

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL**



“IDENTIFICACION DE HOSPEDEROS ALTERNOS DE PATÓGENOS QUE OCASIONAN ENFERMEDADES EN CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) EN EL MUNICIPIO DE SANTIAGO TEXACUANGOS, DEPARTAMENTO DE SAN SALVADOR”

POR:

**MAURICIO VLADIMIR JIMÉNEZ LEMUS
LUIS MARIO MORALES SANDOVAL**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE:
INGENIERO AGRONOMO**

San Salvador, Septiembre de 2011

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

ING. AGR. Y MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO GENERAL:

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

DR. E ING. AGR. REYNALDO ADALBERTO LÓPEZ LANDAVERDE

SECRETARIO:

ING. Y MSc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL:

Ing. Agr. MSc. Rafael Antonio Menjívar Rosa

DOCENTES DIRECTORES:

Ing. Agr. Edgardo Wigberto Lara Rodríguez

Ing. Agr. MSc. Andrés Rivas Flores

COORDINADOR DE PROCESOS DE GRADUACION

Ing. Agr. MSc. Rafael Antonio Menjívar Rosa

RESUMEN

Con la finalidad de ayudar a los agricultores a mejorar sus niveles de producción, se realizó el presente trabajo de investigación que consistió en encontrar hospederos alternos del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris. L*), en el Cantón Shiltapa, municipio de Santiago Texacuangos, departamento de San Salvador, El Salvador, C.A, ubicado a 15 Km. de San Salvador y está localizado entre las coordenadas septentrional 13°40'39" latitud norte, meridional 13°36'17" latitud norte, oriental 89°04'40" longitud oeste y occidental 89°07'47" longitud oeste con una altitud de 780 metros sobre el nivel del mar, en el periodo comprendido de Septiembre de 2009 y Diciembre de 2010. Realizando muestreos de campo colectando muestras de tejido vegetal enfermo, que posteriormente se analizaron en la Universidad y con el apoyo de los asesores se determinó que habían *Fusarium sp* y *Pythium sp*, arrojada dicha información se procedió a montar un ensayo en el laboratorio de Microbiología de La Facultad de Ciencias Agronómicas para conocer la patogenicidad de estos dos hongos sobre el cultivo del frijol, dicho ensayo se estableció bajo un diseño de parcelas divididas y cuatro tratamientos que fueron: Variedad CENTA Pipil mas *Fusarium*, Variedad CENTA Pipil mas *Pythium*, Variedad Rojo de Seda mas *Fusarium*, Variedad Rojo de Seda mas *Pythium*.

Al finalizar la investigación pudimos concluir que hay diferencia significativa en cuanto al porcentaje de germinación, la variedad más susceptible fue Rojo de Seda, por lo tanto la variedad CENTA Pipil puede sobrevivir al ataque de hongos como *Fusarium sp* y *Pythium sp*.

AGRADECIMIENTO

Luego de cinco años, cincuenta materias y dos años y medio de trabajo en la investigación quiero dar mis más sinceros agradecimientos en primer lugar a Dios quien siempre tuvo cuidado de mis pasos en este largo caminar y fue mi mayor fuerza para superar los retos que se aparecieron frente a mí.

A mis padres Mauricio Vladimir Jiménez Moran y Rosa Elvira Lemus de Jiménez, a mi hermano Julio Mauricio Jiménez Lemus, mi familia, quienes a pesar de todo siempre apoyaron mis ideas, mis sueños y mi visión de futuro, que siempre estuvieron ahí en las tristezas y alegrías que el camino por la Universidad nos da, a ellos MUCHAS GRACIAS.

A Luis Mario Morales Sandoval mi amigo, mi compañero de tesis quien ha corrido hasta el final esta carrera que hoy terminamos.

A José Simeón Ramírez Reyes y Ruby Eunice Benitez Iglesias, compañeros, amigos quienes nunca se irán de la memoria, con quienes vivimos y disfrutamos la Universidad al máximo.

A todas esas personas que aunque aquí no se mencionen siempre estuvieron ahí y hoy se pueden dar por aludidos.

A todos MUCHAS GRACIAS.

Mauricio Vladimir Jiménez Lemus.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme permitido realizar mis estudios, a mi padre y a mi madre por el apoyo que he recibido de ellos, a mi hermana y hermano por estar siempre conmigo, también a mi compañero de tesis y mis otros dos buenos compañeros de estudio que tuve durante mi carrera y a mis asesores de tesis.

Luis Mario Morales Sandoval.

DEDICATORIA

Vaya esta dedicatoria a Vlady, mi padre quien ha servido de ejemplo de vida, a mi madre quien siempre estuvo pendiente de mi y me apoyo, a mi hermano Maury mi amigo mi hermano.

A mis amigos Ruby, Simeón, Luis Mario, con quienes vivimos experiencias inolvidables juntos.

A esa persona, a esa mujer especial que siempre hubo en mi vida, hasta el día de hoy.

A Dios, quien sabe que de todo corazón siempre le he servido y seguido, a Él, vaya este triunfo dedicado.

Mauricio Vladimir Jiménez Lemus.

DEDICATORIA

Les dedico este trabajo a mis padres, mis hermanos y demás familia que estuvieron pendientes durante toda mi carrera.

Luis Mario Morales Sandoval.

INDICE

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	REVISION DE LITERATURA.....	2
2.1	Hospederos Alternativos.....	2
2.1.1	Sobrevivencia como saprofitos.....	3
2.1.2	Longevidad.....	4
2.2	Variabilidad de los fitopatogenos.....	5
2.3	Relaciones Hospedante- Patógeno.....	6
2.3.1	Inoculo, Inoculación y Germinación.....	6
2.4	Infección y colonización.....	7
2.5	Reproducción del patógeno.....	7
2.6	Generalidades del frijol.....	8
2.6.1	Programas fitosanitarios.....	8
2.6.2	Principales enfermedades.....	10
2.6.2.1	Mustia hilachosa o telaraña.....	10
2.6.2.2	Antracnosis.....	11
2.6.2.3	Mancha angular.....	12
2.6.2.4	Pudriciones radicales.....	13
2.6.2.5	<i>Fusarium sp</i>.....	14
2.6.2.6	<i>Phytium sp</i>.....	14
3.	MATERIALES Y METODOS	
3.1	Ubicación geográfica.....	16
3.2	Metodología de campo.....	17
3.3	Metodología de laboratorio.....	18
3.3.1	Identificación de la vegetación espontanea.....	18
3.3.2	Procesamiento de las muestras y análisis microscópico.....	18
3.3.3	Aislamiento de patógenos.....	18
3.3.4	Multiplicación de patógenos.....	19
3.3.5	Prueba de patogenicidad in vitro.....	19
3.3.6	Montaje del experimento.....	20
3.3.7	Incidencia de la enfermedad.....	21

3.4	Metodología estadística.....	21
4.	ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	
4.1	Identificación de la vegetación espontanea.....	23
4.2	Identificación de los patógenos.....	23
4.3	Prueba de patogenicidad.....	24
4.4	Pruebas de significancia estadística.....	29
5.	CONCLUSIONES.....	30
6.	RECOMENDACIONES.....	31
7.	BIBLIOGRAFIA.....	32
8.	ANEXOS.....	34

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Mapa de ubicación de el municipio de Santiago Texacuangos departamento de San Salvador.....	16
Figura2. Porcentaje de germinación de plantas de frijol Centa pipil(<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)inoculados in vitro con <i>Fusarium sp</i>	25
Figura 3. Porcentaje de germinación de plantas de frijol Centa pipil(<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados in vitro con <i>Pythium sp</i>	25
Figura 4. Porcentaje de germinación de plantas de frijol Rojo de seda (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)inoculados in vitro con <i>Fusarium sp</i>	26
Figura 5. Porcentaje de germinación de plantas de frijol Rojo de seda (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados in vitro con <i>Pythium sp</i>	26
Figura 6. Porcentaje de germinación de plantas de frijol Centa pipil(<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados in vitro con <i>Fusarium sp</i>	27
Figura 7. Porcentaje de germinación de plantas de frijol Centa pipil(<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)inoculados in vitro con <i>Pythium sp</i>	27
Figura 8. Porcentaje de germinación de plantas de frijol Rojo de seda (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados in vitro con <i>Fusarium sp</i>	28
Figura 9. Porcentaje de germinación de plantas de frijol Rojo de seda (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculados in vitro con <i>Pythium sp</i>	28

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cuadros promedio de presencia de malezas en los muestreos de vegetación espontánea.....	34
Anexo2. Vegetación espontanea encontrada en campos de siembra de cultivo de frijol en cantón Shaltipa de Santiago Texacuangos San Salvador.....	35
Anexo 3. Hongos encontrados hospedados en vegetación espontanea de un terreno de siembra de cultivo de frijol en Cantón Shaltipa de Santiago Texacuangos, San Salvador.....	36
Anexo 4. Cultivos puros de hongos fitopatogenos en medio de cultivo Caseína Peptona Agar aislados de Vegetación espontanea.....	37
Anexo 5. Dilución por el método de Placa Vertida para determinar la dosis de inoculación de hongos <i>Fusarium sp</i> y <i>Pythium sp</i>	38
Anexo 6. Cuadro de Porcentaje de plantas dañadas durante la germinación de la variedad CENTA pipil y Rojo de Seda inoculados con <i>Fusarium sp</i> y <i>Pythium sp</i> respectivamente.....	39
Anexo 7. Cuadro de Porcentaje de plantas dañadas de la variedad CENTA pipil y Rojo de Seda inoculados con <i>Fusarium sp</i> y <i>Pythium sp</i> respectivamente.....	40
Anexo 8. Montaje de ensayo (prueba de patogenicidad in vitro) laboratorio de Microbiología Facultad de Ciencias Agronómicas.....	41
Anexo 9. Toma de datos de germinación de <i>Fusarium sp</i> y <i>Pythium sp</i> en laboratorio.....	42

Anexo 10. . Hojas con manchas localizadas generalizadas con necrosis de <i>I. calea</i> y <i>E.hirta</i>	42
Anexo 11. Resultados íntegros obtenidos del sistema computacional SAS.....	43
Anexo 12. Pruebas de Tukey.....	48

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación comprende la Identificación de Hospederos Alternos de Patógenos, que pueden afectar negativamente al cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Los Hospederos alternos implican un enorme riesgo para los cultivos de importancia ya que sirven de albergue a patógenos que afectan los rendimientos; el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) puede presentar pérdidas hasta de un 15- 20 % en la producción, poniendo en peligro la seguridad alimentaria del país. El rol de los hospederos alternos se fundamenta en la sobrevivencia de patógenos dentro de dichos hospederos durante el periodo que no hay cultivos y bajo condiciones adversas, para luego atacar a una o varias especies determinadas. Por lo que se hace necesaria la determinación de dichos hospederos para disminuir en buena medida la incidencia de patógenos en cualquier cultivo.

Este trabajo tiene como objetivo identificar hospederos alternos que alojan patógenos que afectan al cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) como el caso de la Mustia, Roya, Mancha angular, entre otras.

Para realizar esta investigación se utilizó metodología de campo como la recolección de muestras en fresco de dicha actividad realizada con la ayuda de muestreos en la zona delimitada para esta actividad, además métodos de laboratorio para la identificación de patógenos, dicha etapa se utilizó el laboratorio de Microbiología de la Universidad de El Salvador donde se nos proporcionó todo los materiales y equipo necesario para llevar a cabo la etapa comprendida de identificación de patógenos.

Con este trabajo se espera contribuir a la obtención de alternativas de solución para el control y manejo de hospederos alternos en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Hospederos alternativos

La sobrevivencia del patógeno puede implicar también el parasitismo de vectores u hospederos alternativos. En algunos casos, los hospederos alternativos se describen así, desde un punto de vista antropocéntrico, es decir, debido a la importancia económica del hospedero primario. En otros casos, el término se utiliza para aquellas especies en las cuales el patógeno es menos virulento. Sea cual fuere el enfoque adoptado, estos hospederos pueden cubrir la brecha entre los cultivos sucesivos de un hospedero económicamente importante. La relación entre el hongo y sus hospederos alternativos es bastante específica y esencial para el término de su ciclo de vida. (Agrios 2001)

Los hospederos alternos juegan un papel muy importante con respecto a los patógenos que afectan a los cultivos, debido a que estos les dan donde refugiarse, mientras los cultivos no han sido sembrados, encontrándose en un estado de vida latente hasta que llegue el momento perfecto para invadir los cultivos.

La mayoría de los ejemplos bien documentados de la función de los hospederos alternativos incluye a los virus y hongos. Se encontró que el virus del mosaico del pepino, la causa del achaparramiento severo y del amarillamiento de la lechuga, estaba presente en doce de catorce especies de malas hierbas que crecían en la vecindad de los cultivos de lechuga. (Agrios 2001) El virus no causaba síntomas reconocibles en la mayoría de estas hierbas, pero sin duda éstas eran una fuente de infección conforme el áfido vector, se alimentaba indiscriminadamente en numerosos hospederos. Así mismo se demostró que un aislamiento de *Peronospora parasítica* es capaz de atacar a 22 especies de crucíferas a parte de los numerosos cultivares de *Brassica olerácea* en los cuales es un patógeno económicamente importante. Sin embargo, fue sorprendente que en muchos de esos hospederos alternativos, la invasión de los tejidos y la esporulación fueron muy restringidas. Por ello, es discutible la posible función de esos hospederos en lo que se refiere a facilitar la sobrevivencia del patógeno entre los cultivos sucesivos de *Brassica* o ayudar a su diseminación epidémica. (Love 2000)

2.1.1 Sobrevivencia como saprofitos

Muchos parásitos facultativos evitan parcial o completamente los problemas de sobrevivir en reposo creciendo saprofiticamente. Algunos de esos organismos tienen capacidades muy restringidas para crecer en una forma no parásita. Algunas bacterias y hongos tienen la capacidad de vivir por largos periodos sobre la superficie de sus hospederos sin penetrar los tejidos vivos. Estos organismos epífitos son capaces de continuar creciendo incluso en los limitados recursos nutricionales ofrecidos por la superficie del hospedero. (Agris 2001)

Una de las cualidades de los patógenos es que pueden vivir en latencia por mucho tiempo esperando el momento idóneo para colonizar a su nuevo hospedero.

Más comúnmente, los parásitos facultativos, compiten con las poblaciones de descomponedores de vida libre. Su éxito relativo en esta competencia determina el grado de su crecimiento saprófito. Dicho éxito depende en parte de la velocidad de germinación y de la tasa de crecimiento subsecuente. La capacidad para degradar una amplia variedad de sustratos orgánicos también es esencial, si el organismo tiene que crecer a gran escala en un hábito natural como el suelo. Durante el proceso de crecimiento, el organismo tiene que tolerar la presencia de otros microorganismos en su ambiente inmediato, aunque puede restringir parcialmente el crecimiento de los competidores al producir metabolitos tóxicos. (Love, 2002)

La competencia entre organismos es vital para la sobrevivencia de saprofitos, es decir que entre mejor adaptado este un organismo, mayor será la posibilidad de sobrevivencia y por ende de incidencia sobre el cultivo.

Todos estos atributos han sido englobados bajo el concepto de la capacidad saprófita competitiva. Se ha demostrado que ese concepto es útil al comparar el comportamiento de los patógenos que sobreviven como saprofitos. También es útil para predecir algunos aspectos del comportamiento parásito, ya que parece existir una correlación entre una buena capacidad saprofita competitiva y un tipo de vida necro trófica en el hospedero. (Love, 2002)

Se consideraran dos patógenos contrastantes para ilustrar estos puntos: ***Rhizoctonia solani*** ataca los tejidos jóvenes y senescentes de un amplio rango de hospederos y una vez

que estos sustratos han sido destruidos y descompuestos, tienen la capacidad de crecer libremente en el suelo. ***Gaeumannomyces*** infecta sólo hospederos cereales, pero no está restringido a alguna etapa particular de su ciclo de vida. Causa necrosis generalizada y sobrevive al invierno dentro de las lesiones de rastrojos persistentes. El grado al cual ***Gaeumannomyces*** puede sobrevivir con éxito de esta forma depende de las condiciones ambientales dominantes. Los suelos cálidos, húmedos y bien ventilados promueven la descomposición de las raíces y paja, los cuales hacen que disminuya el inóculo de este hongo. El régimen de nitrógeno del suelo también es muy importante ya que los restos de los cereales tienen una proporción muy alta de carbono-nitrógeno y esto limita la velocidad de su descomposición. (Love, 2002)

Rhizoctonia es un ejemplo de patógenos que atacan una gran variedad de especies vegetales y otros son muy selectivos, pero si atacan diferentes especies, las condiciones favorables para su sobrevivencia es la misma por lo que su incidencia será proporcional a lo favorable del ambiente en que se encuentre.

Los hongos utilizan con mucho la gama más extensa de mecanismos de sobrevivencia. Muchos hongos patógenos adoptan varias estrategias de sobrevivencia que, utilizadas a la par, aumentan considerablemente sus posibilidades de resistir con éxito en los periodos desfavorables.

En contraste con muchas bacterias que infectan animales, las bacterias fitopatógenas no forman esporas de resistencia. Más bien, han adoptado varios tipos de vida que aseguren la persistencia de sus células vegetativas normales, con frecuencia dentro de los órganos perennes de sus hospederos. El otro modo principal de sobrevivencia es dentro de vectores u hospederos alternos.

2.2.2 Longevidad

Los datos relativos a la longevidad de patógenos particulares bajo condiciones naturales suelen ser inciertos. Casi todos esos datos se han obtenido a través de dos formas principales. Un brote de enfermedad en un área que no ha mantenido un cultivo particular durante un número conocido de años con frecuencia se ha tomado como ejemplo de la

capacidad del patógeno para sobrevivir durante el período intermedio. Sin duda, dicha información tiene un significado práctico, pero en general es imposible relacionarla con la sobrevivencia de propágulos particulares, como esporas o esclerocios. La información sobre la sobrevivencia de estructuras específicas sólo puede obtenerse a partir de experimentos. Requiere poca imaginación ver las dificultades prácticas que implican los estudios de este tipo, el cual puede tardar varias décadas y se requieren técnicas de muestreo cada vez más sensibles para detectar cantidades más y más pequeñas de esporas viables. Debe tenerse en cuenta que los estudios de laboratorio no necesariamente demuestran el destino de los propágulos sea en suelos naturales o en la atmósfera superior. A pesar de estas dificultades, es evidente que existen variaciones sustanciales en la longevidad de diferentes patógenas. (Agrios, 2001)

La longevidad de los patógenos es de suma importancia para profundizar los estudios realizados debido a que con datos de longevidad se podría evitar tener grandes pandemias en cultivos de importancia como el frijol para así evitar riesgos de hambre en zonas vulnerables especialmente en América Latina.

2.2 Variabilidad de los fitopatógenos.

Toda especie de organismos está constituida por una población heterogénea de individuos; entre más complejo el organismo, mayor la variabilidad. La variabilidad que se observa en los seres vivientes tiene dos orígenes:

1. Ambiental, no transmitida a la progenie.
2. Genética, que es la importante en este caso en particular, tal que si se transmite a la progenie.

Las diferentes formas genéticas que pueden encontrarse dentro de cada especie se llaman variantes. La cantidad de variantes será mayor o menos de acuerdo a su método de reproducción, siendo desde luego mayor para los casos en que se produce unión entre células de diferente composición genética para formar un nuevo individuo. Muchos de estos variantes se perpetúan como generaciones sucesivas, si es que la variación les permite

adaptarse mejor a su medio ambiente; en cambio, si la variación resulta desventajosa para su adaptación, el nuevo variante desaparece. En el caso de los fitopatógenos, la variabilidad es un fenómeno de gran importancia, porque les confiere el potencial de adaptarse y superar condiciones cambiantes adversas, incluyendo la producción de variedades resistentes y otras medidas introducidas por el hombre con el fin de combatir las enfermedades.

2.3 Relaciones hospedante-patógeno.

Las enfermedades infecciosas son el resultado de una serie de interacciones entre el hospedante, el patógeno y el medio ambiente; estas interacciones constituyen el “ciclo de la enfermedad”. Este ciclo se repite muchas veces y el efecto cumulativo de varios o muchos ciclos sucesivos determina la severidad de la enfermedad. (Gonzales 1985)

2.3.1 Inoculo, Inoculación y Germinación.

Se considera inoculo la población de estructuras del patógeno que logra acceso al hospedante con posibilidad de infectarlo. En los hongos, el inoculo consiste generalmente de estructuras especializadas, las esporas; pero también las estructuras vegetativas (micelio, esclerocios) pueden servir de inoculo. El inoculo primario es el que causa las primeras infecciones en una población determinada del hospedante; el inoculo secundario es el que se produce luego, a partir de las infecciones primarias, y va a infectar la misma población.

El inoculo puede llegar al hospedante por sus propios medios (en forma activa) pero generalmente es acarreado por algún agente diseminador. En ambos casos, el acceso a los tejidos del hospedante se denomina “inoculación”.

Las esporas de hongos, que constituyen el tipo más importante de inoculo, deben germinar para penetrar en el hospedante; la fase de germinación es la más crítica en el ciclo de los hongos fitopatógenos, ya que el tubo germinativo de las esporas es muy delicado, y puede morir rápidamente por desecación o al hacer contacto con sustancias químicas tóxicas. Esto explica porque solo un porcentaje muy bajo de las esporas que caen sobre las hojas logran germinar normalmente e iniciar el proceso de penetración. (Gonzales 1985)

2.4 Infección y colonización.

Una vez que el patógeno penetra puede comenzar la infección, que es el establecimiento del patógeno en el hospedante en condición parasítica. Hay casos de penetración sin infección, como sucede cuando un organismo penetra los tejidos de plantas no susceptibles, resultando en la muerte del organismo sin causar enfermedad. El término infección no implica la aparición de síntomas, ya que puede haber un intervalo largo entre los dos, si bien ordinariamente uno sigue de cerca al otro. La infección continúa mientras el patógeno actúa dentro del hospedante y este reacciona a su presencia. El patógeno puede colonizar apenas unas pocas células, porciones considerables de tejido, o la planta entera. (Gonzales 1985)

2.5 Reproducción del patógeno.

A medida que la enfermedad progresa, el patógeno, crece en la planta y, simultáneamente o posteriormente, produce unidades de multiplicación y diseminación, llamadas colectivamente propágulos. Con las bacterias y los virus el crecimiento es igual a la multiplicación; el número de propágulos (partículas y células, respectivamente) aumenta continuamente mientras haya tejido susceptible. Con los hongos y en cierta forma con los nematodos, generalmente se necesita cierto grado de crecimiento vegetativo antes de que se puedan producir los nuevos propágulos (esporas y huevos, respectivamente). Muchos hongos empiezan a esporular en el tejido vivo, mientras que otros solo lo hacen en lesiones necróticas; lo que tiene en común casi todos los hongos es que la esporulación responde a estímulos nutritivos; mientras el tejido hospedante provea abundantes nutrientes, predomina el crecimiento micelial, pero al agotarse el sustrato alimenticio el hongo tiende a producir fructificaciones (conidióforos, esporangióforos, peritecios, uredos). Generalmente estos cuerpos se forman en el exterior de las lesiones o tiene una apertura en el exterior, de manera que las esporas son expuestas a los agentes de diseminación (lluvia, aire en movimiento). Sin embargo, ciertos patógenos, especialmente los del suelo, solo liberan sus propágulos cuando el tejido enfermo se desintegra. (Gonzales, 1985)

2.6 Generalidades del frijol.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano de mayor consumo en el mundo. Su mayor área de producción se encuentra concentrada en América Latina, donde se localiza cerca del 45% de la producción mundial, y representa, además, la región de mayor consumo del grano. Según datos de la FAO (2001), durante el año 2000 en América Central y México se sembraron alrededor de 2.334.425 ha de frijol, que registraron una producción de 1,433,316 ton. La producción de frijol es afectada por diferentes factores, tanto bióticos como abióticos, que reducen el área sembrada y los rendimientos esperados. Entre los factores bióticos, las enfermedades pueden causar enormes pérdidas en rendimiento dependiendo de las características de la población prevaleciente del patógeno, la variedad de frijol, las condiciones ambientales de la zona, y el sistema del cultivo practicado. Los eventos abióticos también pueden tener profundas repercusiones económicas y sociales. Por ejemplo, en 1998 el área sembrada de frijol en América Central fue severamente reducida por efecto del huracán Mitch y las necesidades de la semilla y grano comercial se hicieron sentir en toda la región. (Araya, 1999)

2.6.1 Programas fitosanitarios

De los cultivos alimenticios de importancia económica, el frijol es probablemente uno de los más afectados por enfermedades e insectos. En la mayoría de las áreas productoras, estos dos factores constituyen la principal causa de reducción del rendimiento. Se han descrito más de 200 patógenos que afectan la planta de frijol; muchos de ellos con la capacidad de infectar durante todo el ciclo del cultivo y, además, capaces de ser transmitidos y sobrevivir en la semilla.

Por la diversidad de ambientes donde el frijol es cultivado, la población de patógenos y la importancia económica de estos varía entre regiones, de acuerdo con las condiciones necesarias para el desarrollo de la enfermedad, el nivel de inóculo actual y residual en el campo, y la susceptibilidad de la variedad. En El Salvador, el frijol es cultivado en altitudes que van desde los 60 hasta 1500 msnm, lo que expone al cultivo a diversos factores que favorecen el ataque de patógenos. Las enfermedades fungosas más frecuentes son la mustia hilachosa o telaraña (*Thanatephorus cucumeris*), antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), pudriciones radicales causadas por *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y varias especies de *Fusarium*. Las enfermedades bacterianas más importantes son la bacteriosis o tizón común

(Xanthomonas campestris) y el anublo o tizón de halo (*Pseudomonas syringae*), mientras que el mosaico común y el mosaico dorado son las virosis más distribuidas en el país. (Araya, 1999)

El combate de enfermedades constituye el rubro más importante durante el ciclo del cultivo; sin embargo, por las limitaciones que sufre el pequeño productor no es posible dar un manejo adecuado y año tras año incurre en prácticas deficientes de manejo, que lo exponen a sufrir importantes pérdidas económicas.

Otro aspecto que en algunas regiones ha exacerbado el problema de las enfermedades es la susceptibilidad de los cultivares comerciales a la mayoría de los principales patógenos del frijol. Bajo estas circunstancias, enfatizar el manejo de las enfermedades únicamente con semilla certificada no es garantía de menor incidencia de patógenos. Para esto, es necesaria la aplicación de otras prácticas de manejo con el fin de mejorar la sanidad del cultivo y de esa manera los rendimientos

El manejo sostenible de enfermedades demanda el conocimiento de la agronomía del cultivo y de la biología de los patógenos. Las prácticas de control deben considerar el tipo de explotación, las condiciones ambientales, el historial del sitio de siembra y el destino del producto. El patosistema del frijol es muy variable por lo que su manejo requiere un seguimiento constante de los cambios a que se exponen los componentes. (Araya, 1999)

Los programas fitosanitarios son de suma importancia debido a que los cultivos de importancia económica como el frijol son atacados como se menciona por cientos de patógenos los cuales necesitan un manejo y control que vaya en función de minimizar las pérdidas y hoy se debe pensar también en los altos costos de pesticidas y agroquímicos, y además el manejo debe ir enfocado a ser amigable con el medio ambiente.

2.6.2 Principales enfermedades

Sin evadir la importancia de las pudriciones radicales, en términos generales, la mustia hilachosa, la antracnosis y la mancha angular son las enfermedades fungosas de mayor importancia en El Salvador. Las tres se encuentran presentes en las zonas frijoleras del país, atacando en diferentes niveles de severidad, en función de las condiciones climáticas prevalecientes en cada zona y de la época de siembra. No obstante, la mancha angular ha aumentado su incidencia y severidad en los últimos años. (Araya, 1999)

En el país las enfermedades mencionadas causan enormes daños en plantaciones completas de frijol, la mustia puede causar pérdidas hasta de un 80% lo que incide grandemente en la economía especialmente de pequeños agricultores que en la mayoría de casos combaten estas enfermedades con pesticidas, sin obtener resultados satisfactorios y por ende generando mayores pérdidas.

2.6.2.1 Mustia hilachosa o telaraña

La mustia hilachosa, conocida también como telaraña por los síntomas que produce, es una enfermedad seria en zonas cálidas y húmedas de los trópicos de América Latina y el Caribe. En algunas ocasiones, la enfermedad se presenta en zonas cercanas a los 1200 msnm, particularmente en época lluviosa. Ataca en cualquier estado de desarrollo de la planta y causa severa necrosis del follaje y las vainas.

Las lesiones iniciales aparecen en las hojas primarias, como manchas necróticas de 5-10 mm, con centros pardos y bordes verde claro. En condiciones de alta humedad y temperatura cálida, estas lesiones crecen en forma irregular y rápidamente coalescen. Las lesiones pueden abarcar todo el follaje; las hojas infectadas se cubren de micelio y se producen pequeños esclerocios. Las condiciones secas detienen el desarrollo de la enfermedad.

La enfermedad es causada por el hongo *Tanatephorus cucumeris*, cuyo estado anamórfico es *Rhizoctonia solani*. Este patógeno es un hongo del suelo con amplia distribución en el mundo y con una amplia gama de hospedantes. *T. cucumeris* posee hifas septadas de paredes delgadas, de 5-7 micras de ancho. Los basidios tienen forma de barril, son blancos de forma oblonga y se forman sobre una capa membranosa de micelio y tiene

cuatro esterigmas, cada uno de los cuales produce una basidiospora hialina, de pared delgada lisa y de forma elipsoidal (Agrios).

Su variabilidad de patogenicidad se ha clasificado en grupos de anastomosis - AG, por sus siglas en inglés. Hasta 1987 habían sido identificados 12 AG, los cuales no han mostrado especificidad en cuanto al hospedante; sin embargo, AG1, AG2-1, AG2-2, AG3 y AG4 se han aislado de raíces y follaje de frijol.

Rhizoctonia solani puede sobrevivir en forma de micelio o micro esclerocios en residuos de cosecha o en hospedantes alternos y representa la principal fuente de inóculo. En la época lluviosa, el inóculo es depositado sobre el follaje de la planta por medio del salpique; así, la severidad del ataque está relacionado con el nivel de inóculo inicial y las condiciones ambientales favorables (temperatura $>25^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa superior a 80%). (Araya, 1999)

Este hongo causa muerte escalonada de la planta, iniciando la muerte en la raíz y subiendo paulatinamente sin que muchas veces el productor note la existencia de esta enfermedad, si la mustia ataca antes de que la planta llegue a la floración seguramente perderá todos los frutos, si es que no se controla a tiempo.

2.6.2.2 Antracnosis

La antracnosis es la enfermedad más destructiva del frijol que se siembra en zonas a más de 1000 msnm, con temperaturas entre 13 y 26°C y alta humedad relativa, sobre todo en regiones con cortos períodos de neblina. No obstante, en El Salvador se encuentra diseminada en casi todo el país. Es ocasionada por el hongo ***Colletotrichum lindemuthianum***. El patógeno tiene la capacidad de infectar desde que se inicia la germinación hasta el estado de madurez fisiológica e incluso a la semilla (Araya 1989).

Colletotrichum lindemuthianum produce lesiones necróticas, húmedas y ligeramente hundidas en el tallo y los pecíolos. En las hojas se observa necrosis a lo largo de las venas primarias y secundarias. Los síntomas más evidentes se encuentran en las vainas, donde se producen lesiones necróticas, redondas y hundidas, desde donde el hongo puede alcanzar

los tejidos de la semilla e infectarla, causándole deformaciones y decoloraciones al tegumento.

Las pérdidas ocasionadas por la antracnosis son elevadas, no sólo en plantaciones comerciales, sino también en lotes productores de semilla. En el primer caso si la infección ocurre durante la primera semana después de la emergencia las pérdidas pueden llegar a 95%. En lotes productores de semilla, la antracnosis ha sido históricamente una de las primeras causas de rechazo (Araya 1989).

Las poblaciones de *Colletotrichum lindemuthianum* presentan una amplia variación patogénica. Estudios realizados con aislamientos centroamericanos demostraron que la variación patogénica en esta región es totalmente diferente y mayor a la descrita previamente para otros países (Araya). Además esta variabilidad es inestable; en los últimos 10 años ha aumentado y únicamente las razas 9, 73, 129, 457, 1033, 1417 y 1993, sobrevivieron en el campo durante la década (Araya).

La capacidad de sobrevivencia es otra característica que incide en el desarrollo de epifitias. El hongo puede sobrevivir en residuos de cosecha o en semilla. En el primer caso, lo hace en forma de esporas o de micelio en los restos de plantas u hojas infectadas que permanecen en el campo después de la cosecha. Actualmente, no se tiene información precisa del tiempo de sobrevivencia en condiciones tropicales, pero por no ser un habitante del suelo, su viabilidad está sujeta al tiempo de descomposición de los residuos de cosecha. La semilla representa el principal medio de diseminación a largas distancias y de sobrevivencia por largos períodos de tiempo (Araya 1999).

2.6.2.3 Mancha angular

En los últimos años esta enfermedad ha alcanzado niveles epifitóticos en las zona frijoleras de El Salvador y en general, en la región centroamericana. Se presenta con mayor severidad en condiciones de temperatura entre 16 y 28°C. La planta es susceptible durante todo su período de crecimiento, pero en el campo se observan síntomas severos después de la sexta semana de la siembra. La vaina también es afectada y la semilla puede transmitir el patógeno.

Hifas de color oliváceo y septadas. Los conidióforos son simples, de color marrón pálido a marrón, lisos y septados, con una ligera dilatación en el ápice. Las conidias son redondeadas en el ápice y truncadas en la base, de color marrón pálido oliváceo, con 2-6 septos y miden 35-70 x 5-7,5 μm . (Ávila)

Isariopsis griseola puede sobrevivir en residuos de cosecha y en semilla. La capacidad de transmisión por semilla es relativamente baja (menor de 2%) y su efecto como fuente de inóculo es reducido, sobre todo considerando que es un patógeno de follaje y que la planta no es susceptible en las primeras etapas de desarrollo. Esta enfermedad fue de importancia secundaria y se trabajó muy poco en mejoramiento para la incorporación de resistencia y en el seguimiento a sus poblaciones naturales, lo que probablemente, influyó en su desarrollo violento y amplia distribución geográfica a partir de mediados de la década de los 90.

Las lesiones en el follaje son más abundantes durante y después de floración. Inicialmente, las lesiones son grises o pardas, con márgenes definidos; aproximadamente nueve días después de la infección las lesiones se tornan necróticas y bien definidas, con la forma angular típica. Más avanzado el ataque puede ocurrir coalescencia de lesiones, clorosis foliar y defoliación prematura.

I. griseola presenta amplia variabilidad patogénica. En América Central se han identificado 37 razas con base en el análisis de 70 aislamientos. La evaluación preliminar de su patogenicidad indicó que las poblaciones centroamericanas del patógeno son más agresivas que las de otras regiones. (Araya, 1999)

2.6.2.4 Pudriciones radicales

Las pudriciones radicales son causadas por un complejo de hongos del suelo y aparecen distribuidas en parches en el campo. La siembra continua, la compactación del suelo y el manejo inadecuado del avenamiento, son algunos de los factores que han contribuido a la presencia de este problema. Las pérdidas que ocasionan pueden ser elevadas y variar de un lote a otro, o en el mismo lote de un año al otro. Es quizá por este comportamiento variable que no se cuenta con datos precisos de pérdidas en la población de plantas y en la producción. (Araya, 1999)

Dentro de las enfermedades la pudrición radical es muchas veces causada no por patógenos necesariamente sino por condiciones topográficas o errores en el manejo del cultivo, sin embargo tiene alta incidencia por lo que se hace necesario su estudio.

2.6.2.5 *Fusarium sp*

Los miembros de este género son típicamente fitopatógenos e incluyen más de 100 patotipos. Es saprobio en una amplia variedad de suelos. Aunque la viabilidad de sus esporas se reduce con la profundidad del suelo, se conoce que puede permanecer a profundidades cercanas a los 50 cm. Requiere elevada humedad para desarrollarse. In vitro, esporula bien sobre sustratos ricos en almidón y manitol. Algunas cepas, que provienen de suelos ácidos, presentan actividad solubilizadora de fosfato de calcio en medio de cultivo (Vera)

Presenta una amplia distribución mundial. Es muy común en los suelos cultivados a diferencia de los suelos forestales. Su presencia se asocia más a suelos neutros y ligeramente ácidos. (Vera)

Colonia de color blanco con tonos violeta, que a medida que envejece se tornan más fuertes. Reverso de la colonia de color rosado pálido. Luego de 4 días de crecimiento en agar el diámetro de la colonia es de 5,4 cm, Microconidios abundantes, con un tamaño de 8,7-12,5 x 2,5-3,1 μm , con uno a dos septos, ligeramente curvados, con extremos redondeados a truncados. Macroconidios fusiformes, de 24-25 x 3-3,5 μm , ligeramente curvados, con 4 a 5 septos. Fiálides en su mayoría cortas. Clamidosporas presentes y abundantes, tanto apicales como intercalares, de 12,5 a 16 μm , de tono más oscuro que la hifa portadora. (Vera)

2.6.2.6 *Pythium sp*

El ***Pythium*** es un hongo parásito, destructor de las raíces. En condiciones favorables, el ***Pythium*** se multiplica con gran rapidez y libera esporas microscópicas que infectan las raíces y no permiten que reciban alimento. Ataca principalmente a semillas y plantas que aún tienen poca resistencia a las enfermedades. Las plantas más grandes son más

resistentes aunque también se vean afectadas, pero si se detecta en una fase primaria podrán ser tratadas y salvadas, a pesar de que la cosecha se verá definitivamente afectada. (http://www.eurohydro.com/pdf/articles/sp_pythium.pdf)

Como otros hongos, **Pythium** está en cualquier parte del entorno de la planta, y atacará prácticamente a todas las plantas. Las mejores condiciones para su desarrollo son los altos niveles de humedad y las temperaturas entre 20 y 30°C. Es una espora de hongo que vive en el aire y en el agua, y que se presentará en tu lugar de cultivo sin importarle lo limpio que esté. (http://www.eurohydro.com/pdf/articles/sp_pythium.pdf)

Pythium, como otros géneros de la familia **Pythiaceae**, se caracterizan por la producción de hifas cenocíticas (sin septos) generalmente contienen una única, contienen un anteridio alargado.

A menudo se describe el **Pythium** como una “infección secundaria”, porque sólo ataca la planta cuando ésta ya ha comenzado a deteriorarse, en condiciones de cultivo que no son las mejores. Se aprovecha de tejidos enfermos o con heridas para colonizar las raíces y causar putrefacción y descomposición de las mismas. (http://www.eurohydro.com/pdf/articles/sp_pythium.pdf)

Ante un ataque de **Pythium** por lo general las semillas infectadas se tornarán blandas, pastosas y negras, y luego morirán. Los plantones tendrán tallos muy húmedos y se colapsarán. Aparentemente sin razón, plantas ya crecidas y plantas madres comenzarán a marchitarse y cogerán un color amarillento (que a menudo se identifica erróneamente como una deficiencia nutricional), y a veces las hojas tenderán a enrollarse hacia abajo. Las plantas tendrán un crecimiento pobre y el rendimiento se reducirá; hasta se puede llegar a una pérdida de toda la cosecha. (http://www.eurohydro.com/pdf/articles/sp_pythium.pdf)

No es fácil detener un ataque de **Pythium** a tiempo, especialmente cuando se cultiva en suelo, ya que los primeros síntomas de estrés en la planta no aparecen inmediatamente en la parte que está sobre la tierra. Sólo después de algunos días las plantas se verán tristes. Pero en el ámbito de las raíces el juego ya ha comenzado hace tiempo. (http://www.eurohydro.com/pdf/articles/sp_pythium.pdf)

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación geográfica del lugar de estudios.

El presente trabajo se llevo a cabo durante los meses de Septiembre de 2009 a Diciembre de 2010 en el municipio de Santiago Texacuangos, departamento de San Salvador, El Salvador, C.A, ubicado a 15 Km. de San Salvador y está localizado entre las coordenadas septentrional $13^{\circ}40'39''$ latitud norte, meridional $13^{\circ}36'17''$ latitud norte, oriental $89^{\circ}04'40''$ longitud oeste y occidental $89^{\circ}07'47''$ longitud oeste.

La altitud referente sobre el nivel del mar es de 780 metros, pero se encuentran sitios que van desde los 478 metros a los 934 metros sobre el nivel del mar.

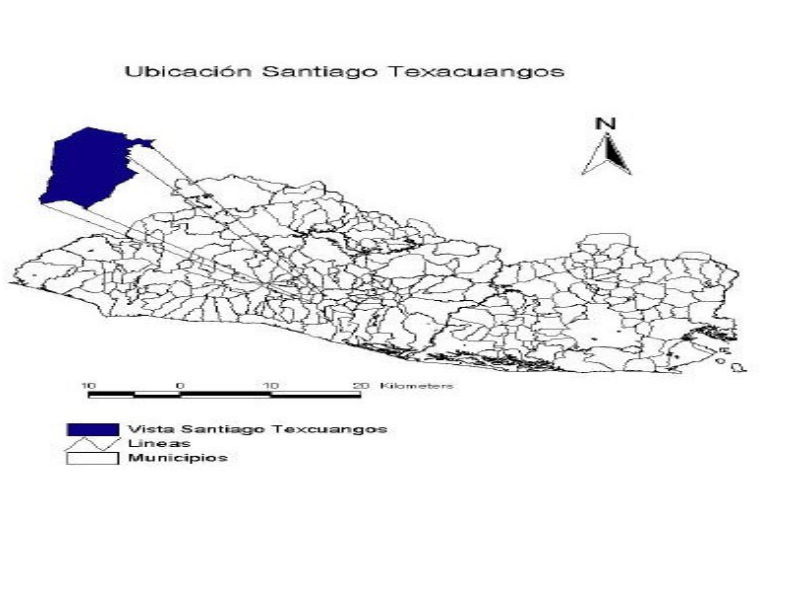
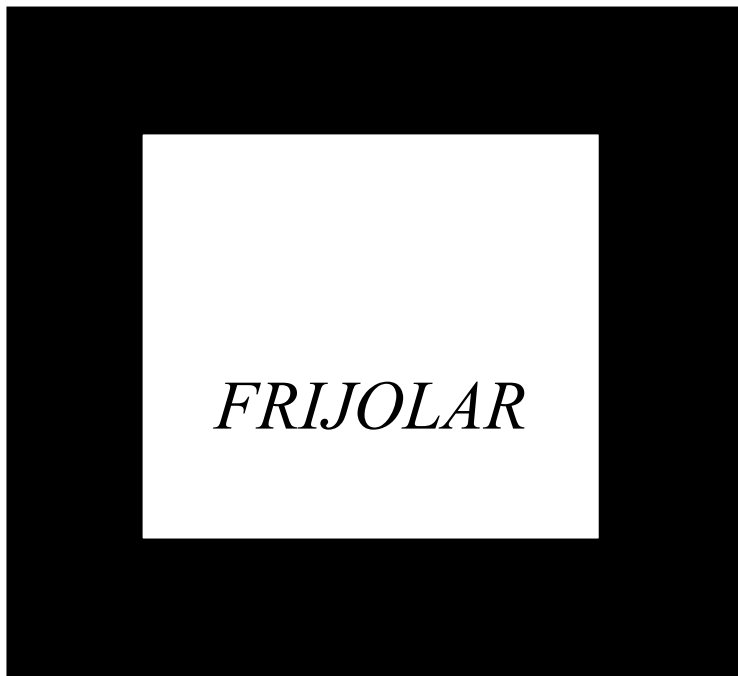


Figura 1. Mapa de ubicación del municipio de Santiago Texacuangos

3.2 Metodología de campo.

En esta fase se realizaron tres muestreos en la zona delimitada cada 15 días, los muestreos se hicieron en horas tempranas de la mañana se discriminaron las muestras en base a la observación de síntomas de enfermedades (A1). El procedimiento y el proceso que se siguió en esta fase se detallan a continuación:

1. Identificación de las zonas a muestrear, con pequeños agricultores y tierras con vocación para el cultivo de frijol y con antecedentes de ataque de enfermedades.
2. Etapa de muestreo la cual se detalla a continuación.
 - 2.1 Ubicación del área a muestrear la cual se determino al azar y en los alrededores del sitio de siembra.
 - 2.2 Determinación del área a muestrear, que en este caso fue de un décimo (1/10) del área designada al cultivo de frijol, áreas que se encontraban en el rango de los 250 y 500 metros cuadrados.



Esquema de representación del área a muestrear, donde la parte central constituye la zona cultivada con frijol y la parte sombreada de color negro representa el área donde se realizaron los muestreos.

2.3 Muestreo el cual se realizo lanzando un marco de madera de 1 metro cuadrado sobre la superficie del área determinada al azar y tomando en cuenta en cada lanzamiento los siguientes aspectos: porcentaje de cobertura vegetal, número de especies.

3.3 Metodología de Laboratorio.

3.3.1 Identificación de hospederos alternos.

La vegetación espontánea fue identificada con la ayuda del Departamento de Biología de la Universidad de El Salvador y también se utilizo el libro titulado “Malezas Tropicales” en el que se observó y se compararon las malezas encontradas en los muestreos.

3.3.2 Procesamiento de las muestras y análisis microscópico. Con las muestras obtenidas en campo se procedió a utilizar la técnica del macerado para identificar posibles patógenos alojados en las muestras. La técnica de macerado se llevo a cabo de la siguiente manera:

- Se cortaron trozos de 1 cm² de las muestras a utilizar y se maceraron para luego pasar la muestra ya macerada a una porta objeto con una gota de agua estéril y así poder observar al microscopio.
- Se procesaron 10 muestras por especie tomando tejido de órganos aéreos (hojas). Dichas muestras previamente fueron discriminadas por la presencia de síntomas como manchas localizadas, generalizadas, marchitamiento o necrosis. (A.10)

3.3.3 Aislamiento de patógenos. Al identificar el patógeno se procedió con el aislamiento llevando a cabo los siguientes pasos:

- Cortar en trozos de 1 cm² el tejido vegetal enfermo
- Pasarlo por hipoclorito de sodio (lejía) durante 1-2 minutos.
- Lavar los trozos de material con agua destilada estéril
- Colocarlos en una caja petri con medio de cultivo (Caseína Peptona Agar)

- Sellado de la caja de petri para evitar entrada de patógenos o insectos y rotulado de la caja.
- Incubación de patógenos a temperatura ambiente.

Los hongos se identificaron utilizando literatura especializada tales como “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” de Barnett y “Plant Pathology” de Agrios y por medio de la asesoría de fitopatólogos de la Facultad de Ciencias Agronómicas

3.3.4 Multiplicación de patógenos. Repique para la obtención de cultivo puro del patógeno.

- En las cajas de petri se procedió a hacer repique a otra caja de petri con medio de cultivo para obtener el patógeno purificado, dentro de una cámara de flujo laminar y con las medidas asépticas pertinentes.
- Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente.

3.3.5 Prueba de patogenicidad in Vitro.

Para la realización de dicha prueba se utilizó un diseño de parcelas divididas, en el cual se midió la interacción de dos factores: variedades de frijol y los dos patógenos encontrados durante el trabajo en el laboratorio.

El procedimiento para el montaje del ensayo fue el siguiente:

- Esterilización de insumos y materiales.
- Se esterilizo en el autoclave el sustrato (suelo), los instrumentos (cajas de petri, pipetas, erlenmeyer, tubos de ensayo).
- Desinfección de las semillas de las dos variedades, pasándolas por hipoclorito de sodio al 5% durante un minuto y luego reposadas en agua destilada estéril para eliminar el hipoclorito de sodio.

3.3.6 Montaje del experimento

- Se utilizaron 40 cajas Petri estériles.
- En cada caja de petri se colocaron 60 gramos de suelo estéril.
- Luego se sembraron 2 semillas por cada caja de petri, según la variedad correspondiente a la parcela en el diseño.(A.8)
- Se inoculo el patógeno correspondiente a cada parcela en el diseño, depositando con una pipeta sobre las semillas 1 mililitro de la solución, cuya dosis se estableció de la siguiente forma:

En primer lugar se estableció una solución stock o solución madre la cual fue producto de la mezcla de porciones de micelio de los patógenos en cuestión en 10 ml de agua destilada estéril luego de tener la solución stock de *Fusarium* y *Pythium* por separado se procedió a realizar las diluciones de cada una de las soluciones; dichas diluciones resultan de tomar 1 ml de la solución stock (Ver A.5) y mezclarla con 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo (1:10); seguido de esto se tomo 1 ml de la solución 1:10 y se siguió el mismo procedimiento anterior para tener dilución siguiente (1:100) y por último se repitió el proceso para obtener la dilución 1:1000.

De cada una de las diluciones se colocó 1ml en caja de petri estéril, agregándole medio de cultivo, a 45°C para evitar su solidificación y muerte del hongo.

Después de realizar el conteo de cada dilución vertida se estableció, que la dilución 1:10 fue la que mayor UFC por lo que se decidió que fuera esta la dosis con la que se inocularía durante la prueba de patogenicidad. (A.5)

La dosis a utilizar para *Fusarium sp* fue de 640 UFC/ ml de acuerdo al promedio obtenido de las diluciones y en el caso de *Phytium sp* la dosis según el promedio obtenido fue de 970 UFC/ ml. (A.5)

3.3.7 Incidencia de la enfermedad.

- Para medir la incidencia se tomaron dos datos, germinación y crecimiento de la plántula.
- Para medir la incidencia en la germinación, se observó al tercer día después del montaje las semillas germinadas y las no germinadas.(A.6)
- Para medir la incidencia en el crecimiento de la plántula se midió cada planta germinada cinco días después de la primera toma de datos.(A.7)

3.4 Metodología Estadística.

Para determinar la fitopatogenicidad de los fitopatógenos en las variedades Rojo de Seda y CENTA Pipil, se utilizó un diseño de parcelas divididas siendo las parcelas grandes las variedades y las parcelas pequeñas la inoculación de los patógenos, siendo la unidad experimental la caja de Petri con sustrato y las semillas de cada variedad sembradas en esta. (A. 8)

Se realizaron cuatro tratamientos que se detallan a continuación:

T1: Variedad CENTA Pipil mas ***Fusarium***

T2: Variedad CENTA Pipil mas ***Pythium***

T3: Variedad Rojo de Seda mas ***Fusarium***

T4: Variedad Rojo de Seda mas ***Pythium***

Se sembraron dos semillas en cada caja Petri y se hicieron 5 repeticiones de cada tratamiento.

Y para el procesamiento y análisis de los datos se utilizó en programa o sistema de computadora SAS.

4. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

4.1 Identificación de la vegetación espontanea.

Los resultados de la investigación determinaron la presencia de vegetación espontánea alrededor de los seis frijolares muestreados, que servían de hospederos alternos de fitopatógenos que ocasionan enfermedades en el cultivo del frijol, según lo describe Agrios 2001 y Love 2000.

Se encontraron diferentes especies de vegetación espontánea que se identificaron como: ***Euforbia hirta***, conocida como pishca la cual es una maleza herbácea anual con raíz pivotante posee tallo semi erecto ramificado pubescente, hojas opuestas lanceoladas cortamente pecioladas, inflorescencia consiste en cabezuela axilar con flores pequeñas que se tornan rojizas; ***Ipomea nuli***, campanilla es una maleza parasítica común desarrolla raíces únicamente durante los primeros estados de crecimiento, tallo delgado en forma de hilo glabro ramificado herbácea cilíndrico y forma masas densas, hoja acorazonada con lóbulos discretos no acuminados flores pequeñas color lila o rosadas; ***Rottboellia exaltata***, zacate de río pasto perenne raíz fibrosa con tallo erecto pubescente, hojas lineales lanceoladas inflorescencia es una panícula se reproduce por semilla y vegetativamente; ***Irecine calea***, bejuquillo planta herbácea anual con raíz pivotante, tallo carnoso con hojas lineales lanceoladas de 5 a 10 centímetros de longitud, inflorescencia densa acuminada, flores hermafroditas rosadas o blancas; ***Stilosanti sp***, centavito pertenece a la familia de las leguminosas posee raíz pivotante, tallo herbáceo ramificado, hojas pinano compuestas con foliolos glabros opuestas y en pares, flores axilares amarillas. (Cárdenas 1972). (A.2)

Se encontraron otras especies de vegetación espontánea como ***Lantana camara***, cinco negritos; ***Melanthera sp***, botoncillo; ***Verbesina encelioides***, flor amarilla; y ***Cyperus rotundus***, coyolillo; las cuales no presentaron ningún síntoma que pudiera sospecharse como causado por fitopatógenos.

4.2 Identificación de los patógenos.

Al realizar análisis macro y microscópicos de la vegetación encontrada, se determinó la presencia de ***Pythium sp*** y ***Fusarium sp*** que se consideran patógenos de diferentes cultivos entre los cuales se encuentra el frijol (***Phaseolus vulgaris L.***) como lo reporta Vera 2007. (A.3)

Los hongos se presentaron de la siguiente manera: *Pythium* y *Fusarium* se encontraron en *E. hirta*, *Fusarium sp* en *I. nuli*, y *I. calea*; y en *Stilosanti sp* y *R. exaltata* se encontró solo *Pythium sp*.

Las muestras vegetales analizadas, presentaron síntomas como clorosis en hojas con los bordes de estas arrugados, amarillamiento hasta necrosis generalizada. En algunos casos las plantas se encontraron con un halo amarillo y el centro necrótico también en otros casos se encontró una mancha café generalizada; estos síntomas se presentaron en todas las muestras vegetales.

Se describió el hongo *Fusarium sp* el cual se presenta un micelio algodonoso, de color blanco rosadoso, cuando crece en medio de cultivo. Al hacer el análisis microscópico, se observó micelio hialino, septado, muy ramificado, observándose además conidias de tres tipos, macroconidias multicelulares de forma curvadas, dando la apariencia de una canoa; microconidias unicelulares de forma ovalada, hialinas y también microconidias bicelulares que también poseían forma de canoas. Esta descripción coincide con la hecha por Barnett and Hunter 1972. (A.3)

El género *Pythium sp* en medio de cultivo se presenta como un micelio algodonoso, es un micelio de color blanco, en el análisis microscópico se observó un micelio cenocítico, hialino, con esporangios terminales formándose vesículas, coincidiendo con la descripción de Agrios 1978. (A.3)

4.3 Prueba de Patogenicidad

En la segunda etapa de la investigación, se procedió a determinar la patogenicidad de los hongos *Fusarium sp* y *Pythium sp*, en dos variedades de frijol el CENTA pipil y Rojo de Seda, que se siembran en la zona de estudio.

En primer lugar de determinaron los porcentajes de germinación observándose que en los diferentes tratamientos el hongo ejerció su acción sobre las plántulas recién emergidas en ambas variedades observándose pudrición radicular, lo que evitó su total germinación con lo cual se puede inferir que al sembrar en un campo en donde existen los hongos en estudio, puede darse un ataque pre emergente y pos emergente. (A.6, 7).

En el tratamiento CENTA Pipil con *Fusarium sp*, se observó que el porcentaje de germinación fue del 50%, es decir que la mitad de las semillas no llegaron a germinar adecuadamente por efecto del hongo, causándole a las raíces recién emergidas una pudrición pre emergente. En el tratamiento CENTA Pipil con *Pythium sp* el porcentaje de germinación fue de 60%, considerándose que el 40% de las semillas sembradas e inoculadas con el hongo no pudieron germinar adecuadamente. Los efectos del hongo son similares al de *Fusarium sp*, causándoles pudrición radical. (Fig. 2 y 3).



Figura 2. Resultado para el tratamiento Centa pipil con *Fusarium sp*.



Figura 3. Resultado para el tratamiento Centa pipil con *Pythium sp*.

En el tratamiento Rojo de Seda inoculado con *Fusarium sp* se observa que el 60% de las semillas fueron afectadas en su germinación y en el tratamiento de Rojo de Seda con

Pythium sp el 85% de las semillas fueron afectadas en la germinación debido a la pudrición radical observada en las semillas recién emergidas. (Fig. 4 y 5).



Figura 4. Resultado para el tratamiento Rojo de seda con ***Fusarium sp.***



Figura 5. Resultado para el tratamiento Rojo de seda con ***Pythium sp.***

Efecto de *Fusarium sp* y *Pythium sp* en plántulas de frijol CENTA Pipil y Rojo de Seda.

Después de cinco días de realizada la primera toma de datos del ensayo, las plantas que sobrevivieron al ataque de los hongos durante el proceso de germinación, mostraron el siguiente comportamiento: en el tratamiento CENTA Pipil con *Fusarium sp*. el porcentaje de plantas enfermas fue de 42% habiéndose observado mal del talluelo en las plantas afectadas. (Fig. 6).

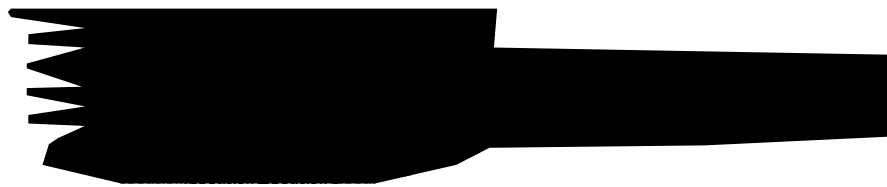


Figura 6. Resultado para el tratamiento Centa pipil con *Fusarium sp*.

Para el caso de CENTA Pipil con *Pythium sp* se observó que en promedio el 33% se enfermaron, pudiéndose inferir que fueron un poco más resistentes al ataque del hongo. (Fig.7).



Figura 7. Resultado para el tratamiento Centa pipil con *Pythium sp.*

En cuanto a la variedad Rojo de Seda inoculadas con *Fusarium sp.*, estas dieron como resultado en un promedio 33% de plantas enfermas las cuales manifestaron síntomas del mal del talluelo. (Fig. 8).



Figura 8. Resultado para el tratamiento Rojo de seda con *Fusarium sp.*

En el caso de la variedad Rojo de Seda inoculada con *Pythium sp.* se obtuvo un 47% de plántulas enfermas con síntomas del mal del talluelo. (Fig. 9).

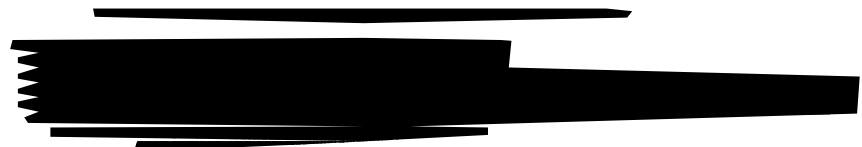


Figura 9. Resultado para el tratamiento Rojo de seda con *Pythium sp.*

Estos datos determinan que comparando los promedios de los porcentajes de germinación y de plántulas afectadas por los hongos del estudio, las variedades se han comportado similarmente. (Fig. 6,7, y 8).

4.4 Pruebas de significancia estadística. Sistema SAS.

Luego de haber realizadas todas las etapas de la investigación, se procedió a procesar los datos obtenidos de la prueba de patogenicidad in vitro, utilizando el programa computacional SAS (A.11) los cuales se presentan a continuación:

Según la prueba de significancia de Tukey, se puede concluir que existe diferencia significativa en cuanto al porcentaje de germinación, siendo la variedad más susceptible Rojo de Seda, por lo tanto la variedad CENTA Pipil puede sobrevivir al ataque de hongos *Fusarium sp* y *Pythium sp* que son hongos que se encuentran presentes en los hospederos alternos en los alrededores de los terrenos de siembra y hospedados en vegetación espontánea. (A12)

Las otras pruebas de significancia en cuanto al porcentaje de plantas dañadas, acción de los agentes patógenos sobre las variedades CENTA Pipil y Rojo de Seda no mostraron diferencias significativas.

5. CONCLUSIONES

1. La presencia de vegetación espontánea en los alrededores de los campos de siembra del cultivo del frijol, constituyen un foco de infección de patógenos causantes de enfermedades en el cultivo, principalmente de hongos del suelo como *Fusarium sp* y *Pythium sp* que causan serios daños de pudriciones radiculares y del tallo.
2. Las especies encontradas hospedando a los hongos *Fusarium sp* y *Pythium sp* son las siguientes: pishca *Euforbia hirta*, campanilla *Ipomea nuli*, bejuquillo *Irecine calea*, zacate de río *Rottboellia exaltata*, y centavito *Stilosanti sp*. Causando enfermedades radiculares en el frijol.
3. Se debe tener atención al manejo de las malezas en los campos de cultivo del frijol y en todos los cultivos en general.

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones a nivel de invernadero y de campo para determinar la presencia de otros patógenos hospedados en otras malezas o vegetación espontánea presentes en los terrenos de siembra del cultivo del frijol.
2. Desarrollar programas de manejo integrado de plagas que incluya el componente de malezas como problemas causantes de plagas en el cultivo del frijol.

7. BIBLIOGRAFIA.

1. Agrios, GN. 2001. Fitopatología. 2° Ed. México, Limusa. p. 513-515.
2. Agrios, G.N. Plant Pathology. 1978. 2ª Ed. Academic Press. New York USA.209 p.
3. Alexopoulos, JC.; Mims, CW. 1979. Introductory Mycology.3° Ed. Estados Unidos, Wiley and Sons. 569 p.
4. Araya, C. 1999. Estatus de las principales enfermedades del cultivo de frijol, y posibilidades organizativas para su manejo integrado. CATIE. <http://web.catie.ac.cr/informacion/Rmip/rmip55/art2-b.htm>.
5. Ávila Campos, J. 1987. Enfermedades del frijol. Trillas. México. 19-31 p.
6. Barnett, H.L. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 1972. 3ª Ed. Burgess Publishing, Minnesota USA. 216 p.
7. Bustamante, E; Rivas, G. 1998. Elementos e importancia del diagnostico de problemas fitosanitarios. CATIE. <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip52/nbusta-3.htm>
8. Cárdenas, J. 1972. Malezas Tropicales. 1º ed. Comalfi. México 51-187 p.

9. Carpenter, P.L. 1977. Microbiología. 2º Ed. Interamericana. Estados Unidos.
10. Crop knowledge Máster, Internet.
11. Finch, H.C. 1974. Los Hongos Comunes que Atacan Cultivos en América Latina. Editorial Trillas. 1º ed. 58, 116 p.
12. Fitchner, E. s.a ***Sclerotium rolfsii*** Sacc. Kudzu of the fungal world. Internet.
13. Gonzales, L.C. 1985. Introducción a la Fitopatología. IICA. 1ª ed. Costa Rica. 65- 92 p
14. Lagos, J.A. 1987. Compendio de Botánica Sistemática. 3º Ed. Dirección de Publicaciones e Impresiones del ministerio de Cultura y Comunicación. San Salvador, El Salvador.
15. Love, J; Beckerman, J. 2002. Southern Blight of Veggies and Herbaceous Plant. 2º Ed. Estados Unidos, Minchster. P. 206-210.
16. Smallwood, W.L. 1970. Biología. 1º Ed. Publicaciones Cultural. México.
17. Vera D., Peña Venegas C., Cardona Vanegas G. 2007. ***Fusarium sp.*** Link 1809. <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=535&method=displayAT>
18. Wikimanager of Gardening. ***Sclerotium rolfsii***. Internet.

19. Wikipedia. The Free Encyclopedia. Internet.

20. http://www.eurohydro.com/pdf/articles/sp_pythium.pdf

8. ANEXOS

A.1. Cuadros promedio de presencia de malezas en muestreos de campo.

Malezas	% Presencia		
	1° Muestreo	2° Muestreo	3° Muestreo
Campanilla	70	70	90
Zacate de rio	100	50	70
Pishca	90	80	70
Bejuquillo	80	90	100
Cinco Negritos	70	60	70
Coyolillo	60	40	100
Flor amarilla	70	80	70
Centavito	80	100	80
Botoncillo	10	40	50

A.2. Vegetación espontánea encontrada en campos de siembra del cultivo de frijol en Cantón Shaltipa, Santiago Texacuangos, San Salvador.

- a) Pishca ***Euforbia hirta***, b) campanilla ***Ipomoea nuli***, c) Bejuquillo ***Irecine calea***, d) Zacate de río ***Rottboellia exaltata***, e) Centavito ***Stilosanti sp***



b)
Ipomoea nuli



a)
ia hirta

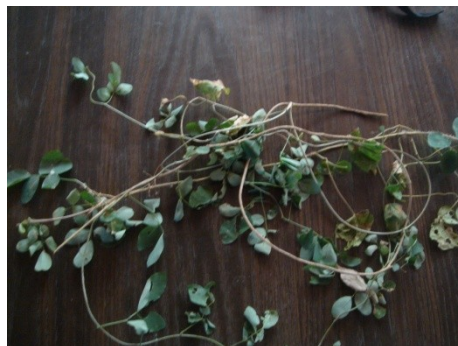
Eufor
b)



c) ***Irecine calea***



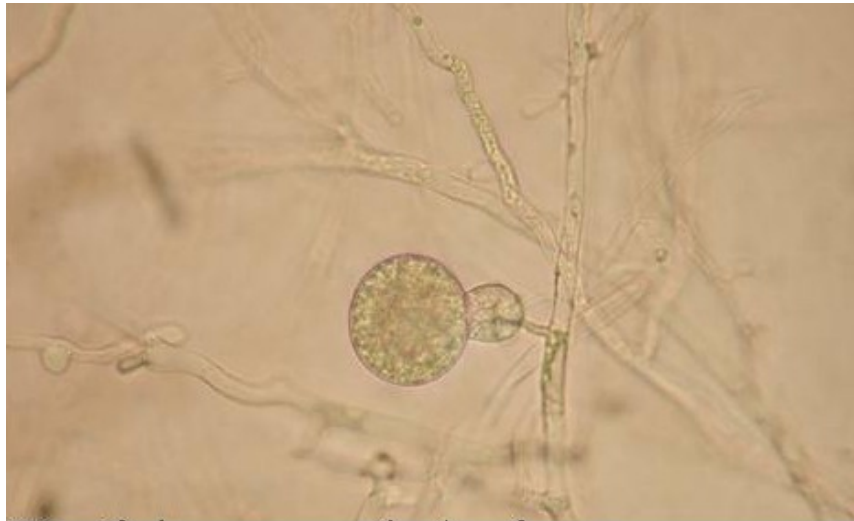
d) ***Rottboellia exaltata***



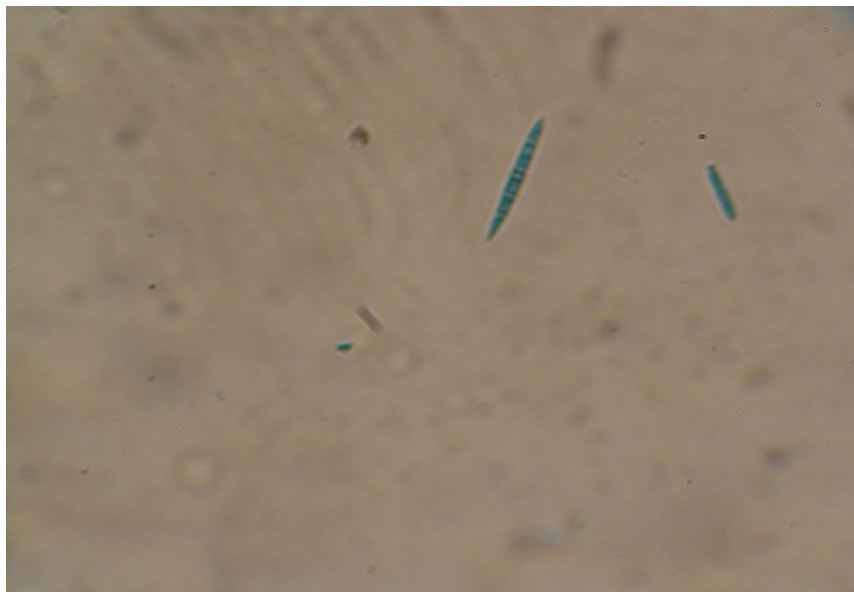
e) *Stilosanti sp*

A.3. Hongos encontrados hospedados en vegetación espontanea de un terreno de siembra de cultivo de frijol en Cantón Shaltipa de Santiago Texacuangos, San Salvador.

- a) *Phytium sp* con esporangio y vesícula b) *Fusarium sp* con macroconidias y microconidias



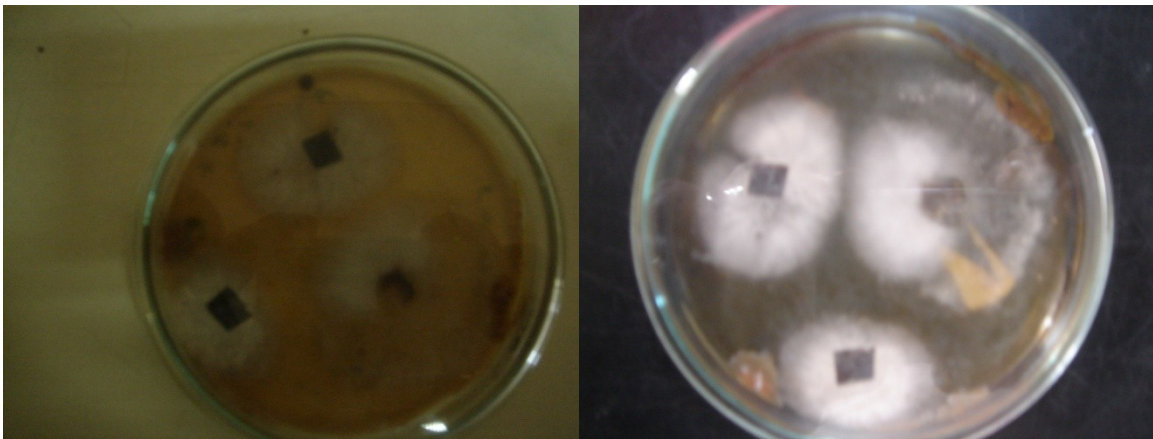
a) *Phytium sp* vista en el microscopio



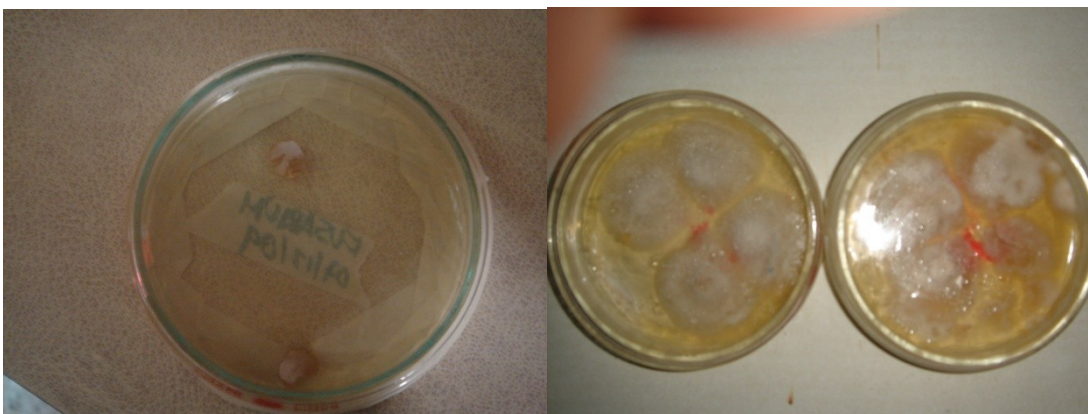
b) *Fusarium sp* vista en el microscopio

A.4. Cultivos puros de hongos fitopatogenos en medio de cultivo Caseína Peptona Agar aislados de Vegetación espontanea. a) *Pythium sp*, b) *Fusarium sp*

a) Cultivo puro de *Pythium sp*.



b) Cultivo puro de *Fusarium sp*



A.5. Dilución por el método de Placa Vertida para determinar la dosis de inoculación de hongos *Fusarium sp* y *Pythium sp*.



A.6. Cuadro de Porcentaje de plantas dañadas durante la germinación de la variedad CENTA pipil y Rojo de Seda inoculados con *Fusarium sp* y *Pythium sp* respectivamente.

Tratamiento	Numero de repetición.	Porcentaje de germinación	Porcentaje de no germinación
T1.Centa pipil <i>Fusariumsp</i>	x1	25	75
	2	50	50
	3	100	0
	4	25	75
	5	50	50
T2.Centa pipil <i>Pythiumsp</i>	x1	75	25
	2	50	50
	3	75	25
	4	75	25
	5	25	75
T3.Rojo de seda <i>Fusarium sp</i>	x1	25	75
	2	0	100
	3	75	25
	4	50	50
	5	50	50
T.4Rojo de seda <i>Pythiumsp</i>	x1	25	75
	2	0	100
	3	25	75
	4	25	75
	5	0	100

A.7. Cuadro de Plantas dañadas de la variedad CENTA pipil y Rojo de Seda inoculados con *Fusarium sp* y *Pythium sp* respectivamente.

Tratamiento	Numero de repetición	Porcentaje de plántulas dañadas	Porcentaje de plántulas sanas
T1.Centa pipil <i>Fusarium sp</i>	x1	33	67
	2	50	50
	3	25	75
	4	100	0
	5	0	100
T2.Centa pipil <i>Pythium sp</i>	x1	25	75
	2	67	33
	3	0	100
	4	25	75
	5	50	50
T.3Rojo de seda <i>Fusarium sp</i>	x1	33	67
	2	0	100
	3	50	50
	4	33	67
	5	50	50
T4.Rojo de seda <i>Pythium sp</i>	x1	50	50
	2	0	100
	3	33	67
	4	50	50
	5	100	0

A.8. Montaje de ensayo (prueba de patogenicidad in vitro) laboratorio de Microbiología
Facultad de Ciencias Agronómicas.



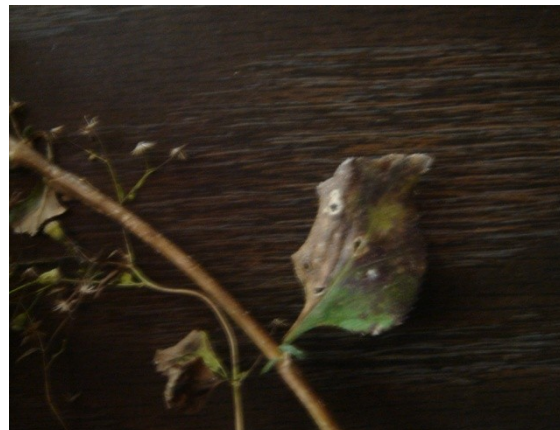
A.9. Toma de datos de germinación de *Fusarium sp* y *Pythium sp* en laboratorio.



A.10. Hojas con manchas localizadas generalizadas con necrosis de *I. calea* y *E.hirta* respectivamente.



a) *I. calea*



b) *E.hirta*

A.11. Resultados íntegros obtenidos del sistema computacional SAS.

Observaciones	Frijol	Hongo	Planta germinadas (pg)	Plantas no germinadas (png)	Porcentaje de plantas dañadas (ppd)	Porcentaje de plantas sanas (pps)
1	C. pipil	<i>Fusarium</i>	25	75	33	67
2	C. pipil	<i>Fusarium</i>	50	50	50	50
3	C. pipil	<i>Fusarium</i>	100	0	25	75
4	C. pipil	<i>Fusarium</i>	25	75	100	0
5	C. pipil	<i>Fusarium</i>	50	50	0	100
6	C. pipil	<i>Pythium</i>	75	25	25	75
7	C. pipil	<i>Pythium</i>	50	50	67	33
8	C. pipil	<i>Pythium</i>	75	25	0	100
9	C. pipil	<i>Pythium</i>	75	25	25	75
10	C. pipil	<i>Pythium</i>	25	75	50	50
11	R. seda	<i>Fusarium</i>	25	75	33	67
12	R. seda	<i>Fusarium</i>	0	100	0	0
13	R. seda	<i>Fusarium</i>	75	25	50	50
14	R. seda	<i>Fusarium</i>	50	50	33	67
15	R. seda	<i>Fusarium</i>	50	50	50	50
16	R. seda	<i>Pythium</i>	25	75	50	50
17	R. seda	<i>Pythium</i>	0	100	0	0
18	R. seda	<i>Pythium</i>	25	75	33	67
19	R. seda	<i>Pythium</i>	25	75	50	50
20	R. seda	<i>Pythium</i>	0	100	100	0

Anexo 11. Continuación...

Clase	Niveles	Valores
frijol	2	pipil seda
hongo	2	<i>Fusarium</i> <i>Pythium</i>

Número de observaciones 20

Variable dependiente: pg

Suma de Cuadrado

Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	5593.75000	1864.58333	3.06	0.0584
error	16	9750.00000	609.37500		
Total correcto	19	15343.75000			

R-cuadrado	CoefVar	Raiz MSE	pg Media
0.364562	59.84369	24.68552	41.25000

Continuación Anexo 11.

Variable dependiente: png

Suma de Cuadrado

Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	5593.75000	1864.58333	3.06	0.0584
Error	16	9750.00000	0.0584		
Total correcto	19	15343.75000	609.37500		

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	png Media
0.364562	42.01791	24.68552	58.75000

Continuación Anexo 11.

Variable dependiente: ppd

Suma de Cuadrado

Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	645.80000	215.26667	0.23	0.8757
Error	16	15120.40000	945.02500		
Total correcto	19	15766.20000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ppd Media
0.040961	79.43478	30.74126	38.70000

Continuación Anexo 11.

Variable dependiente: pps

Suma de Cuadrado

Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	3125.80000	1041.93333	1.10	0.3781
Error	16	15160.40000	947.52500		
Total correcto	19	18286.20000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	pps Media
0.170938	60.00369	30.78189	51.30000

A.12. Pruebas de Tukey

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pg

NOTA: Este test controla el índice de error experimental de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	609.375
Valor crítico del rango estudentizado	2.99800
Diferencia significativa mínima	23.403

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Frijol
A	55.00	10	pipil
B	27.50	10	seda

Continuación Anexo 12.

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para png

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	609.375
Valor crítico del rango estudentizado	2.99800
Diferencia significativa mínima	23.403

Media

s con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Frijol
A	72.50	10	seda
B	45.00	10	pipil

Continuación Anexo 12.

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pps

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	945.025
Valor crítico del rango estudentizado	2.99800
Diferencia significativa mínima	29.144

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Frijol
A	39.90	10	seda
A	37.50	10	pipil

Continuación Anexo 12.

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pps

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	947.525
Valor crítico del rango estudentizado	2.99800
Diferencia significativa mínima	29.183

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Frijol
A	62.50	10	pipil
A	40.10	10	seda

Continuación Anexo 12.

frijol	hongo	N	Media	Dev std

pipil	<i>fusarium</i>	5	58.4000000	37.2867269
pipil	<i>phytium</i>	5	66.6000000	25.7934100
seda	<i>fusarium</i>	5	46.8000000	27.5081806
seda	<i>phytium</i>	5	33.4000000	31.2697937

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pg

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	609.375
Valor crítico del rango estudentizado	2.99800
Diferencia significativa mínima	23.403

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Hongo
A	45.00	10	<i>Fusarium</i>
A	37.50	10	<i>Pythium</i>

Continuación Anexo 12.

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para png

Alfa	0.05
------	------

Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	609.375
Valor crítico del rango estudentizado	2.99800
Diferencia significativa mínima	23.403

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Hongo
A	62.50	10	<i>Pythium</i>
A	55.00	10	<i>Fusarium</i>

Continuación Anexo 12.

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para ppd

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	945.025
Valor crítico del rango estudentizado	2.99800

Diferencia significativa mínima	29.144
---------------------------------	--------

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Hongo
A	40.00	10	<i>Pythium</i>
A	37.40	10	<i>Fusarium</i>

Continuación Anexo 12.

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para pps

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	947.525
Valor crítico del rango estudentizado	2.99800
Diferencia significativa mínima	29.183

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Hongo
A	52.60	10	<i>Fusarium</i>
A	50.00	10	<i>Pythium</i>