Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Jorge Patricio Venegas Ferrín

Honduras
Diciembre, 2002

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Ciencia y Producción Agropecuaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Jorge Patricio Venegas Ferrín

Honduras
Diciembre, 2002

El autor concede a Zamorano permiso
Para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Jorge Patricio Venegas Ferrín

Honduras
Diciembre, 2002

Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

presentado por:

Jorge Patricio Venegas Ferrín

Aprobada:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor Principal

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.
Coordinador de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

María Mercedes Doyle, Ph.D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Mario Contreras, Ph.D.
Director General

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Coordinador Área Temática
Biotecnología

DEDICATORIA

A Dios

A mi padre Manuel y a mi madre Grace.

A mis hermanos Danilo, Marianela y Michael.

A mi amigo y hermano César.

A toda mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme fuerza e iluminarme en el camino hacia el triunfo.

A mi padre y mejor amigo Manuel por su esfuerzo, confianza, formación y apoyo en todo momento.

A mi madre Grace por su infinito amor.

A mi segundo padre Danilo por su consejos y soporte.

A mis hermanos Marianela y Michael por su cariño y apoyo.

A Juan Carlos Rosas por sus consejos y el apoyo para culminar con éxitos mis estudios en Zamorano.

A Mario Contreras por sus consejos y por guiarme e incentivarme hacia las sendas de la investigación.

A María Mercedes Doyle por su tiempo, orientación y ayuda en la realización de este estudio.

Al grupo del Programa de Frijol de Zamorano: Luwbia, Byron, Luz María, Tomasa, Eduardo, Roger y Calixto por su valiosa ayuda y guía en el laboratorio, invernaderos y campo.

A Miriam Carolina y a su familia, por acogerme en su hogar y darme su apoyo en los vaivenes de este estudio.

A Esteban Falconí y Eduardo Peralta por facilitarme su apoyo en el aprendizaje de técnicas de aislamientos de hongos patógenos.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A la Fundación Privada Wilson Popenoe por el financiamiento brindado durante mi primer año en Zamorano.

A Zamorano por el apoyo económico brindado en mi segundo y tercer año.

Al Instituto Ecuatoriano de Crédito Estudiantil (IECE) por el financiamiento brindado durante mi cuarto año en Zamorano.

Al Programa de Investigaciones en Frijol, bajo el financiamiento del Programa Bean/Cowpea CRSP.

RESUMEN

Venegas Ferrín, Jorge Patricio. 2002. Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 49 p.

La antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) son enfermedades del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) que causan grandes pérdidas económicas a nivel mundial. La antracnosis afecta la calidad del grano y de la vaina, lo que es muy importante si el frijol se consume verde o como habichuela; también produce lesiones en tallos, hojas y peciolos. La mancha angular causa lesiones angulares en el follaje de la planta, y afecta tallos, pecíolos y vainas. El objetivo de este estudio fue adaptar técnicas y métodos para estudiar la variabilidad patogénica de *C. lindemuthianum* y *P. griseola*, incluyendo las fases de aislamiento, cultivo, conservación e inoculación, para determinar las razas predominantes mediante el uso de genotipos diferenciales. Los estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología, usando cámaras de incubación, invernaderos y camas de infección de Zamorano. Se evaluó la germinación de esporas de antracnosis. Se inocularon las hojas, vainas y peciolos de las variedades Desarrural (susceptible) y Catrachita (resistente) con aislamientos de *C. lindemuthianum* para verificar el tercer postulado de Koch. Se hicieron inoculaciones en variedades diferenciales andinas y mesoamericanas de frijol usando aislamiento de *P. griseola*. La germinación de esporas de *C. lindemuthianum* se redujo significativamente después de 15 y 30 días de esporulación de las colonias. Los hipocotilos no mostraron ninguna reacción, a diferencia de las hojas y vainas de la variedad Desarrural que formaron acérvulos. Las plantas de los diferenciales de antracnosis 8, 11 y 12 presentaron síntomas desuniformes con una severidad de 6, 3 y 3, respectivamente. Todos los diferenciales de mancha angular presentaron susceptibilidad a los aislamientos de *P. griseola*, pero la incidencia fue menor en las variedades de origen andino. La reacción de los diferenciales a los aislamientos monospóricos de *P. griseola* facilitó la identificación de las razas 63-59 y 63-51 del hongo. Se aislaron y conservaron dos aislamientos de antracnosis y de mancha angular para estudios posteriores. El aislamiento de antracnosis debe ser reactivado en cultivo artificial y en plantas susceptibles después de seis meses de conservado. La antracnosis es exigente a temperaturas bajas constantes, por lo que se requiere una cámara de inoculación con temperatura controlable.

Palabras clave: Humedad relativa, infección, incubadora, relación nutricional, suspensión, variación patogénica.

_____

Abelino Pitty, Ph.D.

NOTA DE PRENSA

MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL FRIJOL MEDIANTE EL CULTIVO DE PATÓGENOS

Desde enero hasta septiembre de 2002, se condujo en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano un estudio, con el objetivo de cultivar los hongos causantes de la antracnosis y la mancha angular del frijol, para después infectar con estos doce variedades de frijol y poder determinar como se comporta la población de estos microorganismos naturalmente.

Las enfermedades son uno de los problemas más relevantes en los bajos rendimientos de la mayoría de regiones productoras de frijol. De las 200 enfermedades que atacan a este grano, solo una docena de estas pueden causar pérdidas económicas graves.

La antracnosis es una enfermedad del frijol que causa más pérdidas económicas a nivel mundial, provocando hasta un 60% de reducciones en la producción. La mancha angular es otra enfermedad causada por un hongo, capaz de reducir la producción de frijol hasta en un 40%.

Actualmente existe un nuevo enfoque de control para estas enfermedades, que esquiva la práctica común de uso de fungicidas utilizada con gran intensidad desde mediados del siglo anterior. Este nuevo paradigma consiste en regresar al uso de variedades mejoradas de frijol que resistan al ataque de estos hongos y que mantengan las características de producción deseada; ayudando con esto a disminuir la presión ambiental que ejerce el uso de plaguicidas.

En el proceso de conseguir variedades mejoradas resistentes a estas enfermedades, se hicieron evaluaciones de doce variedades de frijol que son utilizadas para saber el comportamiento de los patógenos mediante la infección o no de estas. En el caso de la mancha angular, se utilizaron seis variedades de origen Andino (desde Perú hasta Colombia) y seis de origen Mesoamericano (desde Panamá hasta México) y para la antracnosis se evaluaron doce variedades de frijol sin orden geográfico, pero al igual que las anteriores con características de resistencia o no resistencia a estos hongos. Luego que es definido como se comportan estos hongos sobre el grupo de variedades de frijol, se puede buscar con mayor facilidad la resistencia requerida.

El aporte de este estudio es principalmente dirigido a la creación de variedades resitentes de frijol, ya que este es uno de los granos básicos de mayor importancia entre los habitantes de escasos recursos de Centroamérica, debido a que constituye una fuente barata de proteínas y porque es el principal cultivo de granos básicos que genera ingresos en la finca.

Lic. Sobeyda Alvarez

CONTENIDO

	Portada	i
	Portadilla	ii
	Autoría	iii
	Página de firmas	iv
	Dedicatoria	v
	Agradecimientos	vi
	Agradecimientos a patrocinadores	vii
	Resumen	viii
	Nota de prensa	ix
	Contenido	x
	Índice de cuadros	xii
	Índice de anexos	xiii
1.	**INTRODUCCIÓN**	1
1.1	OBJETIVOS	2
1.1.1	Objetivo General	2
1.1.2	Objetivos Específicos	2
2.	**REVISIÓN DE LITERATURA**	3
2.1	IMPORTANCIA DEL FRIJOL	3
2.1.1	Características del frijol común	3
2.1.2	Origen, domesticación y evolución del frijol común	4
2.2	HONGOS PATÓGENOS DEL FRIJOL	4
2.2.1	La antracnosis del frijol	5
2.2.1.1	Descripción del patógeno	6
2.2.1.2	Epidemiología	7
2.2.1.3	Infección	7
2.2.1.4	Síntomas	7
2.2.1.5	Variación patogénica	8
2.2.1.6	Hospedero	8
2.2.1.7	Resistencia varietal	8
2.2.1.8	Cultivares diferenciales de antracnosis	9
2.2.2	La mancha angular del frijol	9
2.2.2.1	Descripción del patógeno	10
2.2.2.2	Epidemiología	10
2.2.2.3	Infección	11
2.2.2.4	Síntomas	11

2.2.2.5 Variación patogénica..... 12
2.2.2.6 Hospedero..... 12
2.2.2.7 Resistencia varietal..... 12
2.2.2.8 Cultivares diferenciales de mancha angular..... 13
2.2.3 Sistema de evaluación de enfermedades de frijol..... 13

3. **MATERIALES Y MÉTODOS**..... 15
3.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS..... 15
3.1.1 Localización del estudio..... 15
3.1.2 Variables evaluadas y su medición..... 15
3.1.3 Adaptación del protocolo para el aislamiento, conservación e inoculación de *C. lindemuthianum*..... 16
3.1.3.1 Equipo y material de laboratorio……... 16
3.1.3.2 Aislamiento..... 16
3.1.3.3 Conservación de los cultivos monospóricos..... 17
3.1.3.4 Inoculación..... 18
3.1.4 Prueba de germinación de esporas de *C. lindemuthianum*..... 19
3.1.4.1 Equipo y material de laboratorio..... 19
3.1.4.2 Metodología..... 19
3.1.4.3 Diseño estadístico..... 20
3.1.5 Adaptación del aislamiento, conservación e inoculación de *P. griseola*..... 20
3.1.5.1 Equipo y material de laboratorio……... 20
3.1.5.2 Aislamiento…… 21
3.1.5.3 Conservación de los cultivos monospóricos……..... 21
3.1.5.4 Inoculación……. 22
3.2 EVALUACIÓN DE CULTIVARES DIFERENCIALES DE *C. lindemuthianum* y *P. griseola*..... 23

4. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**..... 24
4.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS..... 24
4.1.1 Aislamiento, conservación e inoculación de *C. lindemuthianum*..... 24
4.1.2 Evaluación de la germinación de esporas de *C. lindemuthianum*..... 27
4.1.3 Aislamiento, conservación e inoculación de *P. griseola*..... 27
4.2 EVALUACIÓN DE CULTIVARES DIFERENCIALES DE *C. lindemuthianum y P. griseola*..... 29

4.2.1 Reacción de cultivares diferenciales de *C. lindemuthianum*..... 29
4.2.2 Reacción de cultivares diferenciales de *P. griseola*..... 30

5. **CONCLUSIONES**..... 34

6. **RECOMENDACIONES**..... 35

7. **BIBLIOGRAFÍA**..... 36

8. **ANEXOS**..... 39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro Nº **Pag.**

1. Presencia de las principales enfermedades en los países de la región centroamericana..... 5

2. Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungosos..... 13

3. Prueba de concentraciones de hipoclorito de sodio para la desinfestación de pedazos de tejido de frijol con daños de antracnosis. Zamorano, Honduras, 2002..... 24

4. Comparación en el tiempo del proceso de aislamiento de *Colletotrichum lindemuthianum* en INIAP – Ecuador y en Zamorano. Zamorano, Honduras, 2002..... 25

5. Microclima en diferentes condiciones de incubación de plantas inoculadas con suspensión de conidias de *Colletotrichum lindemuthianum*. Zamorano, Honduras, 2002..... 26

6. Germinación de esporas de colonias de *Colletotrichum lindemuthianum* en tres diferentes fechas de esporulación. Zamorano, Honduras, 2002..... 27

7. Reacción de los genotipos diferenciales al aislamiento Co-Z1 de *Colletotrichum lindemuthianum* en camas de infección. Zamorano, Honduras, 2002..... 30

8. Reacción de los genotipos diferenciales al aislamiento MA-O1 de *Paeoisariopsis griseola* en camas de infección. Zamorano, Honduras, 2002... 31

9. Reacción de los genotipos diferenciales al aislamiento MA-O3 de *Paeoisariopsis griseola* en cámara húmeda-invernadero. Zamorano, Honduras, 2002…..... 32

10. Evaluación de diferenciales de mancha angular inoculados con el método sucio en camas de infección. Zamorano, Honduras, 2002..... 32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nº **Pag.**

1. Áreas de producción de frijol en América Central, México y el Caribe.. 4

2. Ciclo reproductivo asexual de *Colletotrichum. lindemuthianum*……. 6

3. Ciclo reproductivo asexual de *Paeoisariopsis griseola*..... 11

4. Escala gráfica de evaluación de daños por *Colletotrichum lindemuthianum* en vainas y trifolios de frijol..... 14

5. Escala gráfica de evaluación de daños por *Paeoisariopsis griseola* en vainas y trifolios de frijol..... 14

6. Flujograma de conservación de *Colletotrichum lindemuthianum*..... 18

7. Flujograma de conservación de *Paeoisariopsis griseola*..... 22

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos N^{o} **Pag.**

1. Protocolo de aislamiento de *Colletotrichum lindemuthianum*..... 40

2. Producción abundante de esporas para inoculaciones con *Colletotrichum lindemuthianum*..... 43

3. Conservación de *Colletotrichum lindemuthianum*..... 44

4. Protocolo de aislamiento de *Phaeoisariopsis griseola*..... 46

5. Producción abundante de esporas para inoculaciones de *Paeoisariopsis griseola*..... 48

6. Conservación de *Paeoisariopsis griseola*..... 49

7. Preparación de inóculo e inoculación de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Paeoisariopsis griseola*..... 50

8. Porcentaje de incidencia de mancha angular en doce cultivares diferenciales, Zamorano, Honduras, 2002..... 52

9. Comportamiento de la germinación de esporas de *Colletotrichum lindemuthianum* en el tiempo, Zamorano, Honduras, 2002..... 53

10. Datos climatológicos de la semana de infección (octubre 1-7, 2002) del aislamiento MA-O1 en las camas de infección. Zamorano, Honduras, 2002..... 54

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los granos básicos de mayor importancia entre los habitantes de escasos recursos de Centroamérica, debido a que constituye una fuente barata de proteínas y por que es el principal cultivo de granos básicos que genera ingresos en la finca (Viana, 1998). Su producción abarca diversas áreas a nivel mundial. América Latina es la zona de mayor producción y consumo, estimándose que más del 45 % del total de la producción mundial proviene de esta región (Voysest, 2000). En Honduras el frijol ocupa el segundo lugar, después del maíz, tanto por la superficie sembrada como por la cantidad que consume la población (SAG, 1998).

Las enfermedades son uno de los factores más importantes asociados con los bajos rendimientos en la mayoría de las regiones productoras de frijol de Latinoamérica y África. Más de 200 patógenos han sido reportados causando enfermedades en el frijol; sin embargo, solo una docena de estos pueden causar pérdidas económicas considerables (Shoonhoven y Voysest, 1991).

La antracnosis es una de las enfermedades del frijol común que causa más pérdidas económicas a escala mundial. En el trópico, se presenta con frecuencia en zonas frijoleras a elevaciones intermedias a altas. Las pérdidas varían según el grado de resistencia de las variedades y la virulencia del patógeno; pero en general, pueden ser muy severas si las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad. Se han reportado reducciones hasta del 60% en el rendimiento de variedades susceptibles cultivadas en Centroamérica (Rosas, 1998).

Debido a la amplia diversidad patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum*, las fuentes de resistencia obtenidas en ciertas localidades no son efectivas en otras. Los enfoques actuales para su prevención y control incluyen: un buen manejo de residuos de cosecha y de la producción de semilla para disminuir la incidencia de la enfermedad y las aplicaciones de plaguicidas; reducir la vulnerabilidad del frijol común, acelerando el mejoramiento genético mediante la búsqueda y piramidación de una amplia diversidad de genes; y el desarrollo de marcadores moleculares ligados a ellos (Schoonhoven y Voysest, 1991).

Según Kelly y Miklas (1999), se han identificado marcadores RAPD para cinco genes dominantes independientes (Co-1, Co-2, Co-4^2, Co-5 y Co-6) que condicionan la resistencia a la antracnosis. Adicionalmente, se han desarrollado marcadores SCAR para dos de estos genes (Co-2 y Co-4^2). Para América Central, se estima que la combinación más adecuada de genes resistentes a *C. lindemuthianum* es la del andino *Co-1* con los genes mesoamericanos Co-2, Co-4^2, Co-5 y Co-6.

Entre las enfermedades más relevantes del frijol se encuentra la mancha angular causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) que se considera limitada a regiones tropicales y subtropicales en los países donde se cultiva este grano básico (Campos-Avila, 1987).

La variación patogénica de *P. griseola* es grande. Los niveles de resistencia a este patógeno son altos, pero la inmunidad no ha sido encontrada en las 20,000 accesiones evaluadas (Singh, 1992).

En la actualidad no existen variedades comerciales de frijol resistentes a la mancha angular. Una alternativa al problema es la generación de resistencia genética empleando recombinaciones de germoplasma andino que presente resistencia, con materiales mesoamericanos que contienen genes de resistencia. Sin embargo, estos son generalmente susceptibles a las razas de mancha angular predominantes en estas regiones (Parreño, 2002).

Para cada una de las dos enfermedades anteriormente mencionadas, se han seleccionado doce variedades diferenciales de frijol que ayudan a detectar las razas del patógeno predominantes en las regiones frijoleras, de acuerdo a su reacción a los aislamientos óbtenidos en estas regiones. Para la identificación de razas, se emplea un sistema binomial consistente en la valoración numérica asignada a cada diferencial según la reacción de resistencia/susceptibilidad a la inoculación con un aislamiento determinado. Una vez identificada las razas, se puede hacer un mejoramiento de frijol más preciso con ayuda de marcadores moleculares que indiquen la presencia o no del gen de resistencia a estas.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo general

Adaptar las técnicas y métodos para evaluar y caracterizar la variabilidad patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en Honduras.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Obtener aislamientos de *C. lindemuthianum* y de *P. griseola* de zonas afectadas por la antracnosis y mancha angular.

2. Adaptar protocolos para el aislamiento, cultivo e inoculación de *C. lindemuthianum* y *P. griseola.*

3. Evaluar métodos para determinar las razas de *C. lindemuthianum* y *P. griseola* presentes mediante el uso de genotipos diferenciales.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA DEL FRIJOL

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano de mayor importancia en el mundo. Es una fuente importante de calorías, proteínas, fibras, minerales, y vitaminas para millones de personas en países desarrollados y en desarrollo alrededor del mundo. Complementa los cereales y otros tipos de alimentos ricos en carbohidratos, proveyendo una nutrición casi perfecta a las personas de todas las edades (Singh, 1999).

El frijol común es cultivado en todos los continentes, excepto la Antártica, y ocupa más del 90% de las áreas de producción de las especies de *Phaseolus* en el mundo. La importancia del frijol común es superada solamente por la soya (*Glycine max* (L.) Merr.) y el maní (*Arachis hypogea* L.) (Singh, 1999).

Según Singh (1999) la región más productora de frijol común es América, siendo Brasil el país con mayor producción y consumo. El consumo *per cápita* en Centroamérica es de 9.8 kg/año, aunque se considera que esto sería mayor si se mejorara su disponibilidad del grano durante todo el año (Rosas, 1998). En el año de 1996 se cultivaron más de 480,000 ha de frijol en Centroamérica (Fig. 1), registrándose una producción de 461,000 TM y un rendimiento promedio de 654 kg/ha (Viana, 1998).

En Honduras, el mayor porcentaje de la producción de granos básicos, principalmente frijol y maíz, está en manos de pequeños agricultores, que utilizan prácticas tradicionales para el manejo de estos cultivos. Estás prácticas en algunos casos son poco eficientes, principalmente si están basadas en tecnologías de bajos insumos que incluyen el uso de variedades criollas de baja resistencia a enfermedades, mecanización deficiente y bajo uso de insumos, incluyendo fertilizantes y pesticidas (Elvir, 1998).

En los últimos cinco años, el área cultivada de frijol anualmente en Honduras ha sido de 113,789 hectáreas, con una producción de 83,188 TM y un rendimiento promedio de 732 kg/ha. El consumo *per capita* de este grano varía, según el rendimiento y el estrato social, en cantidades que van desde 9 a 21 kg/año (SAG, 1998).

2.1.1 Características del frijol común

Pocos cultivos, como el frijol, pueden mostrar tan amplia adaptación a las más variadas condiciones climáticas, o exhibir tantos contrastes en el tipo de planta y duración del periodo vegetativo. Esto hace que los frijoles formen parte del sistema de producción más diverso del mundo.

Dentro del área geográfica, desde las latitudes 52 ° N a 32 ° S, los cultivos de frijol pueden ser vistos en campos que se encuentran al nivel del mar hasta más de 3000 msnm. Aunque posee una mejor adaptación a áreas altas de las zonas tropicales y templadas, los frijoles también son cultivados en los trópicos húmedos, en los trópicos semiáridos, e incluso en regiones de clima frío. La diversidad de sus hábitos de crecimiento significa que ellos pueden ser sembrados en tierras planas, donde se pueden beneficiar de la ventaja de la mecanización, como en las laderas donde es posible trabajar con tracción animal. Su periodo vegetativo puede variar de menos de 70 a más de 200 días. Esto les permite actuar como un cultivo de rotación excelente, donde se requiere un cultivo con período vegetativo corto; o como una fuente de alimento continuo, como en los Andes de Sudamérica, donde el cultivo de más de 200 días de duración le permite al agricultor utilizar sus vainas tiernas, los granos verdes o granos secos a través de casi todo el año (Schoonhoven y Voysest, 1991).

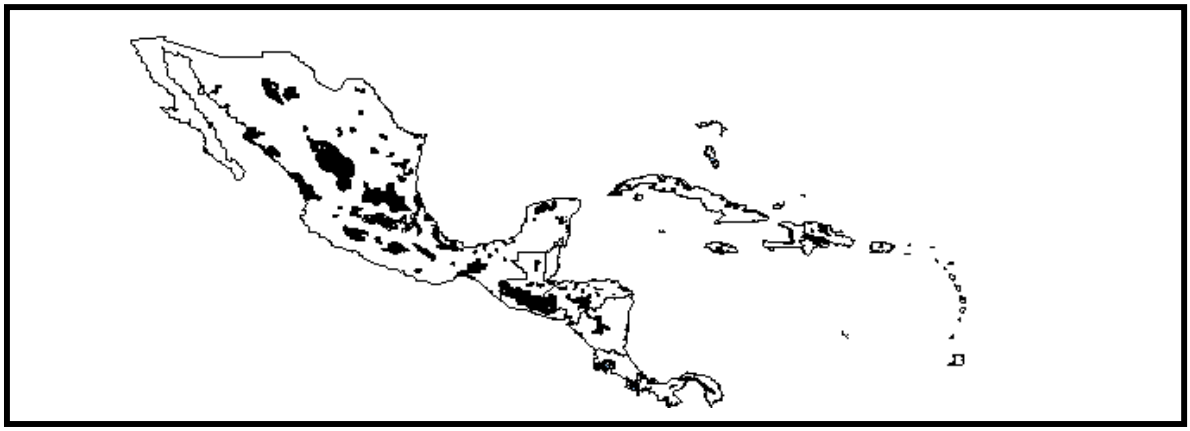


Figura 1. Áreas de producción de frijol en América Central, México y el Caribe.

2.1.2 Origen, domesticación y evolución del frijol común

A partir del siglo XX, los científicos empezaron a aceptar al Nuevo mundo como centro de origen del frijol común. En base a las observaciones en restos arqueológicos, primero del Perú, y más tarde del suroeste de los EE.UU., se concluyó que el frijol común se había originado en las Américas (Rosas, 1998).
Dos centros primarios de domesticación, localizados en Mesoamérica y la región sur de los Andes, dieron lugar a dos grupos mayores de cultivares. Después de su domesticación, los cultivares de frijol común fueron introducidos a otras regiones del mundo. En general, ambos cultivares mesoamericanos y andinos fueron diseminados a las mismas regiones (Rosas, 1998).
En un periodo de al menos 7000 a 8000 años, el frijol común ha evolucionado de una vaina silvestre que crece en las alturas de América Central y los Andes, a un cultivo mayor de leguminosas alimenticias (Schoonhoven y Voysest, 1991).

2.2 HONGOS PATÓGENOS DEL FRIJOL

Las enfermedades son uno de los principales factores limitantes de la producción de frijol, especialmente en las áreas tropicales, donde es atacado por un gran número de patógenos. Los patógenos fungosos del frijol importantes en el trópico son: la roya

(*Uromyces appendiculatus*), la antracnosis, la mancha angular, la mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris*, fase sexual; *Rhizoctonia solani*, fase asexual), el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*) y las pudriciones radicales causadas por varias especies de hongos (Thurston, 1989).

Cuadro 1. Presencia de las principales enfermedades en los países de la región centroamericana.

	Enfermedades										
Países	Roya	Mh	An	Ma	As	Pr	Ac	Th	VMC	VMD	VMCL
Belice		X							X		
Costa Rica	X	X	X	X					X		
Cuba	X						X		X		
El Salvador		X					X		X	X	
Guatemala	X	X	X	X		X			X	X	
Haití	X	X	X	X		X	X		X	X	
Honduras	X	X	X	X			X		X	X	
Jamaica	X		X				X		X	X	
México	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Nicaragua	X	X	X	X			X		X	X	
Panamá	X	X					X		X		
Puerto Rico		X				X				X	X
R. Dominicana	X	X	X					X	X		
Total	10	11	8	6	1	4	8	2	12	8	1

Mh = Mustia hilachosa; An = Antracnosis; Ma = Mancha angular; As = Mancha de Ascochyta; Pr = Pudriciones radiculares; Ac = Añublo común; Th = Tizón de halo; VMC = Virus del mosaico común (BCMV); VMD = Virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV); VMCI = Virus del moteado clorótico del frijol (BCIMV). Fuente: CIAT y PROFRIJOL (1995)

2.2.1 La antracnosis del frijol

La antracnosis es una enfermedad del frijol, cuyo agente causal es el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. La enfermedad tiene distribución mundial, sin embargo, causa mayores daños en zonas templadas y subtropicales que en las tropicales. La enfermedad empieza temprano en el ciclo del cultivo y persiste si las condiciones favorables prevalecen por mucho tiempo. La antracnosis también afecta la calidad del grano así como la de la vaina, lo que es muy importante si el frijol se consume verde o como habichuela. La antracnosis puede causar daños muy severos y pérdidas totales del rendimiento, sobretodo cuando se siembra semilla infectada de una variedad susceptible. Según Campos-Ávila (1987), aunque en México existen variedades tolerantes, la antracnosis sigue siendo uno de los principales problemas del frijol, siendo observada frecuentemente en regiones de clima templado y lluvioso.

En América Latina la enfermedad ocurre y es importante en el noroeste de Argentina; en la mayoría de los estados frijoleros de Brasil, sobre todo en el sur y centro; en la zona andina de Perú, Ecuador y Colombia; en las zonas de clima fresco o regiones altas de América Central; en las partes montañosas de los países del Caribe; y cuando ocurre temperaturas bajas, en la República Dominicana, Haití y Cuba. La enfermedad también ocurre en Estados Unidos y Canadá, así como en Europa. En Africa, la antracnosis es muy importante en la región de Los Grandes Lagos (Pastor-Corrales, 1992). Según CIAT

(1981a), las pérdidas pueden ser hasta del 100% cuando se siembra semilla severamente infectada bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.

2.2.1.1 Descripción del patógeno

C. lindemuthianum es miembro de los hongos imperfectos o subdivisión Deuteromycotina (Pastor-Corrales, 1992). Produce micelio septado; cuando joven es hialino y se torna de color café oscuro a negro a medida que envejece. Los conidios son unicelulares, hialinos con una vacuola y miden 5.7 x 2.0 micras. Son de forma oblonga a cilíndrica. Cuando germinan emiten un tubo germinativo que desarrolla sobre la superficie de la hoja una estructura llamada apresorio, que utiliza para fijarse al hospedante. Luego que el hongo completa su ciclo, rompe la epidermis formando las estructuras llamadas acérvulos, constituidos por conidióforos cortos que miden de 40 a 60 micras de longitud, en cuyo ápice están los conidios; también se observan setas o espinas (Campos-Ávila, 1987). Este hongo también puede presentar el estado perfecto o sexual conocido como *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et. V. Schrenk (CIAT, 1981a).

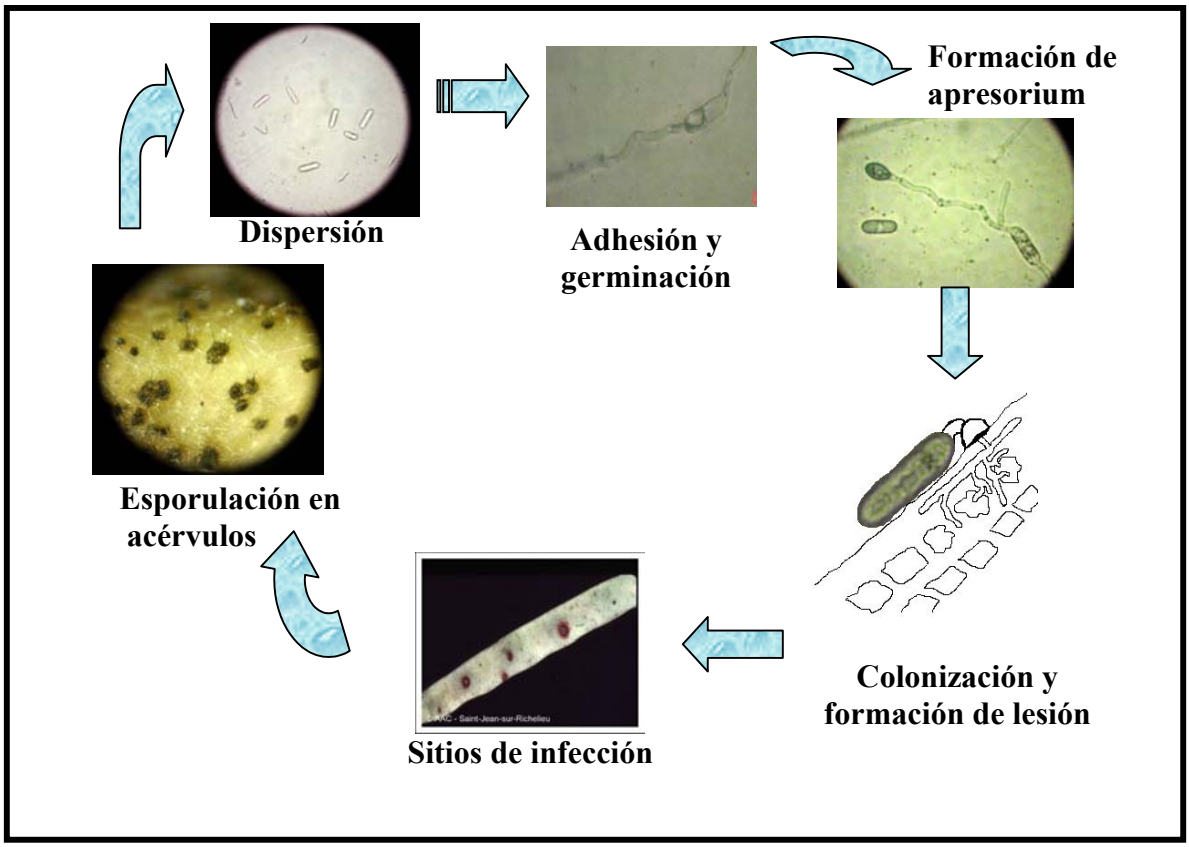


Figura 2. Ciclo reproductivo asexual de *Colletotrichum lindemuthianum*

2.2.1.2 Epidemiología

La antracnosis es una enfermedad de clima fresco, alta humedad relativa y lluvias frecuentes. La infección del hongo es favorecida por temperaturas entre 13 y 26° C, con un óptimo de 17° C. Tanto la infección como el desarrollo del hongo son retardados o inhibidos en temperaturas menores de 7°C ó mayores de 33° C. Se requiere una alta humedad relativa mayor de 92 %, y una lámina de agua durante todos los estados de la germinación de esporas, incubación y esporulación. Lluvias moderadas a intervalos frecuentes, acompañados de corrientes de viento que resulten en salpique son muy importantes en la diseminación de las conidias a cortas distancias, y para que la antracnosis se convierta en una epidemia severa (Pastor-Corrales, 1992).

Campos-Ávila (1987) señala que son varios los medios que ayudan a diseminar este hongo. Entre ellos se puede mencionar la salpicadura de agua de lluvia, los insectos, el viento, los instrumentos de trabajo, los animales, el mismo hombre, la semilla infectada y el roce de hojas entre sí.

2.2.1.3 Infección

Los conidios de *C. lindemuthianum* pueden germinar en cuatro horas en condiciones de alta humedad; forman un tubo germinativo y apresorio por medio del cual se adhieren a la cutícula del hospedante, y penetran en forma mecánica a través de la cutícula y la epidermis. Después de 8 días de inoculado el patógeno, sobre las lesiones formadas en las vainas, semilla y hojas se desarrolla el micelio hasta producir acérvulos que rompen la cutícula del hospedero liberando miles de esporas (Campos-Ávila, 1987).

2.2.1.4 Síntomas

Los síntomas pueden ocurrir en cualquier parte de la planta, aunque raramente en las raíces. Cuando se siembra semilla infectada, los síntomas iniciales pueden aparecer en los cotiledones como lesiones necróticas. También el hipocotilo puede presentar lesiones necróticas, como resultado de la germinación de las esporas del hongo provenientes de los cotiledones infectados, y que han sido arrastradas por el agua de lluvia (CIAT, 1981a).
Las vainas son las partes más dañadas y en las que los síntomas de la enfermedad son más notorios; lo anterior disminuye la calidad de la cosecha. Las lesiones producidas en las vainas varían de tamaño, de pequeños puntitos necróticos a lesiones profundas de color negro y de forma circular de más de un centímetro de diámetro, delimitadas por un borde de color rojizo. Cuando las lesiones se juntan, cubren gran parte de la vaina y la secan por completo. Las condiciones de alta humedad y las bajas temperaturas favorecen la esporulación; formándose en el centro de las lesiones de las vainas, masas de miles de esporas de color rosado del hongo.
Los síntomas en las hojas aparecen inicialmente en el envés, como lesiones de un color que varía desde rojo hasta negro, localizadas a lo largo de las nervaduras de la hoja. Estas lesiones pueden transformarse en chancros donde es posible encontrar masas de esporas (Castaño-Zapata y Del Río, 1994). En los tallos, se observan lesiones longitudinales de tamaño variable, de color café oscuro, hundidas en el centro; cuando abarcan todo el tallo, secan por completo la planta (Campos-Ávila, 1987). Según CIAT (1981a), si las condiciones son favorables para el crecimiento del hongo, las lesiones al crecer llegan a debilitar el tallo volviéndolo incapaz de sostener la parte superior de la planta, y quebrándose en el sitio de la lesión.

Las lesiones de las vainas pueden ser tan profundas que el hongo puede infectar la semilla apareciendo manchas de diferentes tamaños, ligeramente hundidas, de color café a negro. El hongo puede permanecer latente en la semilla, debajo de la cutícula en los cotiledones o en el embrión. Al germinar las semillas infectadas, el hongo reanuda su actividad (Campos-Ávila, 1987).

2.2.1.5 Variación patogénica

En 1911, Barrus reportó que algunas variedades de frijol eran resistentes mientras que otras eran susceptibles al patógeno de la antracnosis. En 1918, el mismo Barrus reportó por primera vez que *C. lindemuthianum* era patogénicamente variable y que los aislamientos se podían dividir en dos razas que denominó Alfa y Beta. Desde esa fecha, se han realizado un gran número de reconocimientos por diferentes investigadores de muchas regiones frijoleras del mundo, con el objetivo de identificar la distribución y prevalencia de razas del patógeno de la antracnosis. Los resultados reportados, claramente demuestran que *C. lindemuthianum* tiene una amplia variación patogénica. Las razas del hongo pueden variar de un lugar a otro y aún dentro de un mismo lugar; sin embargo, muchos de los resultados de variación patogénica no son comparables porque los investigadores han utilizado diferentes grupos de variedades de frijol diferenciales de *C. lindemuthianum* (Pastor-Corrales, 1992).

2.2.1.6 Hospedero

El hongo *C. lindemuthianum,* puede infectar muchas especies del género *Phaseolus*, pero *P. vulgaris* es su hospedante principal. También puede atacar a las especies *P. acutifolius* variedad *latifolius*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. aureus*, *Vigna unguiculata* y *Vicia faba* (CIAT, 1981a).

2.2.1.7 Resistencia varietal

El empleo de variedades resistentes obtenidas a través del mejoramiento genético, es la mejor medida de control y la más económica para el agricultor. El mejoramiento genético ha encontrado obstáculos, ya que no siempre ha sido fácil obtener resistencia en variedades con buena aceptación en los mercados locales.

Se confía que mediante la resistencia vertical o específica se puedan controlar las razas de *C. lindemuthianum*, a pesar de que el hongo, por selección natural, mutación u otros mecanismos, ha mostrado gran variabilidad en su patogenicidad (CIAT, 1981a).

La identificación de nuevas fuentes de resistencia se hace con el objetivo principal de utilizar la mayor diversidad genética posible, en los cruzamientos que se hacen por resistencia al patógeno de la antracnosis. Se hace mucho esfuerzo en ampliar la base genética del frijol, utilizando un gran número de fuentes de resistencia que son diferentes en su origen; color, tamaño y brillo de grano; hábito de crecimiento y en los genes de resistencia (Pastor-Corrales, 1992).

Los resultados obtenidos de los ensayos conducidos en campo como e invernadero, estudiando los mecanismos de resistencia en frijol a *C. Lindemuthianum,* sugieren por lo menos cuatro mecanismos diferentes.

- Uno es el que tienen ciertas accesiones o variedades que son resistentes al patógeno en condiciones de campo en muchas localidades donde se han evaluado, pero son susceptibles en estado de plántula en el invernadero. Este mecanismo se le llama resistencia de planta adulta, porque en el invernadero a medida que la planta crece su

reacción de susceptibilidad disminuye hasta llegar a ser casi inmune en plantas adultas.

- El otro mecanismo, se presenta cuando las accesiones son resistentes en todas las localidades de campo donde se han evaluado, así como en el invernadero en estado de plántula, con todos los aislamientos probados.
- El tercer mecanismo, es de resistencia específica, o sea de resistencia a unos aislamientos del patógeno y no a otros, tanto en campo como en invernadero.
- El cuarto mecanismo, es de las accesiones que son susceptibles en estado de plántula a la gran mayoría de aislamientos en el invernadero así como en la mayoría o en todas las localidades de campo donde se les ha evaluado. Por último hay accesiones que tienen resistencia intermedia tanto en el campo como en el invernadero.

2.2.1.8 Cultivares diferenciales de antracnosis

C. lindemuthianum ha demostrado considerables variaciones en patogenicidad a escala mundial. Sin embargo, la comparación de estudios de caracterización de razas entre regiones se vuelve más difícil, debido a diferentes grupos de cultivares diferenciales usados por investigadores. Actualmente los investigadores de frijol, están usando un grupo de cultivares diferenciales establecidos mundialmente y el sistema numérico de clasificación de razas, para facilitar el intercambio de información y el trabajo de reproducción. El grupo propuesto de cultivares diferenciales de antracnosis está compuesto de 12 genotipos, cada cultivar diferencial tiene una posición fija en el orden general del grupo, y es identificado con un valor numérico. Los genotipos y su valor binario son: Michelite (1), Michigan Dark Red Kidney (2), Perry Marrow (4), Cornell 49242 (8), Widusa (16), Kaboon (32), Mexico 222 (64), PI 207262 (128), TO (256), TU (512), AB136 (1024), y G 2333 (2048). El sistema numérico (binario) de nomenclatura es usado para la clasificación de razas, basado en el espectro de patogenicidad presentado por un aislamiento en los 12 genotipos diferenciales. Los valores son asignados como la suma de los números binarios de los diferenciales en los cuales el aislamiento es patogénico (Young, 1995).

2.2.2 La mancha angular del frijol

Phaeoisariopsis griseola (Sacc.) Ferr. es el agente causal de la mancha angular, una de las enfermedades del frijol común de mayor importancia económica y distribución geográfica a nivel mundial (Pastor-Corrales y Castellanos, s.f.). Esta enfermedad se caracteriza por causar lesiones típicamente angulares en el follaje de la planta.

Saccardo la registró por primera vez en 1877 en Italia. En América se han reportado pérdidas de frijol especialmente en países como, México, Costa Rica, Guatemala, Colombia, Perú y Brasil; estas pérdidas en rendimiento pueden llegar a ser severas como en los casos de Colombia, Estados Unidos y México en donde se han evaluado en 40-60, 50% y hasta 80%, respectivamente (CIAT, 1982).

Debido a que la mayor severidad de la enfermedad se presenta después de la floración, se consideraba que no había reducciones significativas en el rendimiento, y por esto se le consideraba a la mancha angular como una enfermedad de menor importancia (Schoonhoven y Voysest, 1991).

En México se observó por primera vez en 1955 en las costas del Golfo de México, especialmente en Veracruz. El patógeno atacó variedades de frijol criollo, y provocó daños en un 100% en el campo (Campos-Ávila, 1987).

En Centro América, las pérdidas en la producción de frijol común por causa de esta enfermedad son de aproximadamente 40% en variedades susceptibles (Elvir, 1998).
En Nicaragua, la mancha angular se presenta con alta intensidad en zonas con clima fresco y con alturas mayores de 600 msnm. Por el ambiente húmedo de la asociación de plantas, la enfermedad ataca con mayor fuerza a los cultivos de frijol sembrados con maíz. Cuando el frijol se siembra solo o en monocultivo, el ataque de la mancha angular es menor (DPV *et. al*, 1996).

2.2.2.1 Descripción del patógeno

P. griseola pertenece al grupo de los hongos imperfectos incluido en la clase de Deuteromicetos, orden Moniliales, familia Stilvaceae. Bajo condiciones de campo, en siembras fuertemente atacadas, se forman sobre las lesiones los cuerpos fructíferos constituidos en grupos de color oscuro que reciben el nombre de coremio o sinema; en el ápice de cada conidióforo se forman las esporas. El sinema puede tener un diámetro de 40 micras y una longitud de 500 micras. Los conidióforos tienden a separarse con la edad, cuando empiezan a fructificar. Los conidios son hialinos generalmente, con tres septas, aunque pueden tener hasta cinco; en conjunto estos son grises, de forma cilíndrica a fusiforme y ligeramente curvados; miden de 50 a 60 micras de largo y de 5.5 a 8 micras de ancho (Campos-Ávila, 1987).
En las hojas, la esporulación ocurre principalmente en el envés en forma de grupos compactos de 8 a 40 conidióforos tabicados, denominados sinemas o coremios (Castaño-Zapata y Del Río, 1994).

2.2.2.2 Epidemiología

La mancha angular es una enfermedad considerada endémica; en ocasiones puede ser epidémica, como ocurrió por primera vez en Wisconsin (EE.UU.) en 1954, causando hasta un 50% de pérdidas en rendimiento. El complejo climático más favorable para el desarrollo epidémico de la enfermedad incluye temperatura moderada, agua continua sobre el follaje y el tallo o alta humedad por 48 horas o más, alternada con períodos de baja humedad y viento; períodos prolongados de lluvia que favorecen la esporulación; y baja humedad para que ocurra liberación y dispersión de esporas. Las variaciones de luz y temperatura también determinan el comportamiento del hongo. A temperaturas menores de 15° C se retarda el desarrollo de la enfermedad, lo mismo que a temperaturas mayores de 25° C. Igualmente, la densidad del cultivo, períodos alternos de alta y baja temperatura favorecen una mayor severidad de ésta. Los residuos de cosecha son el medio primario de sobrevivencia del hongo de una siembra a otra, en la forma de micelio o de coremios (CIAT, 1982).

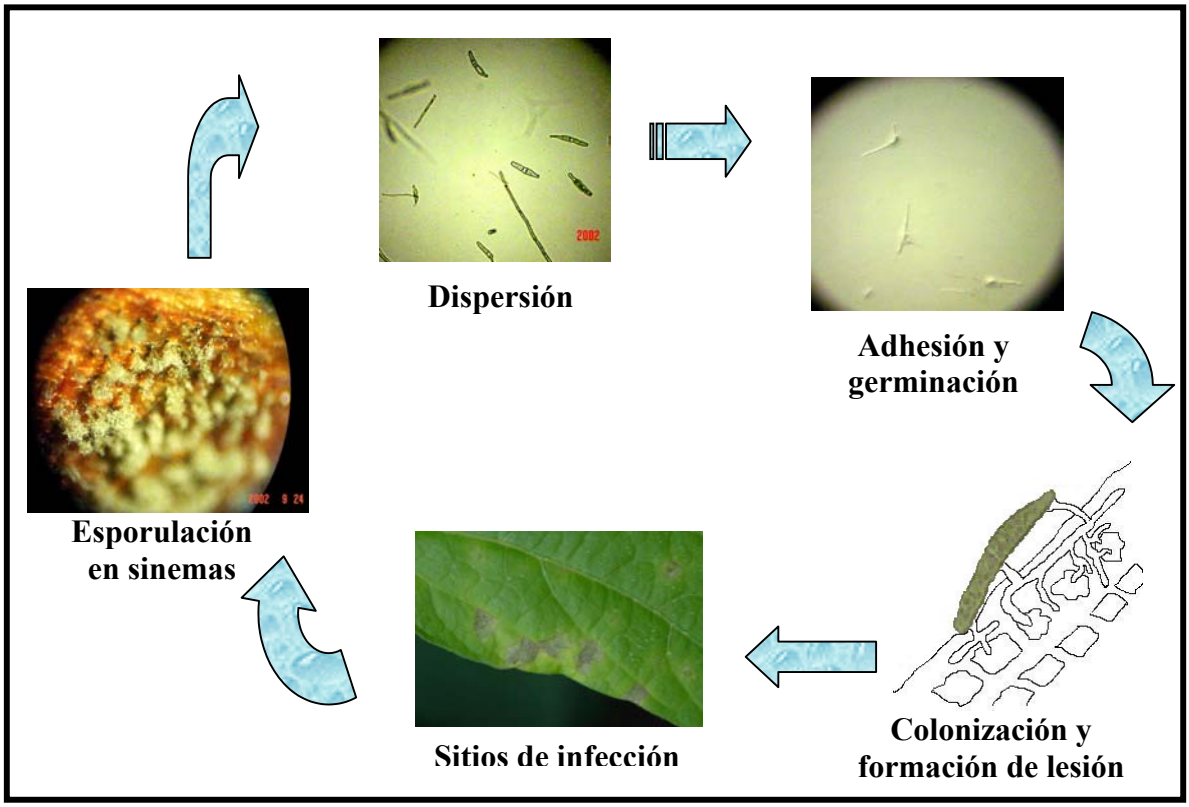


Figura 3. Ciclo reproductivo asexual de *Paeoisariopsis griseola*.

2.2.2.3 Infección

Bajo condiciones de humedad, las conidias pueden germinar en tres horas. La germinación bipolar de las esporas es más común pero la germinación lateral con 3 ó 4 tubos germinativos se ha observado también. Las esporas infectan el tejido de la hoja al penetrar a través de los estomas. La penetración se completa en dos días bajo condiciones óptimas. El micelio se desarrolla en la cavidad subestomatal, y después de cuatro días es colonizado el espacio intercelular entre el parénquima en empalizada. Los cloropastos presentan signos de degradación tres días después de la inoculación; seguido por la necrosis de las células guardianes y las células del mesófilo adyacente; desintegración del parénquima en empalizada y finalmente la epidermis es destruida (Liebenberg y Pretorius, 1997). Según Campos-Ávila (1987), a los 19 días el hongo se desarrolla intracelularmente en las lesiones necróticas; 12 días después, en la cavidad subestomática, el hongo desarrolla un estroma de donde emergen los conidióforos que forman el sinema.

2.2.2.4 Síntomas

Los síntomas de la infección son comunes en las hojas y se presentan generalmente como lesiones angulares delimitadas por las nervaduras. Inicialmente aparecen en el envés de las hojas como pequeños puntos grises y, dependiendo de la variedad, pueden presentar un halo clorótico de márgenes indefinidos. Generalmente, el patógeno puede producir estructuras reproductivas como coremios o sinemas en el envés de la hoja sobre la lesión. Las lesiones angulares pueden coalescer extendiéndose sobre la lámina foliar, llegando a

cubrir toda el área (CIAT, 1982). Ataques tempranos pueden resultar en una defoliación parcial prematura. Las lesiones en vainas, tallos y pecíolos son de un color café rojizo y frecuentemente presentan un borde más oscuro. A diferencia de las lesiones producidas por antracnosis en las vainas, las producidas por la mancha angular no se observan hundidas. En las hojas primarias, las lesiones son típicamente redondeadas y presentan anillos concéntricos (Castaño-Zapata y Del Río, 1994).

2.2.2.5 Variación patogénica

El patógeno de la mancha angular posee razas. La mayoría de los genotipos evaluados hasta ahora son resistentes a unas razas y susceptibles a otras. Pastor-Corrales (1995) añade, que existe evidencia que indica que la organización de la diversidad genética del hongo que causa la mancha angular del frijol, *P. griseola*, es paralela a la de su hospedero. Existen dos grandes grupos de aislamientos de *P. griseola*, uno andino y otro mesoamericano. Esta separación se ha obtenido estudiando la diversidad del patógeno con variedades diferenciales y marcadores moleculares. En el frijol, existen muchas diferencias entre los aislamientos andinos y mesoamericanos del patógeno de la mancha angular. Los resultados sugieren que los aislamientos andinos habrían evolucionado por miles de años con los frijoles de grano grande de origen andino; y los aislamientos mesoamericanos con los frijoles de grano pequeño o mediano de origen mesoamericano. Estos datos también sugieren que los dos grupos de aislamientos del patógeno son el resultado de dos eventos evolutivos separados y diferentes.

2.2.2.6 Hospedero

Este hongo tiene varios hospederos; los de mayor importancia son *Phaseolus lunatus* y *P. multiflorus*. También se afirma que *Pisum sativum*, *Vigna sinensis* y *Glycine max* son hospederos; pero en la soya no se ha podido comprobar. En México, bajo condiciones de invernadero, se inocularon varias especies del género *Phaseolus*, resultando susceptibles *P. angularis*, *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. calcaratus*, *P. vulgaris silvestre* y *P. coccineus* (Campos-Ávila, 1987).

2.2.2.7 Resistencia varietal

Según Campos-Ávila (1987), el uso de variedades resistentes es la medida más segura y económica, para prevenir este mal. La resistencia varietal para *P. griseola* fue detectada inicialmente en 1929 cuando Gardner y Mains observaron que la variedad Kentucky Wonder fue la más resistente de 40 variedades de frijol común probadas en invernadero. Fueron también probadas 150 accesiones de *P. vulgaris* y dos de *P.coccineus*, y se reportó que 10 variedades de *P. vulgaris* y una variedad de *P. coccineus* fueron altamente resistentes a la mancha angular en Australia (Pastor-Corrales *et. al*, 1982).
El uso de materiales tolerantes permite la presencia del patógeno sin que ocasione pérdidas económicas debidas a la disminución de los rendimientos. Algunos investigadores indican que la herencia de la resistencia está controlada principalmente por genes recesivos o por genes dominantes, dependiendo de la variedad utilizada en el estudio (CIAT, 1982). En estudios realizados por Díaz (2001) en Honduras, se determinó la resistencia de la accesión andina G 06727 debida a un gen recesivo.

2.2.2.8 Cultivares diferenciales de mancha angular

Hasta 1996, no existía un grupo de cultivares diferenciales estandarizado que sirviera para comparar los resultados a través del tiempo y en diferentes partes del mundo.
Según Liebenberg y Pretorius (1997), en noviembre de 1995, en el Taller Internacional de Mancha Angular desarrollado en Colombia, se aceptó el grupo de cultivares diferenciales desarrollado por el CIAT y su valor binario para determinar las razas del patógeno. Dentro de los genotipos se encuentran seis cultivares de origen Andino (Don Timoteo (1), G11796 (2), Bolón Bayo (4), Montcalm (8), Amendoin (16) y G05686 (32)), y seis Mesoamericanos (PAN 72 (1), G02858 (2), Flor de Mayo (4), México 54 (8), BAT 332 (16) y Cornell 49242 (32)). Estos diferenciales han sido usados por el CIAT y otros centros de investigación, incluyendo al Programa de Investigación de Frijol de Zamorano, en estudios de virulencia (Díaz, 2001).

2.2.3 Sistema de evaluación de enfermedades de frijol

En 1987, el CIAT formuló un sistema estándar de evaluación de enfermedades de frijol uniforme, rápido y preciso para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos fungosos y bacterianos en condiciones de campo.

En este sistema, dos criterios de evaluación son empleados: la **severidad** de la enfermedad, que según el CIAT (1987) se define como la cantidad de tejido de la planta afectado por los organismos causantes de la enfermedad y se expresa como porcentaje de la cantidad total de ese tejido; y la **incidencia** de la enfermedad, definida como el número de unidades afectadas, considerando dentro de esta a plantas enteras, hojas, tallos, vainas y raíces, expresando luego estas unidades como porcentaje de la población total de unidades escogidas.

Cuadro 2. Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungosos.

Calificación	Severidad	Categoría	Descripción	Incidencia (%)
1	Ausente		Síntomas no visibles	0
2	Dudoso	Resistente	o muy leves	1-10
3	Débiles			11-25
4	Moderados		Síntomas visibles y	26-40
5	Intermedios	Intermedio	conspicuos que sólo	41-60
6	Generales		ocasionan un daño económico limitado	61-75
7	Intensos		Síntomas severos a	76-90
8	Severos	Susceptible	muy severos que	91-99
9	Muerte		Causan pérdidas considerables en rendimiento o la muerte de la planta	100

Fuente: CIAT (1987)

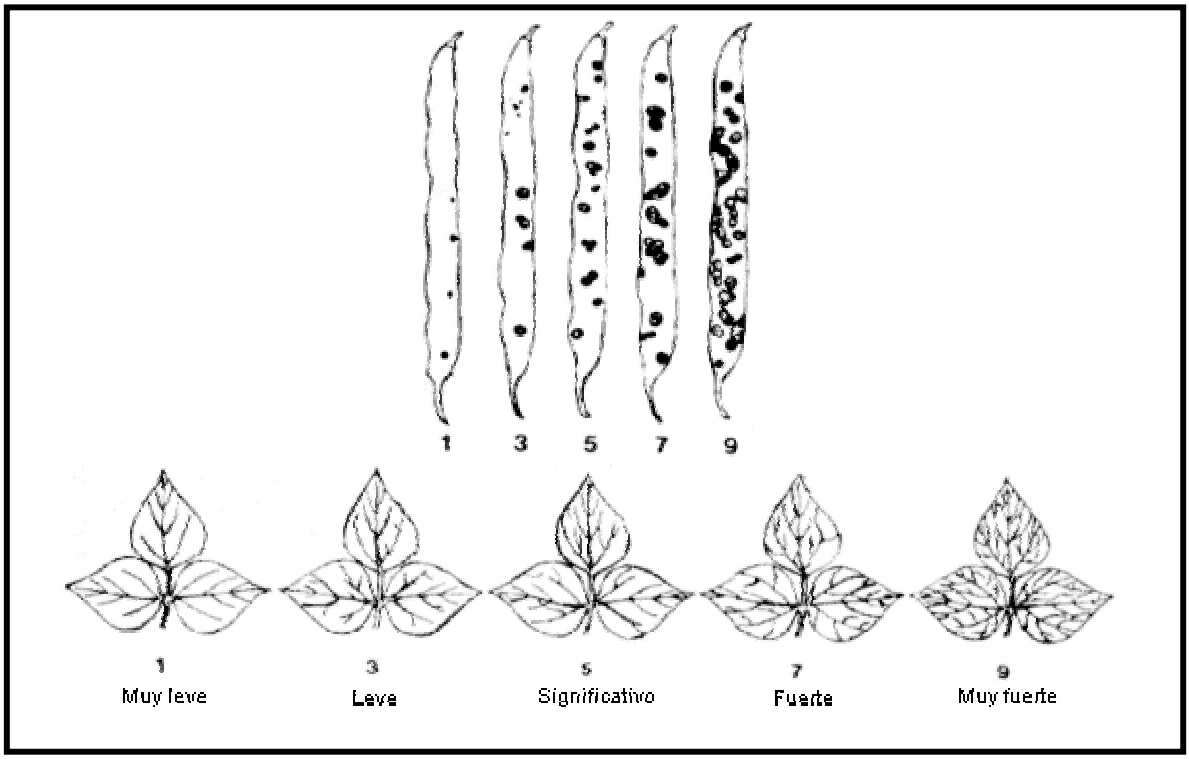


Figura 4. Escala gráfica de evaluación de daños por *C. lindemuthianum* en vainas y trifolios de frijol (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos de México, 1992).

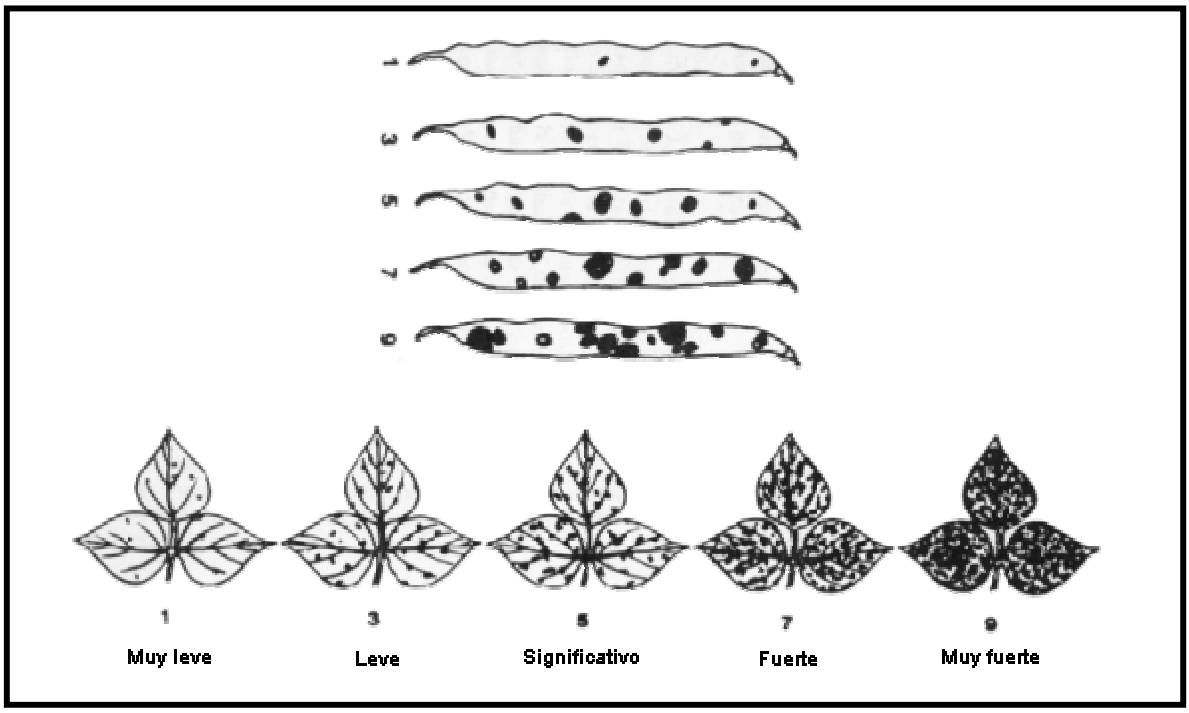


Figura 5. Escala gráfica de evaluación de daños por *P. griseola* en vainas y trifolios de frijol (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos de México, 1992).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS

Una manera práctica de identificar una enfermedad y su agente patógeno se puede resumir en cuatro pasos (CIAT, 1981b):

1. La observación de los síntomas
2. El aislamiento del patógeno
3. Las pruebas de patogenicidad
4. La consulta bibliográfica

Para encontrar la relación entre el probable agente patógeno y la enfermedad que presenta una planta, deben cumplirse los postulados de Koch. Estos postulados, que permiten establecer la etiología, son:

1. El organismo o agente fitopatógeno debe estar asociado con la enfermedad en todos los casos y a su vez la enfermedad no debe aparecer sin que el microorganismo esté o haya estado presente.
2. El organismo o agente fitopatógeno debe ser aislado en cultivo puro, natural o artificialmente y deben estudiarse sus caracteres específicos.
3. Cuando en condiciones favorables la planta hospedante sana se inocula con el posible agente fitopatógeno en cultivo puro, deben reproducirse los síntomas característicos de la enfermedad.
4. El agente fitopatógeno debe ser reaislado del hospedante inoculado y debe mostrar las mismas características en cultivo puro que el que se aisló anteriormente.

3.1.1 Localización del estudio

La adaptación de los protocolos para el aislamiento de *C. lindemuthianum* y *P. griseola* se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano. Las inoculaciones y los ensayos de identificación de razas con las variedades diferenciales de antracnosis y mancha angular se condujeron en cámaras húmedas (en laboratorio e invernadero) y en camas de infección.

3.1.2 Variables evaluadas y su medición

La caracterización patogénica de *C. lindemuthianum* y *P. griseola* se midió en las camas de infección y en una cámara húmeda de invernadero mediante los síntomas presentados en las variedades diferenciales después de las inoculaciones. La disminución del porcentaje de germinación de las conidias (esporas) de *C. lindemuthianum* fue medida en el laboratorio durante 30 días en tres conteos.

3.1.3 Adaptación del protocolo para el aislamiento, conservación e inoculación de *Colletotrichum lindemuthianum*

Se utilizó el protocolo de aislamiento de antracnosis del INIAP - Estación Experimental de Santa Catalina, Ecuador. Se realizaron recolecciones de hojas, tallos y vainas con necrosis de antracnosis, en la zonas de Lavanderos (Güinope), Los Planes(Yuscarán) y en el valle del Zamorano.

3.1.3.1 Equipo y material de laboratorio

Para la recolección de muestras con síntomas de antracnosis, se utilizó papel toalla y bolsas de papel, para evitar que la humedad excesiva dañe la muestra fresca. En el laboratorio se utilizó un bisturí hoja # 14, con su mango, y una paleta de madera para hacer los cortes de tejido con síntomas. La desinfestación de los cortes de tejido se hicieron en beakers de 50 ml con hipoclorito de sodio al 1.5 %, se lavaron con agua destilada estéril y se secaron en papel toalla estéril. La siembra de los cortes se hizo con ayuda de pinzas estériles en platos Petri con PDA (papa-dextrosa-agar) con antibiótico (Tetraciclina) y estos se sellaron con cintas de Parafilm®. La purificación del patógeno se realizó con ayuda de un haz de punta, mechero de alcohol al 70 % , bisturí de hoja # 11, medio de Mathur´s con antibiótico y cintas de Parafilm®. Para la dispersión de conidias se utilizó un haz de punta, mechero de alcohol, chupón, pipetas Pasteur, rastrillo de vidrio, medio agar–agua con antibiótico y cintas de Parafilm®. En la obtención de los cultivos monospóricos se requirió, un haz de transferencia, mechero con alcohol, medio de Mathur´s con antibiótico, cintas Parafilm® y un estereoscopio. Todos estos procedimientos de aislamiento se hicieron dentro de una cámara de flujo laminar horizontal y los platos se guardaron en una incubadora para protegerlos de la contaminación. Para el proceso de conservación de cepas de *C. lindemuthianum* se utilizó papel filtro, agua destilada estéril, pipeta con bulbo, pinzas, sobres pequeños de aluminio y de papel, silica gel, algodón estéril y frascos pequeños con tapón.

3.1.3.2 Aislamiento

El propósito de aislar cualquier patógeno, es obtener una cepa pura monospórica libre de contaminantes que nos sirva en la identificación de razas patogénicas presentes en la región.
Según Castaño-Zapata (1994), dentro de una especie de hongo existen formas especiales (*formae specialis*) que atacan a ciertas plantas; y dentro de estas formas especiales, algunos individuos atacan a algunas de las variedades de la planta hospedante pero no a otras. Cada grupo de tales individuos comprende una raza fisiológica.

Recolección de muestras. Las muestras se recolectaron en tres localidades del Departamento de Fco. Morazán, Honduras: Lavanderos, Los Planes y Zamorano. El tejido recolectado se obtuvo de partes de la planta donde la enfermedad se encontraba en diferentes etapas de desarrollo, y cuando los síntomas y los posibles signos eran evidentes. Se evitó recolectar tejido en estado avanzado de infección, debido a que organismos saprofitos pudieron haber invadido la muestra. El tejido recolectado (hojas, tallos, pecíolos y vainas) fue guardado en papel toalla y bolsas de papel para

evitar daños y alteraciones durante el transporte. La muestra se llevó al laboratorio el mismo día para ser cortada, desinfestada y sembrada.

Siembra. El tejido infectado fue cortado en pedazos (explantes) de 5 x 3 mm con un bisturí y sobre una paleta de madera. Estos cortes fueron luego desinfestados en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5%, para eliminar organismos que se encuentren en la superficie del tejido y que puedan contaminar el medio de cultivo. Luego de sumergidos los pedazos de tejido infestado en hipoclorito de sodio, se secaron en papel toalla estéril y se sembraron 4 a 5 pedacitos de tejido por plato Petri con PDA con antibiótico.

Purificación. Después de 4 a 6 días se procedió a subcultivar el hongo de la antracnosis, identificado entre todos los contaminantes que crecieron en el medio de PDA. Para esto, se extrajo pedazos de 5 x 3 mm de *C. lindemuthianum* con un bisturí y se transfirieron al medio de Mathur´s con antibiótico.

Dispersión. Cuando el cultivo purificado ya estuvo esporulado, se procedió a extraer las esporas con ayuda de una punta de transferencia mojada. La punta de transferencia se pasó sobre el micelio esporulado para que las esporas queden atrapadas en la punta mojada. Luego se hizo gotear agua destilada estéril sobre la punta con esporas para que se desprendieran y cayeran en el plato Petri con agar-agua con antibiótico. Luego con un rastrillo de vidrio se esparcieron las gotas con esporas sobre la superficie del medio.

Cultivo monospórico. Transcurrido un día después de la dispersión, y cuando las esporas ya habían germinado, se procedió a extraer individualmente las conidias y se las colocó finalmente en medio de Mathurs con antibiótico, para que colonizaran el plato y así obtener un cultivo monospórico puro de *C. lindemuthianum*.

3.1.3.3 Conservación de los cultivos monospóricos

Cuando se ha logrado aislar el patógeno se procede a conservarlo para su uso futuro. Toda conservación de hongos consiste en retardar, mediante alguna técnica, el proceso metabólico del hongo pero conservando su patogenicidad. CIAT (1981b) cita algunas técnicas comunes de conservación de hongos:

1. A bajas temperaturas
2. Criopreservación
3. Anaerobiosis
4. Desecación
5. Liofilización
6. En tejido vivo

En nuestro caso, la técnica utilizada para conservar *C. lindemuthianum* fue a bajas temperaturas (-20ºC) y por desecación a bajas temperaturas (4ºC). Para esto se utilizó un cultivo monospórico, el cual ya haya colonizado gran parte del medio en el plato Petri y papel filtro humedecido con agua destilada estéril, que se colocó sobre el micelio del hongo para que éste colonice el papel.[1] Luego de 10 días y cuando el hongo colonizó el papel, se cortó éste en triángulos que fueron guardados en sobres de aluminio y de papel, y

[1] María Mercedes Doyle. 2002. Conservación del patógeno de la antracnosis del frijol. Zamorano, Honduras. (Comunicación personal).

conservados a bajas temperaturas (-20ºC) en el congelador. También se guardaron triángulos de papel filtro en frascos pequeños con silica gel y algodón que luego fueron refrigerados a 4ºC (Anexo 3).

Según el CIAT (1981b), las técnicas de conservación de agentes patógenos producen con el tiempo variación y por lo tanto pérdida de patogenicidad. La técnica, en la que este fenómeno se presenta con menos frecuencia es la de liofilización, debido a que en esta las estructuras reproductivas, como esporas, son sometidas a deshidratación, baja temperatura y vacío, haciendo efectiva la preservación del patógeno con sus características de patogenicidad.

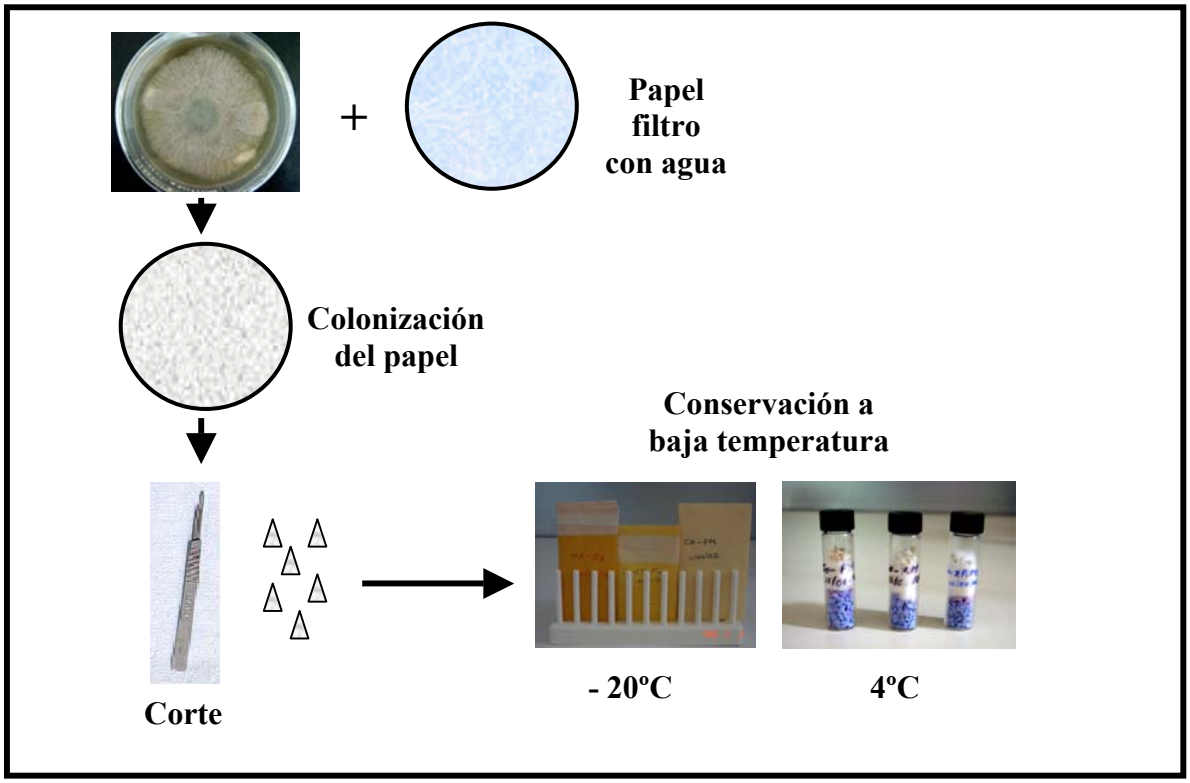


Figura 6. Flujograma de conservación de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Recuperación del hongo. El objetivo de esta metodología es recuperar el hongo en condiciones de viabilidad. El procedimiento a utilizarse depende del estado en que se encuentra almacenado el aislamiento que se quiere recuperar (Pastor-Corrales y Castellanos, s.f.). En nuestro caso se transfirió los triángulos de papel filtro a medio de Mathur´s usando una pinza estéril.

3.1.3.4 Inoculación

Según Castaño-Zapata (1986), las conidias pequeñas de *C. lindemuthianum* deben ser contadas en el mm^2 central del hemacitómetro.

Preparación de inóculo. Se hizo una producción de conidias, incrementando cada cultivo monospórico en medio de Mathur´s con antibiótico. Se colocó sobre el medio una buena cantidad de conidias y se las esparció con un rastrillo de vidrio sobre la superficie. Estos platos Petri se incubaron durante 15 días de 24 – 28 ºC. Luego de este periodo se colocó a

cada plato 30 ml de agua destilada estéril con 1 µl de Tween 20 (para desagrupar las esporas) y se procedió a raspar el micelio esporulado con una espátula para desprender las conidias. La suspensión de conidias y micelio se filtró con ayuda de una gasa estéril y luego se procedió a hacer el ajuste de la concentración de esporas a 1.2 x 10^6 conidias/ml , con un hemacitómetro. Aproximadamente cada plato bien esporulado sirvió para hacer 300 ml de inóculo.

Tercer postulado de Koch en hipocotilos, vainas y hojas de frijol. Se hizo una inoculación de conidias de *C. lindemuthianum* en hipocotilos, vainas y hojas de frijol, utilizando las variedades "Catrachita" y "Desarrural" como modelo de resistencia y susceptibilidad respectivamente, para comprobar el tercer postulado de Koch. En los hipocotilos y vainas se usó la técnica de inoculación con jeringa, haciendo heridas a los tejidos para ayudar la infección; las hojas fueron inoculadas con aspersión a presión. Todos los tejidos luego de inoculados fueron colocados en cámara húmeda para la incubación de las conidias.

Inoculación de variedades diferenciales. Para caracterizar a *C. lindemuthianum* se inoculó un juego de 12 variedades diferenciales. Estas variedades se sembraron en cámaras húmedas (invernadero y laboratorio) y en camas de infección. En las cámaras húmedas las plantas fueron sembradas en maceteros pequeños, medianos y grandes, de 3 a 5 maceteros por diferencial y 1 a 2 plantas por macetero. En las camas de infección se sembraron 8 plantas por diferencial por cama. El método de inoculación usado fue el de aspersión a presión con ayuda de asperjadores de plásticos para limpiar vidrios y con un atomizador DeVilbiss® # 15. Las plantas inoculadas tenían 10 – 12 días de germinadas y con la primera hoja trifoliar. La inoculación fue dirigida al haz y envés de las hojas. Después de inoculadas, las plantas se sometieron a un periodo de incubación en cámara húmeda, bolsas de plástico e incubación natural en las camas de infección, con una humedad del 100% y a temperatura ambiente,. Las inoculaciones se realizaron al terminar la tarde, para que la baja temperatura y el rocio de la noche favorecieran el desarrollo de la enfermedad; esta última condición solamente ayudó a la incubación natural.

3.1.4 Prueba de germinación de esporas de *C. lindemuthianum*

Se pudo observar que las colonias monospóricas de *C. lindemuthianum*, después de un mes de iniciada la esporulación (aprox. 10 días de reactivado el patógeno), se reducía la germinación de esporas, afectando la producción abundante de conidias para las inoculaciones.

3.1.4.1 Equipo y material de laboratorio

Para la germinación de conidias de *C. lindemuthianum* se utilizaron tres (primer tratamiento) y 10 platos petri (segundo y tercer tratamiento) con papel filtro, agua destilada estéril, triángulos de vidrio, pipetas Pasteur con bulbo, porta-objetos estériles, cintas de Parafilm®, una espátula estéril, beakers de 50 ml y cepa monospórica de antracnosis reactivada en medio de Mathur´s.

3.1.4.2 Metodología

A cada plato con el patógeno reactivado se le hizo un conteo de germinación de esporas, al 1ro, 15vo y 30vo día de iniciada la esporulación de la colonia (12 días después de reactivada).

Para esto se transfirió a medio de Mathur´s (medio utilizado para abundante esporulación) triángulos de papel filtro con hifas y esporas del patógeno conservado. A cada plato con Mathur´s se le colocó un triángulo de papel para que el patógeno colonizara individualmente el medio. A los 12 días de transferido el triángulo, hubo esporulación de la colonia, se pusieron las esporas a germinar y al día siguiente se determinó la germinación de las conidias. A los 15 y 30 días después de este primer conteo, se hizo la segunda y tercera verificación de la reducción de germinación, respectivamente.

Extracción. Se colocaron 30 ml de agua destilada estéril en el plato petri colonizado de C. lindemuthianum, y con una espátula estéril se procedió a raspar toda la colonia del patógeno para que las esporas se desprendieran. Luego esta suspensión de conidias se pasó por una gasa y sobre un beaker de 50 ml para separar el micelio y formar una suspensión homogenea que no interfiera con la atomización de esporas. Con la pipeta Pasteur se homogenizó la suspensión y se colocó una gota en un porta-objetos para ver con el microscopio la cantidad de conidias; si ésta era muy alta y se dificultaba el conteo, se hacían diluciones de la suspensión madre hasta que la concentración de conidias/gota quedara baja. Luego de ajustada la suspensión, se procedió a montar una gota por porta-objetos y se colocó la placa en un plato petri con papel filtro humedecido y un triángulo de vidrio, para que el porta-objetos no toque el papel del fondo. En total se procesaron 10 platos petri con 10 porta-objetos.

Germinación. Los platos petri conteniendo las placas y las gotas con conidias, se sellaron con Parafilm® para mantener la humedad durante 15 horas, en las cuales debieron haber germinado todas las conidias.

3.1.4.3 Diseño estadístico

Se usó un Diseño experimental Completamente al Azar (DCA) compuesto por tres fechas de edad del cultivo (tratamientos) para verificar la reducción en la germinación de las conidias. La primera, es la fecha de inicio de esporulación del cultivo de antracnosis; la segunda y tercer fecha, a los 15 y 30 días después de iniciada la esporulación, respectivamente. Las repeticiones por tratamiento fueron tres para el primero, y 10 para los dos últimos. Las unidades experimentales fueron los portaobjetos con gota de conidias en suspensión.

3.1.5 Adaptación del aislamiento, conservación e inoculación de *Phaeoisariopsis griseola*

Se empleó el protocolo de aislamiento de mancha angular del CIAT (Centro Internaciona de Agricultura Tropical) de Colombia. Se hizo recolecciones de hojas infestadas en el sector de El Ocotal, Yuscarán, y en el valle de El Zamorano.

3.1.5.1 Equipo y material de laboratorio

Las muestras recolectadas fueron conservadas durante el transporte en papel toalla y bolsas de papel. Se utilizaron platos petri con papel filtro humedecido en el fondo y un triángulo de vidrio, para que sirvieran de cámara húmeda para las hojas infestadas. Para la extracción de esporas de los sinemas, se utilizó una punta de transferencia, agua destilada estéril, medios PDA con antibiótico y agar-agua. En la obtención de los cultivos monospóricos se utilizó una punta de transferencia, mechero con alcohol, asperjador con alcohol, medio V8

con antibiótico, un estereoscopio y cintas Parafilm®. Los aislamientos se hicieron dentro de una cámara de flujo laminar horizontal y los platos se guardaron en una incubadora. Para la conservación de los monospóricos del patógeno se utilizó papel filtro, agua destilada estéril, pipeta con bulbo, pinzas, sobres pequeños de aluminio y de papel.

3.1.5.2 Aislamiento

Recolección de muestras. Las muestras de tejido infestado fueron recolectadas en las localidades de El Ocotal (Yuscarán) y el valle del Zamorano. Se escogieron hojas jóvenes con lesiones (manchas) bien desarrolladas y sin esporular; y se guardaron en papel toalla y bolsas de papel para impedir el daño por humedad.

Esporulación de muestras. Las hojas recolectadas fueron colocadas individualmente sobre un triángulo de vidrio dentro de un plato petri con papel filtro húmedo en el fondo. Luego de 3 a 4 días las lesiones esporularon y los sinemas fueron visibles.

Extracción y dispersión de esporas. Se sacaron de los platos petri las hojas esporuladas y se las colocó en un estereoscopio. Con ayuda de una lámpara anexa, se procedió a extraer las conidias de los sinemas esporulados. Se colocó un pedacito de agar – agua en la punta del haz de transferencia y se impregnó con esporas el agar, tocando con este los sinemas sobre la lesión. Finalmente se hizo gotear sobre el trozo de agar, con esporas, cinco gotas de agua destilada estéril para que las conidias se desprendieran y cayeran en el medio de PDA con antibiótico. Después se esparcieron las gotas con un rastrillo de vidrio sobre el medio para que las esporas germinaran y no se dificultara la extracción de estas al hacer los cultivos monospóricos.

Cultivo monospórico. Después de dos días de haber hecho la dispersión y cuando las esporas ya habían germinado, se procedió a extraer individualmente las conidias con una aguja de transferencia y se las colocó, cada una, en el centro de un plato con medio V8 con antibiótico (tetraciclina).

3.1.5.3 Conservación de los cultivos monospóricos

Se utilizó como base el método de conservación a bajas temperaturas del CIAT. Cada monospórico se procesó en un plato petri con medio V8 por separado, en cada plato se colocaron 5 cuadros pequeños de papel filtro estéril y sobre estos una gota de suspensión de esporas de los monospóricos. Después de 12 días se removieron los cuadros de papel filtro colonizados con *P. griseola*, se dejaron secar por seis días y luego se conservaron en sobres de aluminio y de papel a –20ºC en el congelador.

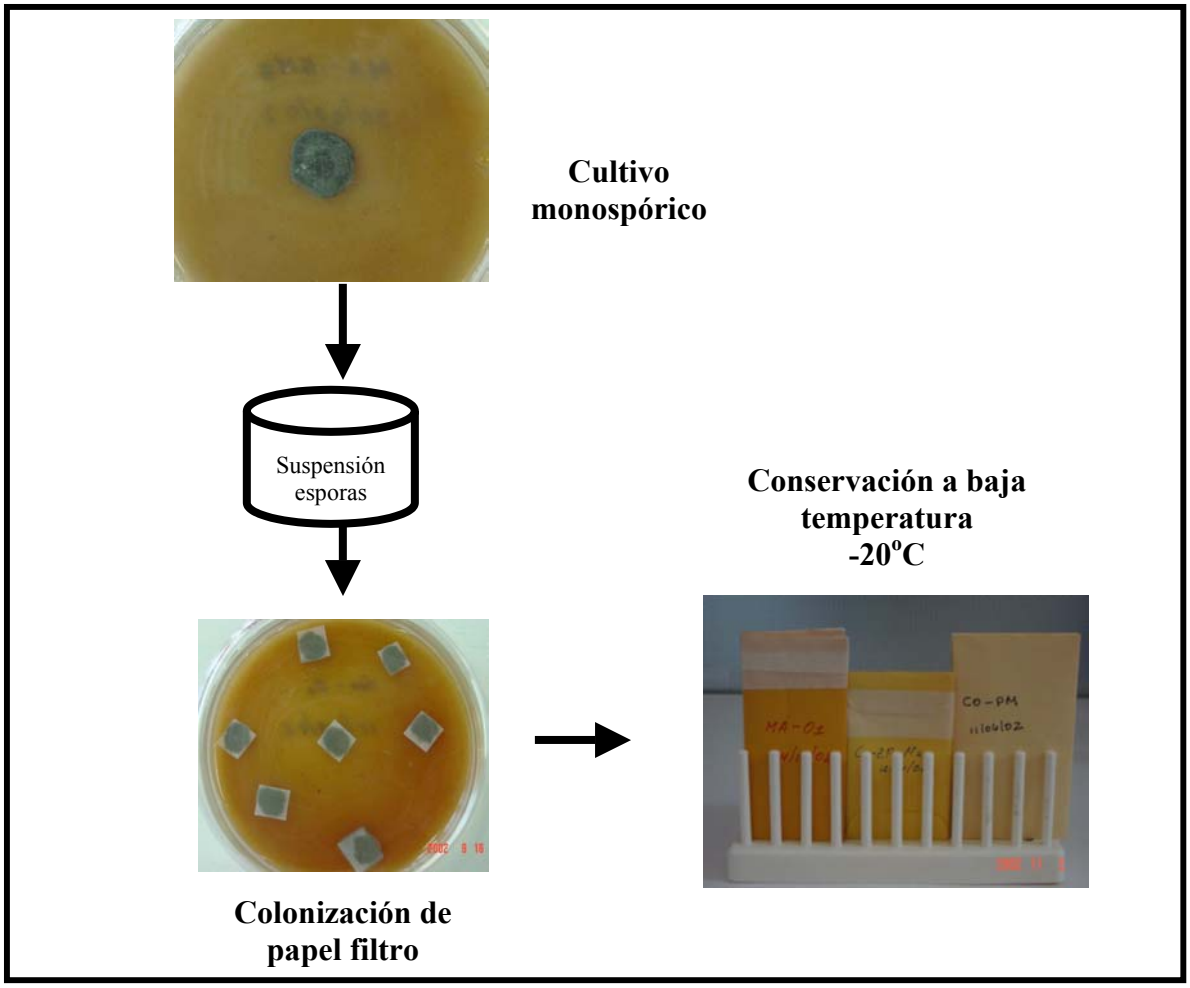


Figura 7. Flujograma de conservación de *Paeoisariopsis griseola*.

3.1.5.4 Inoculación

Castaño-Zapata (1986), nombra a las esporas de *Helminthosporium turcicum* como conidias grandes por lo que para hacer el ajuste de concentración de inóculo, se cuentan en cinco cuadrados principales de 1 mm de lado en el hemacitómetro. Mahuku *et. al* (s.f.) cita que las conidias largas de *P. griseola* se cuentan fácilmente en los cuadrados grandes de un hemacitómetro.

Producción abundante de esporas. Este paso fue necesario de realizar para obtener un incremento considerado de esporas, que nos sirvieran para hacer las inoculaciones en las camas de infección y en la cámaras húmedas (invernadero y laboratorio).

Preparación de inóculo de cepa pura. El inóculo de *P. griseola* se hizo de la misma manera que el de *C. lindemuthianum*, siendo la única variante el ajuste de concentración de esporas a 2 x 10^5 (dos primeras inoculaciones) y a 1.5 x 10^5 (última inoculación).

Preparación de inóculo proveniente de hojas infestadas. Se hizo una suspensión de esporas de concentración desconocida, agregando 100 g de hojas infestadas de mancha angular y pulverizadas a una bomba de mochila de 15 L. Estas hojas fueron recolectadas de la cosecha anterior en las camas de infección y pulverizadas en un molino eléctrico. La

solución fue preparada licuando las hojas con agua y pasando la mezcla por los cedazos No. 20, 40 y 60 para evitar obstruir la bomba de mochila.

Inoculación de variedades diferenciales. Las plantas de los diferenciales fueron sembradas en cámaras húmedas y en camas de infección. En las cámaras húmedas se utilizó maceteras medianas, pequeñas y grandes, colocando de 3 a 5 maceteros por diferencial y una a dos plantas por macetero. En las camas de infección se sembraron 6 a 8 plantas por diferencial/cama. La inoculación de los cultivos monospóricos fue realizada con un atomizador DeVilbiss® # 15. Las plantas de 18 – 20 días de germinadas o con dos hojas trifoliares, fueron inoculadas por el haz y el envés. Cabe recalcar que la primera inoculación, y la más efectiva, en las plantas sembradas en camas de infección fue dirigida solamente al envés de las hojas por las lluvias constantes que se presentaron durante esa semana. Después de inoculadas, las plantas se sometieron a un periodo de incubación a una humedad del 100% y a temperatura ambiente, en cámara húmeda dentro y fuera del laboratorio. La humedad en las camas de infección no fue registrada, únicamente se mantuvo una lámina de agua constante en las hojas, exceptuando la horas de mayor luminosidad. Las inoculaciones se realizaron al terminar la tarde, para que las condiciones de baja temperatura y el rocio de la noche favorecieran a la incubación en las camas de infección.
Para aplicar el inóculo proveniente de hojas infestadas, se agregaron a la suspensión 2 gotas de Tween 20 como adherente por litro de inóculo. Las aplicaciones con este inóculo se hicieron cada siete días por la tarde hasta que los primeros síntomas se presentaron, y se mantuvo una lámina de agua constante en las hojas durante el tiempo que duraron las inoculaciones.
Una última inoculación fue hecha en diferenciales sembrados en maceteras grandes, colocando dos maceteras por diferencial y dos plantas por macetera. Se hizo una adecuación de la cámara húmeda en el invernadero: se construyó una cámara de incubación pequeña (menor) dentro de la más grande (mayor) con tapaderas superiores y se cortaron las paredes laterales de plástico de la cámara mayor. La inoculación fue hecha al terminar la tarde (6 p.m.), se humedeció el piso de la cámara menor de incubación y se colocaron las tapaderas superiores para que ascendiera la humedad dentro de la cámara. Al día siguiente, se quitaron las tapaderas y se asperjaron las plantas inoculadas y el piso de la cámara a las 10 a.m. con un nebulizador de manguera. Se evitó regar las plantas al medio día por quemaduras del sol ocasionadas en inoculaciones anteriores. Durante una semana se repitió el proceso de colocar y quitar las tapaderas y mantener la humedad alta dentro de la cámara. La segunda semana se mantuvo la cámara menor destapada y se regó el follaje de las plantas (a las 10 a.m. y después de las 3 p.m.) y al suelo (todo el día).

3.2 EVALUACIÓN DE CULTIVARES DIFERENCIALES DE *C. lindemuthianum* y *P. griseola*

Los diferenciales de mancha angular y antracnosis fueron evaluados utilizando un sistema binario desarrollado por el CIAT y por la primera reunión de antracnosis del frijol en América Latina (1992), respectivamente. Según Pastor-Corrales (s.f.) la reacción de las variedades se clasifica como incompatible o de resistencia si la planta no muestra síntomas visibles de la enfermedad, o si solo tiene pequeñas lesiones sin esporulación; y como compatible o de susceptibilidad, si la planta muestra lesiones típicas de la enfermedad. En este sistema, a las variedades se les asigna un valor numérico binario cuando tienen una reacción susceptible. Los valores de las variedades diferenciales susceptibles se suman para así obtener el número final que identifica a la raza.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS

La adaptación de protocolos en el laboratorio de Biotecnología de Zamorano es importante por razones de investigación. Estas incluyen la obtención de razas de *C. lindemuthianum* y *P. griseola* predominantes en las regiones frijoleras de Centroamérica, y la aplicación de técnicas moleculares para el desarrollo de variedades de frijol con resistencia a antracnosis y mancha angular; debido a que estas dos enfermedades constituyen los dos más importantes problemas fungosos del frijol en esta región. La determinación de la razas incluyen la implementación de protocolos de aislamiento de los patógenos en el laboratorio y su inoculación en variedades diferenciales de frijol, que indican según su reacción de resistencia o susceptibilidad, la raza del patógeno inoculado. Adicionalmente, las técnicas moleculares incluyen el uso de marcadores tipo SCAR y RAPD, para facilitar la búsqueda de genes de resistencia a estas dos enfermedades.

4.1.1 Aislamiento, conservación e inoculación de *Colletotrichum lindemuthianum*

Durante el aislamiento de la antracnosis, el procesamiento inmediato de las muestras, la desinfección de los pedazos de tejido infestado, el reconocimiento microscópico del patógeno, los cultivos monospóricos y la asepsia total en todos los pasos, fueron los aspectos críticos dentro del proceso de aislamiento de *C. lindemuthianum*.
De los tres lugares donde se hicieron las recolecciones de material infestado, se pudo obtener aislamientos de solo dos, debido a que las muestras del sector de Lavanderos se procesaron después de un día de ser recolectadas, provocando la reducción en la viabilidad del patógeno y la proliferación de contaminantes, como bacterias u otros hongos.
Se hizo la desinfección de explantes con tres concentraciones de hipoclorito de sodio: al 1.5%, la más empleada en INIAP – Sta. Catalina, Ecuador; otra al 0.5%, utilizada por el CIAT y una concentración intermedia al 1%. Los resultados de las tres concentraciones en un mismo tiempo, dependiendo el tipo de tejido (Anexo 1), son los siguientes:

Cuadro 3. Prueba de concentraciones de hipoclorito de sodio para la desinfestación de pedazos de tejido de frijol con daños de antracnosis. Zamorano, Honduras, 2002.

Hipoclorito de Na (%)	Pedazos de tejido de frijol contaminados con bacterias (%)
0.5	80
1	40
1.5	5

Al final de la evaluación de las concentraciones de hipoclorito de sodio se decidió emplear la concentración al 1.5%, ya que en esta se observó crecimiento bacteriano muy limitado.
En el aislamiento de antracnosis se cometió inicialmente un error de reconocimiento macroscópico del patógeno, debido a que se confundió la cepa de *C. lindemuthianum* con la de *Fusarium spp.* por el crecimiento algodonoso de las hifas cuando las dos colonias están inmaduras.[1]

El problema de contaminación bacteriana en los cultivos se resolvió agregándole al medio Tetraciclina (Anexo 1), empleándose este antibiótico en todos los pasos del proceso de aislamiento.

Los primeros aislamientos de *C. lindemuthianum* fueron obtenidos a mediados de abril de 2002 y conservados 20 días después, cuando el cultivo había llenado el medio.
El crecimiento del cultivo de antracnosis creció más lento que el tiempo descrito por el INIAP – Sta. Catalina, Ecuador (Cuadro 4), debido a que la temperatura del Laboratorio de Biotecnología era mayor al rango de temperatura óptimo de incubación del patógeno. CIAT (1985), determina que la temperatura de incubación apropiada para manejar *C. lindemuthianum* es de 18 – 21ºC. Según CIAT (1981), en general, las temperaturas ideales para el desarrollo óptimo de los hongos varían entre 14 y 18ºC, dependiendo de las condiciones ambientales del lugar de recolección de la muestra. En el INIAP – Sta. Catalina, la temperatura de incubación es de 24ºC, para la mayoría de los hongos que en este centro de investigación se manejan. En el Laboratorio de Biotecnología se tomó datos de temperatura los cuales resultaron ser muy variables, dependiendo de la época del año; estas variaciones iban desde los 22ºC, cuando el aire acondicionado era encendido, a los 32ºC en la mayoría de las noches debido a los equipos eléctricos que están instalados dentro del laboratorio.

Cuadro 4. Comparación en el tiempo del proceso de aislamiento de *C. lindemuthianum* en INIAP – Ecuador y en Zamorano. Zamorano, Honduras, 2002.

Pasos de aislamiento	INIAP (días)	Zamorano (días)
Siembra	4	7
Purificación	10	8
Dispersión	1	1
Monospórico esporulado	10	15
Total (días)	24	31

La conservación de los cultivos monospóricos se llevó a cabo luego que los cultivos puros del patógeno habían colonizado el plato y esporulado. La viabilidad del patógeno conservado a – 20ºC y 4ºC fue verificada seis meses después; observando que la mejor conservación con papel filtro fue a 4ºC en silica gel, ya que estos aislamientos se reactivaron en un 100%.

Para la obtención abundante de conidias utilizadas en las inoculaciones de los cultivares diferenciales se hizo un incremento del cultivo monospórico, recomendada por Pastor-

[1] Mario Contreras. 2002. Verificación microscópica del patógeno de la antracnosis del frijol. Zamorano, Honduras. (Comunicación personal).

Corrales (s.f.). Se observó que este método es bastante efectivo, porque el medio de Mathurs con la dispersión de esporas después de 15 días nos dio un crecimiento del patógeno con poco micelio y abundantes conidias, obteniéndose por cada plato hasta 300 ml de inóculo a 1.2 x 10^6 esporas/ml. El inóculo de antracnosis fue filtrado con una gasa estéril para evitar que el atomizador DeVilbiss® se taponara con facilidad por el micelio en suspensión.

La comprobación del tercer postulado de Koch, dio resultado parcial en la inoculación de vainas y en hojas. Los hipocotilos de frijol no mostraron ningún síntoma de daño. Las vainas de la variedad de frijol Desarrural (susceptible), después de inoculadas y puestas en cámara húmeda por cinco días, mostraron abundante formación de acérvulos; mientras que, las vainas de la variedad Catrachita (resistente), expuestas a las mismas condiciones, no presentaron esporulación alguna. Los mismos resultados fueron observados en las plantas de estas dos variedades que fueron asperjadas con la suspensión de conidias de antracnosis. Las hojas de frijol Desarrural, después de 15 días de la inoculación en la cámara húmeda del laboratorio (Cuadro 5) presentaron manchas cloróticas de 5mm de diámetro; al observarse estas lesiones al estereoscopio, mostraban formación de acérvulos característicos de *C. lindemuthianum*. Posteriormente, se extrajo los acérvulos de las lesiones en la hojas y se montó placas de estos para su observación microscópica. Se comprobó que las esporas de los acérvulos pertenecían al patógeno de la antracnosis.

Estos resultados indican que aunque los síntomas comunes de la antracnosis en las vainas (chancros hundidos) y hojas (necrosis en nervaduras) de frijol no se presentaron por falta de condiciones microclimáticas adecuadas (Cuadro 5), la relación entre las conidias del patógeno y el tejido del hospedero va muy relacionado al grado de resistencia/susceptibilidad del frijol.

Cuadro 5. Microclima en diferentes condiciones de incubación de plantas inoculadas con suspensión de conidias de *Colletotrichum lindemuthianum*. Zamorano, Honduras, 2002.

Condiciones	Humedad (%)	Temperatura (ºC)	
		Día	Noche
Cámara húmeda - laboratorio	100	24	30
Cámara húmeda – invernadero	100	30	22
Bolsa de plástico - invernadero	100	30	22
Camas de infección	ambiente	25	22

Las inoculaciones de las variedades diferenciales de antracnosis se hicieron únicamente en las camas de infección por poca disponibilidad de semilla de una de las variedades de origen andino. La severidad de la infección fue leve y desuniforme, presentando únicamente daño de grado 6 en una planta del diferencial # 8 (PI 207262). Esto sugiere que aunque las condiciones microclimáticas en las camas de infección fueron mejores que en las otras condiciones de inoculación, no se llegó a las condiciones de microclima apropiado para el desarrollo de la enfermedad. CIAT (1981a) cita como condiciones apropiadas de desarrollo de la antracnosis, una humedad relativa de 85 – 100% y una temperatura de 18 – 22ºC. Los resultados de investigaciones indican que la temperatura es un factor decisivo para la infección y disiminación de la antracnosis del frijol. Períodos prolongados de altas temperaturas entre 25 y 35ºC restringen el desarrollo de la enfermedad (Bailey y Jeger, 1992).

Uno de los problemas por el cual también se redujo la posibilidad de una buena infección de la antracnosis fue la colonización rápida de otras enfermedades en los diferenciales. Se registró la presencia de infecciones virales, mancha angular y roya. Dentro de estas enfermedades, la de mayor severidad e incidencia fue la infección viral (principalmente mosaico dorado amarillo).

4.1.2 Evaluación de la germinación de esporas de *C. lindemuthianum*

Hubo una reducción de la germinación de esporas de la colonia *C. lindemuthianum* a lo largo del tiempo de evaluación (30 días). Los promedios obtenidos de la germinación muestran una reducción significativa de esta según la prueba SNK (0.05) con un coeficiente de variación de 8.6 entre los promedios (Cuadro 6).

Cuadro 6. Germinación de esporas de colonias de *Colletotrichum lindemuthianum* en tres diferentes fechas de esporulación. Zamorano, Honduras, 2002.

Días de esporulación de la colonia	Germinación de esporas (%)
1	93 a
15	56 c
30	75 b
C.V.	8.6

Los promedios de germinación en una misma columna seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes según prueba SNK < 0.05.

Según el CIAT (1981), en las técnicas de conservación de hongos se produce variación y pérdida de patogenicidad de las cepas aisladas. La técnica de conservación, que mantiene mejor las características del patógeno es la de liofilización, pero esta es laboriosa y requiere el equipo necesario.

Aunque las diferencias en germinación fueron marcadas, hubo un ascenso en el porcentaje de germinación del tercer tratamiento. Por lo que se puede asumir que aunque las esporas provenían de una sola cepa monospórica, hubo variación del patógeno durante el tiempo que estuvo conservado a bajas temperaturas (4°C), o debido a la carencia de una incubadora con temperatura constante y a las temperaturas variables del laboratorio, la latencia de las esporas se rompió, produciendo el aumento inesperado de germinación.

4.1.3 Aislamiento, conservación e inoculación de *P. griseola*.

Pastor-Corrales y Castellanos (s.f.) consideran a este hongo como muy difícil de manejar y de crecimiento fastidioso en laboratorio. Los investigadores que trabajan por primera vez con *P. griseola* encuentran muy laborioso aislarlo de tejido de frijol. Además, una vez que han logrado aislarlo, muchos no consiguen que los aislamientos esporulen, requisito necesario para poder realizar inoculaciones artificiales de plantas de frijol. Para muchos también es difícil la recuperación de los aislamientos de este patógeno cuando estos han sido almacenados, aunque sea por períodos cortos de tiempo.

Una de las dificultades que se tuvo al momento de aislar por primera vez *P. griseola* con el método de tejido con lesión, fue el de confundir las conidias y la colonia de este patógeno

con las de *Cladosporium*, un hongo contaminante común en laboratorios.[2] El error se debió a la similitud macroscópica de las colonias de estos dos hongos y a la verificación microscópica errónea de las conidias. El CIAT (1982) nombra dos tipos de colonias del patógeno de la mancha angular: colonias redondeadas, de superficie convexa y coloración oscura, casi negra; y colonias de crecimiento no circular y desuniforme sobre el medio, formando una capa felpuda de color café-grisáceo.

Después de este primer fracaso, se cambió la metodología de aislamiento conjugando dos métodos de obtención de cultivos puros de *P. griseola* utilizados por el CIAT (Anexo 4); estos procesos son: aislamiento con gota de agua estéril y aislamiento con pedacitos de agar disueltos en agua.

Las esporas capturadas de los sinemas en las lesiones de hojas y vainas, fueron dispersadas sobre medio de agar-agua y PDA, como se indica en el protocolo de aislamiento de Pastor-Corrales y Castellanos (s.f.). La germinación de las conidias en estos dos medios fueron iguales y en el mismo tiempo (1 día), con la diferencia que los monospóricos obtenidos de las dispersión en agar-agua no tuvieron crecimiento y los obtenidos de PDA crecieron sin problema alguno. Con esta diferencia podemos decir que las conidias de mancha angular necesitan nutrirse rápidamente luego de que han germinado y que al no encontrar la relación nutricional necesaria éstas dejan de crecer.

La esporulación de los monospóricos se dio a los 30 días, considerando esto y el tamaño de la colonia para la producción abundante de esporas y la conservación del hongo.

El problema de contaminación bacteriana al igual que en el aislamiento de *C. lindemuthianum* se resolvió agregándole tetraciclina al medio.

El tiempo de germinación, conservación y producción abundante de esporas, fue igual al citado por Pastor-Corrales y Castellanos (s.f.) (Anexos 4, 5 y 6).

Las inoculaciones se hicieron con esporas incrementadas de platos de 12 días de sembrados. Se notó que las colonias incrementadas, después de 20 días de sembradas producían una capa superior de micelio blanquecino corto y la cantidad de conidias por plato se reducía.

Según Liebenberg y Pretorius (1997), muchos autores reportan que la aspersión de hojas con una suspensión de conidias es la técnica de inoculación más satisfactoria.

Para las inoculaciones se hicieron pruebas posteriores con el atomizador DeVilbiss®, ya que se temía que las esporas por ser más grandes que las conidias de antracnosis, que son comúnmente inoculadas con este atomizador, no salieran íntegras al inocularlas. Las pruebas consistieron en hacer aplicaciones con el atomizador sobre porta-objetos, luego se colocó un cubre-objetos y se observó al microscopio para comprobar la calidad del inóculo atomizado. Las esporas observadas se encontraban en buen estado sin importar su tamaño.

Las condiciones de temperatura y humedad, al momento de incubar las plantas inoculadas, fueron las mismas a las que fueron expuestas las inoculaciones de antracnosis (Cuadro 5). La incubación con bolsa de plástico se obvió con mancha angular, debido a que en los diferenciales de antracnosis esta metodología ocasionó quemaduras por radiación solar.

Para las inoculaciones se usó una concentración de 2 x 10^5 conidias/ml de inóculo, diez veces más la concentración recomendada por el CIAT (Anexo 7). El empleo de esta concentración elevada se decidió por la carencia de un microclima favorable para el desarrollo de la infección, aumentando con esto la presión de esporas sobre los diferenciales. Liebenberg y Pretorius (1997) nombran varias concentraciones de inóculo

[2] Mario Contreras. 2002. Verificación microscópica del patógeno de la mancha angular del frijol. Zamorano, Honduras. (Comunicación personal).

probadas durante todo el tiempo de trabajo con *P.griseola*, llegando al final a una concentración recomendada de 2 x 10^4 conidias/ml.

La mejor reacción de la enfermedad de dio sobre los materiales diferenciales en las camas de infección. La inoculación se hizo inicialmente sobre el envés de las hojas durante una semana muy lluviosa y nublada (Anexo 10). Estas condiciones climáticas, buenas para el desarrollo de la enfermedad, y la alta presión de esporas provocaron que los primeros síntomas de mancha angular se presentaran a los 3 días de inoculadas las variedades diferenciales. Estos primeros síntomas ya mostraban las lesiones características del patógeno en ángulos, delimitadas por las nervaduras y de color gris.

La inoculación conducida en la cámara húmeda del laboratorio, presentó variación en el tiempo de aparición de los síntomas con respecto a la inoculación en las camas de infección. Después de inoculadas con una concentración de 2 x 10^5, las plantas fueron sometidas a 24 horas de incubación a 100% de humedad relativa y luego se las mantuvo con una lámina de agua sobre las hojas durante el día y en la noche se las cubría con plástico para aumentar la humedad, además se les dio 6 horas diarias de luz blanca. Este tratamiento de humedad y luz se hizo durante la primera semana después de inoculados los diferenciales. Los primeros síntomas se presentaron a los 15 días de realizada la inoculación, pero estos se presentaban de manera desuniforme en las plantas por la alta concentración de esporas, presentando algunas plantas manchas que cubrían gran parte de la superficie de las hojas sin diferenciarse las lesiones características, mientras que en otras las manchas angulares, características de la enfermedad, se presentaron normalmente.
Los síntomas de mancha angular, en las inoculaciones hechas en los cultivares diferenciales con inóculo proveniente de hojas infestadas, se presentaron después de la tercera inoculación, manteniendo una lámina de agua constante sobre las hojas. La infección inicial generalmente se presenta en las hojas inferiores, las cuales se convierten en fuente de inóculo secundario de las hojas superiores y de las vainas, logrando así el patógeno causar la defoliación completa de la planta e infectar la totalidad de los tejidos (CIAT, 1982).

4.2 EVALUACIÓN DE CULTIVARES DIFERENCIALES DE *C. lindemuthianum y P. griseola*

La infección en los diferenciales de antracnosis y mancha angular fue evaluada con la escala general de reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungosos del CIAT (Cuadro 2), con la única diferencia que la categoría de reacción intermedia se obvió y la categoría de resistencia representó la calificación de 1 a 3, y la susceptibilidad de 4 a 9.

4.2.1 Reacción de cultivares diferenciales de *C. lindemuthianum*

De los doce diferenciales de antracnosis inoculados en tres ocasiones con el aislamiento Co-Z1, únicamente las líneas PI 207262, AB 136 y G 2333 mostraron reacción al patógeno. Las lesiones que presentaron estas tres líneas diferenciales fueron evaluadas, pero esta lectura no se tomó en cuenta para la identificación de la raza del patógeno por la desuniformidad de la reacción; es decir, de las ocho plantas de cada uno de estos diferenciales con síntomas, solo una planta de PI 207262 y dos de AB 136 y G 2333 presentaron daño por antracnosis (Cuadro 7).

Cuadro 7. Reacción de los genotipos diferenciales al aislamiento Co-Z1 de *Colletotrichum lindemuthianum* en camas de infección. Zamorano, Honduras, 2002.

Cultivar Diferencial	Valor Binario por diferencial	Calificación * Severidad	Reacción Co-Z1
1. Michelite	1	1	-
2. Michigan Dark Red Kidney	2	1	-
3. Perry Marrow	4	1	-
4. Cornell 49242	8	1	-
5. Widusa	16	1	-
6. Kaboon	32	1	-
7. México 222	64	1	-
8. PI 207262	128	6	+
9. TO	256	1	-
10. TU	512	1	-
11. AB 136	1024	3	-
12. G 2333	2048	3	-

* Calificación de severidad, donde 1 es ausencia de síntomas y 9 es muerte de la planta (Fig. 4)
+ = Reacción compatible o de susceptibilidad; - = no hay reacción de susceptibilidad

Esta desuniformidad en la reacción patógeno/planta, se atribuye a la reducida capacidad de virulencia del patógeno aislado y/o a las condiciones climáticas que no favorecieron la infección. Los patógenos consisten de un gran número de razas, cada una distinguiéndose de las otras por su habilidad para atacar ciertas variedades de una especie de plantas, pero no a otras. Variedades que poseen ciertos genes de resistencia o susceptibilidad reaccionan en una forma diferente contra varias razas de un patógeno y sus genes de virulencia o avirulencia (Castaño-Zapata, 1994).

En este ensayo con diferenciales no se empleó testigos resistentes (Catrachita) y susceptibles (Desarrural), por lo que no se puede asegurar con exactitud cual de las dos condiciones, virulencia o clima, afectó decisivamente al desarrollo de la enfermedad. La reacción de estos testigos sirve de base de resistencia (calificación del 1 al 3) y de susceptibilidad (del 4 al 9), para evaluar los diferenciales de antracnosis.

4.2.2 Reacción de cultivares diferenciales de *P. griseola*

A diferencia de la reacción anterior de los cultivares diferenciales de antracnosis, la inoculación guiada al envés de las hojas en los diferenciales de mancha angular dio resultado favorable para la identificación de la raza de *P. griseola* de la cepa monospórica MA-O1 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Reacción de los genotipos diferenciales al aislamiento MA-O1 de *Paeoisariopsis griseola* en camas de infección. Zamorano, Honduras, 2002.

Cultivar Diferencial	Valor Binario por diferencial	Calificación * Severidad	Reacción MA-O1
Andinos			
1. Don Timoteo	1	9	+
2. G11796	2	8	+
3. Bolón Bayo	4	9	+
4. Montcalm	8	9	+
5. Amendoin	16	7	+
6. G05686	32	6	+
Mesoamericanos			
7. PAN 72	1	6	+
8. G02858	2	6	+
9. Flor de Mayo	4	3	-
10. México 54	8	6	+
11. BAT 332	16	9	+
12. Cornell 49242	32	9	+
Raza			63-59

* Calificación de severidad, donde 1 es ausencia de síntomas y 9 es muerte de la planta (Fig. 5).
+ = Reacción compatible o de susceptibilidad; - = no hay reacción de susceptibilidad

La inoculación hecha en los diferenciales dentro de la cámara de incubación mejorada con una concentración de 1.5 x 10^5, resultó muy eficaz. Los síntomas fueron evaluados después de 15 días de realizada la inoculación y se identificó la raza de *P. griseola* del monospórico MA-O3 (Cuadro 9).

Los diferenciales de mancha angular crecidos en las camas de infección e inoculados con el método sucio de hojas molidas, tuvieron un grado de severidad alto (Cuadro 10). Según Parreño (2002), la alta susceptibilidad de todos los diferenciales de mancha angular a un inóculo mixto indica la máxima reacción posible (63-63), similar a la inducida por la raza del patógeno predominante en Honduras. Se observó que a medida que el follaje del cultivo de frijol aumentaba, la infección de mancha angular incrementaba; esto se debió a que el follaje proporcionó un microclima adecuado (humedad relativa alta) para el desarrollo de la enfermedad.

Cuadro 9. Reacción de los genotipos diferenciales al aislamiento MA-O3 de *Paeoisariopsis griseola* en cámara húmeda-invernadero. Zamorano, Honduras, 2002.

Cultivar diferencial	Valor Binario **por diferencial**	Calificación * **Severidad**	Reacción **MA-O3**
Andinos			
1. Don Timoteo	1	9	+
2. G11796	2	7	+
3. Bolón Bayo	4	9	+
4. Montcalm	8	9	+
5. Amendoin	16	9	+
6. G05686	32	7	+
Mesoamericanos			
7. PAN 72	1	9	+
8. G02858	2	9	+
9. Flor de Mayo	4	1	-
10. México 54	8	3	-
11. BAT 332	16	9	+
12. Cornell 49242	32	9	+
Raza			63-51

* Calificación de severidad, donde 1 es ausencia de síntomas y 9 es muerte de la planta (Fig. %5).
+ = Reacción compatible o de susceptibilidad; - = no hay reacción de susceptibilidad

Cuadro 10. Evaluación de diferenciales de mancha angular inoculados con el método sucio en camas de infección. Zamorano, Honduras, 2002.

Cultivar Diferencial	Severidad *	Incidencia (%)
Andinos		
1. Don Timoteo	9	100
2. G11796	9	90
3. Bolón Bayo	9	80
4. Montcalm	7	60
5. Amedoin	7	50
6. G05686	9	60
Mesoamericanos		
7. PAN 72	9	100
8. G02858	9	100
9. Flor de Mayo	9	90
10. México 54	9	95
11. BAT 332	9	100
12. Cornell 49242	9	95

* Calificación de severidad, donde 1 es ausencia de síntomas y 9 es muerte de la planta (Fig. 5).

Aunque todos los cultivares mostraron susceptibilidad a la mancha angular con un alto grado de severidad, el porcentaje de incidencia varió en las camas de infección. Las variedades diferenciales de origen andino, con excepción de Don Timoteo, presentaron una menor incidencia de la enfermedad en comparación con las variedades de origen mesoamericano (Cuadro 9). Con esto podemos decir que la organización de la diversidad genética de *P. griseola*, es paralela a la de su hospedero; es decir, la reducción en la incidencia del patógeno en los cultivares andinos nos muestra la menor afinidad patogénica que tiene el hongo hacia estos cultivares, que evolucionaron separados de la presencia del patógeno.

5. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron aislamientos de *C. lindemuthianum* provenientes de tejido de frijol recolectado del sector de Los Planes (Yuscarán) y de las camas de infección del Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano.

2. Se obtuvieron cultivos monospóricos puros de los aislamientos Co-P1 y Co-Z1 de *C. lindemuthianum*.

3. Se comprobó la virulencia parcial de la cepa Co-Z, con inoculaciones en plantas y vainas de variedades de frijol resistente y susceptible.

4. Se observó que el patógeno de la antracnosis es muy exigente a temperaturas bajas constantes.

5. Se verificó la reducción en la germinación de las esporas de antracnosis, y la variabilidad del patógeno en el tiempo de su conservación.

6. Se obtuvieron cultivos monospóricos puros (aislamientos MA-O1 y MA-Z1) de *P. griseola* de tejido de frijol recolectado del sector de El Ocotal (Yuscarán) y de las camas de infección del Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano.

7. Se consiguió infección del patógeno de la mancha angular en variedades diferenciales, en tres lugares diferentes de inoculación.

8. Se caracterizaron patogénicamente los cultivos monospóricos MA-O1 y MA-O3 del sector de El Ocotal (Yuscarán), obteniéndo las razas de *P. griseola* 63-59 y 63-51 respectivamente.

9. Las inoculaciones de los diferenciales con inóculo de hojas secas molidas de las camas de infección del Programa de Frijol de la EAP / Zamorano, presentaron reacciones correspondientes a las razas 63-63.

6. RECOMENDACIONES

1. Las viabilidad y variación de los cultivos de *C. lindemuthianum* deben verificarse a los seis meses de conservación, ya que éstos podrían sufrir alteraciones en estas características.

2. Los cultivos de *C. lindemuthianum* y *P. griseola* deben ser reactivados a los seis meses, tanto en cultivo artificial en el laboratorio como en inoculaciones en plantas susceptibles, y aislados nuevamente para trabajos futuros.

3. Las incubaciones en laboratorio de los cultivos de *C. lindemuthianum* y *P. griseola* deben realizarse en una incubadora de enfriamiento, que reduzca y mantenga la temperatura, para el óptimo crecimiento de los cultivos.

4. Para obtener una infección favorable para la caracterización patogénica de *C. lindemuthianum*, se debe construir una cámara de inoculación efectiva y económica, que proporcione las condiciones microclimáticas que el hongo requiere para su desarrollo en el hospedero.

5. Realizar aislamientos y caracterizaciones, y generar una base de datos de las razas predominantes de mancha angular y antracnosis en las regiones frijoleras de Honduras.

6. Los datos de temperatura y humedad deben ser tomados con base en las lecturas de un higrotermógrafo.

7. Usar marcadores moleculares RAPD y SCAR para identificar genes y fuentes de resistencia para el mejoramiento genético en el desarrollo de líneas mejoradas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bailey, J.A.; Jeger, M.J. 1992. *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. Redwood Press Ltd, Wallingford, U.K. 388 p.

Campos-Ávila, J. 1987. Enfermedades del frijol. México, Ed. Trillas. 132 p.

Castaño-Zapata, J. 1986. Prácticas de Laboratorio de Fitopatología. El Zamorano, Honduras. 45 p.

Castaño-Zapata, J. 1994. Principios Básicos de Fitopatología. 2 ed. Zamorano Academic Press, Zamorano, Honduras. 538 p.

Castaño-Zapata, J.; Del Río, L. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. 3 ed. Zamorano Academic Press, Zamorano, Honduras. 302 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1981a. La antracnosis del frijol y su control; guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audititutorial sobre el mismo tema. Eds. Schwartz H.F.; Correa F.; Pastor– Corrales M. Cali, Colombia. 27 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1981b. Técnicas para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audiotutorial sobre el mismo tema. Cali, Colombia, CIAT. 33 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. La mancha angular del frijol y su control; guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audititutorial sobre el mismo tema. Eds. Schwartz H.F.; Correa F.; Pastor – Corrales M. Cali, Colombia. 24 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Trad. EDITEC. Eds. Mata F.; van Schoonhoven A.; Pastor – Corrales M. Cali, Colombia, CIAT. 56 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical); PROFRIJOL (Programa Cooperativo Regional de Frijol para Centroamérica, México y el Caribe). 1995. Importancia, síntomas y manejo de las principales enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali, Colombia. 69 p.

Departamento de Protección Vegetal; COSUDE; INTA; UNA; MIP-CATIE. 1996. Manual de manejo integrado de plagas en el cultivo de frijol. Eds. Alemán F.; Cáceres O.; Méndez E.R.; Mercado J.; Pichardo S.; Rivera J.A.; Rojas A. Zamorano Academic Press, Zamorano, Honduras. 75 p.

Díaz Gálvez, M.G. 2001. Caracterización genética de la resistencia del frijol común a la mancha angular. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 45 p.

Elvir Guevara, F.M. 1998. Evaluación de pérdidas en rendimiento ocasionadas por la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 20 p.

Kelly, J.D.; Miklas, P.N. 1999. Marker-Assisted Selection. *In* S. Singh (ed.) Common Bean Improvement in the Twenty-First Century. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p 93 – 124.

Liebenberg, M.M.; Pretorius, Z. 1997. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *In* African Plant Protection 3 (2): 81 – 106 p

Mahuku, G.; Castellanos, G.; Jara, C. 2000. Useful guidelines (methods) for studying selected bean pathogens in the laboratory. Cali, Colombia, CIAT. 6 p.

Parreño Ruíz, M.D. 2002. Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 43 p.

Pastor-Corrales, M.A. 1992. La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris* L., en América Latina. Documento de Trabajo No. 113. Programa de Frijol, Cali, Colombia, CIAT. 251 p.

Pastor-Corrales, M.A.; Castellanos, G. s.f. Guía para el manejo del hongo *Phaeoisariopsis griseola* en el laboratorio. Programa de Frijol, CIAT. Cali, Colombia. 11 p.

Pastor-Corrales, M.A.; Schwartz, H.F.; Singh, S.P. 1982. New sources of resistanse to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). CIAT, Cali, Colombia. Euphytica 31. p 741 – 754.

Pastor-Corrales, M.A. 1995. La diversidad en virulencia y molecular de *Phaeoisariopsis griseola*, su evolución con el frijol común y las aplicaciones para el mejoramiento del frijol por resistencia a la mancha angular. International Workshop on Angular Leaf Spot of Common Beans. Cali, Colombia, CIAT.

Pastor-Corrales, M.A. s.f. Importancia de la diversidad y evolución de *Colletotrichum lindemuthianum* para el logro de cultivares de frijol común con resistencia duradera a la antracnosis. Cali, Colombia, CIAT.

Rosas, J.C. 1998. El Cultivo del Frijol Común en América Tropical. Zamorano Academic Press, Zamorano, Honduras. 52 p.

SAG (Secretaría de Agricultura y Ganadería). 1998. El cultivo del frijol: Guía para uso de empresas privadas, consultores individuales y productores. Eds. Rodríguez F.; Gómez A.C. Honduras, ZAS. 39 p.

Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos de México. 1992. Guía fitosanitaria para el cultivo del fréjol (en línea). Consultado el 12 de nov. de 2002. Disponible en: http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/frejol/index.html

Singh, S.P. 1992. Common Bean Improvement in the Tropics. Ed. John Wiley & Sons, Inc. CIAT.

Singh, S.P. 1999. Common Bean: Improvement in the Twenty – First Century. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 405 p.

Thurston, D.H. 1989. Enfermedades de Cultivos en el Trópico. Trad. JJ Galindo. CATIE. Turrialba, C.R. 236 p.

Viana, A. 1998. Flujo de germoplasma e impacto del PROFRIJOL en Centro América. Período 1987 – 1996. Guatemala. 48 p.

Voysest, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de las variedades de América Latina. Cali, Colombia. 195p.

Van Shoonhoven, A.; Voysest, O. 1991. Common Beans: Research for Crop Improvement. U.K. CIAT. 480 p.

Young Bustillos, R.A. 1995. Inheritance studies and development of RAPD markers for major anthracnose resistanse genes in common bean. Tesis Ph.D. Michigan State University, E.U.A. 112 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de aislamiento de *Colletotrichum lindemuthianum*

Materiales
- Hipoclorito al 1.5 %
- Alcohol Antiséptico
- Mechero
- Erlenmeyers
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Cajas petri: 40 cajas / litro de medio
- Toallas estériles de papel toalla
- Beakers pequeños
- Pinzas
- Bisturí
- Puntas de transferencia
- Rastrillo de vidrio
- Medio de cultivo agar-agua
- Medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA)
- Medio de cultivo de Mathur´s
- Cintas de Parafilm®
- Cámara de flujo laminar

Formulación de medios de cultivo para el aislamiento de *Colletotrichum lindemuthianum*

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA)
- 35 g de PDA.
- 1 litro de agua destilada

Procedimiento:
1. Agregar 35 g de PDA en un Erlenmeyer con un litro de agua destilada y mezclar hasta disolver el PDA (utilizar el agitador).
2. Colocar el medio en el autoclave por 20 minutos a 121° C.
3. Dejar enfriar la solución hasta que la mano soporte el calor y agregar tetraciclina para evitar contaminación bacteriana.

Medio de Mathur´s Mejorado (CIAT)

- 11.2 g de dextrosa
- 2.5 g de $MgSO_4$. 7 H_2O
- 2.7 g de KH_2PO_4
- 1 g de peptona
- 0.8 g de extracto de levadura
- 15 g de agar
- 1 litro de agua destilada

Procedimiento:
1. Pesar los sólidos y agregarlos en un Erlenmeyer con agua destilada.
2. Mezclar la solución en el agitador.

3. Colocar el medio en el autoclave por 20 minutos a 121° C.
4. Dejar enfriar la solución hasta que se le pueda agregar tetraciclina.
5. Vertir el medio en platos petri esterilizados.

Medio de agar-agua

- 20 g de agar
- 1 litro de agua destilada

Procedimiento:
1.Agregar 20 g de agar en un Erlenmeyer con 1 litro de agua destilada y mezclarlo manualmente hasta disolver el agar.
2. Colocar el medio al autoclave, esterilizándolo por 20 minutos a 121 ° C.
3. Agregar tetraciclina.

NOTA:
- Se deberá agregar tetraciclina a los medios a razón de 0.13 g / 300 ml de medio.
- Empacar, rotular y guardar los platos petri con medio a 4° C en el refrigerador.

<u>Aislamiento</u>

Siembra

1. Cortar explantes de 5 x 3 mm de vainas, hojas y tallos infectados con *C. lindemuthianum*. Las lesiones no deben estar muy maduras o viejas para evitar que otros patógenos contaminen el medio de aislamiento.
2. Desinfestar los explantes con hipoclorito de sodio a 1.5 %, agitándolos por 1 minuto (hojas), 2 minutos (vainas y tallos finos), ó 3 minutos (tallos gruesos).
3. Enjuagar los explantes con agua destilada estéril después de quitarlos del hipoclorito de sodio. Hacer tres enjuagues dentro de la cámara de flujo laminar.
4. Sacar los explantes y secar en papel servilleta esterilizado, tratando de que los dos lados de los cortes queden bien secos.
5. Colocar 4 a 5 explantes por caja petri y enterrarlos hasta la mitad en el medio PDA solidificado.
6. Colocar los platos petri en la incubadora a 24° C durante 4 días o en un horno con base de 28 ° C para evitar que en la noche la temperatura baje y afecte el crecimiento del cultivo.

Purificación

A los cuatro días después de la siembra se tiene un medio de PDA con micelios o hifas del hongo, que necesitan ser trasladados al medio de Mathur´s, cuyo beneficio es el de hacer esporular las hifas mientras estas siguen creciendo.
1. Cortar con la aguja de transferencia flameada, 5 x 3 mm del extremo de la colonia de *C. lindemuthianum* (previa observación microscópica de esporas) del medio PDA, o extraer una punta de hifa con medio (técnica llamada "transferencia de punta de hifa"), y transferirla a un plato petri con medio Mathur´s y antibiótico.

Este es el primer paso para la purificación de las colonias del patógeno, que en el medio PDA se encontraban junto a contaminantes como *Penicillum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, bacterias, etc.

Dispersión

La realización de este paso va a depender del tiempo que tarde en esporular la colonia purificada en el medio de Mathur´s. Luego que la colonia ha esporulado y tenga las característica de la antracnosis (miscelio compacto con coloración hialina grisáceo, halo oscuro, periferia gris, fondo de la colonia rosada y acérvulos negruscos), se procede a hacer la dispersión de la manera siguiente:

1. Flamear la aguja de transferencia y mojar su punta con agua destilada estéril.
2. Pasar la punta mojada sobre el micelio esporulado, para que las esporas queden atrapadas en la aguja.
3. Hacer gotear agua destilada (dos gotas) sobre la punta con esporas en una caja petri con medio de agar-agua.
4. Dispersar las gotas con un rastrillo de vidrio, previamente flameado, sobre la superficie del medio de cultivo.

Transcurrido un día se puede observar las esporas germinando en forma de comas o "rabitos", indicándonos el momento más propicio para extraer solo una conidia y preparar un cultivo monospórico.

Cultivo Monospórico

Este es el paso más crucial dentro de la técnica del aislado del patógeno. Consiste en extraer de la dispersión, una espora de dos días de germinada y colocarla en medio de Mathur´s para que crezca y así obtener una colonia pura monospórica de *C. lindemuthianum* :

1. Ingresar el estereoscopio, limpiado con alcohol, a la cámara de flujo laminar previamente desinfectada.
2. Localizar con el estereoscopio y señalar con un marcador, en la base del plato petri, las esporas que se quieren extraer.
3. Flamear la aguja de transferencia y enfriarla en el medio.
4. Visualizar la espora.
5. Cortar el medio alrededor de la conidia germinada (espora) cuidando de no tocarla.
6. Levantar, con la punta, el "pedacito" de medio con la espora encima; y transferirlo al centro de una caja petri con medio de Mathur´s y antibiótico.
7. Tratar que la conidia quede arriba del "pedacito" del medio sembrado, ya que de lo contrario no seguirá germinando por falta de oxígeno.
8. Incubar los cultivos monospóricos a 24 - 28 ° C.

Anexo 2. Producción abundante de esporas para inoculaciones con *Colletotrichum lindemuthianum*.

Después de 15 días de cultivados los monospóricos de antracnosis y cuando la colonia en el medio de Mathur´s empieza a esporular, se extrae las esporas y se incrementan los platos petri para realizar inoculaciones artificiales en el invernadero o en el campo.

Materiales

- Agua destilada estéril
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Espátula de metal o paleta de madera estéril
- Rastrillo de vidrio
- Mechero de alcohol
- Platos petri con medio de Mathur´s
- Cintas de Parafilm®

Procedimiento

1. Seleccionar una colonia monospórica de antracnosis, que tenga conidias y que esté libre de contaminantes.
2. Agregar a la colonia 30 gotas de agua destilada estéril y luego raspar el micelio con una espátula.
3. Inclinar el plato petri para que la suspensión de esporas sea recolectada con facilidad.
4. Colocar a seis platos petri con medio de Mathur´s, cinco gotas de esta suspensión a cada uno y esparcir las conidias en suspensión con un rastrillo de vidrio previamente flameado.
5. Sellar los platos petri con cinta Parafilm® e incubarlas por aprox. 15 días.

Cada plato petri incrementado con esporas de *C. lindemuthianum* produce aprox. 300 ml de inóculo.

Anexo 3. Conservación de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Cuando se ha logrado establecer que el hongo es el patógeno indicado se procede a conservarlo para uso futuro. Una de las prácticas más simples utilizadas para conservar patógenos es la de baja temperatura, donde el hongo se conserva manteniéndolo a una temperatura de –20ºC o 4ºC. Otra forma de aislar el patógeno es desecándolo en silica-gel y mantenerlo a 4ºC. Las bajas temperaturas restringen los procesos metabólicos debido a las condiciones adversas para el desarrollo del hongo.

Materiales

- Agua destilada estéril
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Círculos de papel filtro estériles
- Pinzas estériles
- Cinta Parafilm®
- Bisturí
- Sobres pequeños de aluminio
- Sobres pequeños de manila estériles
- Frascos pequeños estériles con tapón de rosca
- Silica gel
- Algodón estéril

Procedimiento

1. De la suspensión de esporas para incrementar los cultivos monospóricos de antracnosis para las inoculaciones, colocar en un par de platos petri con PDA, cuatro gotas de la suspensión por plato y dispersar las gotas con un rastrillo de vidrio. Luego de 10 a 15 días se tendrá los platos petri completamente colonizados con micelio del patógeno y listo para ser conservado.
2. Humedecer los círculos de papel filtro con agua destilada estéril con ayuda de una pipeta Pasteur.
3. Colocar un papel filtro humedecido, por cada plato, sobre el micelio crecido y esporulado de *C. lindemuthianum*. Manipular siempre el papel filtro con las pinzas estériles para evitar contaminación.
4. Luego de 10 días, cuando el hongo ha colonizado parte del papel filtro húmedo y la coloración del papel haya cambiado de blanco a gris, quitar el papel con ayuda de las pinzas, y sobre un vidrio estéril cortar con un bisturí triángulos pequeños de 3 mm por cada lado.
5. Dejar secar los triángulos por 2 min frente al flujo laminar de la cámara.
6. Recordar que los triángulos de cada monospóricos deben conservarse por separado. Destinar la mitad de los triángulos de cada monospórico a ser envasados en un sobre de aluminio y este a su vez dentro de un sobre de papel. La otra mitad de los triángulos envasarlos en los frascos pequeños con silica-gel y algodón. El sobre de papel y el de aluminio que contienen los triángulos deben ser sellados con cinta adhesiva, rotulados con el código del monospórico y la fecha de conservación, y llevarlos a –20ºC en el congelador. Los frascos pequeños deben ser sellados fuertemente con su tapa para evitar ingreso de humedad, rotulados y llevados a 4ºC en el refrigerador.

Verificar la actividad del hongo reactivándolo sobre medio de Mathur´s. En INIAP se reporta que la viabilidad de la conservación en silica-gel a 4ºC es de 6 meses al igual que la conservación a –20ºC.

Anexo 4. Protocolo de aislamiento de *Phaeoisariopsis griseola*.

Materiales

- Platos Petri
- Papel filtro
- Triángulos de vidrio
- Agua destilada estéril
- Pinzas estériles
- Puntas de transferencia
- Estereoscopio con lámpara superior anexa
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Beakers pequeños
- Rastrillo de vidrio
- Cintas Parafilm®
- Medio de cultivo agar-agua
- Medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA)
- Medio de cultivo V8
- Cámara de flujo laminar
- Mechero

Formulación de medio de cultivo V8 para el aislamiento de *P. griseola.*

- 600 ml de agua destilada
- 15 g de agar
- 2.25 g de Carbonato de calcio $CaCO_3$
- 170 ml de jugo V8

Cantidad de medio estimada para aprox. 30 platos petri

Procedimiento:
1. Añadir en un beaker los 600 ml de agua destilada y los 170 ml de jugo V8.
2. Colocar un magneto dentro del beaker con el medio y revolver bien por tres minutos en una mezcladora de líquidos colocando poco a poco los 2.25 g de $CaCO_3$ ya que este se precipita fácilmente.
3. Luego que el $CaCO_3$ se haya mezclado se le extrae el magneto a la solución, se envasa en un erlenmeyer conteniendo los 15 g de agar y se lleva a esterilizar en el autoclave a 121ºC por 20 minutos. El esterilizador hará el trabajo de terminar de mezclar todos los componentes del medio.
4. Dejar enfriar la solución hasta que la mano soporte el calor del vidrio del beaker y agregar tetraciclina para evitar contaminación bacteriana.

NOTA:
- Se deberá agregar tetraciclina a los medios a razón de 0.13 g / 300 ml de medio.
- Empacar, rotular y guardar los platos petri con medio a 4° C en el refrigerador.
- La preparación de medios de agar-agua y PDA se hacen igual a la manera citada en el protocolo de aislamiento de *C. lindemuthianum*.

Aislamiento

Esporulación de tejido infectado

Las lesiones de mancha angular en hojas y vainas son estimuladas a esporular y emitir sinemas (estructuras de fructificación del patógeno) para capturar sus conidias, para lo cual estos tejidos se someten a alta humedad durante 3 – 4 días en cajas petri con papel filtro humedecido:

1. Colocar dentro de varios platos petri, un papel filtro y un triángulo de vidrio.
2. Humedecer el papel filtro con agua destilada estéril con ayuda de una pipeta Pasteur.
3. Colocar sobre los triángulos de vidrio, las hojas y las vainas con síntomas de mancha angular, procurando que estos tejidos no toquen el papel humedecido por la descomposición que provocaría el contacto directo con el agua.
4. Sellar los platos petri con cinta Parafilm® para impedir escape de humedad.

Captura y dispersión de esporas

Después de 3-4 días de someter a alta humedad las hojas y vainas lesionadas, los sinemas ya se han formado, crecido y madurado sobre las lesiones; por lo que están en el punto exacto para cosechar sus esporas con facilidad:

1. Ingresar un estereoscopio desinfectado a la cámara de flujo laminar.
2. Destapar un plato petri con hoja o vaina y colocarlo en el estereoscopio.
3. Enfocar lesiones bien esporuladas (buena agrupación de sinemas) en las hojas o vainas.
4. Con una punta de transferencia previamente flameada agarrar un “pedacito” bien delgado de agar-agua y con mucho cuidado tocar los sinemas procurando que las conidias se peguen al agar. Se debe evitar que el agar toque el resto de la lesión para evitar contaminantes.
5. Hacer gotear agua destilada (cinco gotas) sobre el pedazo de agar con esporas en una caja petri con medio PDA.
6. Dispersar las gotas con un rastrillo de vidrio, previamente flameado, sobre la superficie del medio de cultivo.

Transcurrido dos días las esporas germinan en forma estrellada, y este es el momento más indicado para extraer solo una conidia y preparar un cultivo monospórico.

Cultivo Monospórico

Este paso consiste en extraer de la dispersión, una espora de 2 a 3 días de germinada y colocarla en medio V8 para que crezca y así obtener una colonia pura monospórica de *P. griseola*:

1. Ingresar el estereoscopio, limpiado con alcohol, a la cámara de flujo laminar previamente desinfectada.
2. Localizar con el estereoscopio, en la base del plato petri, las esporas mejor germinadas y las más precoces.
3. Flamear la aguja de transferencia y enfriarla en el medio.
4. Visualizar la espora.
5. Cortar el medio alrededor de la conidia germinada (espora) cuidando de no tocarla.
6. Levantar, con la punta, el "pedacito" de medio con la espora encima; y transferirlo al centro de una caja petri con medio V8 y antibiótico.
7. Tratar que la conidia quede arriba del "pedacito" del medio sembrado, ya que de lo contrario no seguirá germinando por falta de oxígeno.
8. Incubar los cultivos monospóricos a 24 - 28 ° C.

Anexo 5. Producción abundante de esporas para inoculaciones de *Paeoisariopsis griseola*.

Después de 30 días de cultivados los monospóricos de mancha angular y cuando la colonia esta madura y esporulada, se extrae las esporas y se incrementan los platos petri para realizar inoculaciones artificiales en el invernadero o en el campo.

Materiales

- Agua destilada estéril
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Espátula estéril de metal o paleta de madera.
- Rastrillo de vidrio
- Mechero de alcohol
- Platos petri con medio V8
- Cintas de Parafilm®

Procedimiento:

1. Seleccionar una colonia monospórica de mancha angular, que tenga conidias y que esté libre de contaminantes.
2. Agregar a la colonia 30 gotas de agua destilada estéril y luego raspar la superficie del micelio con una espátula.
3. Inclinar el plato petri para que la suspensión de esporas sea recolectada fácilmente.
4. Colocar a un par de platos petri, con medio V8, 10 gotas de esta suspensión a cada uno y esparcir las conidias en suspensión con un rastrillo de vidrio previamente flameado.
5. Sellar los plato petri con cinta Parafilm® e incubarlos por aprox. 12 días.

Luego de 12 días, se prepara otra suspensión de esporas de mayor volumen con el par de cajas petri esporuladas. Esta suspensión es la que se utiliza para incrementar un número mayor de cajas petri con V8, dependiendo de la cantidad de inóculo que se va a necesitar:

1. Agregar a cada plato petri, 10 ml de agua destilada estéril y luego raspar el micelio con una espátula.
2. Colocar 10 gotas de la suspensión en cada plato y esparcir las esporas con un rastrillo de vidrio.
3. Sellar los platos con Parafilm e incubarlas por 12 días. Este es el tiempo estimado para obtener una muy buena esporulación y utilizar las esporas para las inoculaciones.

Anexo 6. Conservación de *Paeoisariopsis griseola*.

En CIAT se utilizan principalmente tres métodos para la conservación de los aislamientos del hongo de la mancha angular: liofilización en ampolletas, conservación en medio V8 a 4ºC y conservación en papel filtro a –20ºC.

Conservación en papel filtro a –20ºC

La conservación en papel filtro permite almacenar y conservar los aislamientos por períodos prolongados de tiempo. Tanto la temperatura de –20ºC, como la manera como el hongo se adhiere al papel filtro, hace posible esta conservación a mediano y largo plazo.

Materiales

- Agua destilada estéril
- Espátula de metal o paleta de madera estéril
- Cuadritos de papel filtro estériles de 1 cm
- Pinzas estériles
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Cintas Parafilm®
- Sobres pequeños de aluminio
- Sobres pequeños de manila estériles

Procedimiento

1. Colocar 5 pedacitos de papel filtro, encima del medio V8, por cada plato petri. Utilizar dos platos petri por cada monospórico.
2. De la suspensión utilizada para incrementar el primer par de platos petri de mancha angular, agregar a cada pedazo de papel filtro una gota de esta suspensión de esporas usando una pipeta Pasteur estéril.
3. Colocar los platos petri con los pedacitos de papel filtro e impregnada de esporas y micelio, en una incubadora por 12 días.
4. Después de doce días, bajo condiciones de asepsia, remover con una pinza estéril los pedazos de papel filtro y depositarlos en un plato petri estéril. Colocar los pedazos de papel en forma invertida para que no se enrollen al secarse.
5. Dejar secar los papeles por seis días en la incubadora.
6. Almacenar los papeles impregnados del hongo, en papel aluminio estéril y guardar estos en sobres de manila estériles.
7. Rotular los sobres manila con el código del cultivo monospórico y la fecha de conservación, sellarlos con cinta adhesiva y guardarlos a –20ºC en el congelador.

Anexo 7. Preparación de inóculo e inoculación de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Paeoisariopsis griseola*.

Materiales

- Agua destilada estéril
- Tween 20
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Micropipeta de 1 a 10 µl
- Espátula de metal o paleta de madera estéril
- Gasa estéril
- Beakers de 50 ml y de 500 ml
- Hemacitómetro
- Atomizador DeVilbiss®.
- Hipoclorito de sodio al 1.5%
- Probeta de 30 ml
- Contador de esporas manual

Procedimiento

1. Colocar 30 ml de agua destilada estéril en un beaker de 50 ml.
2. Agregar al agua destilada estéril 1 µl de Tween-20 y mezclar. El Tween 20 actuará como dispersante para mejorar la distribución de las esporas.
3. Añadir esta solución de agua y Tween, al cultivo incrementado de los patógenos.
4. Raspar bien el micelio hasta que estén completamente desprendidas las conidias.
5. Hacer pasar las suspensión de conidias y micelio por una gasa estéril en un beaker. La gasa es empleada para que el atomizador no se tapone con el micelio.
6. Homogenizar la suspensión de esporas con ayuda de una pipeta Pasteur presionando varias veces el bulbo, y colocar una gota en cada margen del cubreobjetos del hemacitómetro. La gota se deslizará rápidamente entre el cubreobjetos y el área reticular del portaobjetos.
7. Permitir que se asienten las esporas durante 1 minuto o 2 minutos.
8. Las esporas pequeñas de *C. lindemuthianum* se cuentan en el mm^2 central del hemacitómetro, el cual está compuesto de 25 grupos de 16 cuadrados pequeños. Cada uno de estos grupos mide 0.04 mm^2.
9. Contar el número de esporas en los 4 grupos de las esquinas y el central. Sumar el total de esporas en los 5 grupos y calcular el número de esporas /ml de la siguiente manera:

No. de esporas x 50000 = No. de esporas/ml (Concentración inicial)

10. Las esporas grandes de *P. griseola* se cuentan en 5 cuadrados principales de 1 mm de lado: los cuatro de las esquinas y el central. Cada cuadro mide 1 mm^2.
11. Contar el número de esporas en los 4 cuadros de las esquinas y el central. Sumar el total de esporas en los 5 cuadrados y calcular el número de esporas/ml de la siguiente manera:

No. de esporas x 2000 = No. de esporas/ml (Concentración inicial)

12. Hacer la dilución de los inóculos usando la siguiente fórmula:

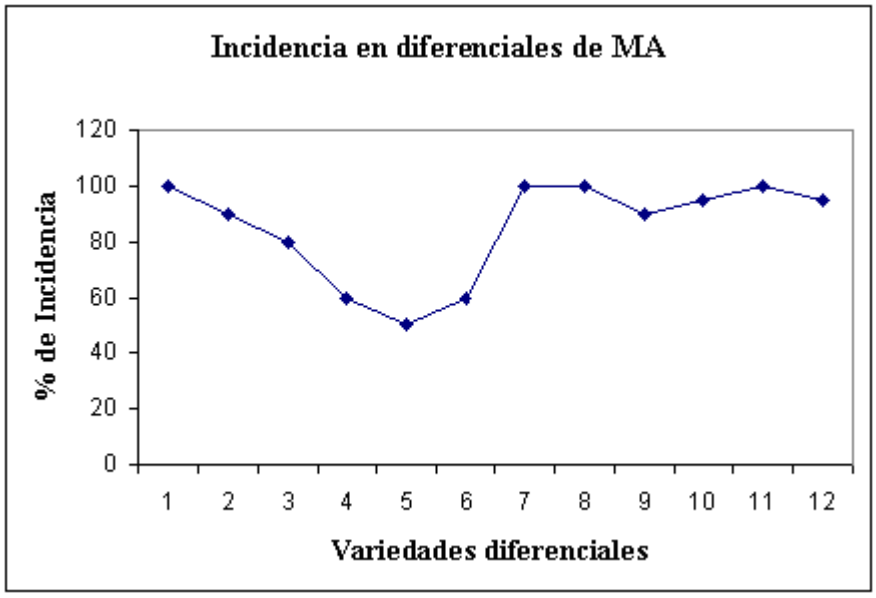
$Vo\ Co = Vf\ Cf$

Vo = Volumen inicial
Co = Concentración inicial
Vf = Volumen final
Cf = Concentración final

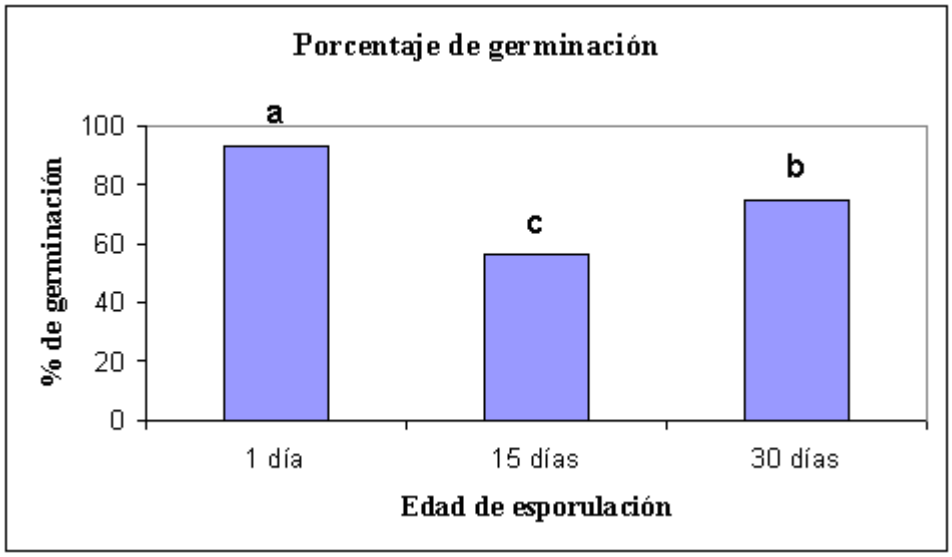
$$Vo = \frac{Vf\ Cf}{Co}$$

13. La concentración de inóculo recomendada para *C. lindemuthianum* es de 1.2 x 10^6 conidias/ml y para P. griseola es de 2 x 10^4 conidias/ml.
14. Después del ajuste de dilución de los inóculos madre, colocar 1 µl de Tween 20 por cada 30 ml de inóculo final para que actúe como adherente y mezclar.
15. Esterilizar en el autoclave los envases de vidrio y el cañón metálico del atomizador, y desinfectar el empaque y el tubo recolector en hipoclorito de sodio al 1.5% por 20 minutos.
16. Enjuagar cuatro veces el empaque y el tubo recolector con agua destilada estéril.
17. Montar el atomizador con sus partes y el inóculo.
18. Presionar con fuerza el diafragma del atomizador para que el inóculo salga con suficiente presión. Humedecer toda la planta de forma pareja en todas sus partes (haz y envés de las hojas, pecíolos y tallo). Durante la inoculación debe mezclarse constantemente la suspensión con movimientos circulares de la mano, para evitar que las esporas se asienten en el fondo del envase y aplicar desuniformemente. Hacer las inoculaciones al terminar la tarde (5-6 p.m.) para que la baja temperatura de la noche y el rocío favorezca la incubación y germinación de las esporas.
19. Colocar las plantas en cámara húmeda 95-100% de humedad relativa y a 24ºC por dos días.

Anexo 8. Porcentaje de incidencia de mancha angular en doce cultivares diferenciales, Zamorano, Honduras, 2002.

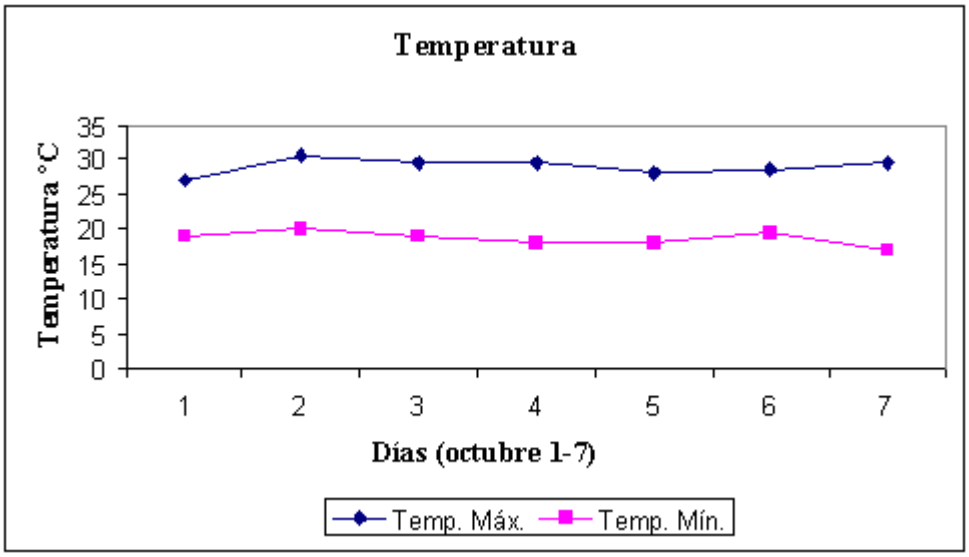


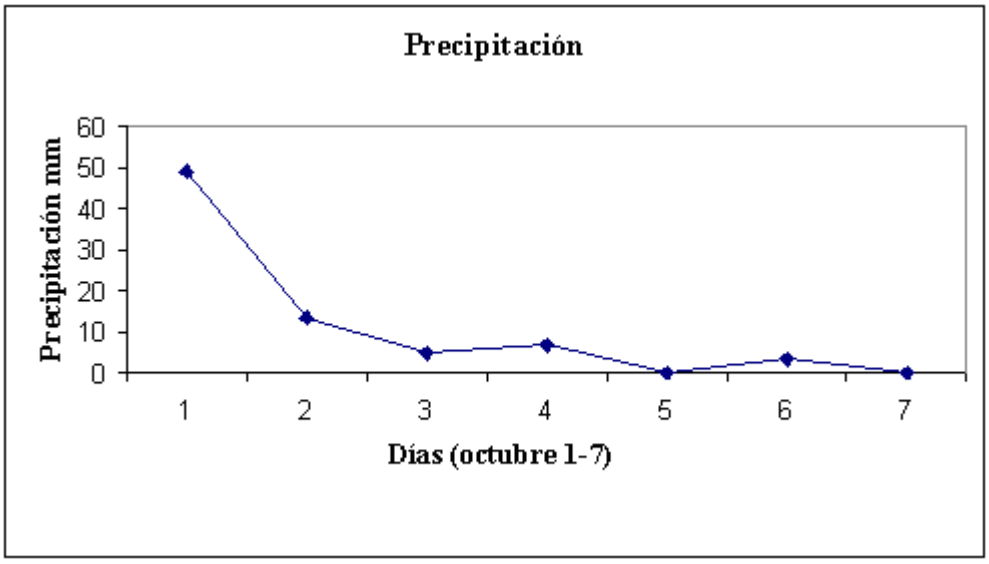
Anexo 9. Comportamiento de la germinación de esporas de *Colletotrichum lindemuthianum* en el tiempo, Zamorano, Honduras, 2002.



Las letras sobre las columnas nos muestran que los promedios de germinación de esporas son estadísticamente diferentes según prueba SNK < 0.05.

Anexo 10. Datos climatológicos [1] de la semana de infección (octubre 1-7, 2002) del aislamiento MA-O1 en las camas de infección. Zamorano, Honduras, 2002.





Fecha de Inoculación: 1 de octubre, 2002.
Temperatura promedio Máxima: 28.9 °C
Temperatura promedio Mínima :18.6 °C
Precipitación Máxima: 49 mm
Precipitación Mínima: 3.4 mm

[1] Datos proporcionados por la Zamoempresa de Servicios Agrícolas, octubre de 2002. El Zamorano, Honduras.