

PIGMENTOS DE LA TESTA DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*, L.) COMO INHIBIDORES DEL DESARROLLO *in-vitro* DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

PIGMENTS FROM BEAN (*Phaseolus vulgaris*, L.) COAT AS INHIBITORS OF GROWING *in-vitro* OF *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* AND *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Ernestina Valadez Moctezuma<sup>1</sup>, Aquiles Carballo Carballo<sup>2</sup>, María Luisa Ortega Delgado<sup>2</sup> y Leopoldo Fucikovsky Zac<sup>2</sup>

RESUMEN

Se ha reportado que los pigmentos que conforman el color de flores, frutos y semillas tiene una diversidad de funciones involucradas en mecanismos que les permiten a las plantas sobrevivir condiciones adversas, entre las que destaca la tolerancia al daño causado por hongos fitopatógenos. En la presente investigación se estudió el efecto que muestran los diferentes pigmentos extraídos de semillas de frijol sobre el desarrollo *in vitro* de las bacterias *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*X. a.* pv. *p.*) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*P. s.* pv. *p.*), patógenos del mismo cultivo, los cuales inhibieron el desarrollo *in-vitro* de ambas bacterias, siendo más afectada *X. a.* pv. *p.* Al separar los integrantes químicos que componen cada pigmento, se encontró que pertenecen a diferentes grupos de flavonoides en donde las antocianinas estuvieron siempre presentes.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Antocianinas, cromatografía, flavonoides, metabolitos

SUMMARY

It has been known that the pigments from flowers, fruits and seeds have several functions that are involved on mechanisms that permit the plants to overcome adverse environmental conditions, principally the tolerance that they show against phytopathogenic fungus. An affect

of pigments from bean seeds on development of two plant pathogenic bacteria namely *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*X. a.* pv. *p.*) and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Ps. s.* pv. *p.*) were studied. Inhibition of both bacteria was noted, being more marked in the case of *X. a.* pv. *p.* On separation of chemical components of each pigment it was found that they belong to different flavonoid groups and the anthocyanins were present in all the extracts.

ADDITIONAL INDEX WORDS

Anthocyanins, chromatography, flavonoids, metabolites

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al igual que otros cultivos, es afectado por una cantidad considerable de organismos fitopatógenos. En México las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos son las principales causas de la pérdida en la producción de este cultivo y las bacterias ocupan el segundo lugar de importancia en este aspecto (Lépiz, 1986).

*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *P. s.* pv. *p.*, y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. a.* pv. *p.*, (reclasificada por Vauterin *et al.*, 1995) causan en el frijol las enfermedades del "tizón de halo" y "tizón común", respectivamente, produciendo grandes pérdidas económicas principalmente en lugares de ambiente húmedo y con temperaturas que oscilan entre 20 y 30 °C (Schaad y Kendrick, 1985; Fahy y

<sup>1</sup> Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. C.P. 56230. Tel. y Fax: 01(595) 2-1642. E-mail: [evaladez@taurus1.chapingo.mx](mailto:evaladez@taurus1.chapingo.mx)

<sup>2</sup> Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. C.P. 56230. Tel. y Fax: 01(595) 2-0200.

Persley, 1983). Ambas bacterias, tienen la capacidad de dañar indistintamente tallos, hojas, vainas y semillas por lo que ha sido necesario considerar diferentes métodos de control como la siembra de variedades mejoradas, el uso de sustancias químicas y ciertas prácticas culturales (Schaad, 1980; Lepiz, 1986; Trigalet y Bidaud, 1978; Gallegos *et al.*, 1966).

Los síntomas típicos del tizón común se caracterizan al inicio de la infección por la presencia de pequeños puntos acuosos en el envés de las hojas que posteriormente se vuelven redondos, aceitosos y de color verde claro; al avanzar la infección, estos puntos se manifiestan como zonas necróticas rodeadas de un halo clorótico bien definido ocasionado por la toxina que produce la bacteria. En vainas, los síntomas se parecen a los de las hojas y en algunos casos es posible observar un exudado de color blanco plateado producido por el patógeno. Cuando la infección se produce por semilla contaminada los síntomas se presentan en plantas muy jóvenes y muchas veces hay adelgazamiento en un punto específico del tallo o una especie de pudrición en el nudo de los cotiledones.

El tizón común se caracteriza porque en el envés de la hoja aparecen puntos acuosos que aumentan de tamaño y adquieren forma irregular dando lugar a lesiones grandes. Estas áreas se notan flácidas y rodeadas de un borde de color amarillo que al necrosarse, adquieren un color café cubriendo gran parte de la hoja. Frecuentemente se observa en el envés de las hojas también un exudado bacteriano, que al principio es de color amarillento y después se vuelve negro; esto causa defoliación prematura cuando el ataque es severo. Al parecer, el patógeno se desplaza desde el punto de infección a los elementos vasculares e induce flacidez en el tallo, dando lugar a un adelgazamiento y una **consecuente pudrición**. En las vainas también se pueden apreciar puntos acuosos, pero mientras que en hojas el borde de la lesión es amarillo, en

vainas es rojizo y levemente deprimido (Pastor-Corrales, 1985; Schaad y Kendrick, 1985).

Aún cuando se ha reconocido ampliamente el daño que los diferentes patógenos ocasionan a las plantas, la mayoría de ellas se mantienen sanas debido a que presentan diferentes mecanismos de autodefensa; se ha citado por ejemplo, la estructura y el color de la semilla para el caso del frijol, que ha sido relacionado como fuente de resistencia contra el ataque de hongos como *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Prasad y Weigle, 1976). Se ha reportado que esta respuesta está dada, en primer lugar, por las diferencias anatómicas de las semillas que contrastan en color; por ejemplo, las que son de color negro a diferencia de las de color blanco tienen un micrópilo más pequeño, la testa es más gruesa y está fuertemente adherida a los cotiledones, además presenta poca afinidad a la humedad por lo que su capacidad de absorción de agua es menor. Estas características confieren a las semillas un porcentaje de germinación más alto, así como un marcado vigor y resistencia a los patógenos antes citados (Gnanamanickam y Patil, 1977; Prasad y Weigle, 1976).

En cuanto al pigmento de las semillas del frijol, se ha señalado que contiene una diversidad de compuestos polifenólicos, particularmente del grupo de los flavonoides, característicos también del color de las flores (Valadez *et al.*, 1990). Se ha reportado que esta clase de metabolitos está involucrada en diferentes aspectos metabólicos en la vida de las plantas que les permite subsistir en ecosistemas adversos, tales como el crecimiento, diferenciación, formar parte del sistema de defensa natural contra patógenos, intervenir en la tolerancia al daño por estrés, actuar como moléculas señal en algunas interacciones planta-patógeno (*Rhizobium* y *Agrobacterium*) y como compuestos alelopáticos, (Siqueira *et al.*, 1991; Peters y Verma, 1990; Harborne, 1980).

Las fitoalexinas, que son las sustancias directamente involucradas en la respuesta de resistencia que ofrece la planta cuando es afectada por algún patógeno, constituyen un grupo químicamente heterogéneo y están distribuidas en varias clases de compuestos. Se ha identificado alrededor de 150 sustancias diferentes y algunas de ellas tienen su origen en los flavonoides (Peters y Verna, 1990). Con respecto a su actividad en el sistema de defensa, se ha observado que estas sustancias se sintetizan inmediatamente después de la infección y se concentran de manera exclusiva y en cantidades suficientes para evitar la dispersión del patógeno al tejido sano (Siqueira *et al.*, 1991).

Por otro lado, se ha indicado que los compuestos fenólicos también exhiben un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra patógenos de plantas. La toxicidad de los fenoles es variable respecto a sus funciones, concentraciones, microorganismos blanco o procesos; por ejemplo, en hongos se afecta la germinación de esporas, crecimiento del micelio, diferenciación y otras características relacionadas a la patogénesis como es la producción y actividad de enzimas y toxinas, pero los mecanismos por los cuales se lleva a cabo lo anterior se desconocen (Valadez *et al.*, 1990; Prasad y Weigle, 1976).

Considerando la actividad antimicrobiana que tienen los pigmentos y tomando en cuenta la variedad y la concentración de los mismos en algunas estructuras de las plantas, la presente investigación se planteó con la finalidad de evaluar el efecto de este tipo de sustancias obtenidas a partir de semillas de frijol de diferente color, sobre el desarrollo *in vitro* de dos bacterias fitopatógenas del mismo, *P. s. pv. p.* y *X. a. pv. p.*, así como la identificación de los compuestos químicos que constituyen dicho pigmento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Extracción de los pigmentos

Los pigmentos a evaluar se obtuvieron de la cubierta (testa) de semillas de 11 genotipos de frijol de diferente color (Cuadro 1), de acuerdo con la metodología citada por Prasad y Weigle (1976) y Kurt (1969). Se molió 25 g de la testa de cada variedad hasta convertirla en harina, la cual se mezcló con 100 mL de una solución de metanol-HCl al 1 %. Esta mezcla se hirvió durante 15 minutos en baño maría, para la máxima extracción de los pigmentos y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante obtenido se colocó nuevamente en baño maría hasta su total evaporación y se eluyó convencionalmente en 5 mL de agua destilada estéril; esto permitió que el extracto se esterilizara y se eliminaran los residuos de metanol y/o HCl que pudieran influir con las evaluaciones posteriores. Al medir el pH de cada una de las eluciones resultantes, se encontraron valores que oscilaron desde 7.5 para el pigmento del frijol Negro Jamapa hasta 6.0 para el resto de las variedades.

Cuadro 1. Variedades de frijol utilizadas

Variedad	Color de la testa
1. Negro Jamapa	Negro
2. Rojo Centroamericano	Rojo
3. Ica Guali	Pinto rojo
4. Flor de Mayo	Pinto rosa
5. Cacahuatate 72	Crema con manchas rojizas
6. Michoacán 152	Café claro
7. Esperanza Puebla	Café pinto
8. Canario 101	Amarillo claro
9. II-758-2-I-MM	Amarillo claro
10. Amarillo 153	Amarillo
11. Güero Aluvia	Blanco



## Evaluación de la actividad de los pigmentos

### a) Efecto de inhibición en medio de cultivo sólido

En primer lugar, los diferentes pigmentos se evaluaron utilizando discos de papel filtro impregnados con cada uno de los extractos sobre el desarrollo de ambas bacterias en cajas petri. Se utilizó el medio de cultivo B de King (KB) [20 g de proteasa peptona No. 3 de Difco, 1.5 g de  $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ , 1.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 15 mL de glicerol y 15.0 g de agar / litro] para *P. s. pv. p.*, y el medio NBY (Nutrien-Broth Yeast extract agar) [8.0 g de caldo nutritivo de Difco, 2.0 g de extracto de levadura de Difco, 2.0 g de  $K_2HPO_4$ , 0.5 g de  $K_2HPO_4$ , 15 g de agar, 50 mL de glucosa 10% y 1.0 mL de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  / litro] para *X. a. pv. p.*, (Schaad, 1980). Se dispersaron sobre la caja petri 100  $\mu$ L de una suspensión de  $3 \times 10^9$  células/mL de la bacteria correspondiente y enseguida se colocaron de forma equidistante 3 discos de papel filtro estéril de 0.5 cm de diámetro impregnados con el extracto correspondiente; las cajas se incubaron por 24 h a 27 °C. La evaluación consistió en la medición del diámetro del halo de inhibición formado alrededor del disco con cada extracto y su comparación en cada especie de bacteria.

### b) Efecto de inhibición en medio de cultivo líquido

Posteriormente, mediante otro bioensayo diferente al anterior, se evaluó el efecto de los mismos extractos sobre el desarrollo de ambas bacterias pero en medio líquido. La prueba se llevó a cabo en tubos de ensayo con capacidad para 20 mL que contenían 5 mL del medio líquido YBG para *Xanthomonas* y KB para *Pseudomonas* (estos medios se prepararon igual que en el inciso a, pero sin agar) y un inóculo bacteriano inicial de 0.05 (concentración final) medido a  $DO_{650}$  nm, más 2.5 % del extracto

pigmentado correspondiente. Los tubos se incubaron inclinados para permitir la aireación respectiva a 27 °C en agitación continua durante 36 h. La evaluación se llevó a cabo midiendo el desarrollo bacteriano final con base a la turbidez registrada en el espectrofotómetro. Cabe mencionar que la longitud de onda utilizada ( $DO_{650}$ ) no es absorbida por los pigmentos en estudio, de manera que éstos no interfirieron sobre el valor de la lectura obtenida antes y después del desarrollo de las bacterias.

Los resultados obtenidos para ambos casos, fueron analizados conforme un diseño de bloques al azar con tres repeticiones independientes, en donde cada repetición fue el promedio de tres observaciones. Se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para las dos variables consideradas en cada bacteria fitopatógena.

## Identificación de los componentes químicos que integran los pigmentos de las semillas de frijol

Para identificar los compuestos que integran el extracto pigmentado de las semillas en estudio de esta leguminosa, se utilizó la técnica de cromatografía descendente en papel (Arditti y Dunn, 1969; Kurt, 1969; Harborne, 1980). Esta técnica consistió en colocar en un extremo de una hoja de papel Whatman No. 1, 50  $\mu$ L de cada uno de los extractos (volúmenes convencionales) en forma lineal y a una distancia de dos cm entre cada muestra. Una vez separados los integrantes de cada pigmento, la hoja Whatman se introdujo en una cámara cromatográfica previamente saturada con butanol-ácido acético-agua en proporción 4:1:5, respectivamente, durante 18 h y una vez que el cromatograma se hubo secado al aire libre, se reveló con luz visible, luz UV y vapores de amoníaco. La identificación y clasificación de los compuestos integrantes para cada pigmento, se llevó a cabo considerando el valor de  $R_f$  y el color

expuesto a los diferentes reveladores utilizados, de acuerdo con lo citado por Ranganna (1977) y Zweig y Sherma (1972).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto que ocasionaron los pigmentos sobre el desarrollo de *X. a. pv. p.* y *P. s. pv. p.*, se indican en las Figuras 1 y 2. La Figura 1 muestra la respuesta promedio de inhibición (expresada en mm) que presentaron ambas bacterias con el primer bioensayo (evaluación con discos de papel filtro). Los halos observados para el caso de *Xanthomonas*, variaron desde 6.5 mm hasta 15.0 mm y los pigmentos que mayor efecto ocasionaron correspondieron a las variedades II-758-2-I-MM (9), Michoacán 152 (6) y Canario 101 (8). Para el género *Pseudomonas*, los diámetros de los halos siempre fueron más pequeños, desde 7.03 mm hasta 6.0 mm y los extractos más eficientes pertenecieron a las variedades Canario 101 (8), Negro Jamapa (1) y Güero Aluvia (11).

En la Figura 2 se muestra el porcentaje de inhibición de las bacterias en estudio evaluadas en medio líquido. Se puede apreciar que los extractos de las variedades Amarillo 153 (10), Flor de Mayo (4) y Michoacán 152 (6), produjeron un mayor efecto para el caso de *Pseudomonas*; mientras que para *Xanthomonas*, la mayor inhibición la ocasionaron los extractos de II-758-2-I-MM (9), Canario 101 (8) y Esperanza Puebla (7).

Al comparar el contenido de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de mayor efecto en *Xanthomonas* (Esperanza Puebla y Canario 101) se puede apreciar en el Cuadro 3 que además de antocianinas, éstos contienen flavonoles y carecen de flavonas, isoflavonas y

flavanonas, lo que pudiera estar correlacionado con dicha respuesta.

Independientemente de la evaluación realizada con dos bioensayos diferentes, se esperaba que los extractos mostraran una correlación en el efecto de inhibición aunque con valores distintos, pero solamente en *Xanthomonas* se pudo apreciar en parte este comportamiento en los extractos 6, 8 y 9 (Figuras 1 y 2). Este efecto no claro pudiera deberse a que ambos bioensayos ofrecen diferente sensibilidad debido a las características de cada uno de ellos; por ejemplo, la concentración utilizada de los extractos y de las bacterias para cada caso no son equivalentes, ya que las cantidades utilizadas fueron arbitrarias y no se evaluaron diluciones; por otro lado, el contacto de los extractos con las bacterias no es el mismo, ya que uno se evaluó sobre medio sólido y el otro en medio líquido, por lo que ambas técnicas no son comparables en este sentido.

Sin embargo, los dos microorganismos fitopatógenos mostraron dos tendencias constantes: un efecto de inhibición más claro en el medio líquido (debido probablemente al mejor contacto con los extractos) y una mayor susceptibilidad con todos los pigmentos por parte de *Xanthomonas*. Estos comportamientos fueron respaldados por los análisis mostrados en el Cuadro 2, en donde se puede apreciar los valores máximos y mínimos de inhibición para cada caso.

Los resultados obtenidos sobre el desarrollo *in-vitro* de *X. a. pv. p.* y *P. s. pv. p.*, indican claramente un efecto antibacterial diferencial ocasionado por los pigmentos en estudio, lo cual concuerda con los reportes de Gnanamanickam y Patil (1977); Prasad y Weigle (1976) y McLean *et al.*, (1968), quienes observaron también este mismo efecto pero sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos utilizando el

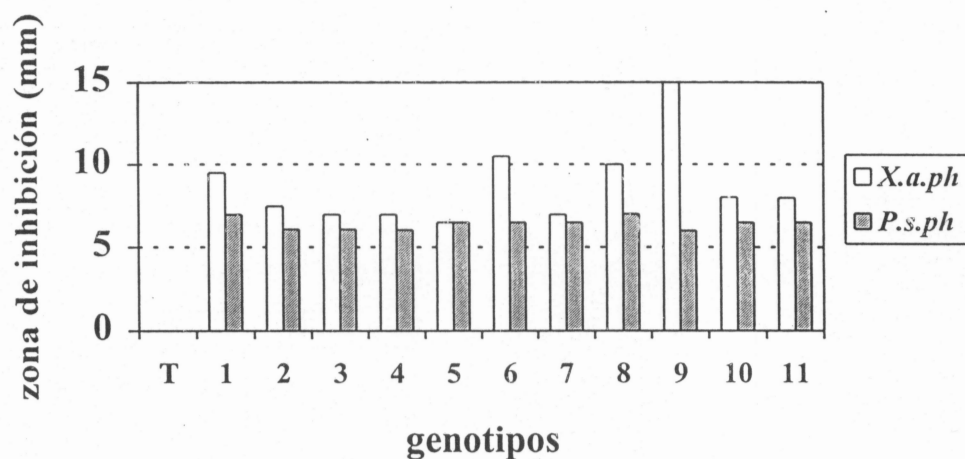


Figura 1. Efecto de inhibición causado por pigmentos de frijol en *X. Axonopodis* pv. *Phaseoli* (*X.a.ph*) genotype y *P. syringae* pv. *Phaseolicola* (*P.s.ph*) en medio sólido.

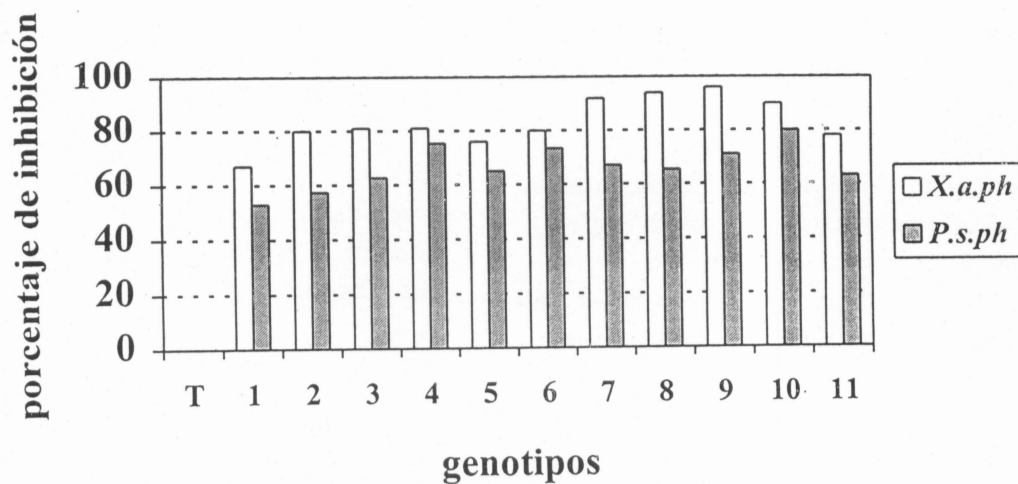


Figura 2. Efecto de inhibición causado por pigmentos de frijol en *X. anonopodis* pv. *phaseoli* (*X.a.ph*) y *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*P.s.ph*) en medio líquido.

Cuadro 2. Análisis de agrupamiento (Tukey  $\alpha = 0.05$ ) del efecto de inhibición de los diferentes pigmentos sobre las bacterias fitopatógenas†

Inhibición en medio sólido				Inhibición en medio líquido			
Variedad	Pseudo-monas	Variedad	Xanthomonas	Variedad	Pseudo-monas	Variedad	Xanthomonas
8	7.0 a	9	15.0 a	10	80.0 a	9	96.0 a
1	7.0 ab	6	10.5 b	4	75.3 ab	8	94.0 a
11	6.5 bc	8	10.0 b	6	73.3 abc	7	92.0 a
10	6.5 bc	1	9.5 b	9	71.0 bcd	10	90.0 a
5	6.5 bc	10	8.0 c	7	67.0 cde	3	81.0 b
6	6.5 bc	11	8.0 cd	8	65.3 de	4	81.0 b
7	6.5 bc	2	7.5 cde	5	65.0 de	6	80.0 b
2	6.0 cd	7	7.0 de	11	63.0 ef	2	80.0 b
3	6.0 cd	3	7.0 de	3	62.7 ef	11	78.0 b
4	6.0 cd	4	7.0 de	2	57.3 fg	5	76.0 b
9	6.0 d	5	6.5 e	1	53.0 g	1	67.0 c

† Medias con una misma letra son iguales estadísticamente.

Cuadro 3. Relación de compuestos fenólicos presentes en los extractos pigmentados de la testa de las diferentes variedades de frijol utilizadas

Variedades de frijol	Antocianina	Flavonol	Flavona	Isoflavona	Flavanona
Jamapa	+	+	-	+	-
Rojo Centroamericano	+	+	-	-	+
Ica Guali	+	+	-	-	-
Flor de Mayo	+	-	+	+	-
Cacahuatate 72	+	-	-	+	-
Michoacán 152	+	-	+	-	-
Esperanza Puebla	+	+	-	-	-
Canario 101	+	+	-	-	-
II-758-2-I-MM	+	+	+	-	-
Amarillo 153	+	-	-	+	-
Güero Aluvia	-	+	-	-	-

pigmento de variedades distintas a las utilizadas en el presente trabajo

Aún cuando no se conoce la forma mediante la cual las bacterias son afectadas por los compuestos fenólicos, podría deberse en un primer plano, a la capacidad que éstas pudieran tener

para transportar a su interior eficientemente dichos compuestos; y/o quizá, a la clase y concentración de cada uno de ellos tomando en cuenta la presencia de proteínas de membrana, cuya función esté involucrada en dicha transferencia. En un segundo plano, el efecto de inhibición pudiera estar correlacionado también con

la alteración de alguna ruta metabólica involucrada en mecanismos importantes una vez que los compuestos fenólicos están dentro de la bacteria, lo que se vio reflejado en la capacidad de reproducción. Esta posibilidad ha sido reportada para hongos, en donde compuestos isoflavonoides son capaces de cambiar la permeabilidad de la membrana celular, inhibir varias enzimas e incluso afectar la transcripción del ADN (Siqueira *et al.*, 1991).

Al analizar los constituyentes químicos de los extractos mediante el análisis cromatográfico descrito, se pudo identificar una variedad de compuestos fenólicos clasificados previamente como flavonoides que se encontró distribuidos de diferente manera en las variedades de frijol consideradas, siendo más abundantes las antocianinas, seguidas de los flavonoles, isoflavonas y finalmente las flavonas. El resumen de estos datos se presenta en el Cuadro 3.

El efecto de los flavonoides que aquí se reporta, ha sido estudiado en otras plantas y se ha considerado de manera general como un mecanismo de resistencia natural que puede ser expresado a diferentes niveles, dependiendo de la calidad y cantidad de dichos compuestos (Cano, *et al.*, 1995). Estos hallazgos han motivado a algunos científicos a dirigir sus investigaciones a la búsqueda de genes responsables de la codificación de enzimas involucradas en el metabolismo de flavonoides, con la finalidad de saber su función en la planta e intentar sobreexpresarlos en las mismas para incrementar el nivel de resistencia natural (Dooner y Robbins, 1991).

Sin embargo, también valdría la pena considerar a mediano o corto plazo el uso potencial de estos compuestos biológicamente activos con la finalidad de optimizar o modificar las propiedades de nuevos plaguicidas en la protección vegetal. Este segundo aspecto sería más factible a mediano plazo comparado con el

tiempo y costo económico que implica manipulación genética.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados de la presente investigación, se enumeran a continuación algunas conclusiones generales.

Los extractos pigmentados purificados a partir de la testa de las semillas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ocasionaron inhibición sobre el desarrollo *in-vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, patógenos de este cultivo.

No se observó una relación directa entre el número de integrantes químicos de los pigmentos evaluados con el grado de inhibición mostrada por las bacterias en estudio.

La bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* resultó más afectada en su desarrollo por los diferentes pigmentos respecto a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Los flavonoides integrantes de los diferentes pigmentos de la testa del frijol en las variedades consideradas fueron: antocianinas, flavonoles, flavonas, isoflavonas y flavanonas.

Se podría considerar las propiedades antibacterianas que ofrecen los compuestos fenólicos en el intento de formular plaguicidas de tipo natural y de esta forma disminuir la contaminación ambiental.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arditti, J. and A. Dunn. 1969. The antocyanin pigments of plants. *Experimental Plant Physiology*. Holt, Rinehart and Winston, INC. N.Y. pp. 138-145.



- Cano C., H; G. P. Zavala y E. L. Gloria. 1995. Las defensas químicas de las plantas. *Ciencia* 46: 64-73.
- Dooner, K. H. and T. P. Robbins. 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 25:173-199.
- Fahy, P.C. and G.J. Persley. 1983. Plant bacterial disease. A diagnostic guide. Academic Press. 393 p.
- Gallegos B., C., A.T. Campos y A. Crispin. 1966. Estudios genéticos de la resistencia del frijol a *Pseudomonas phaseolicola* (Burk) Dows. *Agrociencia* 1:56-66.
- Gnanamanickam, S.S. and S.S. Patil. 1977. Phaseotaxia suppresses bacterially induced hypersensitive reaction and phytoalexin synthesis in bean cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* 10:169-179.
- Harborne, J.B. 1980. Plant phenolics. In: Bell, H.H. and B.V. Chalwood, (eds.). Secondary plant products. *Encyclopedia of plant physiology*. 8, 329-395.
- Kurt, E. 1969. Compounds classes and their distributions. In: Thin-layer chromatography. Stahl, E. 1969. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, N.Y. pp. 687-706.
- Lépiz I., R. 1986. Enfermedades del frijol en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 4(2):176-181.
- McLean, D.M., J.C. Hoffman, and G.B. Brown. 1968. Greenhouse studies on resistance of snap beans to *Rhizoctonia solani*. *Plant Dis. Rep.* 52:486-488.
- Pastor-Corrales, M. (1985). Enfermedades del frijol causadas por bacterias. Frijol: Investigación y Producción. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp. 207-215.
- Peters, N.K. and D.P.S. Verma. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* Vol. 3(1):4-8.
- Prasad, K. and L.J. Weigle. 1976. Association of seed coat factors with resistance to *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 66:342-345.
- Ranganna, S. 1977. Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products. McGraw-Hill. New Delhi. 634 p.
- Siqueira O.J., M.G. Nair., H. Raymond, and G.R. Safir. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical reviews in plant sciences*, 10(1):63-121.
- Schaad, N. W. 1980. Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 15. Schaad, N.W. 1982. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. *Plant Disease*. 66:885-890.
- Schaad, N.W. and R. Kendrick. 1975. A qualitative method for detecting *Xanthomonas campestris* in crucifer seed. *Phytopathology* 65:1034-1036.
- Trigalet, A. and P. Bidaud. 1978. Some aspects of epidemiology of bean halo blight. *Proc. 4<sup>th</sup> Intern. Conf. Plant Path. Bact. Angers*. 895-902.
- Valadez M., E. M.L. Ortega, A. Carballo y L. Fucikovsky. 1990. Flavonoides de la testa del frijol como inhibidores de dos bacterias fitopatógenas. *Agrociencia, Serie Protección Vegetal*. Vol. 1 (2): 75-91.
- Vauterin, L., R. Hoste, K. Kersters, and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic bacteriology* 45 (3): 472-489.
- Zweig, G. and J. Sherma. 1972. CRC Handbook series in chromatography. Vol. I y Vol. II. Press. Inc. Palm Beach, USA. 784 p.