18	4	12	26	38	x	x	x		x
Méx.201-B	95	95	8	14	27	25		x	x		x
Mat. 1-B	24	35	4	12	18	59	x	x			x
45-B	35	35	4	12	29	50		x			x
S-856-B-10	15	29	6	10	20	34	x		x	x	
Méx.F. II.209	7	15	8	8	23	48	x			x	x
S-490-B	9	19	5	12	18	40	x	x			x
59 Méx.-B	9	18	7	12	27	42	x	x			x
Valiente-B	10	22	2	14	32	40	x	x			x
F. Temprano-B	22	65	10	16	35	40	x	x	x		x
Mat.-4-B-1	23	27	10	16	30	45	x	x	x		x
S-1565-B	12	65	3	6	18	30	x	x	x		x
55-B	14	35	5	10	22	49	x	x	x		x
66-C-B	14	32	4	9	28	40	x	x	x		x
69-B	17	30	2	8	35	45	x	x	x		x
70-B	10	20	6	14	22	30	x	x			x
71-B	10	45	4	8	26	45	x	x			x
19-B	9	22	6	10	20	30	x	x			x
94-B	55	55	4	8	35	40			x		x
100-B	16	22	8	12	32	32	x	x			x
106-B	23	45	1	8	32	42	x	x		x	x
Méx. 17-B	60	60	6	8	26	45			x		x
107-B	14	34	5	9	30	46	x	x	x		x
Méx. 198-B	55	55	14	16	38	43					*
Méx. 200-B	35	35	6	9	26	40		x	x		x

*Plantas sin síntomas visibles.

CUADRO Nº 4. Comportamiento de variedades de frijol color variegada (frijol pinto) a inoculaciones con Fusarium oxysporum f. phaseoli en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad.

Variedades	Desarrollo de las plantas						Síntomas visibles en las plantas infectadas				
	Altura de la parte aérea (en cm)		Promedio del número de raíces laterales		Promedio del largo de raíces laterales (en cm)		Enanismo	Amarillamiento	Marchitez	Defoliación	Muerte
	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo					
S-64-P	32	75	4	8	14	20	x	x			x
S-562-P	30	80	3	12	16	28	x	x	x	x	x
Col.97-P	66	65	9	12	38	42					*
54-P	60	75	3	6	38	40		x	x	x	
Diacol Andino-P	24	105	2	8	19	26	x	x	x	x	x
Col. 93-P	48	52	10	12	40	45					*
81-P	32	90	1	9	23	29	x	x	x		x
41-P	95	95	6	6	25	30		x	x	x	
67-P	32	75	5	9	35	36	x	x	x		
S-211-P	78	80	6	8	30	32		x	x	x	x
Méx. 46-P	30	64	2	8	20	26	x	x	x	x	x
Tostado Manteca-P	32	65	3	5	20	24	x	x	x	x	
S-219-P	95	95	1	4	35	35		x	x	x	x
Col. 95-P	30	35	6	7	35	36					*
S-475-P	32	38	9	11	38	42					*
S-450-P	35	55	6	6	33	38	x	x	x		x
84-P	24	50	3	8	20	22	x	x	x		x
USA-P	35	105	3	10	20	35	x	x	x		x

* Plantas sin síntomas visibles.

CUADRO Nº 5. Comportamiento de variedades de frijol color blanco a inoculaciones con Fusarium oxysporum f. phaseoli en estado conidial. Valores promedios de 4 plantas y 6 repeticiones por variedad.

Variedades	Desarrollo de las plantas						Síntomas visibles en las plantas infectadas				
	Altura de la parte aérea (en cm)		Promedio del número de raíces laterales		Promedio del largo de raíces laterales (en cm)						
	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo	Plantas Infectadas	Testigo	Enanismo	Amarillamiento	Marchitez	Defoliación	Muerte
112-B1	20	60	6	8	18	40	x	x	x		x
Sal.68-B1	55	120	8	8	18	28	x	x	x		x
Michelite	60	90	6	12	28	30	x	x	x		x
56-B1	18	130	8	14	28	39	x	x	x		x
S-452-B1	90	120	6	8	22	35	x	x	x	x	
C-186-B1	12	24	7	12	30	35	x	x			x
40881-B1	80	120	4	6	25	40	x	x	x		x
Soginaw USA 40025	14	65	4	10	20	25	x	x	x	x	x
Col.119-B1	9	14	10	13	22	35	x	x	x	x	x
108-B1	90	90	12	13	35	35					*

* Plantas sin síntomas visibles.

CUADRO Nº 6. Comportamiento de variedades de frijol a inoculaciones con Fusarium oxysporum f. phaseoli en estado de clamidóspora

Variedades	SINTOMAS VISIBLES EN LAS PLANTAS INFECTADAS				
	Enanismo	Amarilla- miento	Marchitez	Defolia- ción	Muerte
Col.109-R	x	x			x
Alto de la Paloma		x			
Rojo Claro	x	x			
Méx.80-R	x	x		x	
* Rojo Grande					
Carne		x	x		
* 32Sal.Ant.C-Sang.					
S-633-B		x	x		x
S-490-B	x	x	x		x
Méx.198-B		x		x	
Sel.182-N	x		x		
* Méx.29-N					
Comp.Chim.-N			x		
H-182-N			x	x	
S-18-N			x		x
4-N-8			x		
* Col.97-P					
* Col.93-P					
* Col.95-P					
S-475-P		x	x	x	

* Plantas sin síntomas visibles.



FIGURA 1. En primer plano: plantas con síntomas de marchitez y amarillamiento (izquierda), a lado de las plantas tolerantes (derecha). En la parte posterior hilera de plantas testigos.



FIGURA 2. Forma progresiva de la enfermedad. A la derecha planta poco antes de su muerte.



FIGURA 3. Plantas con síntomas de marchitez y amarillamiento (izquierda) junto a plantas de la misma variedad sin inocular (testigo).



FIGURA 4. Plantas con síntomas de enanismo, marchitez y amarillamiento (izquierda), junto a plantas de la misma variedad sin inocular (testigo).



FIGURA 5. Plantas mostrando defoliación con y sin amarillamiento.

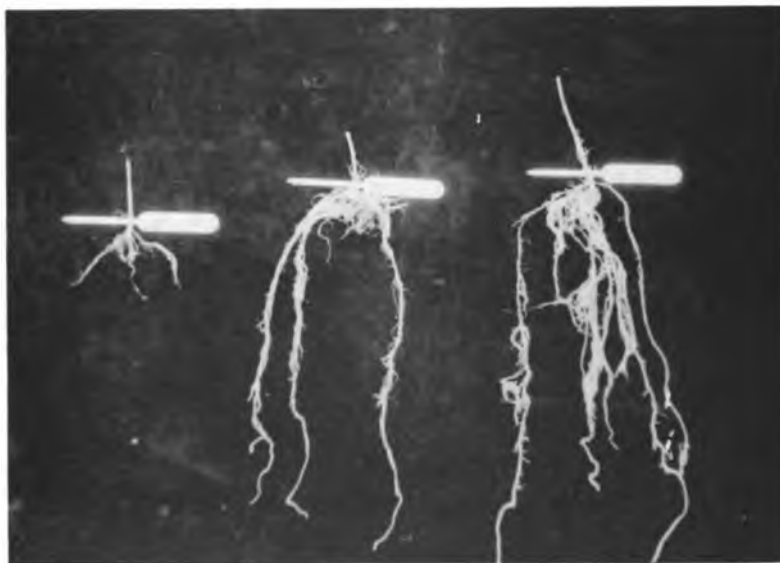


FIGURA 6. Número y largo de raíces laterales. Izquierda: planta susceptible inoculada; centro: planta susceptible sin inocular; derecha: planta tolerante inoculada.

B. Comportamiento de Variedades de Frijol al Filtrado Obtenido de Cultivar el Hongo en Diferentes Medios

El filtrado obtenido de cultivar y desarrollar el hongo tanto en un medio de afrecho húmedo esterilizado como en medio sintético durante 3, 6 y 9 días, resultó tóxico a las plantas de frijol de 7 días de edad.

Se observó diferencia en cuanto al tiempo a producirse la marchitez de las plantas, siendo ésta más violenta en el filtrado obtenido del hongo de 9 días y más lenta en el de 3 días; pero al final en todos los casos las plantas se marchitaron y se murieron (Cuadros 7 y 8). Las plantas que fueron puestas en los frascos que contenían agua destilada esterilizada como en los que contenían filtrado de los medios sin desarrollo del hongo, permanecieron vivas (Figura 7).

Con los filtrados calentados los resultados fueron los mismos que cuando se les usó sin calentar (Cuadro 8).

La marchitez de las plantas se manifestó con encrespamiento de las hojas hacia abajo, sin el amarillamiento que fue observado en las pruebas de invernadero. Estos síntomas se presentaron tanto en las variedades susceptibles como en las tolerantes.

Los resultados de estas pruebas mostraron que el filtrado obtenido de cultivar y desarrollar el hongo en estos dos tipos de medios (afrecho y sintético) es tóxico a las plantas de frijol cuando éstas son puestas en contacto con el filtrado. No hubo diferencia en cuanto al comportamiento de la variedad tolerante y susceptible, ambas se marchitaron y se murieron al mismo tiempo.

El filtrado obtenido de cultivar y desarrollar el hongo en medio

sintético causó la marchitez de las plantas en menor tiempo que el filtrado obtenido de cultivar y desarrollar el hongo en afrecho húmedo esterilizado (Cuadros 7 y 8).

CUADRO Nº 7. Comportamiento de variedades de frijol a filtrado obtenido de cultivar el hongo en afrecho húmedo esterilizado.

Tiempo	T R A T A M I E N T O S				
	Agua	Filtrado de afrecho no inoculado	Filtrado del hongo de 3 días	Filtrado del hongo de 6 días	Filtrado del hongo de 9 días
36 horas	Normal	Normal	Normal	Lig.marchitez	Marchitez
45 horas	Normal	Normal	Lig.marchitez	Marchitez	Muerte
60 horas	Normal	Normal	Marchitez	Muerte	Muerte
8 días	Normal	Normal	Muerte	Muerte	Muerte

CUADRO Nº 8. Comportamiento de variedades de frijol a filtrado obtenido de cultivar el hongo en medio sintético.

Tiempo	T R A T A M I E N T O S				
	Agua	Filtrado del medio no inoculado	Filtrado del hongo de 3 días	Filtrado del hongo de 6 días	Filtrado del hongo de 9 días
18 horas	Normal	Normal	Lig.marchitez	Marchitez	Marchitez
24 horas	Normal	Normal	Lig.marchitez	Marchitez	Muerte
48 horas	Normal	Normal	Marchitez	Muerte	Muerte

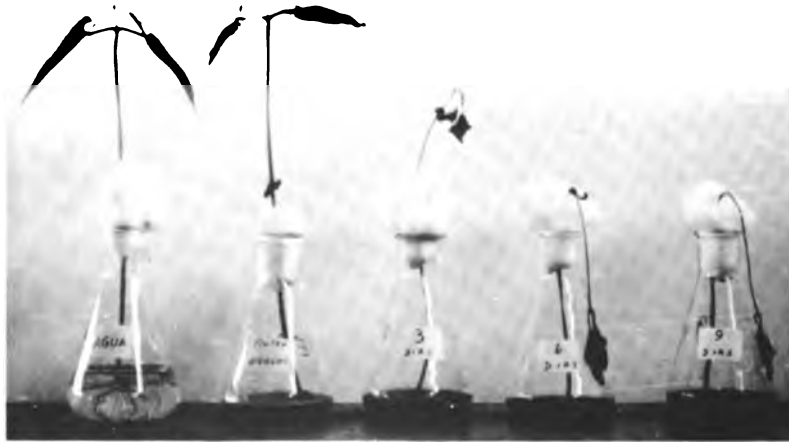


FIGURA 7. A la derecha: frascos Erlenmeyer conteniendo filtrado de 3, 6 y 9 días, obtenido de cultivar el hongo en afrecho de trigo húmedo esterilizado, se notas todas las plantas muertas; a la izquierda: el primer frasco conteniendo agua destilada esterilizada, el segundo frasco conteniendo filtrado del medio de afrecho húmedo esterilizado sin cultivo del hongo, se notan las plantas en su estado normal en ambos frascos.

V. DISCUSION

La patogenicidad del Fusarium oxysporum f. phaseoli aislado de plantas de frijol en campos de Costa Rica, fue comprobada en las pruebas realizadas en el presente estudio; también se pudo determinar diferentes grados entre tolerancia y susceptibilidad al patógeno, de 103 variedades de frijol.

Las diferencias en la sintomatología descrita por diferentes autores se deben probablemente a la variedad de frijol y no a la variación del patógeno como indican los resultados de este estudio. La razón por la cual Kendrick (21) llamó a la enfermedad "amarillamiento del frijol", quizás fue debida al hecho de que el síntoma predominante encontrado por él fuera el amarillamiento. Pero bien puede ser que en otras zonas o localidades se presente la marchitez como sucede en Carolina del Sur (2, 3). En muchos casos puede ser que el síntoma sea menos llamativo como por ejemplo el enanismo, o pueda ser confundido con el ataque cortical producido por F. solani, siempre cuando la enfermedad se presenta con defoliación y marchitez sin amarillamiento de las hojas. Esta discusión ayuda a aclarar la situación respecto a la denominación de la enfermedad como "amarillamiento del frijol" atribuída al patógeno.

Muchos investigadores han demostrado (2, 16, 21) que el F. oxysporum causa la marchitez debido a alteraciones del sistema vascular del frijol, enfermedad que en los últimos años ha adquirido mayor importancia económica por las pérdidas notorias que causa al cultivo. Poco es lo que se conoce de sus prácticas de control. Se han recomendado el uso de productos químicos aplicados a la semilla, variedades resistentes, etc. Nos preguntamos, cuánto se puede ganar con el uso de productos químicos

aplicados a la semilla si el ataque es tardío, si el hongo penetra por las raicillas y se localiza en el sistema vascular de la planta y los productos recomendados no tienen acción sistémica?

Es obvio que en todo programa de mejoramiento se tienda a trabajar con material resistente o tolerante al mayor número de enfermedades. El criterio seguido es el grado de resistencia que muestren las variedades a determinados patógenos. Basándose las recomendaciones en el uso de variedades resistentes, es importante saber la naturaleza y causa de dicha resistencia para poder mejorar variedades o líneas de buena producción, o crear nuevas variedades o líneas resistentes.

En las pruebas de inoculación efectuadas con las 103 variedades, ninguna mostró verdadera resistencia, muy pocas fueron tolerantes al ataque del hongo en estado conidial, y este número se redujo aún más cuando el hongo fue usado en estado de clamidóspora. Estos resultados coinciden con los de Echandi (10) y de Armstrong y Armstrong (2), quienes determinaron en sus pruebas de patogenicidad que la mayoría de las variedades de frijol probadas por ellos resultaron susceptibles. Baggett (4), en ensayos de resistencia de especies de Phaseolus a Fusarium solani causante de la pudrición de raíces de frijol, concluyó que el problema más serio en la obtención de líneas y variedades de frijol resistentes es contar con una fuente genética inicial de verdadera resistencia o inmunidad. Por lo tanto los resultados obtenidos en muchos programas de mejoramiento realizados hasta el momento no corresponden a lo esperado.

Según Shirley (30) la infección natural de las raíces de frijol por Fusarium en el campo no se debe tanto al estado conidial sino más bien al ataque provocado por clamidósporas. Por otra parte Milton (26) opina

que las clamidósporas de Fusarium solani f. phaseoli germinan más consistentemente en el suelo cuando se hallan cerca a las semillas de frijol germinando, punta de raíz principal, raíces laterales y adventicias, pues las partes subterráneas de la planta parecen proveer los nutrientes necesarios y creas así un ambiente favorable para la infección. Los resultados de las presentes pruebas parecen indicar que en el caso de la penetración del hongo F. oxysporum f. phaseoli ésta fue más rápida al emplearse clamidósporas como fuente de infección. En esta forma las plantas susceptibles mostraron síntomas a los 5 días de inoculadas, mientras se necesitaban 11 días cuando fueron inoculadas con el estado conidial del hongo. Otra evidencia que nos hace suponer que el hongo F. oxysporum f. phaseoli se desarrolló más rápidamente a partir de clamidósporas en el suelo y que quizás en este estado pueda penetrar más fácilmente en las raíces o producir sustancias tóxicas que lo hagan más virulento fue el comportamiento de algunas variedades de frijol que mostraron tolerancia al estado conidial pero fueron susceptibles cuando se les inoculó con el hongo en el estado de clamidóspera.

Es interesante resaltar la importancia del número y de la longitud de las raíces laterales. Los resultados sugieren que la facultad de las variedades para producir fuertes y numerosas raíces laterales está en relación con el grado de tolerancia al Fusarium, tal como fue ya constatado por Burke (5) y Linford (24). Estos autores remarcaron la importancia de las raíces laterales en la localización de la resistencia de las plantas de frijol al ataque por Fusarium. Baggett (4) consideró la producción de raíces laterales como una característica importante de las plantas de Phaseolus polyanthus para sobrevivir y desarrollarse a pesar de ser atacadas

por Fusarium solani.

Con relación a las pruebas realizadas con los filtrados de cultivos de Fusarium desarrollado sobre afrecho húmedo y medio sintético podemos deducir que los resultados son similares a los obtenidos por Linford (22) en arvejas al usar diferentes concentraciones de filtrados de F. orthoceras var. pisi.

A pesar de no ser el propósito de este estudio el de caracterizar la naturaleza del filtrado, se hizo la prueba para determinar si era o no termolábil. Los resultados mostraron igual efecto sobre las plantas de frijol cuando los filtrados fueron o no calentados, resultados que son opuestos a los de Pierson (29). El encontró que los filtrados de F. oxysporum f. lycopersici calentados en un autoclave a 15 libras de presión durante 90 minutos no causaron taponamiento ni marronamiento vascular en tomate. Trabajos de esta naturaleza han sido realizados también por otros investigadores con diferentes especies de Fusarium causantes de enfermedades vasculares. Un aspecto importante de estos estudios es que en ninguno de los casos se ha llegado a determinar con exactitud la naturaleza de la sustancia o sustancias tóxicas presentes en estos filtrados. A consecuencia no se ve un criterio uniforme entre investigadores al señalar cuál o cuáles de estas sustancias son la o las responsables en causar los síntomas de la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

Del trabajo efectuado pueden deducirse las siguientes conclusiones:

1. Los resultados de esta investigación indican que Fusarium oxysporum f. phaseoli, es una amenaza potencial a la producción de frijol; pues en condiciones de invernadero, ninguna de las variedades probadas mostró verdadera resistencia al ataque del hongo F. oxysporum f. phaseoli.
2. Pueden ser consideradas como tolerantes al estado conidial del hongo las siguientes variedades: 'Sel.182-N', 'Comp.Chim.-N', 'Méx.29-N', 'H.182-N', 'Alto de la paloma', 'Col.132-R', '38-R', 'Rojo grande', '32 Sal.Antioquia C-Sangretoro', 'S-15-R', '59-R', 'Col.97-P', 'Col.93-P', 'Col.95-P', 'S-475-P', 'Méx.198-B', y '108-B1', y como tolerantes al estado de clamidósporas las variedades: 'Col.97-P', 'Col.93-P', 'Col.95-P', 'Rojo grande', '32-Sal.Antioquia C-Sangre-roro' y 'Méx.29-N'. Ninguna variedad de color blanco y bayo mostró tolerancia a este estado del hongo.
3. Los síntomas de infección vascular del frijol de la parte aérea de la planta al parecer tienen algo que ver con el color de la testa de la variedad, siendo el amarillamiento intenso de las hojas más característico en las variedades claras y la marchitez de las hojas en las variedades de grano oscuro.
4. El desarrollo de raíces laterales parece guardar cierta correlación con la tolerancia al hongo.

5. Los filtrados obtenidos de cultivar el hongo en medio de afrecho húmedo y sintético fueron letales a plantas de frijol, tanto susceptibles como tolerantes.

RESUMEN

Se efectuaron estudios de la patogenicidad del hongo Fusarium oxysporum Schlecht f. phaseoli Kendrick y Snyder sobre 103 variedades de frijol del germoplasma del Programa de Cultivos Alimenticios del IICA. Se hicieron también pruebas preliminares sobre la toxicidad de filtrados obtenidos al cultivar el hongo en medio sintético y afrecho de trigo húmedo.

A través de los estudios de patogenicidad del hongo en sus estados conidial y de clamidóspora fue posible determinar los diferentes grados de resistencia, tolerancia o susceptibilidad de las variedades de frijol probadas.

Los resultados demuestran que las variedades de frijol estudiadas no tenían verdadera resistencia al ataque del hongo cuando el inóculo tenía 10 días de edad. Algunas de las variedades que mostraron cierta tolerancia al estado conidial del hongo fueron, sin embargo, susceptibles al estado de clamidóspora.

El número y la longitud de raíces laterales presentes en las plantas, que mostraron tolerancia al ataque del hongo, sugieren que la tolerancia puede deberse hasta cierto punto a la capacidad de las plantas para producir numerosas y fuertes raíces laterales después de que tuvo lugar la infección.

Se observó que hay correlación entre el color de la testa de la variedad y la manifestación de los síntomas. Entre los síntomas observados había evidencia tanto de amarillamiento intenso como marchitez sin pérdida de la pigmentación, siendo la causa de ambas el mismo hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli.

Los filtrados obtenidos al cultivar el hongo en los dos medios (solución nutritiva y afrecho de trigo húmedo) fueron letales a las plantas de frijol introducidas en ellos, tanto para tolerantes como susceptibles. Al calentar el filtrado no se perdió este efecto nocivo. Las plantas de frijol, puestas en contacto con los filtrados del medio sin cultivo del hongo y en agua destilada esterilizada, permanecieron vivas por muchos días.

SUMMARY

Studies were carried out on the pathogenicity of the fungus Fusarium oxysporum Schlecht f. phaseoli Kendrick and Snyder to 103 bean varieties of the germplasm of the IICA collection of beans.

Preliminary trials were also made on the toxicity of filtrates obtained by culturing the fungus in a synthetic medium and on moist wheat bran.

Through the studies of the pathogenicity of the fungus in its conidial and chlamydospore stages, it was possible to determine the different degrees of resistance, tolerance and susceptibility of the bean varieties tested.

The results demonstrated that the bean varieties studied did not have a true resistance to the attack of the fungus when the inoculum was 10 days old. Some of the varieties that showed certain tolerance to the conidial stage of the fungus were however susceptible to the chlamydospore stage.

The number and length of the lateral roots of the plants that showed tolerance to the attack of the fungus suggest that the tolerance may be due in part to the capacity of the plants to produce a large number of strong lateral roots after the infection.

It was observed that there is a correlation between the color or the seed coat of the variety and the degree of symptoms shown. It was found that the same fungus, Fusarium oxysporum f. phaseoli, could cause symptoms of either intense yellowing or wilting without loss of pigmentación.

The filtrates obtained when the fungus was cultivated on the two media (nutrient solution and moist wheat bran) were lethal to the bean plants when their roots were immersed into them, both for the tolerant and susceptible. The bean plants, when maintained in contact with the

filtrates of the medium minus the fungus and in sterilized water, remained alive for many days.

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, J. V. et al. Induction of chlamyospore formation by Fusarium solani in sterile soil extracts. Phytopathology 56(3): 353-354. 1966.
2. ARMSTRONG, G. M. y ARMSTRONG, J. K. Fusarium wilt of bean South Carolina and some host relations of the bean Fusarium. Plant Disease Reporter 47(12):1088-1091. 1963.
3. _____ y ARMSTRONG J. K. Pathogenicity of isolates of the bean wilt Fusarium from England and the United States. Plant Disease Reporter 48(11):846-847. 1964.
4. BAGGETT, W. A. et al. Test of phaseolus species for resistance to Fusarium root rot. Plant Disease Reporter 49(7):630-633. 1965.
5. BURKE, D. W. y BARKER, A. W. Importance of lateral roots in Fusarium root rot of beans. Phytopathology 56(3):292-294. 1966.
6. CARDONA, A. C. Pudriciones fungosas radiculares del frijol (Phaseolus vulgaris L.) en el valle de Medellín, Colombia. Revista de la Facultad Nacional de Agricultura (Medellín) 15(46):137-209. 1954.
7. DIMOND, A. E. y WAGGONER, P. E. The cause of epinastic symptoms in Fusarium wilt of tomatoes. Phytopathology 43(12):663-669. 1953.
8. _____ y WAGGONER, P. E. The physiology of lycopersin production by Fusarium oxysporum f. lycopersici. Phytopathology 43(3):195-199. 1953.
9. DONGO, D. S. L. Especies de Fusarium patógenas sobre frijol en el Perú. Lima, Estación Experimental Agrícola La Molina; Boletín nº 3. 1961. 16 p.
10. ECHANDI, E. Amarillamiento del frijol (Phaseolus vulgaris L.) provocado por Fusarium oxysporum f. phaseoli. Turrialba 17(4):409-410. 1967.
11. GARRET, S. D. Biology of root infecting fungi. London, Cambridge University Press. 1960. 293 p.
12. GAUMANN, E. Fusaric acid as a wilt toxin. Phytopathology 47(6): 342-357. 1957.
13. GOTTLIEB, D. The mechanism of wilting caused by Fusarium bulbigenum var. lycopersici. Phytopathology 34(1):41-59. 1944.

14. GOTHOSKAR, R. P. et al. The role of pectid enzymes in Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 43(11):535-536. 1953.
15. _____ et al. The role of enzymes in the development of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 45(7):381-387. 1955.
16. HARTER, L. L. A fusarium disease of beans. *Phytopathology* 19(1):84. 1929.
17. HENRIETTA, L. CH. y CORDEN, M. E. Semeiography of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 53(9):1006-1010. 1963.
18. HURSH, C. R. The reactions of plant stems to fungous products. *Phytopathology* 18(7):603-610. 1928.
19. INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA, CENTRO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION, TURRIALBA, COSTA RICA. Sumario de datos meteorológicos. 1966. (mecnografiado)
20. KENDRICK, J. B. Seed transmission of Fusarium yellows of beans. *Phytopathology* 24(10):1139. 1934.
21. _____ y SNYDER, W. C. Fusarium yellows of beans. *Phytopathology* 32(11):1010-1014. 1942.
22. LINFORD, M. B. Studies of pathogenesis and resistance in pea wilt caused by Fusarium orthoceras var. psi. *Phytopathology* 21(7):797-826. 1931.
23. _____. Transpirational history as a key to the nature of wilting in the Fusarium wilt of peas. *Phytopathology* 21(8):791-796. 1931.
24. _____. Wound inoculation in relation to resistance in the Fusarium wilt of peas. *Phytopathology* 21(7):827-833. 1931.
25. MARTHUR, R. S. et al. Sporulation of C. lindemuthianum in culture. *Phytopathology* 40(1):104-114. 1950.
26. MILTON, N. S. y SNYDER, W. C. Effect to host exudates on chlamydospore germination of the bean root rot fungus, Fusarium solani f. phaseoli. *Phytopathology* 51(6):389-393. 1961.
27. PAGE, O. T. Fusaric acid in banana plants infected with Fusarium oxysporum f. cusense. *Phytopathology* 49(4):230. 1959.
28. _____. The physiology of lycomarasin production by Fusarium oxysporum f. cusense. *Phytopathology* 51(8):578. 1961.

29. PIERSON, C. F. et al. Histological studies on role of pectic enzymes in the development of Fusarium wilt symptoms in tomato. Phytopathology 45(10):524-527. 1955.
30. SHIRLEY, M. N. et al. Existence of Fusarium solani f. phaseoli as chlamydospores in soil. Phytopathology 51(5):308-312. 1961.
31. SLEETH, B. Relationship of Fusarium niveum to the formation of tyloses in melon plants. Phytopathology 23(1):33. 1933.
32. SNYDER, W. C. y TOUSSOUN, T. A. Current status of taxonomy in Fusarium species and their perfect stages. Phytopathology 55(8):833-837. 1965.
33. TAYLOR, G. S. y PARKINSON, D. Studies on fungus in the root region IV. Fungi vulgaris L. Plant and Soil 22(1):1-20. 1965.
34. VIRGIN, W. J. Relation of temperature and moisture to near-wilt of pea. Journal of Agriculture Research 59(8):591-600. 1939.
35. WELLS, D. G. et al. Evaluation of resistance and susceptibility in garden pea to near-wilt in the greenhouse. Phytopathology 39(10):771-779. 1949.
36. WINSTEAD, N. N. y WALKER, J. C. Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. Phytopathology 44(3):153-158. 1924.
37. ZAUMEYER, W. J. y GOTH, R. W. Bean disease investigations. Bean Improvement Cooperative n^o 6:31-32. 1963.
38. _____ y THOMAS, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S. Department of Agriculture. Technical Bulletin 868. 1957. 255 p.