

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba

Mylene Corzo López^{I*}, Deyanira Rivero González^{II}, Loidy Zamora Gutiérrez^I, Yamila Martínez Zubiaur^I, Benedicto Martínez Coca^I

^IGrupo de Fitopatología, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba. ^{II}Unidad Científico Tecnológica de Base «Los Palacios», Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera a Sierra Maestra, Km.11/2, Los Palacios, Pinar del Río.

RESUMEN: Este estudio se realizó con el objetivo de detectar e identificar el agente causal de la enfermedad denominada Bacteriosis común o Tizón común en frijol, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Se colectaron un total de 30 muestras de hojas y vainas de plantas infectadas de forma natural en diferentes localidades de la provincia Mayabeque. Las muestras se procesaron para el aislamiento del agente causal y se identificaron por las siguientes técnicas: aislamiento en medios de cultivo semiselectivos (YDCA y XCP1), prueba de patogenicidad en un cultivar susceptible (Bat 304), así como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los cebadores específicos (p7X4c yp7X4e). De 30 aislados obtenidos, 29 provocaron síntomas en el cultivar utilizado en la prueba de patogenicidad. Los aislados manifestaron diferentes sintomatologías de la enfermedad en las plantas inoculadas artificialmente. La PCR rindió, como producto amplificado, un fragmento de ADN cuya talla corresponde con la informada en la literatura para los aislados pertenecientes a este patógeno. Estos resultados mostraron que la presencia de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* afecta las regiones productoras de frijol en esta provincia, lo que representa un problema frecuente en dichas áreas.

Palabras clave: bacteriosis común, tizón común, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, patogenicidad.

Detection and identification of new isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars in Mayabeque province, Cuba

ABSTRACT: With the aim of detecting and identifying *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, the causal agent of the disease known as common bacterial blight (CBB) on common bean, 30 leaf and pod samples were taken from naturally infected plants in different localities of Mayabeque province. The samples were examined and the causal agent isolated and identified by using the following techniques: isolation on semi-selective media (YDCA y XCP1), pathogenicity test in a susceptible cultivar (BAT 304), and the PCR technique with specific primers (p7X4c yp7X4e). Of the 30 isolates obtained, 29 caused symptoms on the cultivar used in the pathogenicity test. Different symptomatologies of the disease were shown by the artificially inoculated plants. The amplification product of the PCR was a DNA fragment with 800 bp, the size reported for the isolates of this pathogen. These results showed the presence of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* affecting the bean growing areas of the province, a frequent problem in these areas.

Key word: common bacterial blight, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, pathogenicity.

*Autor para correspondencia: Mylene Corzo López.
Correo electrónico: mylene@censa.edu.cu.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa comestible de mayor importancia en el mundo, debido a que proporciona una fuente significativa de proteínas, vitaminas y minerales a la dieta humana (1). El rendimiento de este cultivo se afecta por factores bióticos y abióticos. Entre los factores bióticos se encuentra la Bacteriosis común o Tizón común, enfermedad ampliamente distribuida en el mundo y causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin y *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Burkholder) Starr & Burkholder (2, 3).

El mecanismo principal de diseminación de estos patógenos es a través de la infección externa o interna de la semilla, que representa una importante fuente de inóculo. Además, se propaga a través de la lluvia, el viento, insectos vectores y restos de cosecha infectados (4, 5).

Las pérdidas provocadas por este patógeno en el rendimiento del cultivo están entre 10 y 40%, en dependencia de la susceptibilidad del cultivar y las condiciones medioambientales (6). En Cuba, esta enfermedad se detectó en las etapas de prefloración, floración y formación de la vaina, con afectaciones en el follaje entre 15 y 48 %, y hasta 80% en cultivares susceptibles (7).

Entre los métodos empleados para la detección e identificación de este microorganismo se encuentran el aislamiento en medios de cultivo semiselectivos (8), los serológicos (9) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (10, 11).

La identificación de estos patógenos en Cuba se realizó por Stefanova *et al.* (7), quienes emplearon pruebas de patogenicidad en variedades comerciales de frijol común e informaron la presencia de aislamientos de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* moderados y altamente virulentos. En años más recientes, Rodríguez *et al.* (12) utilizaron medios de cultivo semiselectivos como Extracto de Levadura, Dextrosa, Carbonato de calcio y Agar (YDCA) y Medio semiselectivo para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (MXP), así como las pruebas de patogenicidad en cultivares susceptibles de frijol común para la identificación de estos patógenos.

Los objetivos de este trabajo fueron detectar y caracterizar el patógeno de la Bacteriosis común en diferentes cultivares de frijol común en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la campaña de frijol 2013-2014 se colectaron 30 muestras de *P. vulgaris* en áreas de los municipios San José de las Lajas, Güines y Quivicán de la provincia Mayabeque (Tabla 1).

Se tomaron muestras foliares (trifolios ubicados en la parte media de la planta) y frutos (vainas) con síntomas similares a los de Bacteriosis común en los periodos de prefloración, floración y formación de la vaina en los diferentes cultivares. Las muestras se colectaron al azar en el campo y se colocaron extendidas en papel secante, para evitar la pudrición por exceso de humedad para su traslado al laboratorio.

- Aislamiento e identificación

Las hojas y las vainas se lavaron con agua corriente durante 15 min. Posteriormente, se separó una pequeña porción de tejido enfermo del borde de la lesión, utilizando un escarpelo previamente desinfectado. Los fragmentos de tejidos se desinfectaron en NaClO (1%) durante dos minutos y se lavaron con agua destilada estéril. A continuación se maceraron en solución salina estéril al 0,85% y con 10 µl de esta suspensión se inocularon con placas Petri de 9 cm, contentivas de medio de cultivo YDCA (13), a razón de tres placas por muestra. Las placas inoculadas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

A las colonias de color amarillo, convexas, con bordes enteros y de aspecto mucoso, obtenidas en YDCA, se les realizó la Tinción de Gram, la prueba de la Oxidasa y se inocularon en el medio de cultivo semiselectivo para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (XCP1)(14). Las placas inoculadas se incubaron a 28°C durante cinco días.

- Prueba de patogenicidad en frijol

La prueba de patogenicidad se desarrolló en los aisladores biológicos del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) en condiciones semicontroladas. En ella se sembraron plantas sanas del cultivar susceptible Bat-304, a razón de dos plantas por muestra. Se emplearon 30 macetas de 400g, contentivas de un sustrato compuesto por 2/3 de suelo estéril y 1/3 de abono orgánico (residuos vegetales) y las plantas se mantuvieron en cámara húmeda de 20 a 30°C hasta la aparición del primer trifolio (16 días después de plantadas las semillas).

TABLA 1. Aislados bacterianos obtenidos de material vegetal de cultivares de frijol con infección./ *Bacterial isolates from infected bean cultivars.*

Tipo de Muestra	Cultivar	Nombre de la cepa	Lugar de colecta
Hoja	Bat-304	Xap1	Finca "El Mamey, San José
Hoja	Bat-304	Xap2	Finca "El Mamey, San José
Hoja	Bat-304	Xap3	Finca "El Mamey, San José
Hoja	Bat-304	Xap4	Finca "El Mamey, San José
Hoja	Bat-304	Xap5	Finca "Asunción", San José
Hoja	Delicia Rojo	Xap6	Finca "Asunción", San José
Hoja	Cueto 309	Xap7	Finca "Asunción", San José
Hoja	Delicia Rojo	Xap8	Empresa de Cultivos Varios, 19 de Abril, Quivicán
Hoja	Delicia Rojo	Xap9	Empresa de Cultivos Varios, 19 de Abril, Quivicán
Hoja	Delicia Rojo	Xap10	Empresa de Cultivos Varios, 19 de Abril, Quivicán
Hoja	Santiago 3	Xap11	Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José
Hoja	Bat 304	Xap12	Unidad Básica de Producción Agropecuaria (UBPC) Guerrillero Heroico, Güines
Hoja	Bat 304	Xap13	UBPC Guerrillero Heroico, Güines
Hoja	Bat 304	Xap14	UBPC Guerrillero Heroico, Güines
Hoja	Bat 304	Xap15	UBPC Guerrillero Heroico, Güines
Hoja	Bat 304	Xap16	UBPC Guerrillero Heroico, Güines
Hoja	Cueto	Xap17	UBPC Agustín Hernández, Güines
Hoja	Cueto	Xap18	UBPC Agustín Hernández, Güines
Hoja	Cueto	Xap19	UBPC Agustín Hernández, Güines
Hoja	MER 2222-48	Xap20	INCA, San José
Vaina	Bat 304	Xap21	INCA, San José
Vaina	Bat 304	Xap22	INCA, San José
Vaina	Bat 304	Xap23	INCA, San José
Vaina	Bat 304	Xap24	INCA, San José
Vaina	Bat 304	Xap25	INCA, San José
Vaina	Bat 9	Xap26	INCA, San José
Hoja	Secano 9 P-2	Xap27	INCA, San José
Hoja	Secano 9 P-3	Xap28	INCA, San José
Hoja	Man 2206-6V	Xap29	INCA, San José
Vaina	Bat 304	Xap30	INCA, San José

El inóculo bacteriano se preparó en solución salina estéril (0,85%) y a partir de cada aislamiento puro cultivado en medio YDCA incubados a 28°C durante 48 horas, con una concentración de 2×10^8 UFCx ml^{-1} (Espectrofotómetro T60 UV PG Instruments).

La inoculación se realizó según el método de Popovic *et al.* (15). Se inocularon dos plantas por cada aislado. Como control negativo se utilizó solución salina estéril (0,85%) y una suspensión bacteriana de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, cepa Xcv20, conservada en el cepario del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Después de inoculadas las plantas, se colocaron en cámara húmeda durante 48 horas, con 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad y temperatura media diaria de 28°C. La humedad relativa se mantuvo superior al 85%. La patogenicidad se evaluó al tercer, quinto, octavo y décimo días después de inoculadas las plantas, tomando en cuenta la frecuencia de aparición de los síntomas típicos de la enfermedad en hojas (15).

- Extracción del ADN total

Todos los aislados se inocularon en cinco ml de Caldo Nutriente (CN) y se incubaron a 28°C de 12 a 18h. Del medio inoculado se tomaron 2 ml y se

centrifugaron (Eppendorf) a 8 000 rpm por 5 min. El precipitado celular se lavó con 1 ml de agua destilada estéril por tres veces y se centrifugó a 8 000 rpm.

La extracción del ADN total del cultivo bacteriano se realizó con el método de Nunes *et al.* (16). Los ADN se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso en la PCR.

- Identificación molecular. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular se usaron los ADNs totales, aislados a partir de los cultivos bacterianos puros. Se utilizó la pareja de cebadores específicos p7X4c y p7X4e que amplifican un fragmento de 800pb procedente de un segmento de 3,4 Kb del ADN plasmídico (P7) de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (17, 18). Como control negativo se utilizó el ADN total de la cepa de referencia de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Xcv20.

El ensayo de amplificación se realizó en una mezcla de reacción de 25µl de volumen final, que contenía GoTaqADN polimerasa a 1,25 U/reacción, solución Tampón de la enzima a 1X, cloruro de magnesio (MgCl₂) a 1,5 mM, dNTP a 0,4 µM, cada cebador a 0,8 µM y 2 µl de ADN molde. La PCR se efectuó en un Termociclador (Eppendorf, Mastercycler) programado para 28 ciclos, usando el programa recomendado (10, 18). El fragmento de ADN amplificado se visualizó por irradiación con luz ultravioleta en un transiluminador (Syngene InGenius L, Syngene, EE.UU) sobre un gel de agarosa al 1% en TBE al 0,5 X teñido con bromuro de etidio. Se empleó el marcador de peso molecular de 1.0Kb (Ladder, Promega).

RESULTADOS

Aislamiento e Identificación morfológica y cultural

De 30 muestras colectadas en las localidades de la provincia Mayabeque, solo 29 produjeron colonias de color amarillo, convexas, con bordes enteros y de aspecto mucoso en el medio de cultivo YDCA. Las bacterias presentaron morfología bacilar y reacción negativa a la Tinción de Gram y a la prueba de la oxidasa. Las colonias inoculadas en el medio de cultivo XCP1 tuvieron un color amarillo brillante rodeadas por una zona clara por la hidrólisis del almidón (Fig. 1).

Prueba de patogenicidad

Los síntomas típicos de la enfermedad en las plantas aparecieron a los tres y cinco días posteriores a la

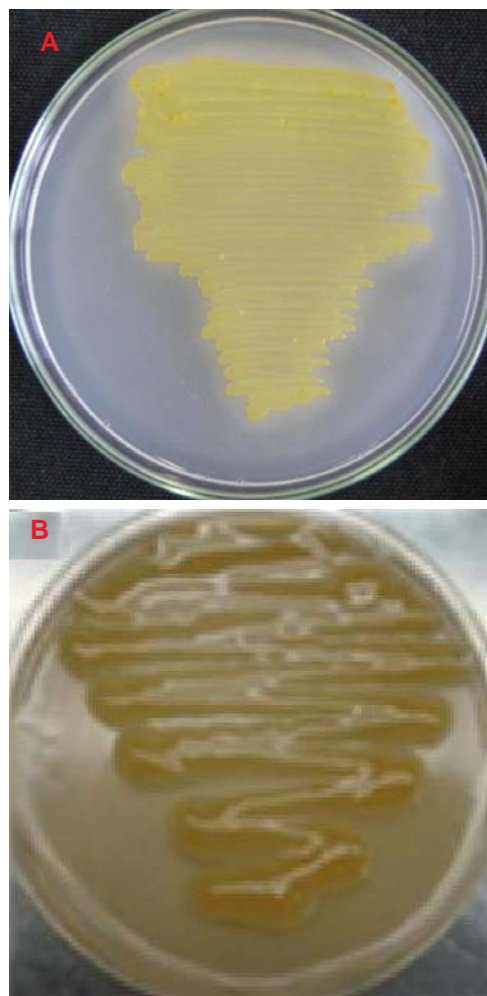


FIGURA 1. Morfología de las colonias en los medios de cultivos semiselectivos. A: medio de cultivo XCP1, B: medio de cultivo YDCA./ *Colony morphology on semi-selective media cultures. A: medium XCP1, B: medium YDCA.*

inoculación (Fig. 2). La marchitez de las plantas, seguida de la necrosis total del tejido foliar ocurrió a los 14 días después de la inoculación.

Los aislados manifestaron diferentes síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas. Los aislados Xap1, Xap4, Xap7, Xap10, Xap19, Xap22, Xap26 y Xap27 provocaron manchas necróticas de color pardo con bordes irregulares, rodeadas por un halo clorótico de color verde claro cercano a la lesión. Los síntomas aparecieron en los márgenes de las hojas después del quinto día posterior a la inoculación. Los aislados Xap2, Xap15, Xap18, Xap20, Xap28 indujeron al quinto día de post inoculación manchas necróticas pardas

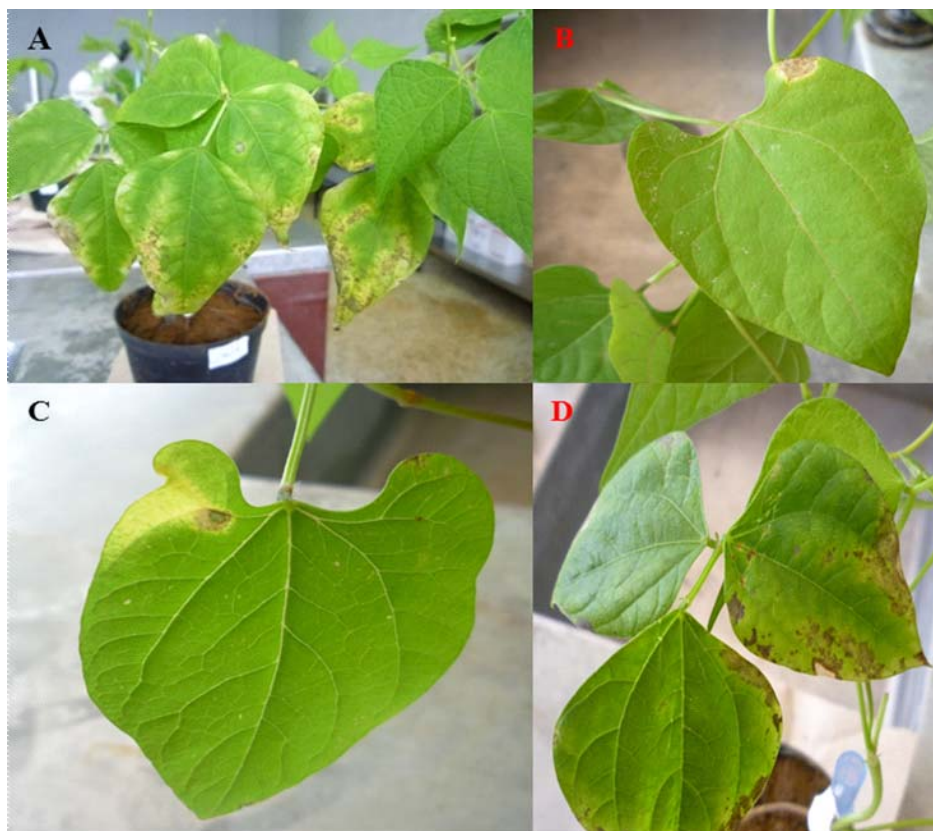


FIGURA 2. Síntomas en plantas de frijol inoculadas al tercer y quinto días post inoculación, A: aislado Xap8, B: aislado Xap1, C: aislado Xap2 y D: aislado Xap12./ *Symptoms on inoculated bean plants at three to five days post inoculation, A: isolate Xap8, B: isolate XAP1, C: isolate XAP2, and D: isolate Xap12.*

concéntricas, con centro más oscuro y bordes regulares, circundadas por un halo clorótico de color verde-amarillo amplio y difuso. Las lesiones aparecieron en los márgenes y centro de las hojas de las plantas inoculadas. Las plantas inoculadas con los aislados Xap3, Xap5, Xap6, Xap8, Xap9, Xap14, Xap16, Xap17, Xap21, Xap23, Xap24, Xap25 y Xap29 mostraron, al tercer día de inoculación, manchas necróticas muy pequeñas, como puntos de color pardo oscuro, que al unirse formaron una mancha necrótica de mayor tamaño con bordes irregulares, rodeadas por un halo clorótico amarillo pálido. Los aislados Xap11, Xap12, Xap13 provocaron manchas necróticas semejantes a las descritas anteriormente, pero sin halo clorótico. Estos síntomas aparecieron a las 48 horas después de la inoculación en el cultivar susceptible usado en la prueba (Fig.2).

Identificación molecular

En el estudio molecular se obtuvo, como producto amplificado, un fragmento de ADN cuya talla corresponde a la informada en la literatura para los aislados

pertenecientes a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (800pb) (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* y su variante *fuscans* son patógenos que provocan la enfermedad del Tizón común en el cultivo del frijol (19). Los métodos empleados confirmaron la presencia de este agente en el 97% de las muestras e indican que el mismo afecta las regiones productoras de frijol en dicha provincia.

En este estudio, la utilización de medios de cultivos semi-electivos, YDC y XCP1, así como las pruebas bioquímicas y fisiológicas permitieron la identificación preliminar de los aislados de este patógeno en el cultivo del frijol. Las características culturales, morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de todos los aislados coincidieron con las notificadas por la EPPO en 1990 y por otros autores (4, 18, 20). La patogenicidad

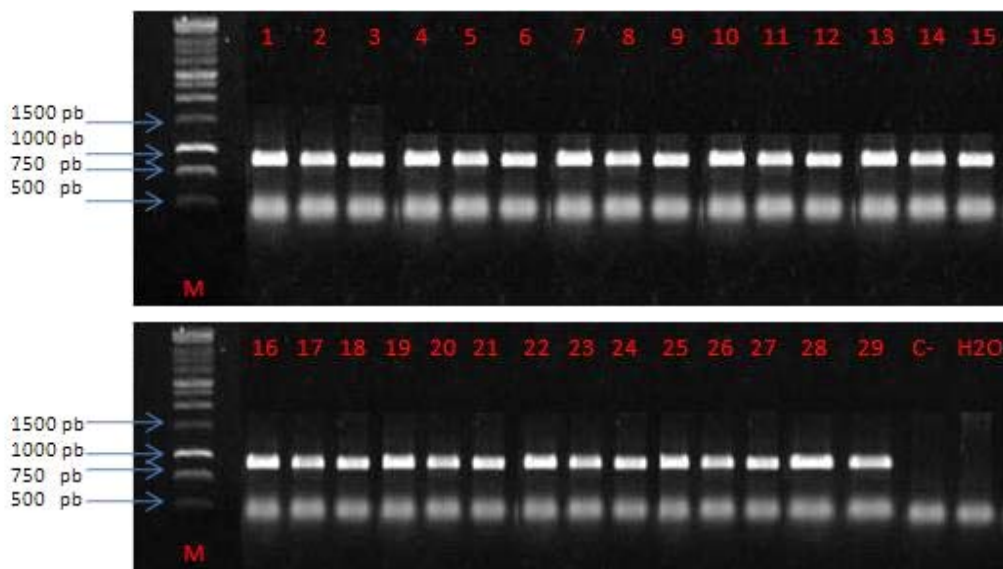


FIGURA 3. Identificación por PCR de aislados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* con los cebadores empleados por Audy *et al.*, 1994, en un gel de agarosa al 1%. M: Patrón de peso molecular (1.0-KbLadder, Promega) línea 1 a la 29: aislados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. C-:cepa de Xcv20. H₂O./ PCR identification of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* isolates with the primers used by Audy *et al.*, 1994, on a 1% agarose gel. M: molecular weight pattern (1.0-Kb ladder, Promega) lanes 1 to 29: isolates of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. C-: Xcv20 strain. H₂O.

de los aislados se confirmó en hojas de plantas jóvenes de frijol y los síntomas fueron similares a los descritos por Sheppard *et al.* (18) para este patógeno y por Grimault *et al.* más recientemente (9).

En la prueba de patogenicidad se visualizaron diferentes características de la sintomatología de la enfermedad. Estas diferencias fenotípicas, expresadas por los disímiles aislados en el mismo cultivar, pudieran estar relacionadas con diferencias genotípicas presentes en los mismos, aspecto que será objeto de investigaciones futuras.

Por otro lado, la técnica de PCR confirmó que los aislados de bacterias estudiados pertenecen a la especie *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Estos resultados coinciden con los informados por Sheppard *et al.* y Grimault *et al.* en los años 2012 y 2014, respectivamente (18, 20).

Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron que el Tizón común constituye un problema frecuente en las áreas productoras de frijol en la provincia Mayabeque. En ocasiones, la sintomatología de esta enfermedad puede confundirse con la causada por patógenos como *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (sin. *A. tenuis* Nees) (sin. *A. macrospora* Zimm) (21). Por tanto, desarrollar un sistema de diagnóstico para la

detección de este patógeno en las fases tempranas de la enfermedad contribuirá a la detección y la toma de medidas de manejo adecuadas.

REFERENCIAS

1. Mederos Y. Revisión bibliográfica: indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 2013;27:55-62.
2. Coyne DP, Steadman JR, Godoy-Lutz G, Gilbertson RL, Arnaud-Santana E, Beaver JS, et al. Contribution of bean/cowpea CRSP to management of bean diseases. *Field Crop Res.* 2003;82:155-168.
3. Arayas FCM, Fonseca HJC. Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. San José, Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria- Costa Rica; 2006. p. 1-44.
4. OEPP/EPPO. Data Sheets on Quarantine Pests. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. CABI/EPPO. 1990:1-6.

5. Arayas FCM. Guía de identificación y manejo integrado de enfermedades del frijol en América Central. 3th ed. Tegucigalpa. Honduras. 2012. p. 1-37.
6. Asensio-Manzanera MC, Asensio C, Singh SPI. Introgressing resistance to bacterial y viral diseases from the Middle American to yean common bean. *Euphytica*. 2005;143:223-228.
7. Stefanova M. Aspectos Etiológicos y epidemiológicos de la Bacteriosis común (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) de frijol en Cuba. 1er Taller Internacional sobre Bacteriosis común del Frijol. Univ. de Puerto Rico. PROFRIJOL. Mayaguez, Puerto Rico; 1996 p. 121-129.
8. Remeus PM, Sheppard JW. Proposal for a new method for detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seeds. Bassersdorf, Switzerland: ISTA Method Validation Reports 3,2006. p. 1-11.
9. Sheppard JW, Roth DA, Saettler AW. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Bean. Schaad NW, RothDA (eds) Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material. Minnesota: U.S: The American Phytopathological Society, 1989. p. 17-29.
10. Audy P, Braat CE, Saindon G, Huang HC, Laroche A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*. 1996;86(4):361-366.
11. Mondal KK, Shanmugam V. Advancements in the diagnosis of bacterial plant pathogens: An overview. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2013;8(1):1-11.
12. Rodríguez MO, Ortíz PR, Hernández EMM, Alvarez GM. Tesis de Doctorado. Evaluación de la reacción de cultivares y líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a Bacteriosis común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e Identificación de Marcadores de interés para este carácter. Mayabeque. 2011:1-103.
13. Schaad NW. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota, U.S: The American Phytopathological Society; 1988:84-107.
14. Schaad NW. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota, U.S: The American Phytopathological Society; 2001:175-199.
15. Popovic T, Bala J, Nikoli Z, Starovi M, Gavrilovi V, Aleksi G, et al. Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. *African Journal of Agricultural Research*. 2010;5(19):2730-2736.
16. Nunes WMC, Corazza MJ, Souza SACD, Tsai SM, Kuramae EE. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isolates. *Summa Phytopathologica*. 2008;34(3):228-231.
17. Audy P, Laroche A, Saindon G, Huang H C, Gilbertson RL. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 1994; 84(10):1185-1192.
18. Grimault V, Olivier V, Rolland M, Darrasse A, Jacques M. A. International Rules for Seed Testing: Seed Health Testing Methods. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* var *fuscans* on *Phaseolus vulgaris* L. (bean). Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA); 2014:1-20.
19. Dursun A, Dönmez MF, Şahin F. Identification of resistance to common bacterial blight disease on bean genotypes grown in Turkey. *Eur J Plant Pathol*. 2002;108:811-813.
20. Sheppard J, Kurowski C, Remeus PM. International Rules for Seed Testing: Seed Health Testing Methods. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA); 2012:1-16.
21. Tamayo MPJ, Londoño ZME. Manejo Integrado de Enfermedades y Plagas en el frijol. Manual de Campo para su Reconocimiento y Control. 1ª ed. Rionegro, Antioquia, Colombia: COMPOICA; 2001:3-79.

Recibido: 24-11-2014.

Aceptado: 8-4-2015.