

EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE FRIJOL
A LA MANCHA ANGULAR

ALGUNOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS
DE Isariopsis griseola Sacc.

y

PATOGENICIDAD DE ALGUNAS CEPAS
COLECTADAS EN COSTA RICA

Por

GASPAR ALBERTO SILVERA C.

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

Junio de 1967

EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE FRIJOL
A LA MANCHA ANGULAR

ALGUNOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS
DE Isariopsis griseola Sacc.

y

PATOGENICIDAD DE ALGUNAS CEPAS
COLECTADAS EN COSTA RICA

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:



Luis C. González, Ph.D.

Consejero



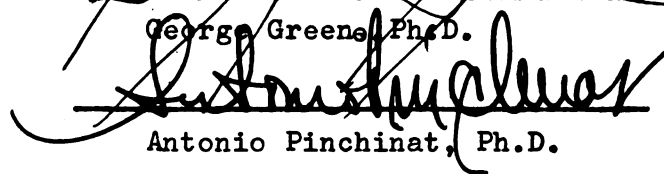
Benjamin H. Waite, Ph.D.

Comité



George Greene, Ph.D.

Comité



Antonio Pinchinat, Ph.D.

Comité

Junio de 1967

A mis padres
y hermanas

A todos mis colegas que luchan
por la superación del agro
panameño.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su más sincero agradecimiento al Dr. Eddie Echandi por su asesoramiento y dirección en la ejecución de este trabajo. Al Dr. Luis C. González por sus valiosos consejos, sugerencias y ayuda desinteresada que permitieron la culminación satisfactoria de esta investigación. A los miembros del Comité Consejero, Drs. George Greene, Antonio Pinchinat y Benjamín Waite.

A la Organización de Estados Americanos, por haber facilitado la beca con que se realizaron estos estudios de postgrado.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de David, República de Panamá, en donde cursó sus estudios primarios y secundarios. En 1960 ingresó en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Panamá, egresando en 1964 con el título de Ingeniero Agrónomo.

Desde Mayo de 1964 hasta Agosto de 1965 trabajó como técnico agrícola en el Departamento Agrícola de la Tabacalera Istmeña, S.A. en Alanje, Chiriquí, República de Panamá.

En Septiembre de 1965 ingresó en la Escuela para Graduados del IICA, para realizar estudios de postgrado en Fitopatología, finalizando sus estudios en Junio de 1967.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
LISTA DE CUADROS	viii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
I. Resistencia de variedades de frijol al ataque de <u>Isariopsis griseola</u> Sacc.	3
II. Comportamiento fisiológico del hongo	4
III. Patogenicidad de <u>Isariopsis griseola</u> Sacc... .. .	5
MATERIALES Y METODOS	6
I. Selección de un medio de cultivo apropiado y de una cepa con abundante crecimiento y esporulación	6
II. Evaluación de la resistencia de variedades de frijol a la mancha angular	8
1. Inoculación e incubación	8
2. Determinación de la reacción a la mancha angular	9
III. Estudios fisiológicos	11
EXPERIMENTOS Y RESULTADOS	16
I. Medio de cultivo y cepa seleccionada	16
II. Evaluación de la resistencia de variedades de frijol a la mancha angular	19
1. Comportamiento de 527 variedades de frijol a inoculaciones con una cepa de <u>Isariopsis griseola</u> Sacc.	19
2. Comprobación de la eficacia del método de evaluación de la resistencia en un grupo de variedades representativas	30

CONTENIDO (Continuación)

	<u>Página</u>
III. Estudios fisiológicos	31
1. Efecto de la temperatura en la formación de los coremios	31
2. Producción de esporas a diferentes temperaturas	32
3. Efecto de la luz y oscuridad en la producción de esporas	33
4. Efecto de la aereación en el crecimiento del hongo	34
5. Efecto de la presencia de agua en la germinación de las esporas..	35
6. Influencia de la temperatura en el crecimiento y esporulación de 8 cepas colectadas en Costa Rica	36
IV. Patogenicidad de algunas cepas colectadas en zonas frijoleras de Costa Rica	37
1. Recolección de las muestras del hongo ...	37
2. Variedades escogidas para estudiar la patogenicidad	43
3. Grados de infección obtenidos	44
DISCUSION	48
RESUMEN	55
SUMMARY	57
LITERATURA CITADA	59

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadros</u>		<u>Página</u>
No. 1	Comportamiento de variedades de frijol negro a inoculaciones con <u>Isariopsis griseola</u> Sacc.	20
No. 2	Comportamiento de variedades de frijol bayo a inoculaciones con <u>Isariopsis griseola</u> Sacc.	24
No. 3	Comportamiento de variedades de frijol rojo a inoculaciones con <u>Isariopsis griseola</u> Sacc.	26
No. 4	Comportamiento de variedades de frijol pinto a inoculaciones con <u>Isariopsis griseola</u> Sacc.	28
No. 5	Comportamiento de variedades de frijol blanco a inoculaciones con <u>Isariopsis griseola</u> Sacc.	29
No. 6	Calificación del grado de crecimiento y días para el inicio de la esporulación de 8 cepas de <u>Isariopsis griseola</u> , en AHFD, a diferentes temperaturas	41
No. 7	Grados de infección obtenidos en 8 variedades de frijol al inocularlas con 7 cepas de <u>Isariopsis griseola</u> Sacc.... ..	45

INTRODUCCION

Isariopsis griseola Sacc. causa en el frijol la enfermedad denominada mancha angular, debido a la forma típica angular que tienen las lesiones en el follaje, al quedar delimitadas por las nervaduras de las hojas. Su presencia es muy común en plantaciones de frijol de Costa Rica; la enfermedad podría considerarse como endémica y en ocasiones de carácter epidémico.

La investigación relacionada con la enfermedad y el organismo causal es bastante escasa, por lo que se justifican trabajos de la naturaleza del proyectado.

Algunos investigadores como Brock (2), Gardner y Mains (5) y Puerto y Alonso (9) han trabajado en evaluación de la resistencia de variedades, pero con un número pequeño de ellas. No hay trabajos al respecto con las variedades de frijol comunmente sembradas en Centro América. Cardona (4) realizó el trabajo más completo sobre la enfermedad y el organismo causal, incluyendo estudios de hospederos, patogenicidad y fisiología del hongo, relaciones ambientales y parásito-hospedero.

Al planear esta investigación se ha juzgado necesario ampliar el conocimiento existente tanto de la enfermedad como del patógeno, para aumentar la información básica disponible y a la vez aportar conocimientos de valor práctico que ayuden a la prevención y combate de la enfermedad.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio e invernaderos de Patología Vegetal del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, en Turrialba, Costa Rica. Se inició en Junio de 1966, finalizándose en Mayo de 1967.

Los objetivos principales de este trabajo son:

1. Evaluación de la resistencia de 527 variedades de frijol a la mancha angular.
2. Realizar algunos estudios fisiológicos con el hongo.
3. Estudiar la patogenicidad de algunas cepas colectadas en zonas frijoleras de Costa Rica.

REVISION DE LITERATURA

I. Resistencia de las variedades de frijol al ataque de Isariopsis griseola Sacc.

Gardner y Mains (6) efectuaron en 1928 los primeros estudios que se conocen sobre reacciones varietales; al probar 40 variedades encontraron que Kentucky Wonder era la única en mostrar algún grado de resistencia. Brock (2) observó que en condiciones de campo variedades de enredadera eran más resistentes que las de mata. Clasificó la reacción de 156 variedades, entre las cuales enumeró a 18 altamente susceptibles, 24 susceptibles, 31 moderadamente resistentes, 19 resistentes y 12 altamente resistentes.

Olave (8) no encontró diferencias en el grado de infección de plantas inoculadas a los 20 y a los 30 días de edad; también efectuó trabajos en evaluación de la resistencia en un grupo de 10 variedades y 2 líneas. Puerta y Alonso (9) señalaron resistencia en las variedades Borriol (234), No. 218 y San Fiacre (CS-27). Weaver y Zaumeyer (10) reportaron a la variedad U.I. Pinto No. 11 como tolerante a la infección.

Según trabajos realizados en Colombia (1), en la mayoría de las cruces simples la resistencia parece ser recesiva y dominada por 2 ó 3 factores independientes. En muy pocos casos la resistencia fué dominante.

II. Comportamiento fisiológico del hongo.

Cardona (4) realizó estudios referentes a la fisiología de Isariopsis griseola. Ensayó varios medios nutritivos sintéticos y naturales, incluyendo algunos con adición de vitaminas y aminoácidos, en todos los cuales el crecimiento obtenido era escaso y lento. En PDA (papa-dextrosa-agar) y PDA con 1% de jugo de hojas de frijol, el diámetro de las colonias era de 20 mm a los 25 días de incubación en platos petri.

Cardona encontró que el hongo crecía a temperaturas desde 8°C hasta 28°C en medio de cultivo, con un óptimo de 24°C, no hubo crecimiento a 32°C. Las esporas germinaban entre 4°C y 36°C; a estas temperaturas el proceso germinativo se inicia a las 3 hrs.; el porcentaje de esporas germinadas es mayor con aumentos de la temperatura, a partir de 4°C hasta alcanzar un óptimo de 24°C.

La infección ocurrió aún con cortas exposiciones (3 hrs.) a condiciones húmedas, pero era favorecida con humedad prolongada sobre las 24 hrs. Después del establecimiento del hongo en los tejidos era necesaria una alta humedad por 24 hrs. para la formación de coremios y un período de 48 hrs. en iguales condiciones para la esporulación.

Llanos (7) comprobó que la luz no influye en la germinación de las esporas. Cardona (4) encontró que no habían diferencias en el período de incubación y defoliación al efectuar experimentos con duración e intensidad de la luz. También determinó que en medio de cultivo el pH más favo-

rable el crecimiento era de 5.0 en agar-peptona-miel y de 5.6 en PDA.

III. Patogenicidad de Isariopsis griseola Sacc.

Brock (2) en 1951, parece ser el primero en haber aislado el hongo en cultivo puro. Hizo pruebas de patogenicidad con aislamientos monospóricos; inoculó plantas de 21 días con una suspensión preparada con cultivos de 21 días en tubos con agar-vainas de frijol (50 gms/lt.). Los síntomas se manifestaron a los 10-12 días.

Cardona (4) inoculó 10 aislamientos monospóricos en plantas de la variedad susceptible Idaho Refugee, sumergiéndolas en una suspensión de esporas y también asperjándolas con un atomizador. Encontró que no había diferencias en la patogenicidad de los 10 aislamientos. Al estudiar la relación entre la madurez fisiológica de las plantas y la infección y severidad de la enfermedad, concluyó que las plantas tienen la misma susceptibilidad durante todo el período de crecimiento.

Llanos (7) determinó que el hongo no pierde su patogenicidad en medio de cultivo, aún cuando haya sufrido numerosos trasplantes.

MATERIALES Y METODOS

I. Selección de un medio de cultivo apropiado y de una cepa con abundante crecimiento y esporulación.

En la literatura consultada, entre los mejores medios reportados para el cultivo de I. griseola, están PDA y PDA con 1% de extracto de hojas de frijol. No hay datos cuantitativos sobre la abundancia del crecimiento obtenido en esos medios.

Con el fin de conseguir un medio nutritivo en el que se lograra un crecimiento y esporulación abundante, se ensayaron varios medios hechos con extractos de plantas. Los medios probados, y sus ingredientes por cada litro, fueron:

1. Agar-raíces de zanahoria (18 gms. agar, 200 gms. raíces)
2. Agar-hojas de zanahoria (18 gms. agar, 300 gms. hojas)
3. Agar-jugo V-8 (18 gms. agar, 5 gms. CaCO_3 , 22 oz. jugo V-8)
4. Agar-hojas de frijol (18 gms. agar, 300 gms. hojas)
5. Frutos de frijol (vainas enteras, esterilizadas)
6. Agar-semillas de frijol (18 gms. agar, 150 gms. semillas)
7. Agar-hojas de remolacha (18 gms. agar, 300 gms. hojas)
8. Agar-papa-dextrosa (18 gms. agar, 200 gms. papas, 20 gms. dextrosa) con 1% de extracto de hojas de frijol.

En los medios a base de hojas de frijol, remolacha y zanahoria, se agregó o no un 1% de dextrosa. Las hojas se desmenuzaron en una licuadora, hirviéndolas en baño María unos 45 minutos. Se filtró la cocción en tela de gasa y al líquido obtenido se le agregó el agar.

Se obtuvieron cultivos puros en PDA, aislando el hongo de hojas enfermas colectadas en invernadero, en Turrialba. Para lograr el aislamiento, se obtuvieron esporas de coremios muy esporulados con un asa fina, pasándolas a platos petri con el medio semilíquido y agitando suavemente el plato. Después de 24 hrs., con un asa especial, fué posible extraer esporas germinadas y llevarlas a tubos de ensayo con PDA.

La siembra en cada uno de los medios probados se hizo frotando segmentos de cultivos contra la superficie del medio en tubos de ensayo, o bien disgregando el segmento del cultivo en el medio semilíquido contenido en platos petri.

Las apreciaciones sobre el crecimiento del hongo en los distintos medios se hicieron por observación visual. Se estimó cuál era el medio en que el hongo crecía mejor según el diámetro y abundancia de las colonias, además de constatar si había o no esporulación.

Para seleccionar una cepa con las mejores cualidades en cuanto a un rápido crecimiento y esporulación, se siguió la técnica empleada por Calpouzos (3) en su trabajo con Cercospora musae Zimm. La técnica consistió en hacer siembras de esporas en platos petri, con el medio líquido a más o menos 40°C y agitando para distribuir mejor las esporas en el medio. Al formarse las colonias, se sacaron aquellas o

sectores de aquellas que hubiesen esporulado más rápida y abundantemente, transfiriéndolas nuevamente a platos petri.

II. Evaluación de la resistencia de las variedades de frijol a la mancha angular

1. Inoculación e incubación:

El inóculo se preparó utilizando cultivos de una cepa seleccionada, en tubos de ensayo con agar-hojas de frijol-dextrosa (AHFD), de unos 12 días de edad; con una aguja plana se extrajo la capa fungosa que contenía la masa de coremios y de esporas. El material obtenido se colocó en una licuadora pequeña, agregando la cantidad de agua destilada-esterilizada necesaria y poniendo en funcionamiento la licuadora por unos minutos. El líquido espeso resultante se filtró por una capa doble de tela de gasa.

La concentración de la suspensión resultante se procuró que fuese de $7-8 \times 10^4$ esporas/ml., regulando la cantidad de agua empleada y el número de tubos de ensayo. El conteo de esporas se hizo con un hematocitómetro. Por lo general, con un crecimiento fungoso abundante en 10 tubos y unos 250 ml de agua se obtuvo suficiente inóculo para asperjar unas 175 plantas.

La suspensión se atomizó en el haz y el envés de la primera hoja trifoliada de plantas de unos 20 días de edad, utilizándose un atomizador De Vilbiss conectado a una bomba portátil que expulsaba aire a presión.

Las plantas inoculadas se llevaron enseguida a cámara

húmeda, en donde permanecieron durante 48 hrs., para brindar condiciones óptimas al proceso de penetración e infección. En la cámara húmeda la temperatura fluctuó entre 23° y 28°. Después de este período, se pasaron las plantas al invernadero, en donde se manifestaron los síntomas.

2. Determinación de la reacción a la mancha angular:

Fué necesario efectuar dos lecturas de los síntomas en las plantas inoculadas, la primera a los 7-8 días y la segunda a los 10-11 días.

Se consideró que la cepa tuvo una alta patogenicidad por incitar síntomas severos en un lapso de 7 a 10 días. Se efectuaron las dos lecturas de los síntomas, con el fin de diferenciar las variedades en base tanto al grado de intensidad de los síntomas como al número de días que éstos tardaban en presentarse. Variedades que presentaron síntomas a los 7 días se consideraron más susceptibles que otras que mostraron los mismos síntomas, pero a los 8 días.

En la primera lectura los síntomas foliares no estaban aún bien definidos, las manchas podían ser un poco difusas, aisladas o coalescentes. En las variedades más susceptibles, las manchas eran coalescentes, pudiendo presentar las hojas un ligero encorvamiento. La lectura se hizo separando los síntomas en tres categorías: sin manchas, manchas aisladas (Figura No.1) y manchas coalescentes (Figura No.2); en algunos casos se diferenció una condición de manchas incipientes, visibles como puntos acuosos en el envés.

En la segunda lectura se establecieron las siguientes calificaciones:

- 1) Altamente resistentes: variedades con hojas ausentes de manchas (Figura No.6)
- 2) Resistentes: hojas inoculadas de color verde, no encorvadas, con menos de 60 manchas aisladas por foliolo (Figura No.3)
- 3) Susceptibles: hojas con numerosas manchas aisladas y/o coalescentes que no llegan a cubrir toda la hoja. Las hojas podían estar amarillentas y un poco encorvadas. No ocurría defoliación al momento de la lectura (Figura No.4).
- 4) Muy susceptibles: hojas encorvadas, cubiertas de manchas coalescentes en su mayoría; en muchos casos ya había esporulación. Ocurría defoliación ó las hojas estaban próximas a caer (Figura No.5).

Después de hechas las dos lecturas, se estableció la evaluación final de la resistencia, promediando ambas lecturas. En la primera lectura se consideró que las variedades que presentaban manchas **aisladas** poseían más resistencia que las que presentaban manchas coalescentes, aún cuando esas mismas variedades podían ser calificadas como muy susceptibles en la segunda lectura.

En la evaluación final de la resistencia se clasifi-

có la reacción de las variedades así: altamente resistentes, medianamente resistentes, susceptibles y altamente susceptibles.

Criterio seguido en la evaluación de la resistencia de las variedades, al promediar las dos lecturas de los síntomas:

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

III. Estudios fisiológicos

Se realizaron los siguientes experimentos:

1. Efecto de la temperatura en la formación de coremios.
2. Producción de esporas a diferentes temperaturas.
3. Efecto de la luz y la oscuridad en la producción de esporas.



FIGURA No. 1. Hoja con manchas aisladas, condición diferenciada en la primera lectura de los síntomas.



FIGURA No. 2. Hoja con manchas coalescentes, síntoma manifestado a los 7-8 días en la primera lectura.



FIGURA Nº 3. Hoja de una variedad resistente, con manchas aisladas, separadas.

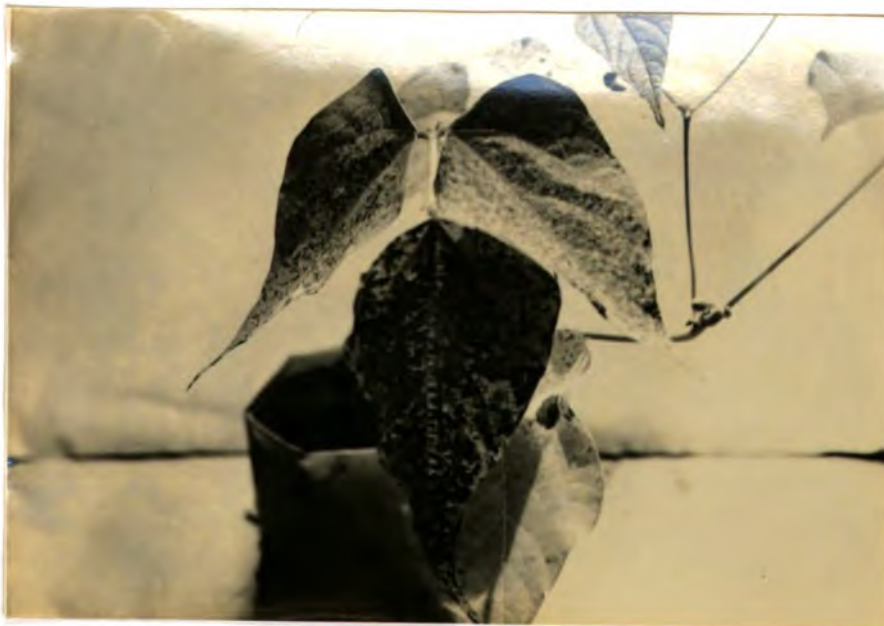


FIGURA Nº 4. Hoja de una variedad susceptible, con numerosas manchas aisladas y coalescentes.



FIGURA Nº 5. Hoja de una variedad muy susceptible, encorvada, con áreas necróticas y próxima a caerse.



FIGURA Nº 6. Planta altamente resistente, a la izquierda, en contraste con otra muy susceptible, a la derecha.

4. Efecto de la aereación en el crecimiento del hongo.
5. Efecto de la presencia de agua en la germinación de esporas.
6. Influencia de la temperatura en el crecimiento y esporulación de 8 cepas colectadas en Costa Rica.

Los experimentos están descritos en la sección de Experimentos y Resultados. En los primeros 5 experimentos se trabajó con una cepa seleccionada del hongo, en cultivo de AHFD, o bien con hojas inoculadas artificialmente con la misma cepa. El sexto experimento se realizó con 8 cepas colectadas en diversas zonas frijoleras de Costa Rica. Las cepas se sembraron en platos petri con AHFD.

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

I. Medio de cultivo y cepa seleccionada

Los medios de agar-hojas de frijol y agar-semillas de frijol se estimaron como los mejores entre el grupo de medios probados. Para determinar la concentración más adecuada de estos dos medios, se prepararon ambos con y sin dextrosa y con 1.8% de agar, en las siguientes concentraciones:

1. Agar-hojas de frijol
 - a. 300 gms. de hojas/litro
 - b. 200 gms. de hojas/litro
 - c. 100 gms. de hojas/litro
 - d. 75 gms. de hojas/litro

2. Agar-semillas de frijol
 - a. 150 gms. de semillas/litro
 - b. 75 gms. de semillas/litro

Se obtuvo el crecimiento y esporulación más abundante con agar-hojas de frijol-dextrosa (AHFD) preparado con 18 gms. de agar, 300 gms. de hojas y 10 gms. de dextrosa, por litro y con agar-semillas de frijol, preparado con 150 gms. de semillas por litro. La adición de dextrosa pareció estimular una esporulación más abundante, por lo que se re-

recomienda añadirla al medio.

Para la selección de una cepa con el mayor crecimiento y esporulación, fué necesario efectuar 6 transferencias o "subcultivos" consecutivos, hasta obtener una con las cualidades deseadas. La cepa así obtenida se denominó como "cepa seleccionada"; a los 8 días su crecimiento y esporulación fué muy abundante, en tubos con AHFD.

A través de los subcultivos se encontraron dos tipos de colonias; unas cónicas, redondeadas, de superficie convexa y color negruzco (Figura N^o 7), y otras colonias de crecimiento uniforme sobre el medio, no circulares y que formaban una capa felpuda en la superficie, de un color más claro, café grisáceo (Figura N^o 8). Normalmente los dos tipos de colonias aparecen mezclados en el medio, aunque pueden haber cepas en que uno de los dos tipos de colonias sea predominante.

La cepa seleccionada en los subcultivos poseía las características del segundo tipo de colonias, aunque siempre se formaban una que otra colonia redondeada. El manejo de esta clase de colonias de crecimiento felpudo es más fácil y además su crecimiento es mucho más rápido y abundante.

La mejor técnica para obtener cultivos puros rápidamente consistió en agregar esporas al medio semilíquido, a unos 40^o, en platos petri, agitando para asegurar una distribución de las esporas y un crecimiento uniforme.

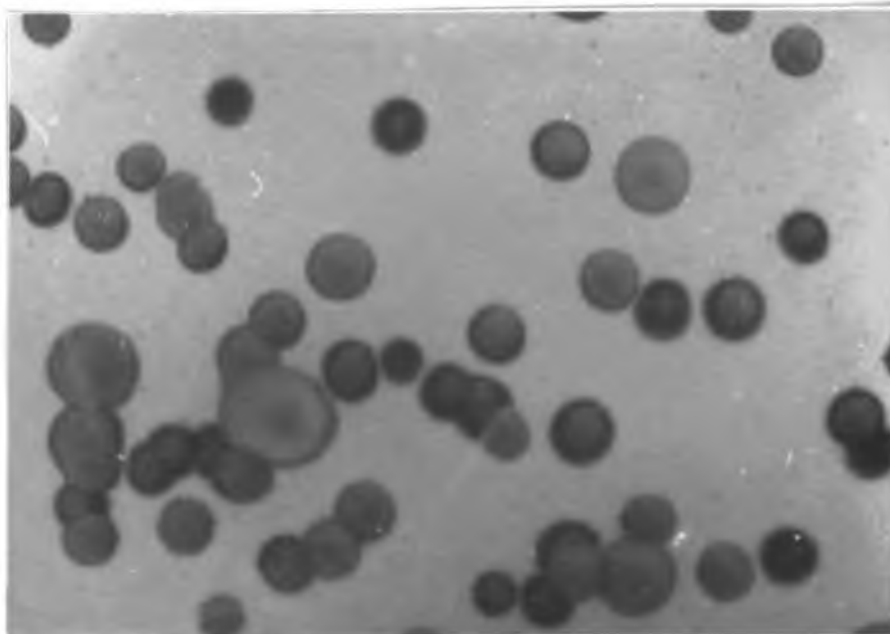


FIGURA Nº 7. Colonias de 14 días de I. griseola, del tipo cónico, redondeado, en AHFD.

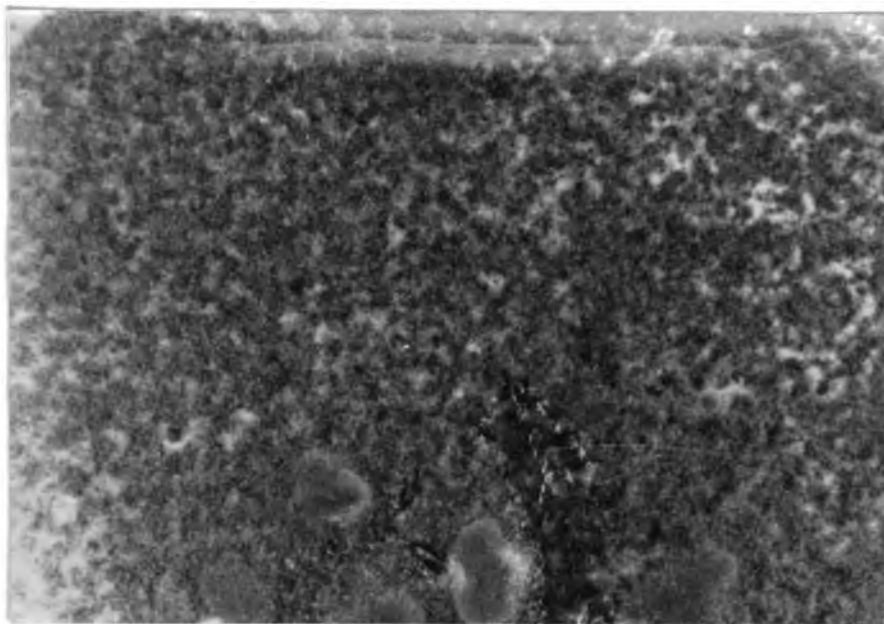


FIGURA Nº 8. Cultivo puro de 7 días de la cepa seleccionada, con una abundante esporulación. En la parte inferior se notan algunas colonias redondeadas.

Los platos deben llevarse a una incubadora a la temperatura óptima de 25º

II. Evaluación de la resistencia de variedades de frijol a la mancha angular

1. Comportamiento de 527 variedades de frijol a inoculaciones con una cepa de *Isariopsis griseola* Sacc:

Se estudió el comportamiento de un grupo de 527 variedades obtenidas en el Banco de Germoplasma del Programa de Cultivos Alimenticios del IICA. Se incluyeron en la prueba variedades representativas de los colores de grano negro, bayo, rojo, pinto y blanco (250, 88, 86, 75 y 28 variedades respectivamente).

Cada variedad se sembró en grupos de 4 plantas, en macetas de arcilla o en bolsas plásticas. La inoculación de las mismas se hizo cuando las plantas tenían unos 20 días de edad, con una suspensión de esporas obtenida de cultivos de la cepa seleccionada en AHFD.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la resistencia de las variedades aparecen en los Cuadros Nos. 1-5.

Del total de variedades evaluadas, los porcentajes obtenidos en los distintos grados de infección fueron los siguientes: 2.6% altamente resistentes (14 variedades); 46.6% medianamente resistentes (246 variedades); 28.1% susceptibles (148 variedades); 14.8% altamente susceptibles (78 variedades) y 7.7% con reaccio-

CUADRO Nº 1. Comportamiento de variedades de frijol negro a inoculaciones con Isariopsis griseola Sacc.

Variedades	Grado de Infección*	Variedades	Grado de Infección*
S-29-N	0	Sal-34-N	1
S-67-N	0	Sal-35-N	1
Sal-209-N	0	Sal-204-N	1
Sal-219-N	0	Sal-208-N	1
Sal-222-N	0	Sal-210-N	1
Sal-223-N	0	Sal-212-N	1
Sal-227-N	0	Sal-213-N	1
18-Guatemala-5091	0	Sal-214-N	1
31-Sal-Es-2873	0	Col-104-N	1
IAN-9-VN	0	Col-105-N	1
2-N	1	Col-121-N	1
4-N	1	Col-122-N	1
8-N	1	Col-123-N	1
72-N	1	Chim-2-N	1
74-N	1	Chim-3-N	1
76-N	1	Chim-5-N	1
83-N	1	Chim-6-N	1
98-N	1	Chim-7-N	1
109-N	1	Chim-8-N	1
6237-N	1	Chim-9-N	1
S-19-N	1	Chim-10-N	1
S-19-7-N	1	Chim-13-N	1
S-89-N	1	Guatemala-4	1
S-182-N	1	Guatemala-11	1
S-184-N	1	Guatemala-20	1
S-185-N	1	Costa Rica-40	1
S-315-N-2	1	Costa Rica-44	1
S-323-N	1	Costa Rica-49	1
S-578-N	1	Costa Rica-52	1
S-587-N	1	Venezuela-66	1
S-690-N	1	Venezuela-67	1
S-771-N	1	Venezuela-69	1
S-1350-N	1	50600	1
S-1412-N	1	Jamapa	1
H-182-N	1	Comp.Negro Chimaltenango	1
Mex-17-N	1	Compuesto Cotaxtla	1
Mex-22-N	1	1-Guatemala-2473-19	1

* 0: altamente resistente
1: medianamente resistente

2: susceptible
3: altamente susceptible

CUADRO Nº 1 (Continuación)

Variedades	Grado de infección*	Variedades	Grado de Infección*
Mex-24-N	1	4-Guatemala-5089-0	1
Mex-28-N	1	7-Guatemala-2829-1c	1
Mex-60-N	1	11-Guatemala-5089-5M	1
Mex-75-N	1	13-Guatemala-5362	1
Mex-76-N	1	39-Costa Rica Porrillo	1
Mex-142-N	1	44-Costa Rica-S-315-N	1
C-166-N	1	49-Costa Rica-S-216-N	1
C-192-N	1	54-Costa Rica Jamapa	1
Sal-22-N	1	26-Sal-Costa Rica 30-3	1
Sal-25-N	1	27-Sal-V-1-4	1
Sal-31-N	1	29-Sal-22-6-4	1
58-Mex-Linea C-II-N		Chim-4-N	2
28c-2c-1c	1	Chim-12-N	2
63-Mex-Linea H-II-209-		Costa Rica-42	2
2c-1c	1	Costa Rica-43	2
Black Turtle 41098	1	Costa Rica-45	2
Matambre Negro-A	1	Costa Rica-51	2
Matambre Negro-C	1	Costa Rica-54	2
Mexico PI-201-33	1	Venezuela-68	2
Negro de Cañas	1	Guateian-6622	2
Negro Costa Rica	1	Rico	2
Negro Venezuela	1	Porrillo Nº 1	2
Negro-150	1	3-Guatemala-2226B-21-N-0	2
Negro S.I.del General	1	5-Guatemala-2473-11	2
Resistente a <u>Fusarium</u>	1	10-Guatemala-2805-4M-OM	2
Venezuela	1	12-Guatemala-2226B-21-N	2
68-Venezuela-I-60	1	43-Costa Rica-S-182-N	2
M-12-1	1	45-Costa Rica-S-89-N	2
5-A Vaina Blanca	1	25-Sal-Comp.R-A-P-2	2
12-B-P-3-2	1	35-Sal-5-A Vaina Blanca	2
6-N	2	62-Mex-Linea F-II-209-8c-1c	2
44-N	2	64-Mex-Linea D-II-209-20c-1c	2
110-N	2	Black Valentine	2
670-N	2	Brasil Preto-147	2
S-18-N	2	Ideal Market	2
S-219-N-1	2	Frijol Negro Indio	2
S-265-N	2	Colombia PI-207-408	2
S-426-N	2	Matambre Negro-D	2

* 0: altamente resistente

1: medianamente resistente

2: susceptible

3: altamente susceptible

CUADRO Nº 1 (Continuación)

Variedades	Grado de infección*	Variedades	Grado de infección*
S-443-N	2	San Andrés Nº 1	2
S-591-N	2	Santa Clara	2
S-772-N	2	Turrialba Negro	2
Mex-23-N	2	N-6-B	2
Mex-27-N	2	13-B-P-1	2
Mex-73-N	2	61-N	3
Mex-74-N	2	63-N	3
C-165-N	2	91-N	3
Sal-26-N	2	97-N	3;
Sal-27-N	2	8-21-N	3
Sal-30-N	2	S-922-N	3
Sal-37-N	2	H-183-N	3
Sal-205-N	2	Mex-21-N	3
Sal-207-N	2	Mex-57-N	3
Sal-211-N	2	Mex-63-N	3
Col-101-N	2	C-36-N	3
Col-114-N	2	C-163-N	3
Col-126-N	2	C-164-N	3
Col-129-N	2	C-167-N	3
Col-130-N	2	C-H-60-111-2	3
Chim-1-N	2	1-N	0+,3+++
C-189-N	3	7-N	0++,1++
C-191-N	3	95-N	0+,1+++
C-193-N	3	Mex-30-N	0+,1++
Sal-29-N	3	Mex-56-N	0+++;3+
Sal-36-N	3	Mex-58-N	1+,3+++
Sal-48-N	3	Mex-72-N	0+,1+++
Sal-215-N	3	Sal-66-N	0+++;2+
Sal-216-N	3	2-Guatemala-2473-17	1++,2++
Sal-217-N	3	6-Guatemala-2829-2c	0++,1++
Sal-218-N	3	8-Guatemala-2809-23	1++,2++
Sal-220-N	3	9-Guatemala-Comp.Chim.	0++,1++
Col-102-N	3	15-Guatemala-2524	0++,1++
Col-107-N	3	16-Guatemala-2226B-32-VN	0+++;2+

* 0: altamente resistentes
1: medianamente resistentes

2: susceptibles
3: altamente susceptibles

CUADRO Nº 1 (Continuación)

Variedades	Grado de infección*	Variedades	Grado de infección*
Col-108-N	3	17-Guatemala-2450-7-1	0++,3+
Col-120-N	3	19-Guatemala-2465-10	0++,3++
Col-125-N	3	21-Guatemala-2995	0++,1++
Guatemala-10	3	40-Costa Rica-S-591-N	0+,1+++
Costa Rica-39	3	51-Costa Rica-Negro-150	0+,1+++
50585	3	52-Costa Rica-Mex-27-N	1++,2++
14-Guatemala-2472	3	22-Sal-S-77-N	1++,2++
20-Guatemala-2450-1E	3	30-Sal-Comp. 22-M	1+,3++
36-Sal-Rico V. de M.		50-Mex-Linea E-II-	
Gerais	3	198-4c-2c-1c	1+,2+++
37-Sal-G-21-70-77	3	56-Mex-Linea Ch-II-198	0+,1+++
48-Sal-Mex-53-5-1-Ch-		57-Mex-Linea A-II-197-	
10-3	3	3c-4c-1c-1c	1++,3++
66-Venezuela-1-66	3	61-Mex-Linea B-II-198-	
67-Venezuela-Cubagua	3	126-4c-2c-1c	0+++1+++
68-Venezuela-I-2	3	Mecentral	0+,1+++
Antigua Negro	3	Sal-224-N	0+++1+
Bolita Negra	3		
Jin-19-N	3		
Negro-110	3		
Veranic-2	3		
M-22-1	3		

* 0: altamente resistentes 2: susceptibles
 1: medianamente resistentes 3: altamente susceptibles

+ El número de cruces indica el número de plantas con los respectivos grados de infección.

CUADRO Nº 2. Comportamiento de variedades de frijol bayo a inoculaciones con *Isariopsis griseola* Sacc.

Variedades	Grado de Infección*	Variedades	Grado de Infección*
Mat-2-B	0	Yunguilla-E	1
Mat-4-B-1	0	46-Costa Rica-S-336-B	1
S-32-B	1	55-Costa Rica-S-556-B	1
S-124-B	1	4314 Nicoya	1
S-331-B	1	S-295-B	2
S-336-B	1	S-325-B	2
S-337-B	1	S-450-B	2
S-534-B	1	S-490-B	2
S-630-B	1	S-586-B-10	2
S-996-B	1	Mex-40-B	2
S-1024-B	1	Mex-203-B	2
S-1137-B	1	Mex-7-B	2
Mex-26-B	1	Jin-10-B	2
Mex-43-B	1	Jin-12-B	2
Mex-45-B	1	18-C	2
Mex-47-B	1	71-B	2
Mex-59-B	1	106-B	2
Mex-61-B	1	Amarillo	2
Mex-65-B	1	Brasil Resinha-1459-9	2
Mex-145-B	1	Brasil Resinha-1277	2
Mex-194-B	1	Brasil Chumbinho-79	2
Mex-197-B	1	H-F-465-63-1-1	2
Mex-198-B	1	Frijol temprano	2
Mex-200-B	1	S-324-B	3
Jin-11-B	1	S-811-B	3
Jin-13-B	1	S-1504-B	3
17-C	1	Mex-37-B	3
30-A	1	Mat-1-B	3
40-A	1	15-C	3
45-B	1	20-C	3
51-A	1	55-B	3
69-B	1	60-C	3
92-B	1	82-C	3
100-B	1	94-B	3
Amarillo Matambre Ecuador	1	Brasil Chumbinho	3
Brasil Jalo-90	1	Yunguilla	3

* 0: altamente resistentes

1: Medianamente resistentes

2: susceptibles

3: altamente susceptibles

CUADRO Nº 2 (Continuación)

<u>Variedades</u>	<u>Grado de Infección*</u>	<u>Variedades</u>	<u>Grado de Infección#</u>
Creme Brasil	1	S-335-B	1+,3+++
Guatemala-209-B-10c-1c	1	Mex-16-B	0++,1+
Mantequilla Crema	1	Mex-136-B	0+,1+++
Mex-F-II-209-8c-1c	1	Jin-14-B	0+++,1+
Poroto Eterno	1	Est-22-B	0+,2+++
Poroto Parado	1	Mixtureado Chaucha	
Sur Africa PI-172-015	1	Ecuador	0+,1+++
Valiente-B	1	T-2 P.Morado Blanco	0+++,3+
Yunguilla-C	1		

+ El numero de cruces indica el número de plantas con los respectivos grados de infección.

CUADRO Nº 3. Comportamiento de variedades de frijol rojo a inoculaciones con Isariopsis griseola Sacc.

Variedades	Grado de Infección	Variedades	Grado de Infección
58-R	0	Carne-18	2
103-R	0	Carne-21	2
S-15-R	1	Carne-24	2
S-18-1-R	1	Carne-25	2
S-59-R	1	Carne-27	2
S-98-R	1	24-R	2
S-209-R	1	50-R	2
S-382-R	1	68-R	2
S-399-R	1	75-R	2
S-402-R	1	93-R	2
S-409-R	1	101-R	2
S-546-R	1	105-R	2
S-560-R	1	6236-R	2
S-613-R	1	Sal-67-R	2
Carne-1	1	Sal-229-R	2
Carne-3	1	Col-109-R	2
Carne-10	1	Mex-78-R	2
21-R	1	Mex-79-R	2
27-R	1	Mex-80-R	2
58-R	1	Mex-81-R	2
42-R	1	USA-71-R	2
53-R	1	H-51-R	2
78-R	1	50585	2
79-R	1	50-Costa Rica-S-402-R	2
Sal-226-R	1	23-Sal-S-78-R	2
Sal-228-R	1	37-Sal-Africa-17	2
Col-110-R	1	Colorado	2
Col-112-R	1	Selección Alto de la Paloma	2
Col-131-R	1	PI-163-555	2
USA-2-R	1	S-100-R	3
50873	1	S-413-R	3
C-190-R	1	S-589-R	3
Riñón Zumpango	1	Carne-12	3
Rojo Grande	1	Carne-14	3
Selección de Pacuare	1	Carne-16	3
S-5-R	2	37-R	3

CUADRO Nº 3 (Continuación)

Variedades	Grado de Infección	Variedades	Grado de Infección
S-120-R	2	Col-132-R	3
S-388-R	2	4-Costa Rica-S-382-R	3
S-696-R	2	Nic-230-R	3
Carne	2	S-167-R	0+++ , 1+
Carne-5	2	Carne-8	0++ , 1++
Carne-15	2	57-R	0++ , 1+
Carne-17	2	53-Costa Rica-S-546-R	1++ , 2++

+ El número de cruces indica el número de plantas con los respectivos grados de infección.

CUADRO Nº 4. Comportamiento de variedades de frijol pinto a inoculaciones con Isariopsis griseola Sacc.

Variedades	Grado de Infección	Variedades	Grado de Infección
Col-86-P	1	Col-118-P	2
Col-87-P	1	Mex-44-P	2
Col-91-P	1	Mex-144-P	2
Col-94-P	1	S-64-P	2
Col-95-P	1	S-219-P	2
Col-96-P	1	S-450-P	2
Col-98-P	1	S-562-P	2
Col-100-P	1	33-P	2
Col-111-P	1	41-P	2
Col-117-P	1	46-P	2
Col-193-P	1	60-P	2
Mex-38-P	1	64-P	2
Mex-46-P	1	73-P	2
S-475-P	1	81-P	2
USA-1-P	1	96-P	2
USA-4-P	1	Brasil Pintado	2
USA-48-P	1	Colombia PI-207-130	2
USA-56-P	1	Cranberry 40853	2
USA-59-P	1	Matambre Mixtreado	2
54-P	1	Pinto-162	2
67-P	1	Pinto-168	2
84-P	1	Rivas-27	2
90-P	1	T-1 P. Rojo-Crema 1/2 Guia	2
Algarrobo	1	T-8-P	2
Chiapas 206-A	11	T-13 P. Amarillo Café Guia	2
Diacol Andino	1	42-Costa Rica-S-237-P	2
Jamaica	1	47-Costa Rica-S-64-P	2
Lot-128-97	1	U.S. Pinto-14	2
<u>Phaseolus lunatus</u>	1	Mex-61-2-P	3
Sur Africa PI-172-032	1	S-211-P	3
Tendergreen	1	49-P	3
Tendergreen 32304	1	118-P	3
Vaquita	1	Bayo Rayado	3
T-2 P. Morado Blanco	1	T-8-2-P	3
T-4 P. Rojo Amarillo Guia	1	Sal-206-P	3
T-12 P. Rojo Blanco	1	Col-192-P	0+,1. ++
US Pinto 5	1	Tostado Manteca	0+,1++
Col-90-P	2		

+ El número de cruces indica el número de plantas con los respectivos grados de infección.

CUADRO Nº 5. Comportamiento de variedades de frijol blanco a inoculaciones con Isariopsis griseola Sacc.

Variedades	Grado de Infección	Variedades	Grado de Infección
S-204-B1	1	Blanco Parramos	1
S-452-B1	1	Esp-33-B1	1
S-580-B1	1	Panamito-A	1
S-719-B1	1	Michelite	1
C-165-B1	1	Soginaw USA-40025	1
C-186-B1	1	USA-12-B1	1
52-B1	1	USA-11-B1	1
56-B1	1	USA-58-B1	1
108-B1	1	28-Sal-Comp.13-B-P-SE	1
112-B1	1	PI-201-496 (Mex)	1
40881-B1	1	PI-163-372 (Perú)	1
Col-119-B1	1	PI-215-717 (Perú)	1
Sal-68-B1	1	Gratiot 40398	2
Blanco de Alajuela	1	Seaway USA	2

nes mezcladas (41 variedades).

En la prueba se incluyeron 13 variedades seleccionadas por el Programa de Cultivos Alimenticios del IICA por su alta producción, amplio radio de adaptación y resistencia de campo a las principales enfermedades. Estas fueron: Compuesto Negro Chimaltenango, S-219-N-1, Compuesto Cotaxtla, S-19-N, Jamapa, Porrillo Nº 1, Rico, S-182-N, H-182, Guateian 6622, S-315-N-2, Col-123-N, Col-109-R.

2. Comprobación de la eficacia del método de evaluación de la resistencia en un grupo de variedades representativas:

Con el fin de comprobar la validez de los resultados obtenidos al evaluar la resistencia de las variedades, se escogió un grupo de 9 variedades, representativas de los diferentes tipos de granos y de los distintos grados de resistencia. Se utilizó la misma semilla usada en la primera prueba, la que se germinó y sembró en grupos de 4 plantas por variedad.

El método de inoculación fué igual que en la prueba anterior y las plantas estuvieron sujetas a las mismas condiciones de infección y desarrollo de los síntomas. La primera lectura de los síntomas se hizo a los 8 días, la segunda lectura a los 11 días.

Susceptibles: San Andrés N^o 1 y S-696-R.

Altamente susceptibles: 118-P, Col-120-N y Sal-218-N.

Los resultados de dos inoculaciones hechas en el grupo de variedades representativas permiten establecer que siguiendo este método de evaluación de la resistencia pueden obtenerse resultados consistentes y que guardan entre sí, la misma relación. En el grupo de 9 variedades probadas por segunda vez, se obtuvieron los mismos grados de infección que los obtenidos en la primera evaluación, clasificándose nuevamente las variedades dentro de los mismos grupos.

III. Estudios fisiológicos

1. Efecto de la temperatura en la formación de coremios:

Se tomaron folíolos de las variedades Mex-80-R, S-124-B y 50873-R, todas medianamente resistentes, a los 8 días de haber sido inoculadas artificialmente. Los folíolos de estas variedades presentaban manchas aisladas en las que se iniciaba la formación de los coremios, visibles como puntitos de color café claro.

Cada folíolo se cortó en 3-4 partes, colocándolas en platos petri acondicionados como cámaras húmedas. Se pusieron estas secciones de hojas de las tres variedades en incubadoras a 10^o, 15^o, 20^o, 25^o y 30^oC y se efectuaron observaciones posteriores con el microscopio entereoscópico para apreciar el desarrollo de los coremios. Para constatar la esporulación, se extrajeron coremios con

una pinza fina, observándolos con el microscopio.

Las observaciones se hicieron a las 6, 24, 48, 72 y 96 horas. A las 24 hrs. ya había coremios desarrollados y en esporulación a 15°C, 20°C y 25°C, con un óptimo de 25°C. A 30°C los coremios que se forman tienden a tener los conidióforos separados, que tardan las 96 hrs. en llegar a formar esporas adultas, pero deformes y escasas. A 10°C los coremios formados son compactos, con conidióforos muy agregados; en esta temperatura a las 96 hrs., pero no antes, hay una producción más o menos abundante de esporas adultas.

2. Producción de esporas a diferentes temperaturas:

El objetivo fué el de determinar el período de tiempo necesario para la formación de esporas en coremios ya desarrollados. Se tomaron hojas de la variedad 15-Guatemala-2524, con manchas aisladas que tenían coremios muy esporulados. Utilizando una corriente de aire a presión y un pñcel suave, se quitaron las esporas de los coremios. Se marcaron con tinta china 5 manchas por hoja, colocándolas en platos petri acondicionados como cámara húmeda y se llevó una hoja a distintas incubadoras a 10°C, 15°C, 20°C, 25°C y 30°C. Para efectuar las lecturas se arrancaron unos 5-10 coremios de cada hoja, depositándolos en portaobjetos para observarlos con el microscopio.

Según los resultados obtenidos, puede establecerse que las esporas adultas se forman en 24 hrs. a 15°C, 20°C y 25°C, con un óptimo de 25°C, siendo la producción muy

abundante a las 36 hrs. a 15°C, 20°C y 25°C, siempre con el óptimo a 25°C. A 30°C las esporas, formadas hasta las 96 hrs., son anormales y deformes y sólo se llegan a formar con un septo de los tres que normalmente pueden tener. A 10°C hay esporas adultas bien desarrolladas a las 48 hrs; a las 60 hrs. la esporulación es más o menos abundante.

3. Efecto de la luz y oscuridad en la producción de esporas.

Se estudió el efecto de la luz continua, períodos alternados de luz por 12 hrs. seguida de oscuridad por 12 hrs., y el de la oscuridad continua en la formación y producción de esporas. Se tomaron hojas de la variedad Mex-58-N, inoculadas previamente y con coremios en esporulación, en manchas grandes y aisladas. Con un pincel suave se eliminaron las esporas de los coremios, colocándose las hojas en platos petri.

En el tratamiento de oscuridad continua se cubrió un plato petri con papel de aluminio y papel negro, al igual que en el tratamiento con oscuridad por 12 hrs. y luz por 12 hrs. En este último caso se mantuvo el plato con la hoja en oscuridad durante la noche, retirando el papel a las 7:00 AM. Los tres tratamientos se colocaron bajo luz fluorescente (dos tubos de 48" cada uno). Cada 12 hrs. se extrajeron coremios, arrancándolos con una pinza fina y depositándolos sobre un portaobjeto para observar la formación de esporas en los coremios.

A las 12 hrs. se habían formado células alargadas en el ápice de los conidióforos, en todos los tratamientos; en algunos casos la espora en formación presentaba un **septo**. A las 24 hrs. en todos los tratamientos la formación de esporas permanecía en igual fase de desarrollo, pero las esporas se producían en mayor número.

A las 36 hrs. en el tratamiento en oscuridad continua, había el mayor número de esporas con dos septos, y algunas con tres septos. En los otros tratamientos de luz y oscuridad alternadas y de luz continua, el número de esporas con dos septos era menor, pero no habían esporas con tres septos.

A las 48 hrs. habían esporas adultas desarrolladas en los tres tratamientos, con dos y tres septos. La mayor producción ocurrió en las hojas expuestas a oscuridad continua; en las hojas con luz y oscuridad alternadas, la producción fué un poco menor, siendo la menor de todas la del tratamiento con luz continua.

4. Efecto de la aereación en el crecimiento del hongo.

Para determinar si el hongo necesita aereación en medio de cultivo, se realizó el siguiente experimento: en cuatro tubos de ensayo con AHFD y tapones de algodón se sembró el hongo frotando contra la superficie del medio segmentos de un cultivo con muchas esporas. En otros cuatro tubos se sembró también el hongo, pero se sellaron los tapones de algodón con parafina. Después de 8 días se observaron ambos tratamientos para compa-

rar los resultados.

Se comprobó que el hongo no crecía en los tubos sellados con parafina, mientras que en los otros, el crecimiento era normal.

5. Efecto de la presencia de agua en la germinación de esporas.

Se trató de comprobar si las esporas pueden germinar en ausencia de agua en estado líquido, aunque hubiese una alta humedad relativa presente.

Se preparó una suspensión concentrada de esporas, obtenidas de medio de cultivo. Se colocaron tres portaobjetos en cada uno de dos platos petri acondicionados como cámara húmeda, en los cuales se depositaron gotas de la suspensión de esporas. En un tratamiento se colocó un plato en una incubadora a 20°C. En otro se evaporaron las gotas de suspensión de esporas con un abanico, poniendo el plato en una cámara herméticamente cerrada que contenía una solución saturada de CaSO_4 con el fin de impedir la condensación, y se llevó la cámara a una incubadora a 20°. Después de 3 y 6 hrs. se tomaron portaobjetos de ambos tratamientos, observándolos con el microscopio.

A las 3 hrs. se constató que las esporas en la cámara con CaSO_4 no habían germinado, pero las esporas en la gota de agua sí habían germinado casi en su totalidad. A las 6 hrs. aún no habían signos de germinación de las esporas en la cámara con CaSO_4 .

6. Influencia de la temperatura en el crecimiento y esporulación de 8 cepas en AHFD

Este experimento tuvo por finalidad comprobar la influencia de la temperatura en el crecimiento y esporulación, en medio de cultivo de AHFD, de 8 cepas de Isariopsis griseola colectadas en distintas zonas de Costa Rica.

Cada cepa se denominó según el lugar o región del país en que fué colectada. Se emplearon las siguientes cepas en el estudio: cepa seleccionada (Turrialba), Cervantes, Paraíso, Alajuela 1, Alajuela 2, San Antonio, Liberia y San Isidro. Las cepas habían sido colectadas previamente y aisladas en cultivo monospórico unos meses antes.

Cada una de las cepas se sembró en platos petri, colocando tres repeticiones por tratamiento y llevando los platos a incubadoras a 10º, 15º, 20º, 25º y 30ºC. Se procuró agregar una cantidad uniforme del medio de AHFD a cada plato. La siembra se hizo tomando segmentos iguales de cultivos de cada cepa en tubos de ensayo con AHFD.

Las calificaciones sobre el crecimiento de las cepas en los distintos tratamientos se hicieron calificándolas a base de una escala de abundancia del crecimiento, elaborada previamente. La escala en mención constaba de 6 valores (0-5), desde un crecimiento nulo (0), hasta el crecimiento máximo (5), y aparece en las

Figuras Nos. 9-14. Dicha escala se confeccionó según el crecimiento obtenido a los 7 días de sembrar las distintas cepas y mantenerlas en platos petri, en medio ambiente.

Además de calificarse el crecimiento de las cepas a los 7 días, se anotó el número de días necesarios para el inicio de la esporulación de cada una de las cepas en los distintos tratamientos. Los resultados se ofrecen en el Cuadro Nº 6.

En el tratamiento a 30°C las esporas germinaban en el medio, pero su crecimiento se detenía, no llegando a formar colonias ni a esporular. Solo hubo crecimiento en los fragmentos de micelio que quedaron esparcidos en el medio (Figura Nº 9).

IV. Patogenicidad de algunas cepas colectadas en zonas frijoleras de Costa Rica.

1. Recolección de las muestras del hongo.

Se efectuaron viajes por diversas regiones de Costa Rica, para coleccionar las distintas cepas del hongo. En el laboratorio se aisló en cultivo monospórico cada una de las cepas.

Se incluyeron en el estudio las siguientes cepas:

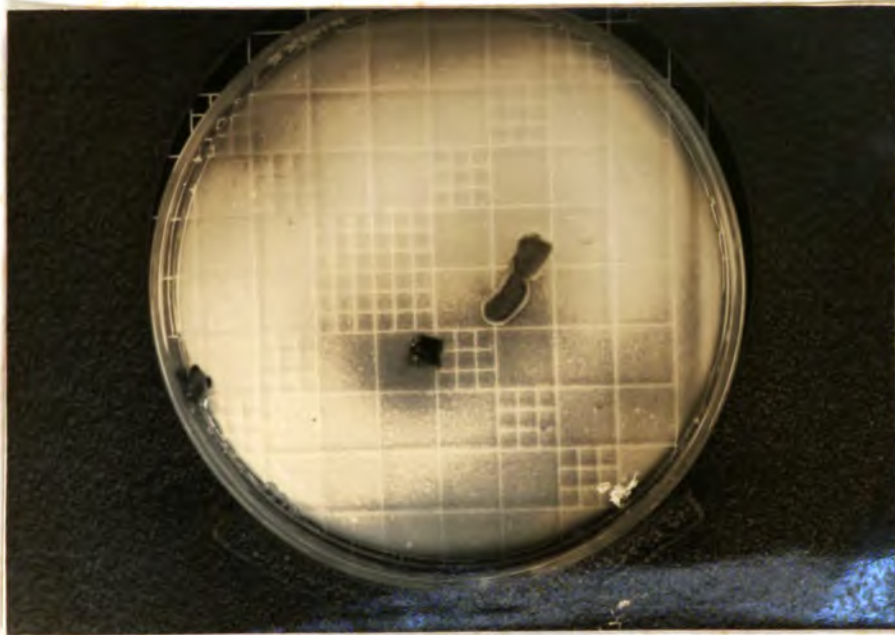


FIGURA Nº 9. Grado 0, crecimiento únicamente en fragmento de micelio esparcidos en el medio.

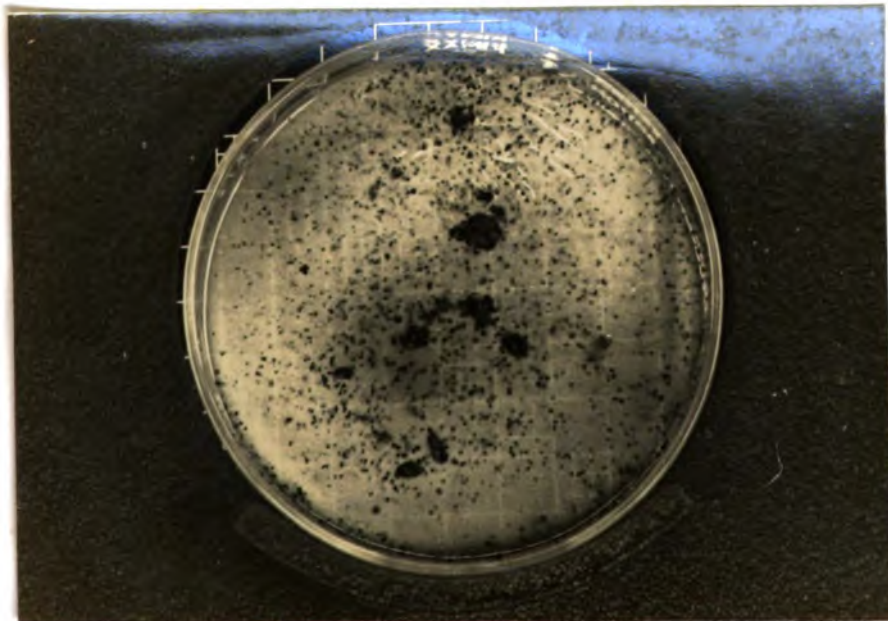


FIGURA Nº 10. Grado 1, formación de colonias muy pequeñas, aisladas y en escaso número.

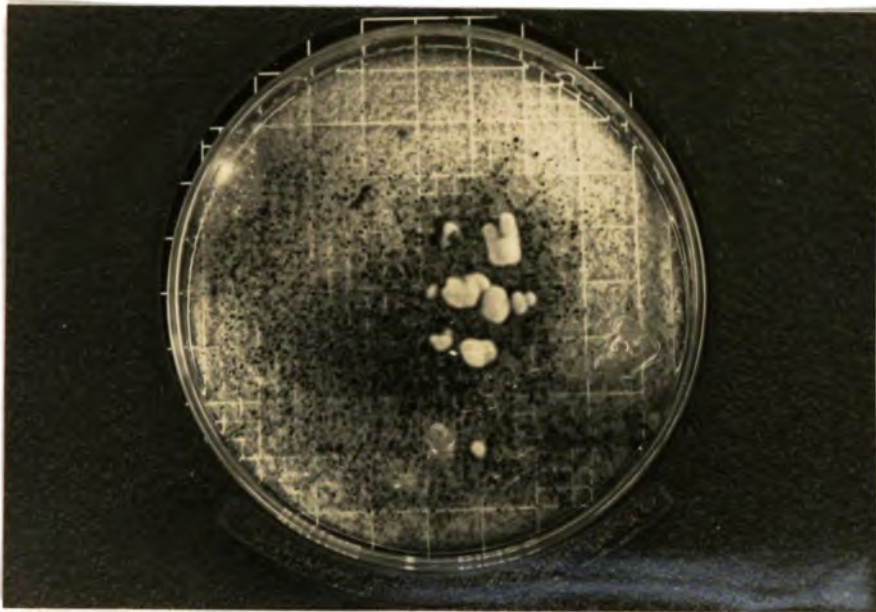


FIGURA Nº 11. Grado 2, formación de colonias pequeñas, agrupadas, pero sin cubrir todo el plato.

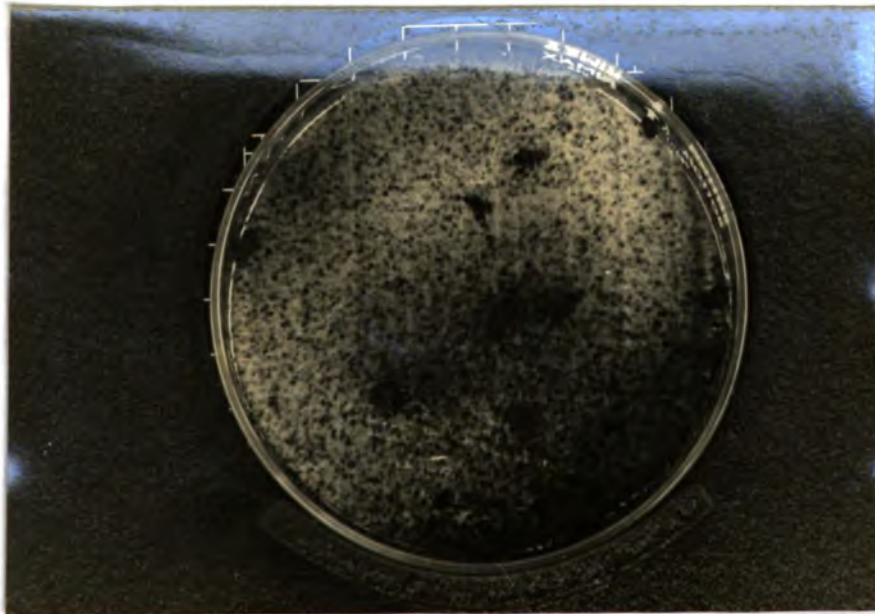


FIGURA Nº 12. Grado 3, presencia de colonias más abundantes y de colonias felpudas en sectores del cultivo (parte inferior en el borde del plato)

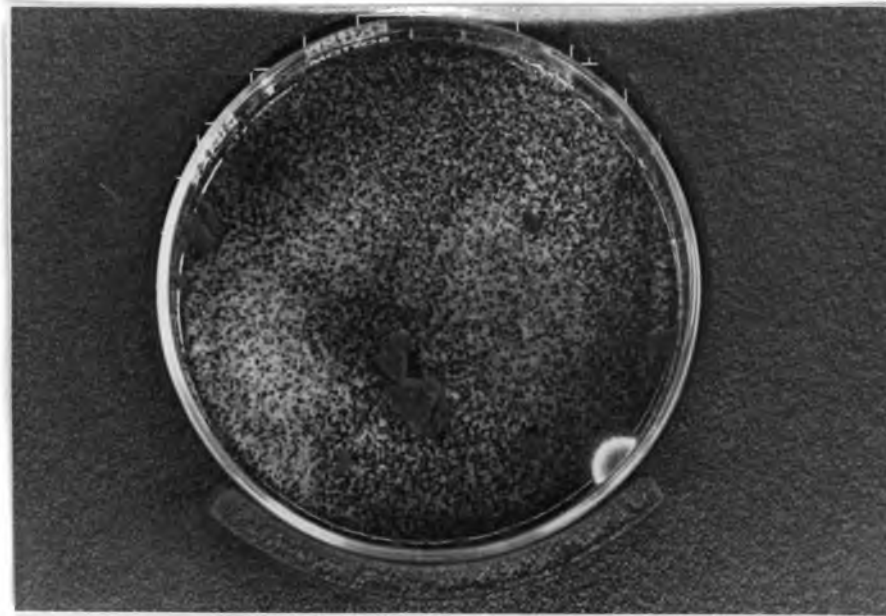


FIGURA Nº 13. Grado 4, presencia de colonias pequeñas en el mayor número, muy agrupadas.

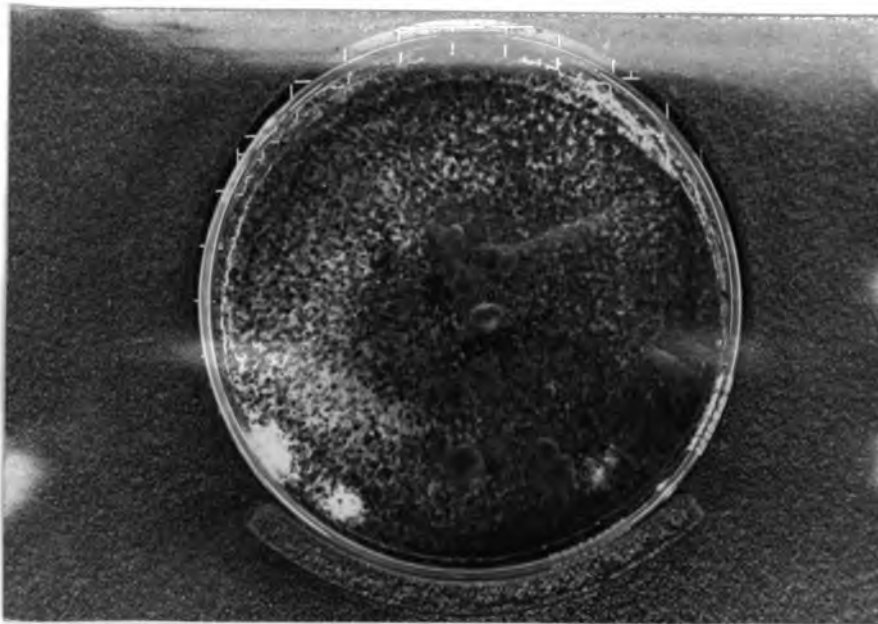


FIGURA Nº 14. Grado 5, predominancia de colonias felpudas, muy abundantes, en casi todo el cultivo.

CUADRO Nº 6. Calificación del grado de crecimiento y días para el inicio de la esporulación de 8 cepas de I. griseola, en AHFD, a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)		Grado de crecimiento a los 7 días	Días requeridos para inicio de la esporulación
10	Seleccionada	0	12
	Cervantes	0	12
	San Antonio	0	12
	Paraíso	0	12
	Liberia	0	12
	Alajuela 1	0	12
	Alajuela 2	0	12
	San Isidro	0	12
15	Seleccionada	0-1	7
	Cervantes	0-1	7
	San Antonio	0-1	7
	Paraíso	0-1	7
	Liberia	0-1	7
	Alajuela 1	1	8
	Alajuela 2	0	8
	San Isidro	0-1	7
20	Seleccionada	2-3	5
	Cervantes	2-3	5
	San Antonio	1-2	6
	Paraíso	2-3	6
	Liberia	2-3	6
	Alajuela 1	2-4	5
	Alajuela 2	1-3	5
	San Isidro	1-3	6
25	Seleccionada	4-5	5
	Cervantes	3-5	5
	San Antonio	3-5	5
	Paraíso	2-4	5
	Liberia	3-4	5
	Alajuela 1	4-5	5
	Alajuela 2	3-4	5
	San Isidro	3-4	5

CUADRO Nº 6 (Continuación)

Tempe- ratura (°C)		Grado de crecimiento a los 7 días	Días requeridos para inicio de la esporulación
30	Seleccionada	0	-
	Cervantes	0	-
	San Antonio	0	-
	Paraíso	0	-
	Liberia	0	-
	Alajuela 1	0	-
	Alajuela 2	0	-
	San Isidro	0	-

<u>Cepas:</u>	<u>Zona ecológica:</u>
Seleccionada (Turrialba)	Bosque muy húmedo subtropical
Cervantes	Bosque muy húmedo subtropical
Paraíso	Bosque húmedo subtropical
Alajuela 1	Bosque húmedo subtropical
San Antonio	Bosque húmedo subtropical
Liberia	Bosque seco tropical
San Isidro	Bosque seco tropical

También se incluyó en el estudio de patogenicidad una inoculación con la mezcla de todas las cepas. Las cepas se mantuvieron en tubos de ensayo con AHFD; el inóculo se preparó en igual forma que en la descrita para la prueba de evaluación de la resistencia.

2. Variedades escogidas para estudiar la patogenicidad

Se escogió un grupo de 8 variedades representativas de los distintos grados de resistencia, para efectuar en ellas las inoculaciones con las cepas. En cada una de esas variedades se había efectuado una primera inoculación con la cepa seleccionada. Se obtuvo la semilla de las plantas inoculadas, la que se sembró nuevamente para realizar una segunda inoculación, también con la cepa seleccionada. Después de obtener los mismos grados de infección que en la primera inoculación, se decidió emplear la semilla de estas plantas, para sembrarlas y efectuar en ellas el estudio de patogenicidad de las cepas.

Las variedades empleadas en el estudio fueron:

Altamente resistentes : 31-Sal-Es-2873 y Sal-209-N
Medianamente resistentes : Mex-80-R y S-124-B
Susceptibles : Col-109-R y 110-N
Altamente susceptibles : Sal-206-P y Carne-14

La variedad Mex-80-R utilizada en la prueba era una mutante enana de la variedad normal de enredadera, considerada como susceptible.

Se preparó una cantidad adecuada de suspensión de esporas de cada una de las cepas, usando cultivos de 8 días en AHFD en platos petri. La suspensión, de unas 80.000 esporas/cc., se asperjó en las primeras hojas trifoliadas con un atomizador. Las plantas se sometieron a cámara húmeda por 48 hrs., y después fueron colocadas en invernadero, en donde se hizo la lectura de los síntomas, según se describió en la evaluación de la resistencia de las variedades.

3. Grados de infección obtenidos.

Los resultados de las dos lecturas, realizadas a los 8 y a los 11 días después de la inoculación, así como la calificación final del grado de infección resultante, se presentan en el Cuadro N^o 7.

CUADRO Nº 7. Grados de infección obtenidos en 8 variedades de frijol al inocularlas con 7 cepas de Isariopsis griseola Sacc.

Cepa	Variedades	Primera lectura*	Segunda lectura**	Calificación final**
Alajuela 1	Sal-209-N	MA	R	R
	31-Sal-Es-2873	SM	R	R
	S-124-B	MA	S	MR
	Mex-80-R	MA	R	R
	Col-109-R	MA	S	MR
	110-N	SM	R	R
	Sal-206-P	MC	AS	AS
Carne-14	MA	AS	S	
Cervantes	Sal-209-N	MA	AR	AR
	31-Sal-Es-2873	MA	R	R
	S-124-B	MA	S	MR
	Mex-80-R	MA	S	MR
	Col-109-R	MA	AS	S
	110-N	MC	S	S
	Sal-206-P	MC	AS	AS
Carne-14	MC	AS	AS	
Liberia	Sal-209-N	MA	R	R
	31-Sal-Es-2873	MA	S	MR
	S-124-B	MA	S	MR
	Mex-80-R	MA	S	MR
	Col-109-R	MA	AS	S
	110-N	MA	S	MR
	Sal-206-P	MC	AS	AS
Carne-14	MC	AS	AS	
Paraiso	Sal-209-N	SM	AR	AR
	31-Sal-Es-2873	SM	AR	AR
	S-124-B	MA	R	R
	Mex-80-R	MA	S	MR
	Col-109-R	MA	AS	S
	110-N	MC	S	S
	Sal-206-P	MC	AS	AS
Carne-14	MC	AS	AS	

* SM: sin manchas. MA: manchas aisladas. MC: manchas coalescentes.

**AR: altamente resistente. MR: medianamente resistente.

R: resistente. S: susceptible. AS: altamente susceptible.

CUADRO Nº 7 (Continuación)

Cepa	Variedades	Primera lectura*	Segunda lectura**	Calificación final**
San Isidro	Sal-209-N	SM	AR	AR
	31-Sal-Es-2873	SM	AR	AR
	S-124-B	MA	R	R
	Mex-80-R	MA	R	R
	Col-109-R	MA	R	R
	110-N	MA	R	R
	Sal-206-P	MC	S	S
Carne-14	MC	S	S	
San Antonio	Sal-209-N	MA	R	R
	31-Sal-Es-2873	SM	AR	AR
	S-124-B	MA	S	MR
	Mex-80-R	MA	R	R
	Col-109-R	MA	AS	S
	110-N	MA	S	MR
	Sal-206-P	MC	S	S
Carne-14	MC	AS	AS	
Seleccionada	Sal-209-N	SM	AR	AR
	31-Sal-Es-2873	SM	AR	AR
	S-124-B	MA	S	MR
	Mex-80-R	MA	S	MR
	Col-109-R	MA	AS	S
	110-N	MC	S	S
	Sal-206-P	MC	AS	AS
Carne-14	MC	AS	AS	
Mezcladas	Sal-209-N	MA	R	R
	31-Sal-Es-2873	MA	R	R
	S-124-B	MA	S	MR
	Mex-80-R	MA	S	MR
	Col-109-R	MC	S	S
	110-N	MA	R	R
	Sal-206-P	MC	AS	AS
Carne-14	MC	S	S	

* SM: sin manchas. MA: manchas aisladas. MC: manchas coalescentes

** AR: altamente resistente. MR: medianamente resistente.

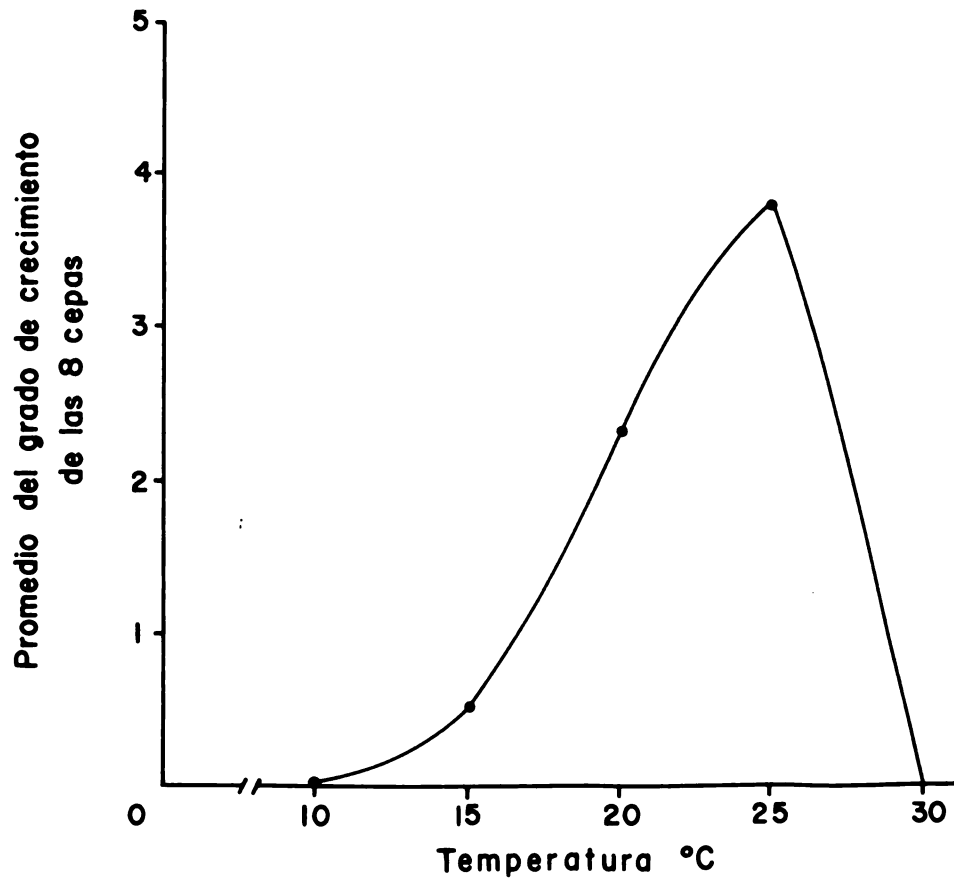


FIG. 15 Representación gráfica del grado de crecimiento a los 7 días de 8 cepas de *Isariopsis griseola*, en AHFD, a diferentes temperaturas.

DISCUSION

Al planear este trabajo de investigación se proyectó investigar en tres aspectos principales: evaluación de la resistencia de variedades de frijol a la mancha angular, comportamiento fisiológico de Isariopsis griseola, organismo causal de la enfermedad, y determinar la existencia de razas fisiológicas del hongo. Debido al poco conocimiento existente sobre esta enfermedad, fué necesario realizar algunos trabajos preliminares, puesto que no se disponía de un medio de cultivo apropiado, no se conocía una técnica para obtener cultivos puros en corto tiempo, ni tampoco se había estudiado el comportamiento en cultivo y la patogenicidad de distintos aislamientos o cepas del hongo.

Se seleccionó el medio nutritivo de agar-hojas de frijol-dextrosa (AHFD) como el mejor entre varios medios probados. Al parecer, el hongo no tiene muchos requerimientos nutritivos, puesto que con la adición de aminoácidos y vitaminas no se acelera el crecimiento, según lo demostró Cardona (4). En el medio de AHFD se apreciaron algunas diferencias culturales y se reconocieron dos tipos de colonias, unas redondeadas, convexas y otras que formaban una capa densa, felpuda (Figuras N^o 7 y 8). Se seleccionó una cepa con el tipo de colonias felpudas, que tienen un crecimiento y esporulación más abundante y rápido. Aparentemente el tipo de colonias resultantes al cultivar una cepa determi-

nada no es una característica constante o específica, ya que se comprobó que ambos tipos aparecían al cultivar las cepas, sin embargo por medio de selección continua de una misma clase de colonias, se puede llegar a obtener una cepa con un tipo predominante de colonias.

En la evaluación de la resistencia se encontraron diferencias de susceptibilidad, clasificándose grupos de variedades desde una máxima susceptibilidad (altamente susceptibles) hasta una mínima susceptibilidad (altamente resistentes).

Casi la mitad de las variedades probadas (46.6%) fueron medianamente resistentes, lo que nos indica que en general las variedades poseen bastante resistencia a la enfermedad. En los extremos de susceptibilidad se clasificó un porcentaje bajo del total, así solamente un 2.6% como altamente resistentes y un 14.8% como altamente susceptibles. También muchas variedades mostraron reacciones mezcladas en los distintos grados de infección, como el grupo de variedades negras Guatemala, Costa Rica y México (Cuadro Nº 1), lo que puede atribuirse a que no son variedades puras, sino que muestran variabilidad genética.

En casi todas las variedades, según el color del grano, se presentaron los distintos grados de infección, con excepción de los pintos, en que no hubieron variedades altamente resistentes, y de los blancos en que no hubieron variedades altamente resistentes, altamente susceptibles, ni con reacciones mezcladas. El grupo de variedades blan-

cas demostró ser medianamente resistentes casi en su totalidad.

Las variedades altamente resistentes encontradas fueron: S-29-N, S-67-N, Sal-209-N, Sal-219-N, Sal-222 -N, Sal-223-N, Sal-227-N, 18-Guatemala-5091, 31-Sal-Es-2873, IAN-9-VN, entre los negros; Mat-2-B, Mat-4-B-1, entre los bayos; 58-R y 103-R, entre los rojos. Además otras variedades con reacciones mezcladas, como Sal-66-N y 15-Guatemala-2524, resultaron ser altamente resistentes. En el grupo de variedades altamente resistentes no hay ninguna que se pueda recomendar para su cultivo comercial en Costa Rica, pero la resistencia al hongo quizás podría incorporarse a variedades recomendables, por medio de cruzamientos.

Entre las variedades seleccionadas por el Programa de Cultivos Alimenticios del IICA por sus buenas cualidades agronómicas, se clasificaron como medianamente resistentes a las siguientes: Compuesto Negro Chimaltenango, Compuesto Cotaxtla, S-19-N, S-182-N, S-315-N-2, Jamapa y Col-123-N.

Los resultados de varias inoculaciones en un grupo de variedades representativas de los distintos grados de infección permiten aseverar que el método empleado para la evaluación de la resistencia es eficaz y puede ser utilizado en trabajos posteriores.

La formación de coremios y la esporulación ocurre a las 24 hrs. a 15º, 20º y 25º, con un óptimo de 25º. A 30º se requieren 96 hrs. para ambos procesos, pero a esta temperatura las esporas formadas presentan alteraciones morfológicas, que se aprecian como hinchazones en la superficie

de las conidias. A 10º los coremios se forman a las 96 hrs. pero la producción de esporas solo requiere 60 hrs.

En los experimentos con luz y oscuridad se comprobó que el hongo esporula más abundantemente en oscuridad completa, en un lapso de 48 hrs. En el mismo tiempo la esporulación es un poco menor con luz y oscuridad alternadas cada 12 hrs., observándose la menor en condiciones de luz continua. El efecto de la luz resultó ser de tipo inhibitorio de la esporulación. Los experimentos anteriores, de efectos de la luz y temperatura en la esporulación y en la formación de coremios permiten establecer relaciones con el desarrollo de la enfermedad en el campo. Es posible que en días con mayor número de horas de luz solar o mayor intensidad lumínica, se retarde la esporulación y consecuentemente el inóculo producido. Una vez que haya coremios formados en las lesiones, el inóculo secundario se produce rápidamente y en forma continua, en períodos de tan solo 24 hrs., con temperaturas de 15-25º y una alta humedad relativa. Las temperaturas menores de 15º o mayores de 25º retardarían el desarrollo de la enfermedad.

En medio de cultivo se requiere aereación para el crecimiento del hongo; esto nos indica que en condiciones de anaerobiosis o con muy poco oxígeno presente, el hongo no llega a crecer. Las esporas requieren la presencia de agua líquida para poder germinar, al contrario de otros hongos cuyas esporas pueden germinar con un 100% de humedad relativa o menos aún. No se consideró necesario probar la germinación con porcentajes inferiores de humedad relativa puesto que ésta no ocurrió con un 100%. De

todo ésto puede deducirse que en el follaje de las plantas deben haber gotas de agua para que ocurra la penetración.

Al estudiar el efecto de la temperatura en el crecimiento y la esporulación de 8 cepas, se obtuvieron resultados similares que al experimentar con la formación de coremios y la producción de esporas. El crecimiento y la esporulación de todas las cepas fué mayor a una temperatura óptima de 25º, siendo menor progresivamente a 20º y a 15º. La esporulación más rápida, a 25º, ocurría a los 5 días en todas las cepas, aunque a 20º en algunas cepas (seleccionada, Cervantes, Alajuela 1 y Alajuela 2) también ocurrió a los 5 días. A 10º hay esporulación en todas las cepas a los 12 días; aunque se clasificó con 0 su crecimiento al séptimo día, posteriormente en todas las cepas, como a los 20 días, hubo crecimiento comprendido entre las calificaciones 3-4. Las esporas pueden germinar de 4º a 36º según lo determinó Cardona (4), o sea a temperaturas que pueden ser bastante superiores al óptimo. A 30º no hubo crecimiento visible, ya que las esporas murieron después de germinar sin llegar a denotar un crecimiento visible.

Analizando los datos del Cuadro No. 6, puede generalizarse que no hay diferencias en el crecimiento e inicio de la esporulación entre las cepas, a una misma temperatura, ya que los resultados son bastante uniformes. Todas las cepas fueron igualmente afectadas por la temperatura, con diferencias de un día, a lo sumo, en cuanto al inicio de la esporulación. El grado de crecimiento, calificado a los 7 días, también fué bas-

tante uniforme en todos los tratamientos. No hubo una cepa que tuviese diferencias consistentes con otras cepas, en to todos los tratamientos.

Se empleó un método cualitativo para medir el grado de crecimiento, sin efectuar mediciones. Métodos convencionales para medir el crecimiento, en base a diámetro de colonias, crecimiento lineal o peso seco del hongo resultan ser poco prácticos o no aplicables al trabajar con I. griseola.

De acuerdo a los experimentos anteriores, se encontró que el rango de temperatura en que es posible la esporulación (de 10° a 30°) es mayor que aquel en que hay crecimiento (de 10 a 25°), al contrario de lo que sucede en la mayoría de los hongos, según lo establecido por Cochrane (5). La temperatura óptima para el crecimiento (25°) es la misma que para la esporulación. El hongo conservó su capacidad de esporulación en medio de cultivo (AHFD) durante los 12 meses que duró la investigación, al igual que su patogenicidad.

En el estudio de la patogenicidad, las 7 cepas inoculadas en 8 variedades, incitaron síntomas que guardaron la misma relación en todas las variedades. Las 7 cepas fueron patógenas, ocasionando síntomas típicos de la enfermedad. Las variedades resistentes conservaron su resistencia y las más susceptibles conservaron igualmente su susceptibilidad, al ser inoculadas con cualquiera de las cepas. La cepa seleccionada se usó como patrón para comparar la patogenicidad de las otras cepas, ya que

con ella se había evaluado la resistencia de las variedades empleadas en la prueba. La cepa Liberia resultó ser la más patógena, pues incitó síntomas más severos en las variedades. La cepa San Isidro fué la menos patógena, por provocar los síntomas más benignos. La cepa Alajuela 1 también provocó síntomas casi tan severos como los causados por la cepa Liberia. En las demás cepas, los síntomas resultantes fueron parecidos a los causados por la cepa seleccionada.

Con el grupo de variedades usadas solamente puede establecerse que existen pocas variaciones en la patogenicidad de las poblaciones del hongo presentes en Costa Rica. No se obtuvo evidencia de que pueda existir una especialización patogénica, en razas fisiológicas, de Isariopsis griseola. Para llegar a un juicio más definitivo, sería necesario trabajar con inoculaciones de un gran número de cepas en un número también muy grande de variedades; mediante estas inoculaciones podría llegarse a escoger un número de variedades diferenciales, en el caso de comprobarse la existencia de razas fisiológicas.

RESUMEN

Se preparó el medio nutritivo de agar-hojas de frijol-dextrosa (AHFD), el cual se usó por primera vez para el cultivo de Isariopsis griseola Sacc. También se seleccionó una cepa adecuada, que esporuló abundantemente a los 8 días en el medio de AHFD.

Se ideó un método para evaluar la resistencia de variedades de frijol, inoculando plantas de 20 días y efectuando dos lecturas de los síntomas, a los 7-8 días y a los 10-11 días.

Al evaluar la resistencia de 527 variedades, se obtuvieron los siguientes resultados: 2.6% altamente resistentes, 46.6% medianamente resistentes, 28.1% susceptibles, 14.8% altamente susceptibles y 7.7% con reacciones mezcladas. Se encontraron 14 variedades altamente resistentes, entre ellas 10 negros, 2 bayos y 2 rojos.

Al efectuar algunos estudios fisiológicos, se comprobó que la temperatura óptima para la formación de conidios y producción de esporas es de 25°C; ambos procesos ocurren en 24 hrs. a esta temperatura. La esporulación es más abundante en oscuridad completa que con luz y oscuridad alternadas y con luz continua. En medio de cultivo se requiere aereación para el crecimiento. Las esporas sólo germinan si hay presente agua en

estado líquido. El crecimiento y días necesarios para el inicio de la esporulación de 8 cepas fué igualmente afectado por una misma temperatura, al efectuar variaciones de 10-30°C; el óptimo fué de 25°C, temperatura en que se iniciaba la esporulación en 5 días.

Al estudiar la patogenicidad de 7 cepas de Costa Rica en 8 variedades, se encontró que la variación en la patogenicidad de todas las cepas no fué muy grande. La cepa Liberia fué ligeramente más patógena y la cepa San Isidro menos patógena. Las otras cepas incitaron síntomas en una relación más o menos igual, de resistencia y susceptibilidad, en las 8 variedades.

SUMMARY

A nutrient medium for the culture of Isariopsis griseola Sacc. was prepared which consists of agar, dextrose and bean leaf extract (AHFD). A clone of this fungus was also selected from nature which sporulated abundantly at eight days on the AHFD medium.

A method was established for evaluating the resistance of bean varieties to the fungus by inoculating 20 day old plants and making two readings of the symptoms produced, one at 7-8 days and one at 10-11 days.

In a evaluation of the resistance of 527 varieties the following results were obtained: Highly resistant: 2.6%. Moderately resistant: 46.6%. Susceptible: 26.1%. Highly susceptible: 14.8% and Mixed susceptibility: 7.7%. Fourteen varieties were found to be highly resistant, which consisted of ten black seeded types, two chestnut colored types and two red types. In physiological studies it was determined that the optimum temperature for the formation of coremia and spore production is 25°C. Both processes occur within 24 hours at this temperature. Sporulation is more abundant in complete darkness than alternating light with darkness or with continual light. The fungus requires the presence of air for growth. Spores germinate only in the presence of free water. The growth and time necessary for the initiation of sporula-

tion of eight clones was equally affected by the same temperature; in studies varying the temperature from 10-30°C, the optimum was 25°C, the temperature at which sporulation was initiated at five days. In a study of the pathogenicity of seven fungus clones in eight varieties, little variation in pathogenicity among the clones was encountered. However, the clone from Liberia was slightly more pathogenic than the clone from San Isidro. The other clones more or less equally incited symptoms on the eight varieties tested.

LITERATURA CITADA

1. BARROS, O., CARDEÑOSA, R. y SKILES, R.L. The severity and control of angular leaf spot of bean in Colombia. *Phytopathology* 47(1):3. 1957.
2. BROCK, R.D. Resistance to angular leaf spot among varieties of beans. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Sciences* 17:25-30. 1951. (Original no consultado; compendiado en *Review of Applied Mycology* 31:3. 1951).
3. CALPOUZOS, L.G. Studies on the sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen. Cienfuegos, Cuba. Atkins Garden and Research Laboratory, 1955. 70 p.
4. CARDONA A., C. Angular leaf spot of bean. Ph.D. thesis. Madison, Wisconsin University, 1956. 56 p.
5. COCHRANE, V.W. *Physiology of Fungus*. 2nd. ed. New York, Wiley, 1963. 524 p.
6. GARDNER, M.W. y MAINS, E.B. Indiana plant diseases, 1928. *Proceedings of the Indiana Academy of Sciences* 39:85-99. 1930. (Original no consultado; compendiado en *Review of Applied Mycology* 10:83. 1931).
7. LLANOS M., C. Patogenicidad del Isariopsis griseola Sacc. en frijol. *Acta Agronómica (Colombia)* 7(2):165-190. 1957.
8. OLAVE L., C. Resistencia de algunas variedades y líneas de frijol (Phaseolus vulgaris) al Isariopsis griseola Sacc. *Acta Agronómica (Colombia)* 8(4):197-219. 1958.
9. PUERTA, J. y ALONSO, A. Pruebas de resistencia a diferentes enfermedades en diferentes variedades de judías. *Boletín del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (España)* 18(38):37-48. 1958.
10. WEAVER, L.O. y ZAUMEYER, W.J. Angular leaf spot of bean found in Maryland. *Plant Disease Reporter* 40(12):1092. 1956.