

Bacteriosis o tizón común del frejol en Chile¹

Adriana Pinto de Torres²

INTRODUCCION

A fines de la temporada de cultivo del frejol, entre 1954 y 1955, se observó por primera vez en el país un serio ataque de una enfermedad de tipo bacteriano, que ocasionó la pérdida total de algunos sembrados en las provincias de Nuble y Bio-Bio y ataques menores en siembras de la zona central del país, especialmente en aquellas de la variedad Villarrica. No obstante, los frejoles de la variedad Zepelín sufrieron un daño mucho menor, lo que dio como

resultado el incremento del cultivo de esta variedad en las áreas atacadas³.

La enfermedad se ha presentado por varios años seguidos, generalmente al término de la temporada de crecimiento del frejol. En 1963, durante la visita que hiciera al país el investigador norteamericano Zaumeyer⁴ señaló la presencia de bacteriosis en siembras de frejol existentes en las localidades de La Calera, Graneros y alrededores de Santiago.

Los primeros aislamientos de bacterias de plantas de frejol fueron realizados en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Investigaciones Agrícolas del Ministerio de Agricultura en 1955 y luego en 1965 y 1966, en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, no lográndose establecer, sin embargo, la identidad y la patogenicidad de los bacterios aislados.

¹Se agradece muy sinceramente el concurso prestado por el Ing. Agr. M. S. Fernando Nome (en convenio con el I. I. A.) en la preparación de los sueros y las correspondientes pruebas serológicas, y a los Ings. Agrs. Abraham Ziver y Claudio Cafati por la valiosa información técnica y cooperación dadas en el desarrollo de este trabajo. También nuestros agradecimientos al Dr. Edgardo Oehrens por su colaboración al entregar algunos cultivos bacterianos obtenidos de plantas de frejol enfermas, en Valdivia, para compararlos con los obtenidos en La Platina.

Recepción manuscrito: 7 de agosto de 1968.

²Ingeniero Agrónomo Proyecto Fitopatología. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Profesor Cátedra de Patología Frutal. Facultad de Agronomía. Universidad de Chile.

³Comunicación personal del Ingeniero Agrónomo Abraham Ziver, Estación Experimental La Platina.

⁴Comunicación personal.

En la última temporada de siembra del frejol, en Valdivia, Oehrens¹ aisló bacterias de plantas enfermas cultivadas en la Estación Experimental Vista Alegre de la Universidad Austral. En esa ocasión se sospechó que la cepa aislada correspondía a *Pseudomonas phaseolicola*. Ante estos hechos, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias resolvió llevar a cabo un estudio exhaustivo de esta enfermedad bacteriana, para establecer, primeramente, la identidad del agente causal y luego, realizar las experiencias tendientes a encontrar el control adecuado de la enfermedad.

Las etapas de aislamiento, reacciones a la tinción de Gram y a los medios diferenciales, y pruebas de patogenicidad, fueron realizadas en la Estación Experimental La Platina. La preparación de sueros y pruebas serológicas se hicieron en la Estación Experimental Agronómica de Rinconada de Maipú, de la Universidad de Chile.

REVISION DE LITERATURA

De acuerdo con el estudio realizado por Zaumeyer y Thomas (7) el tizón común del frejol fue reconocido por primera vez por Beach en EE. UU., en 1892. Al mismo tiempo Halsted describió una enfermedad de origen bacteriano en vainas y semillas de frejoles y obtuvo resultados positivos en las inoculaciones. En 1897, Smith, describe y denomina al organismo *Bacillus phaseoli* E. F. Sm. En 1901, Smith informa sobre las características culturales del organismo y lo transfiere al género *Pseudomonas*. Hasta esa fecha la clasificación de Migula había sido seguida por la mayoría de los bacteriólogos. En 1905, Smith cambia al organismo causal del tizón del frejol al género *Bacterium*, quedando su clasificación como: *Bacterium phaseoli*. Más tarde, se reemplaza nuevamente el nombre por el de *Xanthomonas phaseoli*.

Muchas bacterias son muy semejantes, culturalmente, a *X. phaseoli* y su separación es posible sólo por su asociación con enfermedades definidas en huéspedes determinados. La diferencia es únicamente biológica. Tal es el caso de *X. campestris* (Pam) Dows., que origina la "pudrición negra del repollo", y de *X. phaseoli*.

A causa de la similitud de algunos patógenos bien conocidos, Link y Sharp (4) trataron de diferenciar serológicamente *X. campestris*, *Corynebacterium flaccumfaciens*, *X. phaseoli* y *X. phaseoli* var. *sojense* y encontraron que estos cuatro patógenos, podrían distinguirse por pruebas de aglutinación. Serológicamente *X. campestris* está estrechamente relacionado con

X. phaseoli y *X. phaseoli* var. *sojense*, pero no así con *C. flaccumfaciens*.

Sharp (5) informó sobre estudios morfológicos, fisiológicos, serológicos, de virulencia y ácido-aglutinación en los organismos antes mencionados, con la excepción de *X. campestris*, y concluyó que las tres especies difieren y pueden ser diferenciadas por el uso de pruebas de aglutinación.

Según Elliott, Ch. (3) el tizón común del frejol tiene una amplia distribución a través de EE. UU. y Canadá y ha sido informada su presencia en Bermuda, Noruega, Suecia, Austria, Bulgaria, Rumania, Hungría, Suiza, Italia, Yugoslavia, Francia, España, Rusia, China, Japón, Corea, Filipinas, Hawaii, Madagascar, Sud Africa, Eritrea, Australia, Tasmania y, probablemente, también está presente en la mayoría de los países donde se cultiva el frejol.

En general *Xanthomonas phaseoli* ha sido extensamente estudiado por muchos investigadores en EE. UU. y otros países. La infección por este organismo tiene lugar a través del estoma y se pueden obtener inoculaciones exitosas mediante el frotamiento de las hojas con una suspensión de bacterias, o pueden también lograrse, pero con mayor dificultad, pulverizando las hojas con un cultivo fresco de bacterias y manteniendo las plantas en una cámara de infección por 24 horas. Cuando las plantas son inoculadas de esta manera, las bacterias frecuentemente entran y alcanzan los haces vasculares hasta cierta distancia del punto de entrada. Algunos autores prefieren mantener las plantas en cámara húmeda algunas horas antes de la inoculación.

Muchos métodos de inoculación han sido usados para evaluar la resistencia de variedades y plantas segregantes de frejol provenientes de cruzamientos, a la bacteria.

Bohn, C. W. (1) comprobó que espolvoreando carborundum sobre las hojas antes de pasar sobre ellas una esponja empapada con una suspensión del organismo, se incrementaba la infección. Este método ha sido usado con éxito por muchos investigadores.

Bridgmon, G. H., citado por Zaumeyer y Thomas (7), obtuvo el porcentaje más alto de infección tanto en plántulas como en plantas maduras de frejol, al pulverizarlas con una suspensión bacteriana bajo condiciones de humedad relativa alta. Para los casos en que el tiempo no es un factor limitante y no se requiere una buena germinación, el autor recomienda inyectar o sumergir los brotes en una suspensión bacteriana.

Walker, J. Ch. (6), describe la sintomatología que se presenta en frejoles ante el ataque de *X. phaseoli*.

¹ Comunicación personal.

MATERIALES Y METODOS

Inóculo.

De la colección de variedades de frejol que se tiene en la Estación Experimental La Platina se tomaron muestras de plantas correspondientes a quince variedades diferentes de frejol que presentaban síntomas evidentes de bacteriosis en sus vainas. Las variedades fueron aquellas identificadas como: 1) Línea S. N., 2) Nouvel Ermitage, 3) Triguitos, 4) The Prince, 5) Mange tout, 6) Zeus, 7) Mil por Uno, 8) Cristal Blanco, 9) Tórtola, 10) Yellow eye, 11) Traros, 12) Kentucky 191, 13) Saisson Blanc, 14) Inglés y 15) Flageolet.

Los tejidos enfermos se maceraron o se obtuvo la secreción bacteriana que emanaba de las vainas enfermas, sembrándose ambas clases de inóculo en agar-papa-dextrosa (APD), en placas de Petri, las que luego fueron colocadas en estufa de cultivo a 24°C. durante 3 días.

Las colonias bacterianas obtenidas se sometieron a la tinción de Gram. Una vez seleccionadas las colonias con posibles características patogénicas se cultivaron en APD, en tubos de ensayo; a partir de estos cultivos se prepararon las suspensiones para infectar artificialmente las plantas.

Patogenicidad.

Se sembraron en invernadero 90 semillas de frejol de la variedad Bountiful e igual número de semillas de Red Kidney distribuidas en número de 3 por macetero. Cuando las plantas enteraron 14 días de edad se dividieron en 3 grupos de 30 plantas cada uno y se procedió a infectarlas usando dos métodos diferentes de inoculación: 1) frotación de la superficie, o el envés de la lámina de las hojas primarias, con un pincel impregnado con carborundum Nº 320, más la suspensión bacteriana. Esta suspensión se preparó trasladando a 50 cc. de agua esterilizada las colonias bacterianas desarrolladas, cultivadas en cuatro tubos de ensayo, con APD, durante 72 horas a 24° C. de temperatura, y 2) inoculación por inyección de la misma suspensión bacteriana empleada en 1) mediante jeringa con aguja hipodérmica, Nº V. 2. A., en la base del pecíolo de las hojas primarias.

Estos sistemas de inoculación se repitieron en un total de 76 vainas de plantas sanas, seleccionadas de las variedades Supergreen, Cristal Bayo, Zeus y Villarrica.

Se dejaron los correspondientes testigos inoculados sólo con agua esterilizada, usando los mismos sistemas de inoculación artificial anteriormente señalados.

Las plantas se colocaron en cámara húmeda desde 24 horas antes, hasta 24 horas después de la inoculación. La cámara consistió en bolsas de polietileno mojadas con agua esterilizada. Durante todo el tiempo en que se llevaron a cabo las pruebas de patogenicidad se mantuvo una temperatura promedio de 24° C. y una humedad relativa alta en la sala del invernadero. Durante la primera semana de inoculadas las plantas, se rociaron con agua esterilizada dos veces al día.

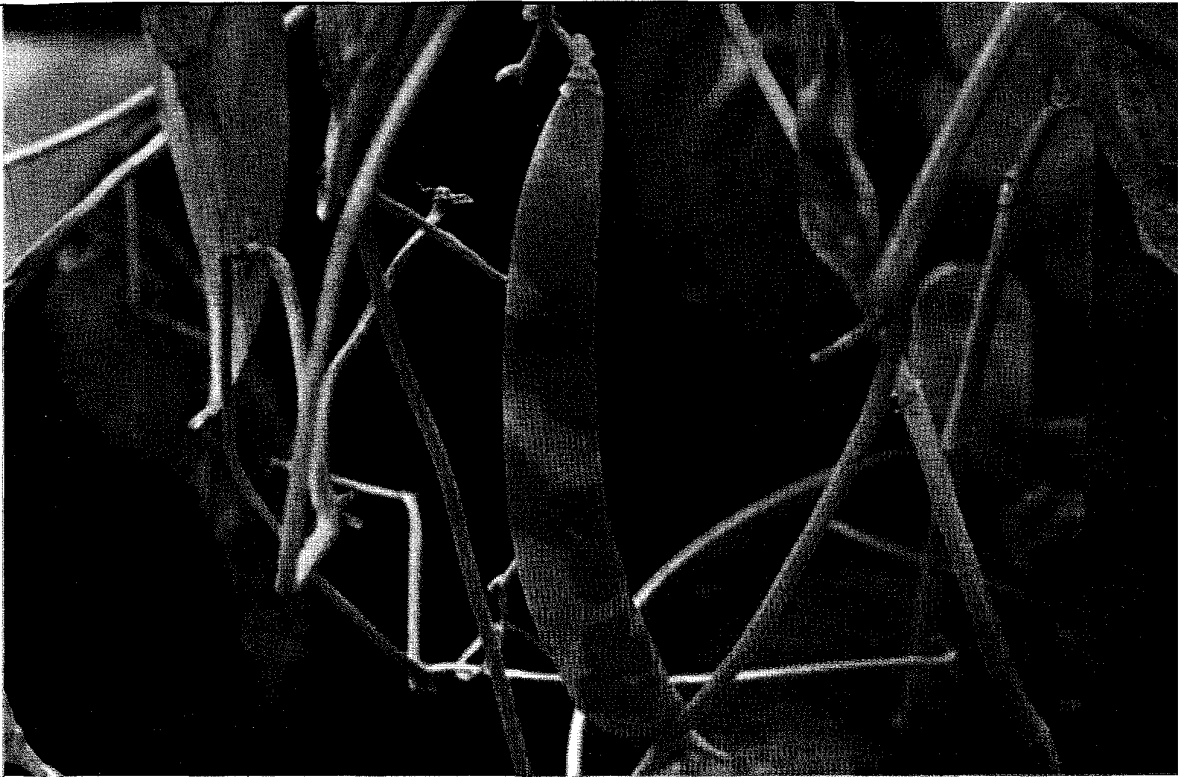
En forma paralela a las pruebas de patogenicidad, se trabajó en la identificación de las bacterias aisladas en La Platina y en Valdivia, observando su reacción a la tinción de Gram, en los medios diferenciales y en pruebas serológicas específicas.

Para la tinción de Gram se usó el método clásico. Los medios diferenciales usados fueron: 1) agar-carne inclinado; 2) agar-carne glucosado; 3) trozos de papa esterilizada; 4) gelatina; 5) caldo de carne; 6) medios para pruebas de indol y nitritos; 7) glucosa, lactosa y maltosa, y 8) medios para anaerobiosis.

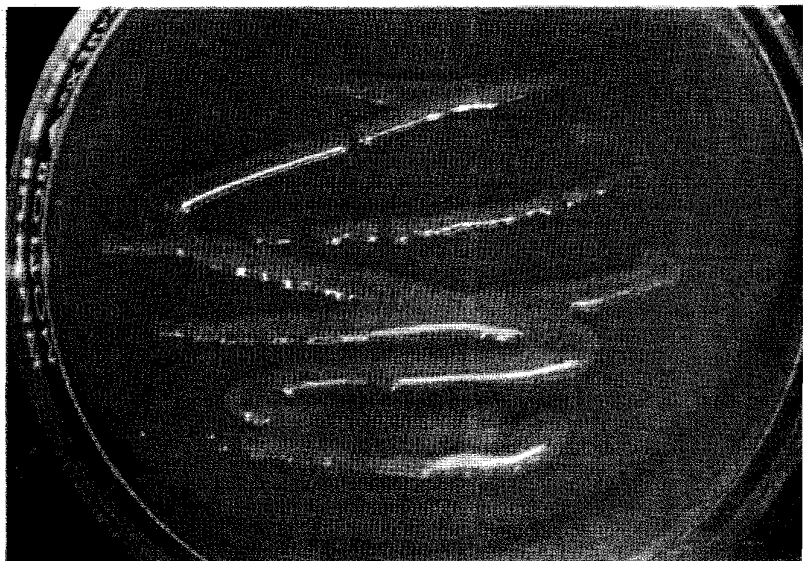
Las pruebas serológicas se realizaron siguiendo la técnica de Ouchterlony de difusión en agar. Se colocaron los aislamientos hechos en la Estación Experimental La Platina y los obtenidos por Oehrens, en la Estación Experimental Vista Alegre de la Universidad Austral en Valdivia, contra los antisueros de *Pseudomonas phaseolicola* y *Pseudomonas syringae*, del Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Agronómica de Rinconada de Maipú, de la Universidad de Chile.

Con cultivo de *X. phaseoli* procedente de Davis, California, EE. UU., se preparó el antisuero correspondiente siguiendo el procedimiento de:

- 1) Cultivo de las bacterias en medio líquido, mantenido en agitación durante dos días.
- 2) Lavado de las bacterias mediante centrifugación y resuspensión en solución fisiológica. El proceso se repitió dos veces. Para la centrifugación se usó una Serval S. S. 1. a 14.000 rpm., durante 15 minutos.
- 3) Las bacterias procedentes de 2 Erlenmeyer con 100 cc. de medio líquido, se resuspendieron en un total de 50 cc. de solución fisiológica.
- 4) Se mantuvo la suspensión bacteriana durante 2 horas a 60° C., para matar las bacterias.
- 5) Se inyectó un conejo con la suspensión bacteriana, colocando 5 cc. de suspensión emulsionados con 5 cc. de Coadyuvante Incompleto de Freund. Los 100 cc. resultantes, se colocaron en inyecciones de 1 cc. subcutáneas en el lomo del animal.



Vaina de frejol inoculada artificialmente con *Xanthomonas phaseoli*, por medio de inyecciones con aguja hipodérmica, mostrando síntomas más avanzados de la enfermedad. (Fotos: Caio Lemos).



Colonia de *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson, en APD, aislada de vainas de frejol enfermas.



Hoja de frejol inoculada artificialmente con *Xanthomonas phaseoli*, por inyección en la base del peciolo. Obsérvense las manchas necróticas pequeñas dispersas en la lámina foliar y las de mayor tamaño en forma angular en los bordes.

- 6) A las 3 semanas de aplicadas las inyecciones, se colocó 1 cc. de la suspensión bacteriana en forma intravenosa.
- 7) Dos días más tarde, se efectuó una sangría de prueba. En consideración a que el título del suero era bajo, se le aplicó otra inyección de 1 cc. intravenosa. Se volvió a extraer sangre del animal a los 2 días.

Siguiendo la técnica de Ouchterlony de difusión en agar, se colocó el antisuero obtenido contra los aislamientos de la Estación Experimental La Platina y de la Universidad Austral y el antígeno correspondiente. Lo mismo se hizo con suero normal.

RESULTADOS

Las bacterias aisladas tanto en La Platina como en Valdivia, se manifestaron como Gram negativas, de forma de pequeños bastones, móviles. La reacción en los distintos medios diferenciales probados fue igual para ambos bacterios (Cuadro 1).

De acuerdo con la clasificación de bacterias fitopatógenas de Dowson (2) las bacterias aisladas correspondían a especies del género *Xanthomonas*.

Pruebas de patogenicidad

Una semana después de la inoculación, en todas las plantas inoculadas con las bacterias aisladas en la Estación Experimental La Platina, se desarrollaron síntomas similares a los vistos en el campo, mientras los testigos permanecieron sanos.

Los síntomas más importantes observados pueden resumirse en: mancha verde acuosa en la lámina foliar, que luego se necrosa; manchas angulares en los bordes de las hojas primarias, las que tienden a distorsionarse y en algunos casos se marchitan y caen. Algunas hojas presentaban, a los veinte días de inoculadas, necrosis de las venas, las que tomaron un color marrón rojizo. Al mes aparecieron estrías rojizas longitudinales en los tallos; estas plantas se quebraban fácilmente.

En la vaina inoculada, primero se desarrolló una mancha verde acuosa, sin halo, de la cual más tarde emanó una secreción bacteriana amarilla, que se secó sobre la mancha. Esta sintomatología es similar a la que se presenta

Cuadro 1— Reacción de las bacterias aisladas en los medios diferenciales empleados.

MEDIOS	Características de la colonia bacteriana y reacción de la bacteria en los diferentes medios.
1) Agar-carne	Colonias amarillas, brillantes, de borde entero.
2) Agar-carne glucosado.	Colonias amarillas, mucosas, abundantes.
3) Trozos de papa esterilizados.	Colonias amarillas, mucosas, abundantes. Las bacterias digieren la papa.
4) Gelatina.	Colonia amarilla brillante. La bacteria licúa el medio lentamente.
5) Caldo de carne	La bacteria forma anillo en la superficie, sin formación de película superficial.
6) Medio para Indol y Nitritos.	Indol negativo, no forma nitritos a partir de los nitratos.
7) Lactosa, Glucosa y Maltosa.	Produce ácido y no gas.
8) Medio para anaerobiosis.	Aerobio.

en tizón común del frejol, causado por *Xanthomonas phaseoli*, en otros países donde también se cultiva esta leguminosa.

En las pruebas serológicas se obtuvieron los siguientes resultados:

En la primera prueba realizada, las bacterias aisladas en La Platina y en Valdivia dieron reacción negativa frente a los antisuecos de *Pseudomonas phaseolicola* y *Pseudomonas syringae*.

En la segunda prueba se obtuvo una reacción positiva y de identidad entre los aislamientos de Valdivia, La Platina y el antígeno de *Xanthomonas phaseoli* enviado de Davis EE. UU., frente al antisuero preparado a partir de esta bacteria.

CONCLUSIONES

Se establece por primera vez en forma científica, que el agente causal de la bacteriosis del frejol en Chile es la bacteria *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson.

RESUMEN

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias, desde hace algunos años, ha estado interesado en el estudio de algunas enfermedades de origen bacteriano que afectan al cultivo del frejol en el país.

Durante el verano recién pasado, de quince variedades de frejol sembradas en la zona central y de otras cultivadas en el sur del país, Valdivia, se aislaron colonias bacterianas de color amarillo cremoso, con características similares en los medios diferenciales usados en laboratorio, lográndose establecer que correspondían a un mismo bacterio del género *Xanthomonas*.

Se realizaron pruebas de patogenicidad de la bacteria aislada, en las condiciones dadas por los invernaderos de la Estación Experimental La Platina. Se inocularon plantas de diferentes variedades, dejándose los correspondientes testigos.

Síntomas similares a los vistos en el campo se desarrollaron en todas las plantas inoculadas con la bacteria, mientras los testigos permanecieron sanos. Los síntomas más importantes observados pueden resumirse en manchas verdes entre las nervaduras y manchas angulares en los bordes de la hoja, la que más tarde tiende a distorsionarse; en algunos casos se marchita y muere. En los tallos aparecen estrías rojizas longitudinales y las plantas se quiebran fácilmente. En la vaina, primero se desarrolla una mancha verde acuosa, de la cual emana posteriormente una secreción bacteriana de color amarillo. Esta sintomatología es similar a la que se presenta con la bacteriosis común del frejol causada por *Xanthomonas phaseoli* en otros países.

Paralelamente se hicieron pruebas serológicas de la bacteria, en la Estación Agronómica de Rinconada de Maipú de la Universidad de Chile, sometiéndola a sueros de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkholder) Dowson y *Pseudomonas syringae* Van Hall, ante los cuales la reacción fue negativa. Pero al someterla al suero de *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson, resultó positiva, dando la identidad de ambas cepas.

Reunidos todos estos antecedentes, se puede decir con certeza que las cepas bacterianas aisladas en nuestro país corresponden a *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson, organismo que, por primera vez en forma científica, se determina en el país.

SUMMARY

For several years, the Instituto de Investigaciones Agropecuarias has been interested in the study of some of the bacterial diseases which affect the bean crop in Chile.

During the past summer, bacterial colonies were isolated from fifteen bean varieties seeded in the central zone and from several others grown in Valdivia, in the southern part of the country. The colonies were of a creamy yellow color and showed similar characteristics when cultured on different media in the laboratory; this permitted their identification as a single bacterium of the genus *Xanthomonas*.

Tests of the pathogenicity of the isolated bacterium were made in the greenhouses of the Experiment Station "La Platina". Plants of different varieties were inoculated, leaving corresponding check plants. All of the inoculated plants developed symptoms similar to those seen in the field, while the check plants remained healthy. The most characteristic symptoms observed were green spots between the veins and angular spots on the edges of the leaves, which later tended to become distorted and in some cases withered and died. Longitudinal reddish streaks appeared on the stems and the plants were easily broken. The first symptoms on the pods were green, water-soaked spots, which later exuded a yellow bacterial secretion. This symptomatology is similar to that presented by "common bacterial blight of beans" caused by *Xanthomonas phaseoli* in other countries.

At the same time, serological tests of the bacterium were made in the Agricultural Experiment Station, Rinconada de Maipú, of the University of Chile. When subjected to serum of *Pseudomonas phaseolicola* (Burkholder) Dowson and *Pseudomonas syringae* Van Hall, the reaction was negative. However, when subjected to serum of *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson, the reaction was positive, permitting the identification of both strains.

Given these results, it can be said with certainty that the bacterial strains isolated are *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson the first time that this organism has been scientifically identified in Chile.

LITERATURA CITADA

1. BOHN, G. W. y MALOTT, J. C. The effects of carborundum in inoculating bean plants with bacteria. *Phytopathology* 37: 196-198 1947, 232 p.
2. DOWSON, W. J. Plant diseases due to bacteria. 2nd. ed. Cambridge University Press 1957
3. ELLIOTT, CH. Manual of bacterial plant pathogens. Waltham, Mass. Chronica Botanica Company. 1951 186 p.
4. LINK, G. K. K. y SHARP, C. G. Correlation of host and seriological specificity of *Bacterium campestris*, *Bacterium flaccumfaciens*, *Bacterium phaseoli* y *Bacterium phaseoli sojense*. Bot. Gaz. 83: (145). 160. 1927.
5. SHARP C. G. Virulence, seriological and other physiological studies of *Bacterium flaccumfaciens*, *Bacterium phaseoli* and *Bacterium phaseoli sojense*. Bot. Gaz. 83: 113-114. 1927.
6. WALKER, J. CH. Diseases of vegetable crops. Mc. Graw. Hill Co. 1952 529 p.
7. ZAUMEYER, W. J. y THOMAS, H. R. A Monographic study of bean diseases and methods for their control. Tech. Bull. 828., U.S. Dept. of Agr. 66-67 1957.