

NOTAS TÉCNICAS

METODOLOGÍA FÁCIL PARA LA EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS DE SEMILLAS DE CARAOTA (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) Y FRIJOL [*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP]

Easy methodology for extraction and detection of plant pathogenic bacteria on haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] seeds

Gustavo Trujillo, Yonis Hernández y Licy Gómez

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica Agrícola, Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas, Apdo. 4579, Maracay 2101, Venezuela. E-mail. gus202@cantv.net.

Fitopatol. Venez. 18: 37-39.

Recibido: 4 de julio de 2005.

Aceptado: 12 de diciembre de 2005.

La semilla constituye la fuente de inóculo primario para la mayoría de las bacterias fitopatógenas, así como para muchos otros patógenos de plantas (5). Las metodologías existentes para la detección de bacterias van desde las más sencillas, como siembra de semillas en suelo estéril y observación del crecimiento de las plantas en busca de la sintomatología característica de las enfermedades bacterianas (poco eficiente) hasta las más sofisticadas que incluyen utilización de medios semi-selectivos, uso de ultra-centrifugas, técnicas serológicas, etc., las cuales son de mayor eficiencia pero costosas (4). Es necesario hacer énfasis del rechazo por parte de los estudiosos en el área de bacterias fitopatógenas de la metodología de siembra directa de semillas sobre medios de crecimiento semisólidos para la obtención de patógenos bacterianos, por el simple hecho de que en la semilla existen muchos microorganismos contaminantes que crecen a una velocidad superior al de las bacterias fitopatógenas, enmascarándolas y haciendo difícil su aislamiento (1,2,4,5,6,7,10).

Se propone una técnica sencilla, económica y repetible para conocer de la presencia de bacterias fitopatógenas en semillas de caraota y frijol. Un adelanto de este trabajo ya ha sido presentado en forma de resumen (8).

Se seleccionaron granos de caraota y frijol, por poseer un alto grado de infección con bacterias, procedentes de cinco casas proveedoras. Fueron separados por colores; en el caso de caraota: negras, blancas, rojas y rosadas; en el caso de frijol: ojo negro, crema, marrón claro y marrón oscuro. Se realizaron 2 repeticiones por cada color y proveedor. Para la extracción se tomaron 50 g de granos sin lavar y se colocaron en una fiola estéril contentiva de 100 mL de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,2 a 3-4° C por 24 h. Luego, el material se licuó en una homogeneizadora de vaso y se filtró a través de doble gasa. Diez mililitros del filtrado se colocaron en un mortero estéril y se le añadió celite al 2-5%. La mezcla fue inoculada mecánicamente con el mazo de un mortero sobre plantas sanas de 10 d de edad, las cuales presentaban sus dos hojas primarias expandidas. Fueron utilizadas 20 plantas por cada muestra analizada. El extracto obtenido de plantas de caraota fue inoculado sobre plantas de caraota cv Tacarigua, mientras que en el caso del frijol el extracto fue ionoculado sobre plantas de frijol cv Tuy. Posteriormente, las hojas de las plantas inoculadas fueron lavadas suavemente con agua destilada estéril y se dejaron en el laboratorio durante 36-48 h a 22 °C. Al cabo de ese tiempo fueron trasladadas a un umbráculo protegido contra insectos con una temperatura de 28 °C. Como testigo se utilizó la metodología tradicional; es decir, plantas de la misma edad y en igual número,

provenientes de granos de las mismas muestras utilizadas para la metodología propuesta y dejadas en iguales condiciones para observación y comparación. De las plantas que mostraron síntomas se tomaron muestras, se hicieron aislamientos y se obtuvieron cultivos puros, con los cuales se realizó los postulados de Koch. Los experimentos se llevaron a cabo en el periodo marzo-mayo de 2005. Con algunos de los cultivos puros obtenidos se realizó serología (doble difusión en agar), para conocer la identidad del patógeno (11), siguiendo metodologías de uso frecuente (1,2,7,9,10,12,13). Los antiseros provenían del Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas de la Facultad de Agronomía de la UCV.

El 90% de las muestras de caraota analizadas con la metodología implementada resultó infectado con bacterias mientras que con la metodología tradicional (granos sembrados y observación de sintomatología) solo se detectó bacterias en el 35 % de las muestras (Cuadro 1). Con la metodología propuesta el porcentaje de plantas enfermas fluctuó entre 5 y 100% (Fig. 1), mientras que con la metodología tradicional (testigo) fue de 35%.

Con las muestras de frijol los resultados fueron similares; la metodología propuesta resultó más eficiente, pudiéndose detectar bacterias en el 45% de las muestras procesadas,



Fig. 1. Sintomatología bacteriana en una hoja trifoliada de caraota tratada con la metodología propuesta.

Cuadro 1. Detección de la presencia de bacterias fitopatógenas en granos de caraota y frijol utilizando la metodología propuesta y la metodología tradicional (siembra y observación de síntomas).

Casa distribuidora	Color del grano		Metodología propuesta		Metodología tradicional	
	Caraota	Frijol	Caraota	Frijol	Caraota	Frjol
1	Negro	Ojo negro	20 ⁽¹⁾	7	7	2,5
	Blanco	Blanco	2	0	0	0
	Rojo	Marrón claro	0	0	0	0
	Rosado	Marrón oscuro	2,5	4	0	0
2	Negro	Ojo negro	9	6	3,5	2
	Blanco	Blanco	6,5	0	0	0
	Rojo	Marrón claro	1	0	0	0
	Rosado	Marrón oscuro	7	5	2,5	0
3	Negro	Ojo negro	13	9,5	3	3
	Blanco	Blanco	9	7	0	1
	Rojo	Marrón claro	5	8	0	0
	Rosado	Marrón oscuro	15	0	0,5	2,5
4	Negro	Ojo negro	14	0	4,5	0
	Blanco	Blanco	9,5	0	0	0
	Rojo	Marrón claro	13	0	4	0
	Rosado	Marrón oscuro	7,5	0	0	0
5	Negro	Ojo negro		0	0	0
	Blanco	Blanco		0	0	0
	Rojo	Marrón claro		0	0	2
	Rosado	Marrón oscuro		0	0	0

⁽¹⁾Número de plantas con síntomas de 20 plantas inoculadas.

mientras que con la metodología testigo, tan solo se detectó síntomas bacterianos en el 30% de las muestras. Con relación al porcentaje de plantas mostrando síntomas bacterianos, con la metodología implementada se obtuvo de 5 a 35%, mientras que con la metodología tradicional fue de 2,5 a 15%. De la sintomatología obtenida en las plantas con ambas metodologías se obtuvieron cultivos puros, cuyas colonias resultaron de diversos colores en medios de cultivo semisólidos (amarillo, blanco crema, blanco traslucido), redondas, margen entero, elevadas, convexas. Las que resultaron patogénicas fueron identificadas serologicamente como sigue: las amarillas como *Xanthomonas phaseoli* y *X. phaseoli* var *fuscans*, las de color blanco crema *Pectobacterium* sp., las de color blanco traslucido *Pseudomonas* del grupo fluorescente, todas provenientes de granos de caraota. Provenientes de granos de frijol se identificaron *X. vignicola* las amarillas y *Pectobacterium* sp. las de color blanco.

Es importante hacer notar que mediante la metodología propuesta se observó frecuentemente la presencia de síntomas virales en las plantas inoculadas, que fueron superiores en número de plantas con síntomas a las de la metodología de control, tanto en las muestras de caraota como de frijol pero no se realizó un seguimiento riguroso al respecto por no constituir el objetivo propuesto.

Es necesario destacar que estas dos metodologías probadas miden parámetros diferentes. La siembra de semillas

y el seguimiento del crecimiento de las plantas nos da como resultado el número de semillas que se transformarían en plantas enfermas en el campo (1,2,4,6). Con la metodología propuesta aumenta el volumen de bacterias fitopatógenas previo a la utilización de una inoculación severa donde se obtienen resultados 4-5 d después de realizado el ensayo y nos señala la presencia de las bacterias, pudiéndose inferir mediante cálculos la concentración final del número de bacterias en la semilla y extrapolar los resultados para conocer el potencial de infección del lote (1,10).

Aunque no fue el objetivo fundamental del trabajo, con la técnica propuesta y el uso de serología se detectaron los géneros más comunes de bacterias señalados en el país para caraota y frijol (*Xanthomonas* y *Pseudomonas*) e incluso se pudo determinar en *X. phaseoli* las variantes común y *fuscans*, en proporciones parecidas en los lotes muestreados. La ventaja de esta metodología radica en lo sencillo y práctico de realizar, por no requerir de equipos costosos, pudiéndose llevar a cabo en cualquier laboratorio; sin embargo, sería necesario confrontarla con las metodologías más sofisticadas (2,3,6,7,10) para conocer cuanto se deja de detectar o cuan exacta es. También es recomendable enfocar esta experiencia en el área de virus y compararla con los protocolos que han presentado otros autores con relación a extracción de virus en semilla (2).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al FONACIT por el financiamiento parcial de esta investigación a través de los proyectos S1- 2001001009 y S1- 2001000998.

LITERATURA CITADA

1. Da Silva, R. 2001. Métodos en bacteriología de plantas. Vicosá, Brasil. Editora Universidad Federal de Vicosá.
2. Peña, Z. y Trujillo, G. 2001. Protocolos para detectar virus transmitidos a través de la semilla de caraota y frijol. *Fitopatol. Venez.* 14: 76 (Resumen).
3. Ramos, R. y Barbosa, R. 2005. Manual de prácticas en fitobacteriología. 2 ed. Recife. Brazil. Universidad Federal Rural de Pernambuco. 98 pp.
4. Roth, D.A. 1995. Review of extraction and isolation methods in Saettler et al. 1995. Detection of bacteria and other planting material. APS. Press. St. Paul, Minnesota. 3-16.
5. Saettler, A.W., Shaad, N.W. and Roth, D. A. 1995. Detection of bacteria in seed and other planting material. St. Paul, Minnesota. APS. Press. 122 pp.
6. Saettler, A.W. and Perry, S.K. 1972. Seed transmitted bacterial disease in Michigan navy (pea) beans (*Phaseolus vulgaris*). *Plant. Dis. Rptr.* 56: 378- 381.
7. Shaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 370 pp.
8. Trujillo, G., Hernández, Y. y Gómez, L. 2005. Metodología fácil para la extracción de bacterias fitopatógenas de semillas de caraotas (*Phaseolus vulgaris* L.) y frijol (*Vigna unguiculata*). XIX Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto. Venezuela. (Formato CDR).
9. Trujillo, G., Hernández, Y. y Subero, L. 2001. Extracción de bacterias fitopatógenas de semillas de girasol (*Helianthus annuus*). *Fitopatol. Venez.* 14: 45. (Resumen).
10. Trujillo, G. 1998. Fundamentos de Bacterias Fitopatógenas. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*. Alcance 56. 211 pp.
11. Trujillo, G., Hernández, Y. y Garrido, M. 1997. La colección de patógenos de plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Caso: Bacterias fitopatógenas. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 23:165 -186.
12. Trujillo, G. and Saettler, A. 1979. A combined semiselective medium and serology test for detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. *J. Seed Technol.* 4: 35 -41.
13. Trujillo, G. and Saettler, A. 1981. Production and characterization of antisera to *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. Michigan State Agricultural Experiment Station 29. 8 pp.