

Pseudomonas fluorescens Biotipo II Y SU INCIDENCIAEN SEMILLAS DE Centrosema acutifolium CIAT 5277*

Berto Arias R. y Jillian M. Lenné**

INTRODUCCION

El ecosistema sabana ocupa 202 millones de hectáreas de las tierras de América Tropical. Alrededor del 56% de ellas se caracterizan por ser bien drenadas e isohipertérmicas (Cochrane et al., 1985) y sostienen actividades pecuarias que usan pasturas naturales de bajo valor nutritivo; esto ha motivado la introducción de materiales mejorados que muchas veces no expresan todo su potencial genético por el ataque de enfermedades (Grof, 1985). Estudios del germoplasma de leguminosas forrajeras indican que el añublo bacterial causado por Pseudomonas fluorescens Biotipo II, es uno de los patógenos más importantes del género Centrosema. La alta susceptibilidad a manchas necróticas y muerte descendente se ha observado en los ecotipos CIAT 5112, 5277 y 527B en donde reducen considerablemente los rendimientos; así mismo, en CIAT 5118 la producción de materia seca se ha visto reducida en 47.1% (CIAT, 1981, 1982). También se ha encontrado asociada a semillas a niveles que oscilan entre 8 y 32% (Lenné y Torres, 1981).

Actualmente existe la necesidad de producir semillas sanas de Centrosema acutifolium por encontrarse esta leguminosa en una etapa avanzada del proceso de

-
- * Trabajo realizado durante la permanencia del autor principal como Investigador Visitante en la sección de Patología de Pastos Tropicales del CIAT, Sept/87 a Marzo/88.
 - ** Ingeniero Agrónomo, Investigador del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) Venezuela, y Fitopatóloga, Programa Pastos Tropicales, CIAT, Cali, Colombia, respectivamente.

liberación. El uso de fungicidas, aplicados en plantas, especialmente aquellos que contienen cobre, podría ser una alternativa en la disminución de los niveles de infección, como se demostró en Phaseolus vulgaris L. donde se redujo la incidencia de Pseudomonas phaseolicola y se mejoró la calidad de las semillas (Saettler y Potter, 1970; Natti, 1969; Saettler y Anderson, 1978).

En base a lo anterior se realizó el presente ensayo con el objetivo de evaluar el efecto de cinco formas de tutores de crecimiento y la aplicación en campo de tres fungicidas y mezclas de ellos sobre P. fluorescens Biotipo II y su presencia en semillas de C. acutifolium CIAT 5277.

MATERIALES Y METODOS

1. Ensayo de campo.

Localización. En ensayo se realizó en la Estación Experimental del Centro Internacional de Agricultura Tropical en Santander de Quilichao, Cauca, Colombia, situada a 3°6' de latitud norte y 76°31' de longitud oeste, a una elevación de 990 m.s.n.m., con 24°C de temperatura media, 1800 mm de precipitación anual y humedad relativa de 74%. La siembra se efectuó en Abril de 1987 en un suelo clasificado como Ultisol.

Diseño estadístico y tratamientos. Se empleó un diseño estadístico de parcelas divididas en bloques al azar con cuatro repeticiones. Las parcelas principales fueron cinco métodos de producción de semillas (tutores de crecimiento de planta): A, tutor de tallo maduro de King grass de 1.80 m de altura; B, tutor de tallo maduro de King grass de 1.80 m de altura colocado en posición invertida; C, tutor convencional con alambre a 1.80 m de altura; D, tutor convencional con alambre a 2.50 m de altura y E, crecimiento postrado. Las subparcelas fueron los fungicidas:

Chlorotalonil (Bravo 500, 5.0 ml/l); Hidróxido de Cobre (Kocide 101, 5.0 g/l); Orthocide 50% (Captan, 5.0 g/l) y las mezclas Chlorotalonil + Hidróxido de Cobre (5.0 ml/l + 5.0 g/l); Hidróxido de Cobre + Orthocide 50% (5.0 g/l + 5.0 g/l) y Chlorotalonil + Orthocide 50% (5.0 ml/l + 5.0 g/l), los cuales fueron aplicados a plantas de C. acutifolium CIAT 5277, establecidas en surcos de 10 m de largo y 1 m de separación. Se dejó un surco sin aplicación que funcionó como testigo. Las aspersiones se iniciaron en Octubre de 1987, antes de la floración, y se repitieron cada 14 días hasta la cosecha, en Enero de 1988, realizándose un total de siete aplicaciones.

Evaluación de la incidencia y severidad de P. fluorescens Biotipo II. Una semana después de iniciadas las aspersiones se evaluó en cada subparcela la incidencia y severidad del marchitamiento bacteriano, éstas observaciones se repitieron con una frecuencia quincenal. El reconocimiento y asignación del grado de infección se hizo utilizando una escala gráfica en donde 0: planta muerta; 1: manchas cloróticas en hojas bajas e inicio de marchitamiento de los puntos de crecimiento; 2: hojas bajas con manchas necróticas y muerte descendente en 25% del rebrote; 3: hojas bajas y del plano medio con necrosis y aproximadamente el 50% del rebrote con marchitamiento y muerte descendente y 4: todas las hojas con necrosis y distorsión, muerte descendente en más del 50% del rebrote (Gráfica 1). La evaluación se realizó en diez plantas tomadas al azar en cada surco.

Estimación del % de infección de semillas con pseudomonas fluorescentes y confirmación de la infección por P. fluorescens Biotipo II. Muestras de 50 semillas provenientes de cada subparcela fueron colocadas en platos petri conteniendo medio B de King. Las semillas fueron previamente lavadas superficialmente con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 1% por tres minutos, luego se colocaron en los platos en número de diez. Se incubaron a 25°C por 48 horas

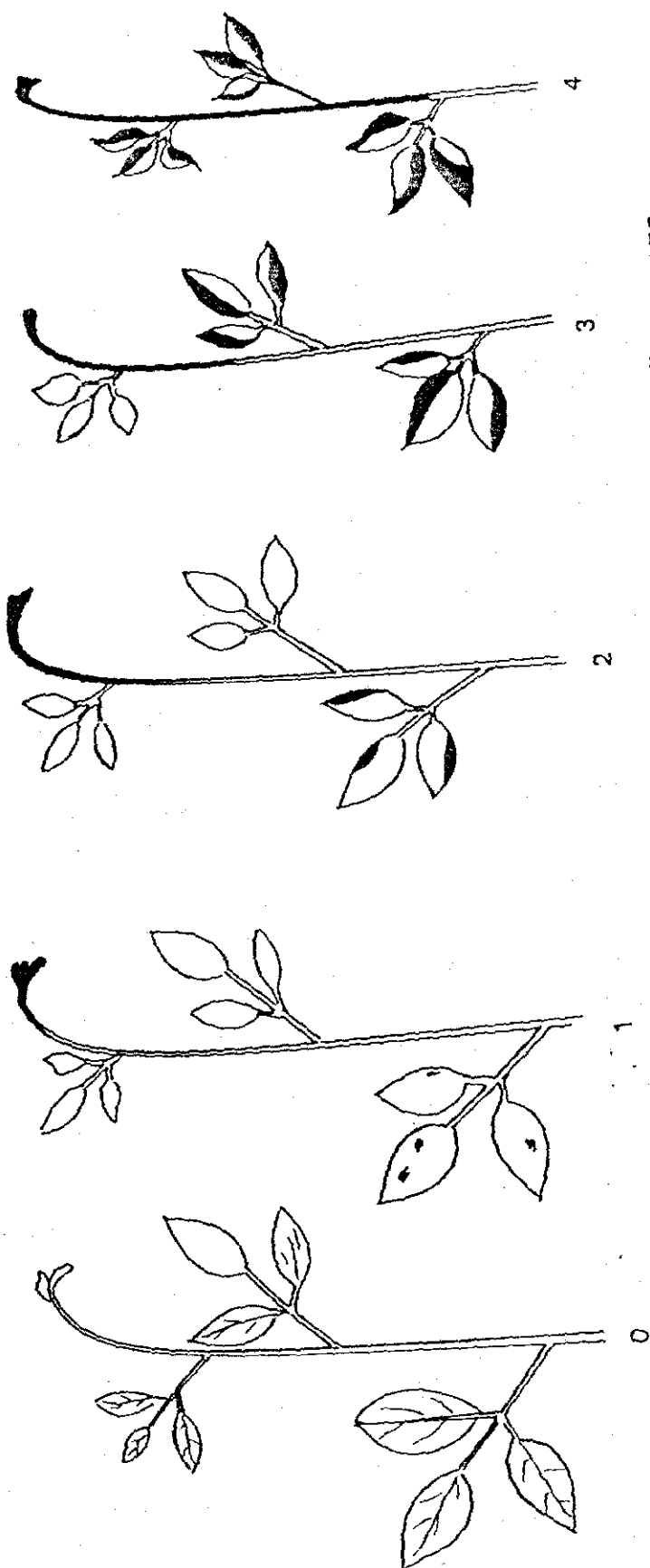


Fig. 1. Escala de evaluación de severidad de *Pseudomonas fluorescens* Biotipo II

posteriormente se determinó el número de colonias bacterianas por muestra, estableciéndose la asociación de bacterias fluorescentes con semillas de *C. acutifolium* CIAT 5277. Se seleccionaron 120 aislamientos por fluorescencia los cuales fueron purificados por estriado, en repetidas oportunidades, en medio B de King. Se emplearon pruebas serológicas de aglutinación en tubos y de doble difusión en agar para confirmar la identidad de *P. fluorescens* Biotipo II. Se usó un antisuero con título 1:8 obtenido por Torres et al. (1987).

Efecto in vitro de los fungicidas usados en campo sobre *P. fluorescens*

Biotipo II. Se utilizaron cuatro aislamientos obtenidos de semillas de *C. acutifolium* CIAT 5112, 5277 y 5278, los cuales fueron debidamente identificados mediante el método combinado de plateo en medio B de King, emisión de fluorescencia ante luz ultravioleta y pruebas serológicas de aglutinación en tubos y doble difusión en agar. Las muestras fueron mantenidas en agar nutritivo. 0.5 ml de una suspensión de cada aislamiento, calibrada a 10^8 CFU/ml, fue distribuido sobre la superficie de medio B de King. Discos de papel de 7 mm de diámetro, previamente sumergidos por 24 horas en soluciones de los fungicidas y dosis usadas en el campo; se colocaron en número de tres en cada plato petri y luego de 48 horas de incubación a 25°C, se midió la zona de inhibición alrededor de ellos por cada tratamiento.

Efecto de los tratamientos en la producción de semillas. Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el rendimiento de semillas se hicieron dos cosechas, determinándose el peso en cada subparcela. Así mismo, se anotó el número de vainas producidas y el número de vainas vanas.

Efecto de los tratamientos sobre la producción y calidad del forraje. Se obtuvieron valores de peso de materia verde de cortes de plantas en un m². Los cortes se hicieron a una altura de 10 cm del suelo cuando las plantas tenían nueve meses de establecidas y habían transcurrido tres meses de iniciado el plan de protección química. Posteriormente una submuestra de 200 gramos de materia verde fue colocada en estufa por cuatro días a una temperatura de 60°C. Así se calculó el peso seco de cada muestra por tratamiento y por repetición. Las muestras secas fueron molidas adecuadamente para determinar el contenido de Nitrógeno, Proteína cruda y Cobre. Todos los valores obtenidos en % fueron transformados por Arcsen x para su análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de la aplicación de fungicidas en campo sobre P. fluorescens Biotipo II.

El análisis de varianza para cada evaluación (Cuadro 1, Anexo) muestra que todos los fungicidas fueron particularmente eficaces a partir de la cuarta observación. La enfermedad se vió limitada en su desarrollo ya que potencialmente podía alcanzar mayores valores como sucedió en las parcelas no tratadas donde el grado de infección fue de 2.15, logrado por el testigo en la quinta evaluación (Cuadro 1). Los resultados del análisis de varianza combinado (Cuadro 2, Anexo) de las evaluaciones muestran que todos los fungicidas tuvieron efecto sobre el marchitamiento bacteriano y aunque oscilan entre 1.32 para Orthocide 50% y 1.48 para la mezcla Bravo 500 + Kocide 101, forman un grupo igual estadísticamente ($P < 0.05$), pero diferentes del testigo que alcanzó un nivel de infección del 2.00 (Cuadro 2). Se puede observar que la acción de los fungicidas tuvo poca variación a través de todas las observaciones, si bien los valores de infección son bajos pudo deberse probablemente a que las condiciones ambientales no fueron favorables para desarrollar una epidemia, no obstante en las parcelas tratadas se disminuyó la

Cuadro 1. Efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas sobre *P. fluorescens* Biotipo II, en *C. acutifolium* CIAT 5277, por evaluaciones.

Parámetros	Grado de Infección/Evaluación					
	1	2	3	4	5	6
Fungicidas						
Testigo	2.08 a*	2.06 a	1.81 a	1.91 a	2.15 a	1.98 a
Kocide 101 + Orthocide 50%	1.86 ab	1.43 b	1.23 c	1.13 b	1.34 b	1.55 b
Kocide 101	1.80 ab	1.42 b	1.55 ab	1.12 b	1.32 b	1.36 b
Bravo 500 + Orthocide 50%	1.78 ab	1.50 b	1.43 bc	0.89 b	1.12 b	1.49 b
Bravo 500 + Kocide 101	1.74 ab	1.57 b	1.43 bc	1.06 b	1.30 b	1.48 b
Orthocide 50%	1.71 b	1.40 b	1.24 c	1.12 b	1.22 b	1.26 b
Bravo 500	1.65 b	1.44 b	1.26 bc	1.08 b	1.31 b	1.57 b
Métodos de Producción						
B	2.03 a	1.63 a	1.57 a	1.26 a	1.49 a	1.53 a
E	1.89 ab	1.62 a	1.32 b	1.10 a	1.22 b	1.46 a
A	1.73 ab	1.54 a	1.42 ab	1.25 a	1.46 ab	1.55 a
C	1.71 b	1.53 a	1.33 b	1.22 a	1.30 ab	1.41 a
D	1.65 b	1.41 a	1.46 ab	1.10 a	1.49 a	1.68 a

* Promedios en una misma columna seguidos por letras iguales, no difieren en forma significativa ($P < 0.05$) según la prueba de Tuckey.

a/ A y B: tutor de King grass normal e invertido, respectivamente.

C y D: tutor convencional con alambre a 1.80 y 2.50 m de altura, respectivamente.

E: crecimiento postrado.

Cuadro 2. Efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas sobre *P. fluorescens* Biotipo II, en *C. acutifolium* CIAT 5277.

Parámetros	Grado de Infección
Fungicidas	
Testigo	2.00 a*
Bravo 500 + Kocide 101	1.43 b
Kocide 101	1.43 b
Kocide 101 + Orthocide 50%	1.42 b
Bravo 500	1.38 b
Bravo 500 + Orthocide 50%	1.37 b
Orthocide 50%	1.32 b
Métodos de Producción^{a/}	
B	1.58 a
A	1.50 b
D	1.46 bc
E	1.42 c
C	1.41 c

* Promedios en una misma columna seguidos por letras iguales, no difieren en forma significativa ($P < 0.05$), según la prueba de Tuckey.

a/ A y B: tutor de King grass normal e invertido, respectivamente.
 C y D: tutor convencional con alambre a 1.80 y 2.50 m de altura, respectivamente.
 E: crecimiento postrado.

severidad por P. fluorescens Biotipo II, lo que demuestra que los productos redujeron la infección en el follaje. Los resultados deben calificarse como buenos para una zona que presenta una gran probabilidad de ataque de la enfermedad. El análisis de varianza combinado (Cuadro 2, Anexo) demostró que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) para el grado de infección en los métodos de producción. Los mayores valores se detectaron en las plantas creciendo en soportes de King grass maduro colocado en posición invertida (Figura 2); la formación de follaje de la gramínea pudo haber interferido el contacto entre el producto asperjado y el follaje de Centrosema; por otra parte se observó que la leguminosa presenta dificultades para trepar por ese tipo de soporte, presentando la mayor concentración del material vegetal en la parte inferior que podría haber favorecido el ataque de P. fluorescens Biotipo II. El promedio de infección mas bajo se detectó en plantas creciendo en soportes convencionales a 1.80 m, como respuesta a que los rebrotes y guías de la planta subieron por el hilo y desarrollaron una arquitectura que concentra poca humedad.

El efecto de Hidróxido de Cobre (Kocide 101) fue bastante bueno; sin embargo, parece ser el responsable de algunos amarillamientos que presentaron las plantas. Este fenómeno coincide con señalamientos de toxicidad producida por Kocide 101 en plantas de P. vulgaris L. a las cuales se les aplicó para el control de P. phaseolicola (Dickens y Oshima, 1968). Las mezclas usadas en este estudio resultaron compatibles y efectivas en el control de P. fluorescens Biotipo II en campo, por lo que el uso de Kocide 101 podría ser mas adecuado bajo esa forma. Experiencias en el control de Pseudomonas tomato señalan el buen efecto proporcionado por la mezcla Kocide 101 + Bravo 500 (MacNab, 1980). El contenido de cobre en las muestras de tejido vegetal provenientes de parcelas tratadas con Kocide

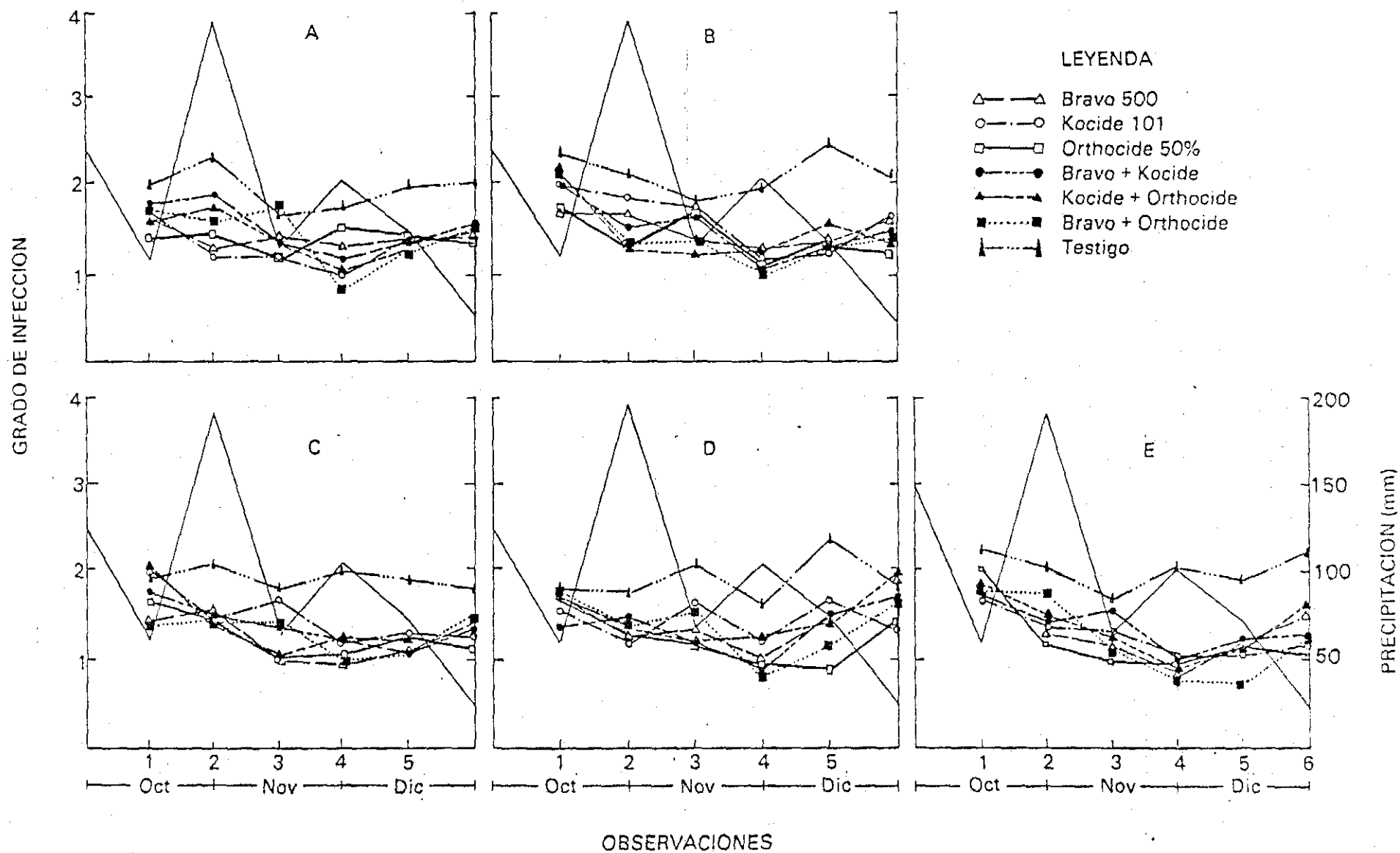


Fig. 2. Efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco formas de tutores de crecimiento en el control de *Pseudomonas fluorescens* Biotipo II en *Centrosema acutifolium* CIAT 5277, (A y B tutor de King Grass normal e invertido; C y D, tutor convencional con alambre a 1.80 y 2.50 m y E, crecimiento postrado).

101 superó en aproximadamente 10 a 20 veces más a las que no recibieron este producto, lo que demuestra su alta residualidad (Cuadro 3, Anexo).

Porcentaje de infección de semillas de *Centrosema acutifolium* CIAT 5277 por bacterias fluorescentes. El análisis de varianza del % de infección de semillas por bacterias fluorescentes (Cuadro 4, Anexo) mostró que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los fungicidas aplicados. La mezcla Bravo 500 + Xocide 101 proporcionó el mejor efecto en comparación con el nivel de infección de las semillas provenientes de las parcelas no tratadas (Cuadro 3). Los métodos de producción no influyeron sobre la sanidad de las semillas. Estos resultados indican que hay una población importante (8.3%) de *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a semillas de *C. acutifolium* CIAT 5277 la cual es posible reducir (1.7%) con la aplicación de fungicidas a las plantas. Es de suponer que no todas las bacterias aisladas por fluorescencia sean patogénicas en esta leguminosa, por lo que los análisis para detectar *P. fluorescens* Biotipo II que tienen como base el crecimiento en medio B de King y emisión de fluorescencia puedan estar arrojando resultados poco confiables. En este estudio la fluorescencia fue variable presentándose aislamientos con pigmentación azul-claro, azul fuerte, verde, verde pálido y verde azulado; esto permitió seleccionar 120 aislamientos, siendo los más abundantes los procedentes de muestras de semillas de las parcelas tratadas con Orthocide 50% y parcelas testigo.

Confirmación de *P. fluorescens* Biotipo II en semillas de *C. acutifolium* CIAT 5277. Se encontró que no todos los aislamientos seleccionados por fluorescencia reaccionaron positivamente al antisuero para *P. fluorescens* Biotipo II (Cuadro 3). Aunque no hubo diferencias significativas (Cuadro 5, Anexo) entre los niveles de infección para semillas provenientes de parcelas tratadas y las parcelas no tratadas, es llamativo el resultado logrado con los productos aplicados en mezclas y

Cuadro 3. Efecto de tres fungicidas y sus mezclas, sobre el nivel de infección por bacterias fluorescentes y por P. fluorescens Biotipo II en semillas de C. acutifolium CIAT 5277.

Fungicidas	Infección de Semillas (%)	
	Bacterias fluorescentes	<u>P. fluorescens</u> Biotipo II
Bravo 500 + Kocide 101	1.7 a*	0.5 a
Kocide 101	2.3 ab	0.1 a
Bravo 500 + Orthocide 50%	2.6 ab	0.0 a
Bravo 500	2.8 ab	1.1 a
Orthocide 50%	3.9 ab	1.2 a
Kocide 101 + Orthocide 50%	5.1 ab	0.0 a
Testigo	8.3 b	2.6 a

* Promedios en una misma columna seguidos por letras iguales no difieren en forma significativa ($P < 0.05$), según la prueba de Tuckey.

con Kocide 101, aplicado en forma individual. Se confirma así que es posible reducir los niveles de infección en campo y beneficiar la sanidad de las semillas. La correlación entre el grado de infección para el momento de la máxima floración, 15 de Diciembre, y % de infección de las semillas por bacterias fluorescentes fue positivo ($r = 0.120^*$), lo que indica que los programas de aspersiones deben implementarse con carácter preventivo o en una etapa muy inicial de la enfermedad. Es bueno anotar que el problema de los patógenos bacterianos transmitidos por semillas es la dificultad de reducir el inóculo primario a bajos niveles con tratamientos a la semilla, parte importante de esta reducción se estaría logrando con las aplicaciones en campo de productos efectivos, por lo que esta práctica debe ser tomada en cuenta en los programas de producción de semillas de C. acutifolium. El uso de Kocide 101 y Difolatan se ha practicado con éxito en la disminución de P. fluorescens Biotipo II en semillas de Leucaena (Moreno, et al., 1987). Igualmente la acción bactericida de Kocide 101 fue demostrada en P. tomato (Conlin y McCarter, 1980) y Pseudomonas phaseolicola (Hagedorn et al., 1969). Los resultados de 0.0% de infección para Bravo 500 + Orthocide 50% y Kocide 101+ Orthocide 50%, es posible que no sean realísticos y pudieron deberse a que los niveles de infección no fueron detectados como consecuencia del tamaño de la muestra de semillas usada en este estudio. También hay que señalar que de existir condiciones ambientales estimulantes de la enfermedad, los niveles de infección en semillas de parcelas no tratadas sería mayor y la diferencia entre la eficacia de los productos más notable.

Los aislamientos agrupados por fluorescencia en medio B de King, fueron sometidos a pruebas serológicas con el objetivo de tener un resultado más preciso que permitiera validar los niveles de infección por P. fluorescens Biotipo II en semillas de Centrosema. Hubo reacción consistente para la prueba de aglutinación en tubo y doble difusión en agar para aislamientos provenientes de parcelas sin

tratamiento y de las parcelas que recibieron a Orthocide 50% (Cuadro 4). Algunos aislamientos mostraron reacción dudosa en aglutinación en tubo pero la reacción en doble difusión fue positiva.

La dificultad de reacción con el método de aglutinación en tubo pudo deberse a bajo nivel de inóculo en esas muestras, teniendo en cuenta que venían de parcelas que habían sido evaluadas con 0.5 y 0.1% de infección de semillas para Bravo 500 + Kocide 101 y Kocide 101 respectivamente. Esto demuestra claramente que la prueba de doble difusión en agar debe emplearse en casos dudosos de aglutinación en tubos, por ser mas sensible para la estimación cuantitativa de la infección en semillas de Centrosema. No obstante es importante obtener un antisuero mas específico para reducir la posibilidad de reacciones serológicas afines, como pudo haber sucedido con los aislamientos con diferencia en fluorescencia que reaccionaron en forma positiva al antisuero, de haber sido así éste contaría con antígenos comunes a los aislamientos separados en la etapa inicial. Igualmente estos resultados sugieren que las diferencias entre los aislamientos podrían deberse a que hay razas de la bacteria pero que no fue precisado por serología. Guthrie (1965) trabajando con dos razas de Pseudomonas phaseolicola, no observó reacciones serologicamente diferentes entre ellas indicando que el antisuero a P. phaseolicola era específico para especies pero no para razas. El método serológico ha resultado muy efectivo en la detección de Xanthomonas phaseoli en semillas de P. vulgaris L. (Trujillo Saettler 1979).

Control de crecimiento in vitro de P. fluorescens Biotipo II. En el Cuadro se muestran los resultados de la sensibilidad de cuatro aislamientos de fluorescens Biotipo II a los productos químicos ensayados en el campo. La variación en cuanto al control de crecimiento, notándose que las mayores tasas

Cuadro 4. Bacterias asociadas a semillas de Centrosema acutifolium CIAT 5277 de reacción positiva para Pseudomonas fluorescens Biotipo II, por crecimiento en medio B de King, emisión de fluorescencia, aglutinación en tubo y doble difusión en agar.

Aislamiento	Método de producción ^{a/}	Fluorescencia	Prueba serológica	
			Aglutinación tubo	Doble difusión en agar
Bravo 500	D	Azul fuerte	+/-	+
Bravo 500	D	Azul verdoso	+/-	+
Kocide 101	D	Azul pálido	+/-	+
Bravo 500 +	E	Azul fuerte	+/-	+
Kocide 101				
Bravo 500 +	E	Azul verdoso	+/-	+
Kocide 101				
Orthocide 50%	C	Azul pálido	+	+
Orthocide 50%	C	Azul fuerte	+	+
Orthocide 50%	C	Azul verdoso	+	+
Orthocide 50%	C	Verde pálido	+	+
Orthocide 50%	C	Verde fuerte	+	+
Testigo	A	Azul pálido	+	+
Testigo	B	Azul pálido	+	+
Testigo	D	Azul pálido	+	+

a/ A y B: tutor de King grass normal e invertido, respectivamente.

C y D: tutor convencional con alambre a 1.80 y 2.50 m de altura, respectivamente.

E: crecimiento postrado.

Cuadro 5. Efecto de tres fungicidas y sus mezclas, sobre el crecimiento in vitro de aislamientos de Pseudomonas fluorescens Biotipo II, realizados de semillas de tres ecotipos de Centrosema acutifolium.

Tratamientos	Ecotipos CIAT No.			
	5277**	5277***	5278**a.	5112***b.
Kocide 101	15.94*	28.83	13.48	27.07
Kocide 101 + Bravo 500	15.61	28.94	13.40	17.11
Kocide 101 + Orthocide 50%	11.95	23.00	12.52	17.00
Orthocide 50%	8.66	10.17	10.67	8.78
Bravo 500	8.28	9.83	9.59	8.33
Bravo 500 + Orthocide 50%	9.22	10.72	9.52	8.15

* Zona de inhibición en mm, promedio de nueve observaciones y tres repeticiones.

** Seleccionada por fluorescencia azul pálido.

*** Seleccionada por fluorescencia verdosa.

a y b Provenientes de Lotes No. 82236 y 83398 respectivamente, cosechadas en Santander de Quilichao, 1984.

inhibición las proporcionaron Kocide 101 y la mezcla Kocide 101 + Bravo 500 en los aislamientos de CIAT 5277 y 5112 (de fluorescencia verde), siendo la zona de inhibición aproximadamente el doble de la producida en los aislamientos provenientes de CIAT 5277 y 5278 (fluorescencia azul pálida). La variación en cuanto a sensibilidad al Cobre que muestran estos resultados, proporciona una evidencia de la existencia de cepas en P. fluorescens Biotipo II que posiblemente sean patovares.

La resistencia de cepas al cobre es un fenómeno poco estudiado y se conoce más con resistencia a Hierro; aunque Marco y Stall (1983), señalan que existen cepas de Xanthomonas campestris p.v. vesicatoria que difieren en su comportamiento ante Cobre. Lo anterior significa que las posibilidades de control de P. fluorescens Biotipo II tendrían que ver con las cepas existentes en el campo porque de practicarse control mediante la aplicación sostenida de Cobre, se estaría empleando un mecanismo de selección y persistencia de las cepas resistentes sin que ocurra efecto benéfico en las plantas y en la calidad de las semillas. Por lo tanto la acción bactericida del Cobre puede aprovecharse mezclándolo con fungicidas, en zonas de alto potencial de producción de semillas donde la enfermedad esté adquiriendo características endémicas.

Efecto de los tratamientos sobre la producción de C. acutifolium CIAT 5277. Se quiso conocer el efecto de los parámetros estudiados en la producción. El análisis estadístico demostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre fungicidas para la producción de semillas, número de vainas y materia seca (Cuadros 6, 7, 8, Anexo). Al comparar las medias se observa una tendencia de incremento en todas las variables de producción (Cuadro 6) cuando los productos fueron aplicados en mezclas. Así, la producción de semillas se mejoró en 65 y 56% con Bravo 500 + Orthocide 50% y Bravo 500 + Kocide 101, en relación con la producción alcanzada en las parcelas no

Cuadro 6. Efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas sobre la marchitez bacteriana en *Centrosema acutifolium* CIAT 5277, medido por algunas variables de producción.

Parámetros	Variables de Producción			Peso seco (Kg/ha)
	Semillas ^{a/} (Kg/ha)	Vainas ^{a/} (No./ha)	Vainas vanas ^{a/} (%)	
Fungicidas				
Bravo 500 + Orthocide 50%	29.35 a*	162600 a*	40.33 a**	2095.90 a*
Bravo 500 + Kocide 101	23.72 ab	135950 ab	47.53 a	1790.00 ab
Kocide 101 + Orthocide 50%	18.56 abc	99650 abc	49.34 a	1561.90 ab
Orthocide 50% Kocide 101	17.76 bc	93700 bc	40.72 a	1762.70 ab
Kocide 101 Bravo 500	16.12 bc	93450 bc	48.65 a	2030.60 a
Bravo 500 Testigo	15.21 bc	97150 ab	48.68 a	1876.00 ab
Testigo	10.41 c	57950 c	39.73 a	1304.40 b
Método de Producción^{b/}				
B	25.41 a	111000 a	40.52 b	1730.01 ab
A	21.12 ab	108000 a	40.52 b	1472.70 b
D	17.19 ab	86210 a	42.05 ab	1733.90 ab
C	15.59 ab	75640 a	45.20 ab	1740.60 ab
E	14.38 b	147450 a	54.98 a	2195.20 a

* y ** Promedios en una misma columna seguidos por letras iguales no difieren en forma significativa ($P < 0.05$), según la prueba de Tuckey y Duncan, respectivamente.

a/ Suma de dos cosechas.

b/ A y B: tutor de King grass normal e invertido, respectivamente.

C y D: tutor convencional con alambre a 1.80 y 2.50 m de altura, respectivamente.

E: crecimiento postrado.

protegidas. Un valor de 29.35 Kg/ha de semilla fue obtenido en el mejor de los casos, esta cifra es baja según lo demostrado en otras investigaciones que señalan producciones entre 30 a 80 Kg/ha, pero bajo condiciones menos críticas (ICA, 1987).

Bajo las condiciones de este ensayo, alrededor del 50% de las vainas producidas quedaron vanas, hecho atribuible por una parte a la floración tardía que ocurrió en los finales de Noviembre, cuando la precipitación presentaba una fuerte declinación y por otra al efecto de la enfermedad. Los coeficientes de correlación calculados para el índice de infección que presentaron las plantas para esa época y la producción de vainas y % de vainas vanas; $r = -0.271^*$ y $r = -0.208^*$ respectivamente corroboran el efecto detrimental del patógeno en la producción de Centrosema. El vaneamiento fue mayor en el método de producción de crecimiento postrado, en donde el hábito de desarrollo lateral motiva la formación de rebrotes y hay un mayor esfuerzo productivo que no llega a materializarse en semillas ya que el 54.98% de las vainas quedaron vanas (Cuadro 6). Si bien los rebrotes crecieron sanos, por la protección de los fungicidas, esta forma de crecimiento no es adecuado para semilleros.

La producción de materia seca presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las parcelas tratadas en comparación con las no tratadas. Los valores más altos se presentaron con la mezcla Bravo 500 + Orthocide 50% y Bravo 500 + Koci 101, que aumentaron en 38 y 36% el rendimiento por encima del testigo (Gráfica 3). Se destacan en estos resultados los efectos de los sistemas de producción convencionales y postrado en la formación de materia verde; aunque esta es una variable errática para tenerla en consideración, muestra la estrecha relación, en la formación de brotes sanos y la producción de materia seca. Según el coeficiente

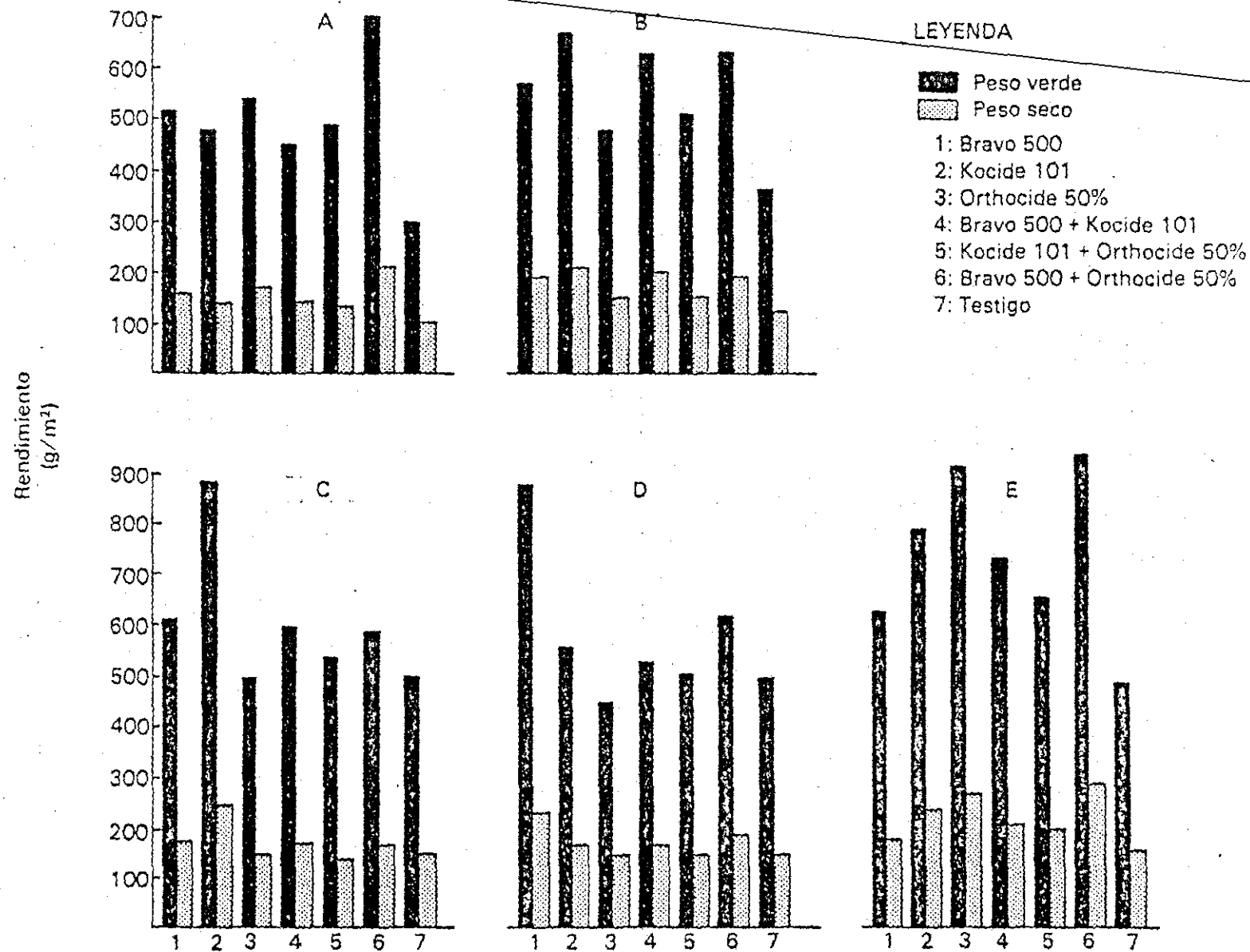


Fig. 3. Efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco formas de crecimiento en el rendimiento en peso verde y peso seco de *Centrosema acutifolium* CIAT 5277. (A y B, tutores de King Grass normal e invertido; C y D, tutores convencionales con alambre a 1.80 y 2.50 m; E, crecimiento postrado).

de correlación el marchitamiento de las plantas disminuye ($r = -0.147*$) la cantidad de materia seca.

Efecto de los tratamientos sobre la calidad del forraje producido por *C. acutifolium* CIAT 5277. El análisis de varianza no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) para el efecto de los productos aplicados sobre calidad del forraje (Cuadros 10 y 11, Anexo). Valores significativos se observan para los métodos de producción, no obstante las diferencias son tan pequeñas que la comparación de medias las coloca en un solo grupo (Cuadro 7). El contenido de proteína cruda varió entre 20.80 y 19.11, bajos para ésta leguminosa, si se toma en consideración que en evaluaciones preliminares en Santander de Quilichao se han obtenido promedios de 26.0% y 25.7% para accesiones de 5277 originarios de la Orinoquia y Colombia respectivamente (Schultze-Kraft et al., 1987). Los bajos rendimientos pudieron deberse a la madurez avanzada del material analizado, ya que el corte se realizó 9 meses después de transplantadas las plantas, mostrando evidentes disminuciones del porcentaje de Nitrógeno.

CONCLUSIONES

De los resultados de esta investigación se puede concluir lo siguiente:

1. Todos los fungicidas estudiados protegieron a las plantas de la marchitez bacteriana.
2. La mezcla Kocide 101 + Bravo 500 proporcionó buen control sobre *Pseudomonas fluorescens* Biotipo II en plantas de *Centrosema acutifolium* CIAT 5277, de igual manera redujo el nivel de infección en semillas a 0.5%.

Cuadro 7. Efecto de cinco métodos de producción de semillas en % de Nitrógeno y % de proteína cruda en plantas de Centrosema acutifolium CIAT 5277 afectados por la marchitez bacteriana inducida por Pseudomonas fluorescens Biotipo II.

Parámetro	Nitrogeno	Proteína cruda
	%	%
Método de Producción ^{a/}		
D	3.33 a*	20.80 a
C	3.26 a	20.37 a
E	3.15 a	19.70 a
A	3.12 a	19.50 a
B	3.06 a	19.11 a
MSD	0.26	1.60

* Promedios en una misma columna seguidos por letras iguales no difieren en forma significativa ($P < 0.05$), según prueba de Tuckey.

a/ A y B: tutor de King grass normal e invertido, respectivamente.
 C y D: tutor convencional con alambre a 1.80 y 2.50 m de altura, respectivamente.
 E: crecimiento postrado.

3. Las pruebas serológicas permitieron cuantificar con mayor precisión los niveles de infección por P. fluorescens Biotipo II en semillas de C. acutifolium CIAT 5277.
4. La variación en sensibilidad al Cobre y las diferencias de fluorescencia en P. fluorescens Biotipo II, sugieren la existencia de razas serológicamente iguales.
5. La interacción entre los fungicidas y los sistemas de producción de semillas no fue significativa en su efecto sobre la marchitez bacteriana, en semillas de Centrosema.
6. La producción de semillas se incrementó en 65 y 56% por efecto de las mezclas Bravo 500 + Orthocide 50% y Bravo 500 + Kocide 101, respectivamente.
7. Existió una correlación significativa ($r = 0.147^*$) entre marchitez bacteriana y la producción de MS de C. acutifolium CIAT 5277. Las parcelas no protegidas químicamente presentaron reducciones entre 36 a 38%.
8. Los efectos del tutoraje de crecimiento y los fungicidas no fueron significativos en el contenido de Nitrógeno y Proteína Cruda de C. acutifolium CIAT 5277.

RESUMEN

En las áreas de producción de semillas de C. acutifolium, existe poca investigación sobre el efecto de productos químicos aplicados en campo, en la reducción de la marchitez bacteriana y su incidencia en semillas. El tratamiento químico a las semillas se ha ensayado pero con eficacia relativa, persistiendo el riesgo de introducir a P. fluorescens Biotipo II a nuevas zonas. Con base en lo anterior se realizó el presente ensayo en Santander de Quilichao, Cauca, Colombia, para evaluar el efecto de tres fungicidas y mezclas de ellos, y cinco métodos de producción de semillas y así obtener información que permita mejorar la producción y calidad de semillas de esta importante leguminosa forrajera.

Los resultados demostraron que la mezcla Kocide 101 + Bravo 500 proporcionó buen control de P. fluorescens Biotipo II tanto en campo como en la infección de las semillas. Las pruebas serológicas permitieron resultados más precisos en la cuantificación de la infección en semillas por P. fluorescens Biotipo II. Hubo un efecto positivo sobre la producción de semillas, por parte de los fungicidas usados, igualmente la marchitez bacteriana tuvo efecto detrimental sobre la producción de materia seca de C. acutifolium CIAT 5277. Los métodos de producción de semillas y los fungicidas no tuvieron efecto sobre el contenido de Nitrógeno y de Proteína Cruda de la leguminosa.

SUMMARY

Little investigation exists about the effect of chemical products applied in the field on the reduction of bacterial wilt and its incidence in seeds in seed production areas of C. acutifolium. Chemical seed treatment has been tried with relative effectiveness due the risk of introducing P. fluorescens Biotype II to new regions. With respect to this base, the present trial was realized in Santander de Quilichao in order to evaluate the effect of three fungicides (alone and in mixtures) and five methods of seed production to obtain information that would allow improved production and quality of seeds of this important forage legume.

The results demonstrated that the mixture Kocide 101 + Bravo 500 gave good control of P. fluorescens Biotype II in the field as well as in seed infestation. The serological tests permitted more precise results in the quantification of the seed infection of P. fluorescens Biotype II. There was a positive effect in the production of seed due to the fungicides used, equally bacterial wilt had a detrimental effect on the production of dry matter of C. acutifolium CIAT 5277. The seed production methods had no effect on the nitrogen crude protein contents of the legume.

BIBLIOGRAFIA

- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1981. Programa de Pastos Tropicales. Informe Anual 1980. Fitopatología. Cali, Colombia. 43 pp.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1982. Programa de Pastos Tropicales. Informe Anual 1981. Fitopatología. Cali, Colombia 107 pp.
- Cochrane, T. T.; Sánchez, L. G.; Porras, J. A.; de Azevedo, L.G.; Garver, C. L. 1985. Land in Tropical America. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Planaltina, D. F. Brasil, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. Centro de Pesquisa Agropecuaria dos Cerrados. V. 1. 146 pp.
- Conlin, K. C. y McCarter, S. M. 1983. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting Pseudomonas syringae pv. tomato in vitro and in controlling bacteria speck. Plant Disease 67: 639-644.
- Dickens, L. E. y Oshima, N. 1968. An evaluation of protective spray for halo blight control in snap beans. Plant Disease Reporter 5(3): 225-226.
- Grof, B. 1985. Especies forrajeras promisorias para la sabanas de suelos ácidos e infértiles de América tropical. Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales. Resultados 1982-1985. CIAT, Cali, Colombia. V. 1: 742 p.
- Guthrie, J. W.; Huber, D. M. y Fenwick, H. S. 1965. Serological detection of halo blight. Plant Disease Reporter 49(4): 297-299.
- Hagedorn, D. J.; Wade, E. K., y Weis, G. 1969. Chemical control of bean bacterial diseases in Wisconsin. Plant Disease Reporter 53(3): 178-181.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 1987. Centrosema Vichada. Boletín Técnico No. 152. 13 pp.
- Lenné, J. M. y Torres, C. 1981. Bacterial leaf spot and dieback of Centrosema spp. Proc. Fifth Int. Conf. Plant Path. Bact. Cali, Colombia. p. 35-38.
- MacNab, A. A. 1980. Tomato bacterial speck control with fungicidas, 1979. Fungic. Nematic. Tests 35:93.

- Marco, G. M. y Stall, R. E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of Xanthomonas campestris p.v. vesicatoria that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67: 779-781.
- Moreno, J., Torres, C. y Lenné, J. M. 1987. Reconocimiento y evaluación de enfermedades de Leucaena en el Valle del Cauca, Colombia. *Pasturas Tropicales-Boletín*. 9(3): 30-35.
- Natti, J. J. 1969. Control of bacterial disease of bean. In: *Bean Improvement cooperative. Annual Report No. 13: 20-26.*
- Saettler, A. W. y Potter, H. S. 1970. Chemical control of halo bacterial blight in field beans. East Lansing, Michigan, Agricultural Experiment Station, Research Report No. 98. 8pp.
- Saettler, A. W. y Andersen, A. L. 1978. Bean diseases and their control. In: Robertson, L. S.; Frazier, R. D. (eds.) *Dry bean production - principles and practices.* East Lansing, Michigan State University, Cooperative Extension Service, Agricultural Experiment Station. Extension Bulletin E-1251 pp. 172-179.
- Schultze-Kraft, R.; Benavidez, G. y Arias, A. 1987. Recolección de germoplasma y evaluación preliminar de Centrosema acutifolium. *Pasturas Tropicales-Boletín*. 9(1): 12-20.
- Torres, C.; Rivera, M. E.; Balcázar, M. y Huertas, C. 1987. Resultados del proyecto Producción de antisuero para Pseudomonas fluorescens Biotipo II. Informe Sección de Patología de Pastos. Mimeografiado. CIAT, Cali, Colombia. 2 p.
- Trujillo, G. E. y Saettler, A. W. 1979. A combined semi-selective medium and serology test for detection of Xanthomonas blight bacteria in bean seed. *Journal of Seed Technology* 4(2): 35-41.

Anexo

Cuadro 1. Análisis de varianza para grado de infección en cada evaluación de *P. fluorescens* Biotipo II en *C. acutifolium* CIAT 5277.

	F. de V	GL	SC	Valor		PR > F
				F		
Eval. 1						
Rep		3	0.3156	0.82		0.4870
MP		4	2.7161	5.28		0.0007*
Rep x MP		12	1.5661	1.02		0.4421
Fung.		6	2.295	2.97		0.0107*
MP x Fung.		24	2.7859	0.90		0.5975
						C.V. 19.90%
Eval. 2						
Rep		3	1.0911	3.57		0.0171*
MP		4	0.8397	2.06		0.0923
Rep x MP		12	1.8745	1.53		0.1263
Fung.		6	6.6224	10.85		0.0001**
MP x Fung.		24	2.8183	1.15		0.3061
						C.V. 20.66%
Eval. 3						
Rep		3	0.0094	0.03		0.9931
MP		4	1.1933	2.82		0.0297*
Rep x MP		12	0.5381	0.42		0.9504
Fung.		6	5.2994	8.35		0.0001**
MP x Fung.		24	3.4927	1.38		0.1429
						C.V. 22.92%
Eval. 4						
Rep		3	1.6059	5.04		0.0028*
MP		4	0.7276	1.71		0.1538
Rep x MP		12	0.4901	0.38		0.9658
Fung.		6	12.9447	20.33		0.0001**
MP x Fung.		24	2.3324	0.92		0.5809
						C.V. 27.52%
Eval. 5						
Rep		3	0.6160	2.57		0.0593
MP		4	1.7326	5.42		0.0006*
Rep x MP		12	0.9669	1.01		0.4489
Fung.		6	14.1237	29.44		0.0001**
MP x Fung.		24	2.4134	1.26		0.2178
						C.V. 20.32%
Eval. 6						
Rep		3	2.6391	5.30		0.0021**
MP		4	1.0990	1.65		0.1675
Rep x MP		12	3.1513	1.58		0.1111
Fung.		6	6.2167	6.24		0.0001**
MP x Fung.		24	2.3840	0.60		0.9238
						C.V. 26.69%

* Diferencias significativas (P < 0.05).

** Diferencias altamente significativas (P < 0.05).

Cuadro 2. Análisis de varianza combinado para el grado de infección en las seis evaluaciones en *C. acutifolium* CIAT 5277.

Fuente de Variación	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep.	3	0.6440	1.78	0.1493
Met. Prod.	4	3.1335	6.51	0.0001 **
Rep x MP	12	0.5287	0.37	0.9747
Fung.	6	38.8461	53.77	0.0001 **
MP x Fung.	24	2.9352	1.02	0.4432
Rep x MP x Fung.	90	12.4273	1.15	0.1840
Eval	5	29.3213	48.71	0.0001 **
Eval x MP	20	5.1748	2.15	0.0028 *
Eval x Fung.	30	8.6557	2.40	0.0001 **
Eval x MP x Fung.	120	13.2915	0.92	0.7079

* Diferencias significativas

** Diferencias altamente significativas

C.V. = 23.48%

Cuadro 3. Efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas sobre *P. fluorescens* Biotipo II, en *C. acutifolium* CIAT 527 medido por el contenido de Cu en tejido vegetal.

Tratamientos	Métodos de Producción					x
	A	B	C	D	E	
Bravo 500	50.0*	74.0	87.5	74.75	30.75	63.4
Kocide 101	813.75	1050.75	566.0	785.50	488.25	578.22
Orthocide 50%	73.75	61.0	61.25	71.0	35.0	60.40
Bravo 500 + Kocide 101	757.50	829.25	518.50	582.50	693.0	676.15
Kocide 101 + Orthocide 50%	550.75	487.25	663.50	850.00	655.50	641.40
Bravo 500 + Orthocide 50%	94.75	41.50	35.25	30.50	108.0	62.00
Testigo	37.50	28.25	34.75	27.8	19.80	29.62

* ppm.

Cuadro 4. Análisis de varianza del porcentaje de infección de semillas de C. acutifolium CIAT 5277, con Pseudomonas fluorescentes.

F. de V	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep.	3	0.0073	0.55	0.6467
MP	4	0.0022	1.27	0.2869
Rep x MP	12	0.0587	1.12	0.3561
Fung.	6	0.0624	2.38	0.0354*
MP x Fung.	24	0.1626	1.55	0.0729

* Diferencias significativas ($P < 0.05$).
C.V. = 8.02%

Cuadro 5. Análisis de varianza del porcentaje de infección de semillas por *P. fluorescens* Biotipo II, en *C. acutifolium* CIAT 5277.

F de V	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep	3	0.0030	0.69	0.5612
MP	4	0.0037	0.65	0.6318*
Rep x MP	12	0.0141	0.81	0.6368*
Fung.	6	0.0114	1.31	0.2625*
MP x Fung	24	0.0331	0.95	0.5339*

* No significativo
C.V. = 4.80%

Cuadro 6. Análisis de varianza del efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas, sobre la marchitez bacteriana de *C. acutifolium* CIAT 5277, medido por la producción de semillas.

F de V	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep	3	90546.25	6.37	0.0006*
MP	4	85783.17	4.52	0.0022*
Rep x MP	12	116751.57	2.05	0.0282
Fung.	6	136729.19	4.81	0.0003*
MP x Fung.	24	118680.03	1.04	0.4242

* Diferencias significativas ($P < 0.05$).

C.V. = 62.45%

Cuadro 7. Análisis de varianza del efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas, sobre la marchitez bacteriana de *C. acutifolium* CIAT 5277, medido por la producción de materia seca.

F de V	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep	3	205307.00	12.26	0.0001*
MP	4	76393.71	3.42	0.0119*
Rep x MP	12	62739.10	0.94	0.5145
Fung.	6	89141.35	2.56	0.0201*
MP x Fung.	24	88956.22	0.66	0.8729

* Diferencias significativas ($P < 0.05$)

C.V. = 42.10%

Cuadro B. Análisis de varianza del efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y métodos de producción de semillas sobre la marchitez bacteriana de *C. acutifolium* CIAT 5277, medido por la producción de vainas.

F de V	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep	3	90546.25	6.37	0.0006*
MP	4	85783.17	4.52	0.0022*
Rep x MP	12	116751.51	2.05	0.0282
Fung.	6	136729.19	4.81	0.0003*
MP x Fung.	24	118680.03	1.04	0.4234

* Diferencias significativas ($P < 0.05$).

C.V. = 65.08%

Cuadro 9. Análisis de varianza del efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas, sobre la marchitez bacteriana de *C. acutifolium* CIAT 5277, medida por el porcentaje de vainas vanas.

F de V	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep.	3	354.99	0.55	0.8507
MP	4	3687.83	4.27	0.0034*
Rep x MP	12	5307.13	2.05	0.0291*
Fung.	6	2344.22	1.81	0.1065
MP x Fung.	24	5445.22	1.05	0.4153

* Diferencias significativas ($P < 0.05$).

C.V. = 32.69%

Cuadro 10. Análisis de varianza del efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas, sobre la marchitez bacteriana de *C. acutifolium* CIAT 5277, medido por porcentaje de Nitrógeno por muestra.

F de V	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep	3	0.336	1.04	0.3810
MP	4	1.325	3.16	0.0178*
Rep x MP	12	1.556	1.23	0.2725
Fung.	6	0.239	0.36	0.8900
MP x Fung.	24	2.629	1.04	0.4236

* Diferencias significativas ($P < 0.05$).
 C.V. = 10.18%

Cuadro II. Análisis de varianza del efecto de tres fungicidas y sus mezclas, y cinco métodos de producción de semillas, sobre la marchitez bacteriana de *C. acutifolium* CIAT 5277, medido por el contenido de proteína por muestra.

F de V	GL	SC	Valor F	PR > F
Rep	3	12.883	1.05	0.3746
MP	4	51.405	3.14	0.0182*
Rep x MP	12	61.173	1.25	0.2651
Fung.	6	9.344	0.38	0.8896
MP x Fung.	24	102.261	1.04	0.4256

* Diferencias significativas ($P < 0.05$).

C.V. = 10.16%

Cuadro 12. Coeficientes de correlación entre grados de infección por *P. fluorescens* Biotipo II en *C. acutifolium* CIAT 5277 y variables de rendimiento.

Grado de	Variables de Rendimiento								
	PV	PS	P Sem.	P. va.	% VaV	% ISBF	% ISPF	% N	% Pr
4a. Eval.	-0.132	-0.117	-0.162°	-0.271*	0.208	0.200	0.058	-0.002	-0.0
5a. Eval.	-0.201*	-0.196*	-0.128	-0.187*	-0.165°	0.143	0.110	0.009	0.0
6a. Eval.	-0.172*	-0.147°	0.013	-0.030	-0.104	0.035	-0.005	0.025	0.0

* Diferencias significativas (P < 0.05)

° Diferencias significativas (P < 0.08)

PV: Peso verde

PS: Peso seco

P Sem: Peso semillas

P Va: Producción vainas

% VaV: % Vainas vanas

% ISBF: % Infección de semillas con bacterias fluorescentes

% ISPF: % Infección de semillas con *P. fluorescens* Biotipo II

% Nn: Rendimiento de Nitrógeno

% Prot: Rendimiento de Proteína