

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Resistencia genética del frijol común a  
aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv.  
*phaseoli* de Honduras**

Proyecto especial presentado como requisito parcial  
para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Felipe Sebastián Zabala Parreño**

HONDURAS  
Diciembre, 2003

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

---

Felipe Sebastián Zabala Parreño

Zamorano, Honduras  
Diciembre, 2003

**Resistencia genética del frijol común a aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* de Honduras**

Presentado por:

Felipe Sebastián Zabala Parreño

Aprobado:

---

Juan Carlos Rosas, Ph.D.  
Asesor Principal

---

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

---

María Mercedes Doyle, Ph.D  
Asesor

---

Alfredo Rueda, Ph. D  
Coordinador Área Temática  
Fitotecnia

---

Jorge Venegas, Ing. Agr.  
Asesor

---

Antonio Flores, Ph.D.  
Decano Académico

---

Luwbia Aranda, Ing. Agr.  
Asesor

---

Kenneth L. Hoadley, D. B. A.  
Rector

**DEDICATORIA**

A Dios.

A mis padres, hermanos y familiares por brindarme su apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Juan Carlos Rosas por su comprensión y apoyo.

Al Ing. Jorge Venegas y a la Ing. Lwbia Aranda por su paciencia y dedicación.

Al personal de Laboratorio de Biotecnología.

A todos mis compañeros E. Freire, P. Guitiérrez, E. El Malouf, D. Villaplana, L. Andrade, R. Endara y E. Andrade por su amistad y apoyo.

## **AGRADECIMIENTO PATROCINADORES**

Al Programa Bean/Cowpea CRSP por financiar mis estudios de Ingeniero Agrónomo.

## RESUMEN

Zabala, Felipe. 2003. Resistencia genética del frijol común a aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* de Honduras. Proyecto Especial del Programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 31 p.

La bacteriosis común es una enfermedad que puede ocasionar pérdidas en rendimiento superiores al 40% en variedades comerciales susceptibles. El objetivo del estudio fue confirmar la resistencia a aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) de Honduras en líneas seleccionadas de las poblaciones X069 y X0104 derivadas de la cruce Tío Canela 75/VAX6, mediante evaluaciones fenotípicas y moleculares. El ensayo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y en camas de infección en la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. Se reactivaron seis aislamientos de Xap de la colección del Programa de Investigación en Frijol (PIF) en medio de cultivo LDCA (levadura dextrosa carbonato de calcio agar), y se obtuvieron nuevos aislamientos de Xap de hojas de plantas infectadas de seis localidades de Honduras. Estos aislamientos se evaluaron y seleccionaron de acuerdo a su virulencia en la variedad Catrachita. Se caracterizó la variante *fuscans* de Xap en la cepa EAP 9506 en medio agar nutriente (AN). Se evaluaron 40 líneas F6 de las poblaciones X069 y X0104, los testigos Catrachita (susceptible) y VAX3 (resistente), y los padres Tío Canela 75 y VAX6, con las cepas EAP 9504 y 9506 y con los nuevos aislamientos de las localidades de Zorrales, El Rancho, Jamastrán, San Matías, Jacaleapa y El Paraíso de Honduras. Se empleó la escala de severidad del daño de 1-9 para evaluar la reacción de la inoculación. La evaluación fenotípica se realizó en dos ensayos; el primero inoculado con los aislamientos EAP 9504 y EAP 9506 y el segundo con los nuevos aislamientos de Xap de Zorrales, El Rancho y EAP 9506. Para la evaluación molecular se usaron los marcadores SCAR SU91 y SAP6, asociados a QTL (locus de características cuantitativas) de resistencia a aislamientos virulentos de Xap; y el marcador SCAR SR2 ligado al gen *bgm-1* para evaluar la resistencia al Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF). Cuatro aislamientos Xap de la colección PIF presentaron síntomas de alta susceptibilidad en plantas de Catrachita. De los nuevos aislamientos sólo las plantas inoculadas con el aislamiento de Zorrales presentaron reacción de susceptibilidad (alta severidad de daño). Se comprobó que el aislamiento EAP 9506 pertenece a la variante *fuscans* de Xap, debido a que produjo melanina en el medio AN. En la evaluación fenotípica de las líneas seleccionadas de las poblaciones X069 y X0104 presentaron promedios de severidad de 2,7 a 3,9. En el segundo ensayo se observó una reducción en el grado de severidad de la cepa EAP 9506. En la evaluación molecular, con el marcador SAP6, se determinó que las 40 líneas, los padres y el testigo VAX3, presentaron el gen de resistencia al aislamiento EAP 9506. Con el marcador SU91, se identificaron 34 plantas resistentes y seis susceptibles; y con el marcador del gen *bgm-1* (SR2) se identificaron 23 plantas resistentes y 17 susceptibles, y ambos marcadores (SAP6 y SU91) estaban presentes en las 34 líneas resistentes.

**Palabras clave:** *Fuscans*, gen *bgm-1*, inoculación, marcadores moleculares, QTL, resistente, severidad, susceptible, variante, VMDAF.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firma.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras.....	xi
Índice de anexos.....	xii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>AISLAMIENTOS.....</b>	<b>3</b>
Reactivación de aislamientos Xap de la colección PIF.....	3
Obtención de nuevos aislamientos de Xap de Honduras.....	3
Caracterización de la variante <i>fuscans</i> de aislamientos de Xap.....	4
<b>EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA.....</b>	<b>4</b>
Material experimental.....	4
Evaluación fenotípica.....	4
Primer ensayo: Inoculación con aislamientos de Xap de PIF.....	4
Segundo ensayo: Inoculación con nuevos aislamientos Xap.....	5
Evaluación molecular.....	5
Extracción de ADN.....	5
Cuantificación y dilución de ADN.....	6
Amplificación de ADN.....	6
Separación de ADN.....	6
Visualización de ADN.....	7
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>AISLAMIENTOS.....</b>	<b>8</b>
Reactivación de Xap de la colección PIF.....	8
Obtención de nuevos aislamientos de Xap de Honduras.....	8
Caracterización de variante <i>fuscans</i> en la cepa EAP 9506 de Xap.....	9
<b>EVALUACIÓN FENOTÍPICA.....</b>	<b>9</b>
Inoculación con aislamiento Xap del PIF.....	9
<b>EVALUACIÓN MOLECULAR.....</b>	<b>11</b>
Evaluación molecular de la resistencia de líneas F6 a Xap.....	11
Comparación genética-molecular (marcadores SCAR) y fenotípica (observación de campo) de las líneas F6 por su resistencia a Xap.....	13

<b>CONCLUSIONES.....</b>	17
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	18
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	19
<b>ANEXOS.....</b>	21

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

1.	Grado de severidad de los aislamientos de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> de la colección PIF en la variedad susceptible Catrachita. ....	8
2.	Grado de severidad de los aislamientos de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> procedentes de recolecciones en diferentes zonas de Honduras en la variedad susceptible Catrachita.....	9
3.	Reacción de severidad de las 40 líneas F6 de las poblaciones X069 y X0104 inoculadas con aislamientos de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .....	10
4.	Resumen de la evaluación molecular de 40 líneas F6 de la población X069 y X0104 empleando marcadores SCAR para Xap.....	12
5.	Genotipo y fenotipo de las líneas F6 de las poblaciones X069 y X0104 evaluadas con el marcador SCAR SR2.....	14
6.	Comparación entre la reacción fenotípica (severidad) al aislamiento Xap EAP 9506 y la presencia de marcadores moleculares en líneas F6 de las poblaciones X069 y X0014 y su complemento con el gen <i>bgm-1</i> de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (SCAR SR2).....	15
7.	Relación de líneas resistentes a la bacteriosis común y el VMDAF que presentan los marcadores SCAR SAP6 y SU91 (QTL de resistencia a Xap) y SR2 (gen <i>bgm-1</i> resistente a VMDAF).....	16

**ÍNDICE DE FIGURAS**

## Figura

1. Bandas generadas con el SCAR SAP6 (QTL) en familias F6 resistentes a Xap..... 12
2. Bandas generadas con el SCAR SU91 (QTL) en familias F6 resistentes a Xap..... 12
3. Bandas generadas con el SCAR SR2 (*gen bgm-1*) en familias F6 resistentes al VMDAF..... 13

## INTRODUCCIÓN

El cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) ocupa el segundo lugar de importancia entre los granos básicos en Honduras. Al igual que otros cultivos presenta factores que pueden limitar su producción. El incremento de enfermedades foliares en el cultivo de frijol representa un serio problema para la mayoría de pequeños productores del país (PRIAG, 1993).

La bacteriosis común es una de las enfermedades que afecta el cultivo de frijol en la mayoría de las zonas frijoleras de América Latina. Esta enfermedad puede ocasionar pérdidas en rendimiento superiores al 40% en variedades comerciales susceptibles (Rosas, 1998).

La bacteriosis común del frijol es ocasionada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) y su variante *fuscans*, la cual puede ser distribuida y diseminada a través de semillas infectadas, siendo este el medio más efectivo para su sobrevivencia (Alvarez *et al.*, s.f.). Las fuentes de inóculo secundario incluyen el agua de riego, lluvia, viento, insectos, labores culturales y residuos de cosecha (Rosas, 1998). En general, las condiciones climáticas de alta humedad y alta temperatura favorecen la aparición y diseminación de la bacteria (Serracín *et al.*, 1991).

La bacteria Xap posee variación patogénica, lo que indica que unos aislamientos son más virulentos que otros (Navarrete, 1996); mostrando distintas reacciones al ser inoculados en diferentes genotipos, concentraciones de inóculo y edades de las hojas (Zapata, 1996).

La infección se inicia en forma de manchas acuosas redondeadas en el envés de la hoja, las que se tornan de coloración marrón o amarillo limón (Rosas, 1998). A medida que avanza, las manchas incrementan de tamaño y las lesiones pueden tornarse secas y de color café. Las lesiones en vainas aparecen como manchas acuosas, que pueden incrementar de tamaño y volverse rojas oscuras (Schwartz y Brick, 1996).

Los estudios para determinar los genes de resistencia a aislamientos de Xap en accesiones de germoplasma y líneas mejoradas, son de gran importancia en los programas de frijol para identificar progenitores donantes de estos genes deseables.

El presente estudio contribuirá con información sobre la identificación de fuentes de resistencia empleando evaluaciones de plantas inoculadas con marcadores moleculares tipo SCAR, y permitirá la identificación de líneas recombinantes con características del acervo mesoamericano, más específicamente de la clase de grano rojo pequeño, con alta resistencia a la bacteriosis común y al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF).

El objetivo general del estudio fue confirmar la resistencia a aislamientos de Xap de Honduras en líneas seleccionadas de las poblaciones X069 y X0104 derivadas de la cruce Tío Canela75/VAX6, mediante evaluaciones fenotípicas y moleculares. Los objetivos específicos consistieron en obtener y reactivar aislamientos de Xap e incrementar otros disponibles, procedentes de diversas localidades de Honduras; determinar su virulencia empleando accesiones susceptibles y resistentes; y confirmar la resistencia de líneas de frijol de las poblaciones X069 y X0104 a la bacteriosis común y al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### AISLAMIENTOS

Las actividades de reactivación de aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) de la colección PIF y la adición de nuevos aislamientos, así como la evaluación de los mismos, se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología y en casas de malla del Programa de Investigación en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana/Zamorano.

#### Reactivación de aislamientos Xap de la colección PIF

Se reactivaron seis aislamientos de Xap de la colección PIF, y se validó su virulencia en condiciones de casa de malla. Los aislamientos fueron reactivados en medio de cultivo LDCA (levadura dextrosa carbonato de calcio agar), en inglés YDCA y se procedió a multiplicar la bacteria en el mismo medio para la producción de inóculo (Anexo 2).

- Para la evaluación de la virulencia de los aislamientos Xap de la colección PIF (EAP 9501, EAP 9501, EAP 9503, EAP 9504, EAP 9506) se sembraron en casa de malla plantas de la variedad "Catrachita" (susceptible a Xap), en maceteros de 6 pulgadas a razón de dos maceteros por aislamiento y tres plantas por macetero. Luego de 48 horas de incubación y crecimiento de la bacteria en medio LDCA, se procedió a raspar el cultivo bacteriano utilizando agua destilada estéril y un rastrillo de vidrio. Posteriormente se colocó el inóculo en un beaker llevándolo hasta 100 ml con agua destilada estéril, para obtener una concentración final de la suspensión bacteriana de  $5 \times 10^7$  UFC/ ml. La inoculación de las plantas de Catrachita se realizó utilizando el método de punción múltiple; este consiste en presionar el folíolo central del trifolio con una base sólida dispuesta de agujas impregnadas de inóculo al momento de la inoculación.

#### Obtención de nuevos aislamientos de Xap de Honduras

Se colectaron hojas de plantas infectadas con Xap de diversas localidades de Honduras. Las muestras se manejaron usando el protocolo del Laboratorio de Biotecnología de Zamorano, para el aislamiento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, y su posterior prueba de virulencia (Anexo 1).

- Para la evaluación de la virulencia de los nuevos aislamientos de Xap de Honduras se empleó el mismo procedimiento descrito anteriormente en la evaluación de virulencia de los aislamientos de Xap del PIF.

## **Caracterización de la variante *fuscans* de aislamientos de Xap**

Los aislamientos de Xap del PIF fueron sembradas en platos petri con medio AN, utilizando dos platos por cada aislamiento. Diariamente se hicieron observaciones para detectar cambios de coloración en el medio de crecimiento.

Para comprobar que el aislamiento EAP 9506 pertenecía a la variante *fuscans* de Xap, se utilizó el medio de cultivo Agar Nutriente (AN), debido a que esta variante de Xap produce melanina en medios con alta proteína. Este pigmento oscurece el medio de cultivo tornándolo de color café (CIAT, 1987).

## **EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA**

### **Material experimental**

Se usaron 40 líneas F6 seleccionadas de las poblaciones X069 y X0104 por su resistencia a Xap en evaluaciones anteriores (Barrera, 2001). Estas líneas se derivan de la cruce Tío Canela 75/VAX6. En las evaluaciones se incluyeron los padres y los testigos Catrachita y VAX3, susceptible y resistente a Xap, respectivamente.

Para la evaluación de la reacción a la inoculación con aislamientos Xap, se empleó la escala de severidad del daño de 1-9 (donde 1= máxima resistencia, no síntomas y 9= máxima susceptibilidad, muerte de la planta), propuesta por el CIAT (1987).

### **Evaluación fenotípica**

#### **Primer ensayo: Inoculación con aislamientos Xap del PIF**

- Siembra. Se realizó el 13 de marzo del 2003, mediante la siembra de un primer grupo de plantas de las 40 líneas seleccionadas de las poblaciones X069 y X0104, los padres Tío Canela 75 y VAX6, y los testigos Catrachita (susceptible) y VAX3 (resistente). Esta se llevó a cabo en dos camas de infección de 24 x 1.2 m (29 m<sup>2</sup>) cada una. El espaciamiento entre surcos fue de 0.5 m y la distancia entre plantas de 12 cm, para un total de 5 plantas/surco.

- Inoculación. A los 30 días después de la siembra (DDS) se procedió a inocular las 40 líneas F6 utilizando la misma metodología descrita anteriormente en la reactivación de Xap. Se inoculó el primer trifolio con la cepa EAP 9504 y el segundo trifolio con la cepa EAP 9506.

- Evaluación. La primera evaluación de las líneas inoculadas con el aislamiento EAP 9504, se realizó a los 15 días después de la inoculación (DDI). La segunda evaluación se hizo tres días después (18 DDI) para registrar con mayor exactitud el grado de severidad. El mismo procedimiento se llevó a cabo al inocular con el aislamiento EAP 9506, una vez evaluada la primera.

## **Segundo ensayo: Inoculación con nuevos aislamientos Xap**

- Siembra. La siembra de un segundo grupo de plantas de las 40 líneas seleccionadas de las poblaciones X069 y X0104, los padres Tío Canela 75 y VAX6, y los testigos Catrachita (susceptible) y VAX3 (resistente), se realizó el 18 de agosto del 2003 en una cama de infección de 24 x 1.2 m (29 m<sup>2</sup>). El espaciamiento entre surcos fue de 0.5 m y la distancia entre plantas de 12 cm, para un total de 5 plantas/surco.

- Inoculación. Se usó el mismo método de obtención de inóculo e inoculación citado anteriormente. Utilizando el método de punción múltiple, se procedió a inocular el primer trifolio con el inóculo del aislamiento de Zorrales (Zamorano), y se evaluó la reacción fenotípica en las líneas a los 15 DDI. En el segundo trifolio, se utilizó el inóculo del aislamiento de El Rancho. Para ampliar el grado de respuesta a Xap se utilizó la cepa EAP 9506 en la inoculación del tercer trifolio.

- Evaluación. Se evaluó la primera inoculación con el aislamiento de Zorrales a los 15 DDI; una segunda lectura fue hecha 3 días después. El mismo procedimiento de evaluación se llevó a cabo con la inoculación del aislamiento de El Rancho y el aislamiento EAP 9506.

## **Evaluación molecular**

Se extrajo ADN de las 40 líneas F6 de la población X069 y X0104, los padres Tío Canela 75 y VAX6, y los testigos Catrachita (susceptible) y VAX3 (resistente). Se realizó los análisis con marcadores moleculares, tomando como base el protocolo de la Universidad de Wisconsin-Madison, adaptado por Aranda (2000) (Anexo 3).

Se implementó el protocolo para amplificar los marcadores SCAR SU91 y SAP6 (Pedraza *et al.*, 1993), que identifican QTL de resistencia a aislamientos virulentos de Xap.

También se utilizó el marcador SCAR SR2 ligado al gen *bgm-1* (Urrea *et al.*, 1996), empleando el protocolo adaptado por Aranda (2000), para evaluar la presencia de este gen de resistencia al VMDAF.

## **Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se empleó el protocolo para marcadores SCAR (Anexo 4). Se emplearon 40 líneas F6 seleccionadas por su reacción de resistencia y susceptibilidad a la inoculación con los aislamientos EAP 9504 y EAP 9506 de Xap. Se utilizaron tubos eppendorf, barras (“*pestle*”) de plexiglass estériles, soluciones amortiguadoras (*buffers*) de lavado y extracción de ADN, micropipetas y puntas, y una microcentrífuga.

## Cuantificación y dilución de ADN

Se utilizó un fluorómetro (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant™200), que permite expresar la cantidad de ADN en nanogramos por microlitro (ng/μl). Para la cuantificación del ADN se siguió el protocolo de laboratorio de Biotecnología de Zamorano (Anexo 5), empleando el ADN bovino estándar (100 ng/μl) y una solución amortiguadora de cuantificación (TE) para las muestras de tejido.

## Amplificación de ADN

Se usó un termociclador (PCR-100™, Programable Thermal Controller, Peltier- Effect Cycling); y su separación en electroforesis (EC Maxicell EC 360M), empleando fuente de amplificación y regulación de voltaje (Hoefer Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP).

- Marcador SR2 para identificar gen *bgm-1*. La amplificación se hizo mediante el perfil térmico para el marcador SR2 iniciando con un ciclo de desnaturalización a 94°C por 30 segundos; seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto; acoplamiento a 60°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 3 minutos, finalizando con un ciclo de elongación a 72°C por 5 minutos. Las concentraciones de los compuestos usados fueron: agua 9 μL, buffer (5X) 2 μL, dNTP'S (4 mM) 0,7 μL, Primer SR2-A 0,3 μL, Primer SR -B 0,3 μL, Tag-Polimerasa 0,7 μL, ADN (30ng/ml) 3 μL, dando un total de 16 μL.

-Marcador SU91 para identificar QTL de resistencia a Xap. Mediante perfil térmico se hizo la amplificación para el marcador SU91 iniciando con 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 segundos; acoplamiento a 58°C por 40 minutos y elongación a 72°C por 2 minutos, finalizando con un ciclo de elongación a 72°C por 5 minutos. Las concentraciones usadas fueron: agua 7,1 μL, buffer (5X) 2 μL, dNTP'S (4 mM) 0,7 μL, Primer SU-91A 1 μL, Primer SU-91B 1 μL, Tag-Polimerasa 0,7 μL, ADN (30ng/ml) 2 μL, con un total de 15 μL.

-Marcador SAP6 para identificar QTL de resistencia a Xap. Utilizando el perfil térmico se hizo la amplificación para el marcador SAP6 iniciando con 34 ciclo de desnaturalización a 94°C por 10 segundos; acoplamiento a 55°C por 40 minutos y elongación a 72°C por 2 minutos, finalizando con un ciclo de elongación a 72°C por 5 minutos. Las concentraciones usadas fueron: agua 6 μL, buffer (5X) 2 μL, dNTP'S (4 mM) 1 μL, Primer SAP6-A 1,4 μL, Primer SAP6-B 1,4 μL, Tag-Polimerasa 0,7 μL, ADN (30ng/ml) 2,5 μL, con un total de 15 μL.

## Separación de ADN

Con base a su tamaño y carga eléctrica se procedió a la separación de las moléculas de ADN, a una concentración de 1% agarosa por 60 min en un tanque de electroforesis (EC Maxicell EC 360M, 44 orificios) usando una fuente de poder (Hoefer Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP) de 140 voltios. Para la tinción de bandas y su visualización se incluyó 2 μL de bromuro de etidio (10 mg/ μL) por gel. Para determinar la longitud de los fragmentos observados se colocó una escalera de ADN

de 100 pares de bases, con control positivo o testigo para cada gen, luego un control negativo y las muestras (20 por cada gel).

### **Visualización de ADN**

La expresión de las bandas de ADN que fueron tomadas de geles de agarosa se identificaron y registraron en fotografías con una cámara Polaroid<sup>®</sup> y luego visualizadas bajo la luz ultravioleta de un transiluminador (Fotodyne, Foto/UV<sup>®</sup> 26).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### AISLAMIENTOS

#### Reactivación de Xap de la colección PIF

Cuatro de los seis aislamientos Xap de la colección PIF presentaron síntomas de alta susceptibilidad en plantas de Catrachita, indicando la virulencia de estos aislamientos (Cuadro 1). Los aislamientos EAP 9504 y EAP 9506 fueron posteriormente utilizados para evaluar la resistencia a Xap en las 40 líneas de las poblaciones X069 y X0104.

**Cuadro 1.** Grado de severidad de los aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) de la colección PIF en la variedad susceptible Catrachita. Zamorano, Honduras. 2003.

Aislamientos de Xap	Procedencia	Severidad <sup>z</sup>
EAP 9501	Guinope, El Paraíso	1
EAP 9502	Orica, Francisco Morazán	3
EAP 9503	Zamorano, Francisco Morazán	8
EAP 9504	Guaimaca, Francisco Morazán	9
EAP 9505	El Paraíso, Francisco Morazán	8
EAP 9506	Namasique, Choluteca	9

<sup>z</sup> Severidad (1= máxima resistencia; 9= máxima susceptibilidad)

#### Obtención de nuevos aislamientos de Xap de Honduras

Cinco aislamientos de diversas procedencias fueron evaluados por su reacción de virulencia en el testigo susceptible Catrachita. Solo las plantas inoculadas con el aislamiento de Zorrales presentaron reacción de susceptibilidad (alta severidad de daño), sugiriendo la virulencia de este aislamiento (Cuadro 2). Los aislamientos de El Rancho, Jamastrán, San Matías, Jacaleapa y El Paraíso, no presentaron daños en el testigo susceptible Catrachita, sugiriendo su falta de virulencia.

**Cuadro 2.** Grado de severidad de los aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* procedentes de recolecciones en diferentes zonas de Honduras en la variedad susceptible Catrachita. Zamorano, Honduras. 2003.

Aislamiento	Procedencia	Severidad <sup>z</sup>
Zorrales (Zamorano)	Francisco Morazán	9
El Rancho (Zamorano)	Francisco Morazán	2
Jamastrán	El Paraíso	1
San Matías	El Paraíso	1
Jacaleapa	El Paraíso	1

<sup>z</sup> Severidad (1= máxima resistencia; 9= máxima susceptibilidad)

Se seleccionó el aislamiento de Zorrales (Zamorano) para evaluar la resistencia a Xap en las poblaciones X069 y X0104, por presentar características adecuadas de virulencia y un buen crecimiento de colonias en medio de cultivo LDCA. En comparación con los aislamientos colectados de las otras zonas, este aislamiento presentó un grado de severidad alto (máxima susceptibilidad) en plantas de la variedad Catrachita. Se escogió también el aislamiento de Xap de El Rancho, como segundo aislamiento para las inoculaciones, por presentar buen crecimiento en cultivo.

Al evaluar en la variedad Catrachita, el aislamiento de El Rancho presentó un grado de severidad bajo. A pesar de estos resultados se lo consideró en el estudio para evaluar su comportamiento en el campo con las líneas de las dos poblaciones en estudio.

### **Caracterización de la variante *fuscans* en la cepa EAP 9506 de Xap**

Se comprobó que el aislamiento EAP 9506 pertenece a la variante *fuscans* de Xap, debido a que produjo melanina en el medio AN, oscureciendo el medio de cultivo tornándolo de color café.

## **EVALUACIÓN FENOTÍPICA**

### **Inoculación con aislamientos Xap del PIF**

De las 40 líneas de las poblaciones X069 y X0104, seleccionadas en un estudio anterior por su resistencia a Xap (Barrera, 2001), presentaron reacciones promedios (2,7-3,9) y rangos de severidad relativamente bajos, independientemente de los aislamientos (EAP 9504, EAP 9506 y Zorrales) usados en las evaluaciones (Cuadro 3). En general, la resistencia a Xap observadas en estas líneas seleccionadas por Barrera (2001), se mantiene en las evaluaciones realizadas en este estudio. Observando las reacciones del padre Tío Canela 75, vemos que el aislamiento EAP 9504 en la primera siembra y el EAP 9506 en la segunda evaluación presentó una reacción intermedia. Sin embargo, los tres aislamientos en ambas evaluaciones causaron daños severos (severidad >8) en el testigo susceptible Catrachita, lo que indica la virulencia de estos aislamientos.

**Cuadro 3.** Reacción de severidad de las 40 líneas F6 de las poblaciones X069 y X0104 inoculadas con aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Zamorano, Honduras, 2003.

Líneas	Aislamientos			
	Siembra 1		Siembra 2	
	EAP 9504	EAP 9506	Zorrales	EAP 9506
	Severidad			
X069-153-9-4-3-2	1,5	1,8	2,6	2,1
X069-153-9-4-3-3	1,5	1,7	3,3	1,9
X069-153-9-4-3-5	2,0	2,3	2,0	2,5
X069-153-9-4-3-5	3,0	2,4	4,6	1,8
X069-157-8-5-1-5	3,8	3,9	5,9	4,0
X069-157-8-5-2-5	2,3	2,7	2,8	3,0
X069-157-8-5-6-1	2,7	3,0	4,2	3,3
X069-157-8-5-6-1	3,3	3,0	3,8	4,7
X069-157-8-5-6-5	3,4	3,6	4,6	3,8
X069-157-12-5-1-4	1,7	2,2	2,9	2,8
X069-157-14-4-1-3	1,6	2,1	2,8	2,5
X069-157-14-4-3-1	1,6	2,3	2,1	3,0
X069-157-14-4-5-5	3,0	2,9	2,4	2,8
X069-157-14-4-5-6	2,9	2,9	2,9	2,9
X0104-25-2-1-1	2,3	2,2	2,6	2,0
X0104-37-2-1-4	2,2	2,7	2,2	3,1
X0104-25-2-4-5	3,0	3,8	2,4	4,5
X0104-25-2-5-1	3,3	2,8	3,9	2,3
X0104-37-5-3-4	1,8	2,5	2,0	3,2
X0104-38-2-1-1	1,7	2,2	1,9	2,8
X0104-38-2-1-2	2,9	3,4	4,5	4,0
X0104-38-2-2-1	2,0	2,8	2,0	3,5
X0104-38-2-2-2	2,8	2,9	3,0	3,1
X0104-38-2-3-2	2,7	2,7	3,2	2,7
X0104-38-2-3-3	1,7	2,5	3,2	3,3
X0104-38-3-4-2	1,9	2,5	2,9	3,2
X0104-38-3-4-3	2,9	2,9	3,1	2,9
X0104-38-3-4-4	2,3	3,7	3,4	3,0
X0104-38-3-4-5	2,7	3,2	3,6	3,7
X0104-40-1-5-1	2,5	3,1	3,8	3,6
X0104-45-3-5-1	2,4	3,1	2,5	3,8
X0104-45-3-5-2	2,0	2,6	2,5	3,3
X0104-45-3-5-5	2,6	2,7	2,3	2,8
X0104-45-5-1-4	3,6	3,9	2,9	3,2
X0104-49-5-1-4	3,3	3,1	3,8	2,9
X0104-52-5-5-2	3,0	3,2	3,6	3,4
X0104-52-5-5-3	2,4	2,7	3,4	3,0
X0104-52-5-5-5	2,5	2,6	3,2	2,7
X0104-52-5-5-6	2,7	2,6	3,1	2,5
X0104-52-5-6-2	2,7	2,5	4,0	2,3
Promedio (n=40)	3,6	3,9	3,2	2,7
Tío-Canela75 (padre susceptible)	4,8	7,7	8,4	4,9
VAX6 (padre resistente)	2,0	1,8	1,9	1,8
VAX3 (resistente)	1,8	1,6	1,4	1,4
Catrachita (susceptible)	8,5	8,6	9,0	8,6

<sup>z</sup> Severidad (1= máxima resistencia; 9= máxima susceptibilidad)

Wolfgang (1999), consideró que las diferencias en la reacción de las plantas sugiere variaciones de patogenicidad en los aislamientos, observando mayor virulencia en aislamiento EAP 9506. Para obtener una mayor respuesta al grado de susceptibilidad y resistencia de las 40 líneas F6, en este estudio se utilizó el aislamiento EAP 9506 en las dos siembras de líneas de frijol de las poblaciones X069 y X0104 (Cuadro 3). Sin embargo, en la segunda siembra, se observó una reducción en el grado de severidad de la cepa EAP 9506, lo cual pudo deberse a que la inoculación se hizo en el tercer trifolio cuando la planta se encontraba en una etapa vegetativa avanzada.

## **EVALUACIÓN MOLECULAR**

Las 40 líneas F6 seleccionadas de las poblaciones X069 y X0104 por resistencia a Xap (Barrera, 2001), fueron evaluadas con los marcadores SCAR SAP6 y SU91 ligados a QTL de resistencia a Xap (Pedraza *et al.*, 1993), y el marcador SR2 para el gen *bgm-1* resistente a VMDF (Anexo 5).

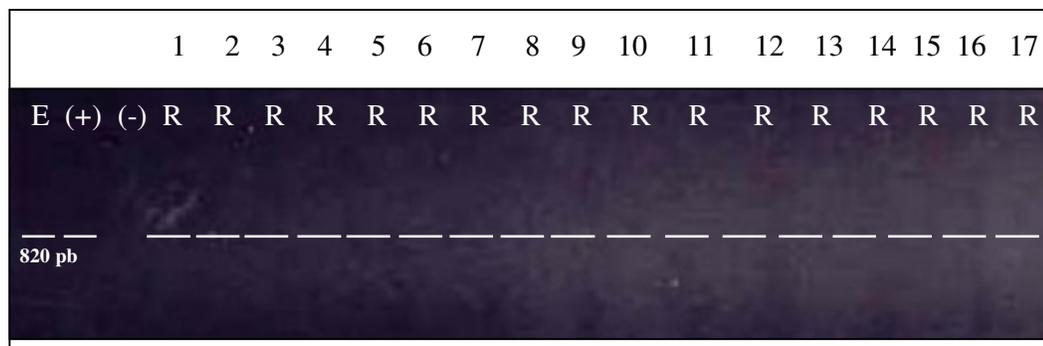
Barrera (2001), identificó plantas con resistencia a Xap y presencia del marcador SAP6, en líneas F5 de la población X069 inoculadas con el aislamiento EAP 9506 de Xap. Adicionalmente, identificó plantas de familias resistentes al VMDF mediante la presencia del marcador SR2. Debido a estos resultados, se decidió continuar utilizando estos marcadores en las 40 líneas F6 seleccionadas de las poblaciones X069 y X0104 para verificar la resistencia de genes de resistencia a Xap (Anexo 7).

### **Evaluación molecular de la resistencia de líneas F6 a Xap**

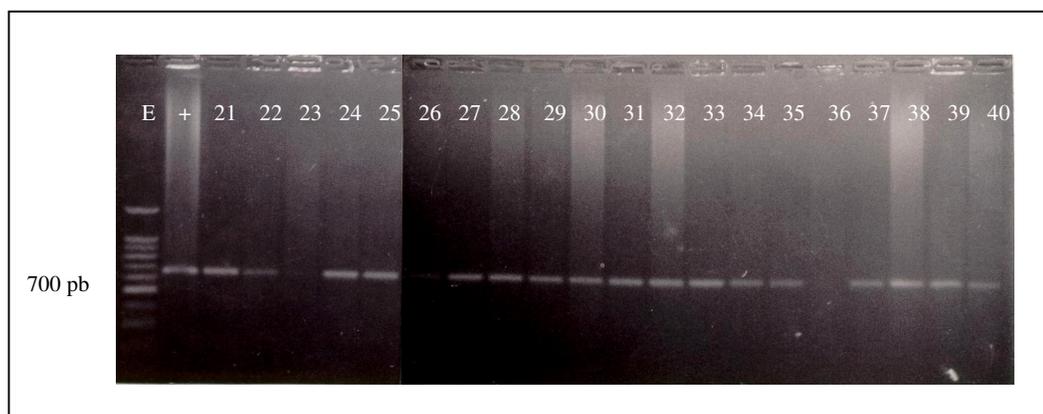
Las 40 líneas F6 resistentes a Xap, los padres y testigos, se evaluaron empleando los marcadores SAP6 y SU91 para determinar la presencia del QTL asociado con la resistencia a Xap (Cuadros 4 y 6).

Con el marcador SAP6, se determinó que las 40 líneas F6 presentan el QTL de resistencia (derivado de GN#1 sel 27) al aislamiento EAP 9506 de Xap. Los padres Tío Canela 75 (TC-75) y VAX6, y el testigo VAX3 presenta el marcador SAP6. Sin embargo, la reacción de Tío Canela 75 a la inoculación con EAP9506 es de susceptibilidad; por lo tanto, el QTL presente (según el marcador SAP6) no es suficiente para determinar resistencia a este aislamiento (Figura 1).

Al utilizar el marcador SU91 en las mismas poblaciones, se identificaron 34 plantas con el marcador presente (700 pb) y seis que no lo presentaron (Figura 2). La presencia de SAP6 y SU91 en plantas resistentes a Xap significa que ambos QTL se requieren para la resistencia al aislamiento EAP 9506. Adicionalmente, se puede aducir que la presencia de ambos QTL pueden conferir una resistencia más amplia a otros aislamientos, lo cual debe ser comprobado en estudios posteriores.



**Figura 1.** Interpretación de bandas de electroforesis generadas con el SCAR SAP6 (QTL) en familias F6 resistentes a Xap. Zamorano, Honduras, 2001.



**Figura 2.** Bandas de electroforesis generadas con el SCAR SU91 (QTL) en familias F6 resistentes a Xap. Zamorano, Honduras, 2001.

**Cuadro 4.** Resumen de la evaluación molecular de 40 líneas F6 de la población X069 y X0104 empleando los marcadores SCAR SAP6 y SU91 para la resistencia a Xap. Zamorano, 2003.

Marcadores	Tamaño (pb) <sup>y</sup>	Número de plantas	
		Presencia	Ausencia
SAP6	820	40	-
SU91	700	34	6
SU91/SAP6	820/700	34	6
SAP6 (padres)	820	2 (TC-75 y VAX6)	-
SU91 (padres)	700	1 (VAX6)	1 (TC-75)
SAP6 (testigos)	820	1 (VAX3)	1 (Catrachita)
SU91 (testigos)	700	1 (VAX3)	1 (Catrachita)

<sup>y</sup> pb = pares de bases

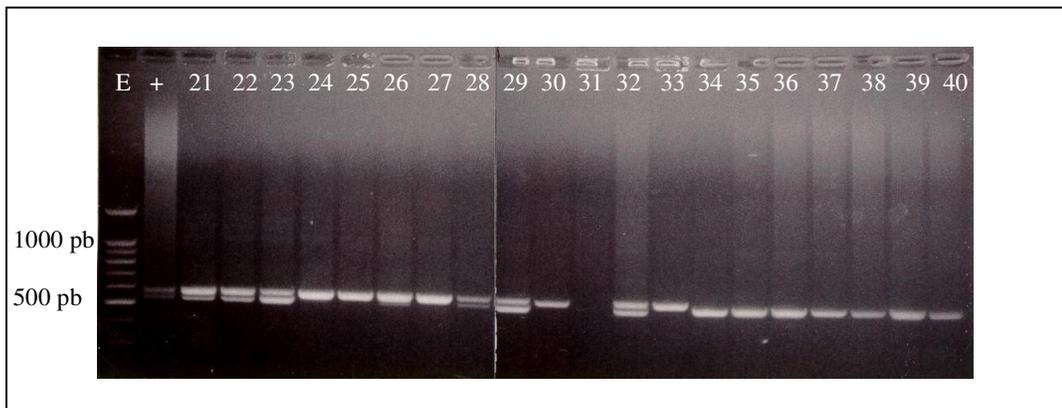
### Comparación genética-molecular (marcadores SCAR) y fenotípica (observación de campo) de las líneas F6 por su resistencia a Xap

La evaluación de campo se realizó mediante observaciones visuales del grado de severidad (daños causados por Xap) de las líneas F6 y evaluación genotípica (marcadores moleculares SCAR).

En ambas poblaciones X069 y X0104 se observaron síntomas de severidad relativamente bajos (< 4), por lo que se puede aceptar que las líneas son resistentes al aislamiento de Xap EAP 9506 (Cuadro 6). El padre susceptible Tío Canela 75 presentó una severidad intermedia (4,8) y presenta el marcador SAP6 y ausencia del SU91. El testigo Catrachita presentó una alta severidad (8,6) sin la presencia de los marcadores como se esperaba. El padre VAX6 y el testigo VAX3 resistentes, presentaron severidad baja (3,5 y 1,6 respectivamente). Y ambos marcadores SAP6 y SU91. En el caso de VAX6, la ausencia del SU91 se relaciona con una severidad ligeramente mayor que VAX3.

Según los resultados obtenidos con los marcadores SCAR para determinar la presencia de QTL de resistencia a Xap, se determinó que ambos marcadores estaban presentes en 34 líneas más resistentes. Se puede asumir que el QTL determinado por el marcador SAP6 es el que está confiriendo la resistencia al aislamiento EAP 9506. Sin embargo, el QTL determinado por el marcador SU91 es necesario para ampliar la resistencia a otros aislamientos de Honduras y de la región centroamericana. En general las líneas sin el marcador SU91, presentan una mayor severidad.

Para determinar la presencia del marcador SR2 asociado con la resistencia del VMDAF conferida por el gen *bgm-1*, se emplearon las 40 líneas F6, los padres Tío Canela-75 (TC-75) y VAX6, y los testigos Catrachita y VAX3. Se identificaron 23 líneas resistentes (banda presente en 530 pb) y 17 susceptibles (bandas presentes en 570 y 570/530 pb) (Figura 3 y Cuadro 5). Diez de las 17 líneas susceptibles son heterocigotas (530/570 pb), lo que indican que continuarán segregando y aumentando la probabilidad de encontrar plantas con resistencia al VMDAF en la siguiente generación. Las 12 líneas de la población X069 presentaron el gen recesivo *bgm-1*, que concuerda con la evaluación de Barrera (2001) (Cuadro 5).



**Figura 3.** Bandas generadas con el SCAR SR2 (*gen bgm-1*) en familias F6 resistentes al VMDAF. Zamorano, Honduras, 2001.

**Cuadro 5.** Genotipo y fenotipo de las líneas F6 de las poblaciones X069 y X0104 evaluadas con el marcador SCAR SR2. Zamorano, Honduras, 2003

Genotipo	Fenotipo <sup>a</sup>	Tamaño (pb) <sup>y</sup>	Líneas F6
<i>bgm-1 bgm-1</i>	Recesivo	530	22
<i>Bgm-1 bgm-1</i>	Heterocigoto	530/570	10
<i>Bgm-1 Bgm-1</i>	Dominante	570	8
Padre (TC-75)	Recesivo	530	
Padre (VAX6)	Dominante	570	
Testigo (Catrachita)	Dominante	570	
Testigo (VAX3)	Dominante	570	

<sup>y</sup> pb = pares de bases

<sup>a</sup> R= recesivo (resistente); heterocigoto (susceptible); dominante (susceptible)

Veintidos líneas presentaron el marcador SR2 que indica la presencia del gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF (Cuaderno 6). El padre resistente Tío Canela 75 presenta este marcador; el padre VAX6 y los testigos VAX3 y Catrachita no lo presentaron.

Estos resultados confirman que el uso de marcadores SCAR representan una alternativa para la selección asistida en los programas de mejoramiento genético del cultivo de frijol. Así mismo, debe considerar que las evaluaciones de campo son una valiosa herramienta para la selección de germoplasma de frijol y para el mejoramiento de características de resistencia a plagas (CIAT, 1987).

**Cuadro 6.** Comparación entre la reacción fenotípica (severidad) al aislamiento Xap EAP 9506 y la presencia de marcadores moleculares en líneas F6 de las poblaciones X069 y X0014 y su complemento con el gen *bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (SCAR SR2). Zamorano, 2003.

Líneas	Severidad <sup>z</sup>	SCAR Xap		SCAR VMDFAF
		SAP6	SU91	SR2
X069-153-9-4-3-2	1,8	+	+	+
X069-153-9-4-3-3	1,7	+	+	+
X069-153-9-4-3-5	2,3	+	+	+
X069-153-9-4-3-5	2,4	+	+	+
X069-157-8-5-1-5	3,9	+	-	+
X069-157-8-5-2-5	2,7	+	+	+
X069-157-8-5-6-1	3,0	+	-	+
X069-157-8-5-6-1	4,0	+	-	-
X069-157-8-5-6-5	3,6	+	-	+
X069-157-12-5-1-4	2,2	+	+	+
X069-157-14-4-1-3	2,1	+	+	+
X069-157-14-4-3-1	2,3	+	+	+
X069-157-14-4-5-5	2,9	+	+	+
X069-157-14-4-5-6	2,9	+	+	-
X0104-25-2-1-1	2,2	+	+	+
X0104-37-2-1-4	2,7	+	+	-
X0104-25-2-4-5	3,8	+	+	-
X0104-25-2-5-1	2,8	+	+	-
X0104-37-5-3-4	2,5	+	+	+
X0104-38-2-1-1	2,2	+	+	+
X0104-38-2-1-2	3,4	+	+	-
X0104-38-2-2-1	2,8	+	+	-
X0104-38-2-2-2	2,9	+	-	-
X0104-38-2-3-2	2,7	+	+	-
X0104-38-2-3-3	2,5	+	+	-
X0104-38-3-4-2	2,5	+	+	-
X0104-38-3-4-3	2,9	+	+	-
X0104-38-3-4-4	3,7	+	+	-
X0104-38-3-4-5	3,2	+	+	-
X0104-40-1-5-1	3,1	+	+	-
X0104-45-3-5-1	3,1	+	+	-
X0104-45-3-5-2	2,6	+	+	-
X0104-45-3-5-5	2,7	+	+	+
X0104-45-5-1-4	3,9	+	+	+
X0104-49-5-1-4	3,1	+	+	+
X0104-52-5-5-2	3,2	+	-	+
X0104-52-5-5-3	2,7	+	+	+
X0104-52-5-5-5	2,6	+	+	+
X0104-52-5-5-6	2,6	+	+	+
X0104-52-5-6-2	2,5	+	+	+
Tío-Canela 75 (padre susceptible)	4,8	+	-	+
VAX6 (padre resistente)	3,5	+	+	-
VAX3 (resistente)	1,6	+	+	-
Catrachita (susceptible)	8,6	-	-	-

(+) = Presencia – banda 530 pb (resistencia); (-)= Ausencia – bandas 530/570 y 570 (susceptibilidad)

<sup>z</sup> Severidad de Xap en plantas de la primera siembra

SAP6 y SU91 (QTL de resistencia a *Xap*); SR2 (gen *bgm-1* de resistencia al VMDFAF)

De acuerdo a los resultados obtenidos con los marcadores SCAR, 19 líneas F6 X069 y X0104 presentan recombinaciones de genes resistentes a Xap y al (VMDAF) (Cuadro 7). Estas líneas deben ser evaluadas por otros aspectos agronómicos para su uso como cultivares o como progenitores en el mejoramiento de la resistencia a estas enfermedades.

**Cuadro 7.** Relación de líneas resistentes a la bacteriosis común y el VMDAF que presentan los marcadores SCAR SAP6 y SU91 (QTL de resistencia a Xap) y SR2 (gen *bgm-1* resistente a VMDAF). Zamorano, Honduras, 2003.

Población X069	Población X0104
X069-157-8-5-2-5	X0104-37-5-3-4
X069-153-9-4-3-2	X0104-38-2-1-1
X069-153-9-4-3-3	X0104-45-3-5-5
X069-153-9-4-3-5	X0104-45-5-1-4
X069-153-9-4-3-5	X0104-45-5-1-4
X069-157-12-5-1-4	X0104-52-5-5-3
X069-157-14-4-1-3	X0104-52-5-5-5
X069-157-14-4-3-1	X0104-52-5-5-6
X069-157-14-4-5-5	X0104-52-5-6-2

## CONCLUSIONES

De los cinco aislamientos obtenidos de las diferentes zonas de Honduras, se observó una mayor virulencia en el aislamiento de Zorrales, el cual servirá para hacer evaluaciones posteriores de germoplasma y líneas mejoradas.

Se comprobó que la cepa EAP 9506 pertenece a la variante *fuscans* de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

En las 40 líneas F6 de las poblaciones X069 y X0104, con el marcador SR2 se identificaron 23 líneas resistentes y 17 susceptibles al VMDAF. Con el marcador SAP6, se determinó que las 40 líneas presentan el QTL de resistencia a Xap y con SU91 se identificaron 34 plantas que presentan el marcador y seis que no lo presentaron.

Mediante evaluaciones fenotípicas y moleculares, empleando aislamientos de las diferentes zonas de Honduras, se identificaron 19 líneas F6 de las poblaciones X069 y X0104 que presentan recombinaciones de genes resistentes a Xap y al VMDAF.

La presencia de SAP6 y SU91 en plantas resistentes a aislamientos de Xap significa que ambos QTL se requieren para alta resistencia a aislamientos virulentos de Xap. Estos resultados confirman que el uso de marcadores SCAR representan una alternativa efectiva para la selección asistida en programas de mejoramiento genético del cultivo de frijol.

## **RECOMENDACIONES**

Continuar recolectando muestras de Xap para obtener nuevos aislamientos de zonas frijoleras de Honduras, para determinar la virulencia y realizar estudios posteriores en líneas mejoradas y germoplasma para la resistencia a la bacteriosis común en Honduras.

Continuar evaluando el comportamiento de la reacción a Xap y al VMDAF para identificar líneas que recombinen genes estables de resistencia a ambas enfermedades.

Seguir utilizando la selección asistida con marcadores moleculares que permitan la identificación de fuentes de resistencia para ampliar la base genética del cultivo del frijol.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, E.; Vanegas, G.; Victoria, J. I. s.f. Transmisión por semilla de bacterias fitopatógenas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Instituto Colombiano Agropecuario. s.n.t.
- Aranda, R. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia del virus del mosaico dorado amarillo en frijol común. Tesis Zamorano, HN, Zamorano. 78 p.
- Barrera, C, 2001. Uso de técnicas convencionales y moleculares para el mejoramiento de la resistencia a la Bacteriosis Común y al Virus del Mosaico Dorado Amarillo del frijol común. Tesis Ing. Agrónomo. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 44 p.
- CIAT. 1987. Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de Frijol. Aart Van Schoonhoven y Marcial A. Pastor-Corrales (comps.) Cali, Colombia. 56 p.
- Navarrete, R. 1996. Variación patogénica de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en diferentes regiones de México. In Primer Taller Internacional Sobre Bacteriosis Común de Frijol. Universidad de Puerto Rico. Documento 96/2. Puerto Rico. P. 39-44.
- Pedraza, F.; Gallego, G.; Beebe, S.; Tohme, J. 1993. Marcadores SCAR y RAPD para la Resistencia a la Bacteriosis Común (CBB) del Frijol. CIAT. Cali, Colombia. s.n.t
- PRIAG.(Programa Regional de Reforzamiento de la Investigación Agronómica sobre los Granos Básicos en Centro América). 1993. El cultivo del frijol, Boletín Técnico, Tegucigalpa, Honduras 28 p.
- Rosas, J. C. 1998. El Cultivo del Frijol Común en América Tropical. Zamorano, Honduras, Zamorano Academia Press. 52 p.
- Schwartz, H. F.; Brick, M. A. 1996. Bry bean production & pest management. Regional Bulletin 562A, Colorado State university. U.S.A. p. 79-78.
- Serracín, J.; Young, R.; Rosas, J. C.; Caceres, J. 1991. Daños causados por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y su efecto en el rendimiento del frijol común (habichuela; *Phaseolus vulgaris*). Journal of Agriculture. University of Puerto Rico. Vol. 75. no. 4. p. 353-361.
- Urrea, C.; Beaver, J.; Riley, R. 1996. A Codominant Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121(6):1035-1039.

Wolfgang, B. 1999. Identificación de fuentes de resistencia utilizando aislamientos hondureños de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y su importancia en el manejo de la bacteriosis común del frijol. Tesis Ing. Agrónomo. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 29 p.

Zapata, M. 1996. Identificación de razas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en hojas de *Phaseoli vulgaris*. In Primer Taller Internacional Sobre Bacteriosis Común del Frijol. Universidad de Puerto Rico. Documento 96/2. Puerto Rico. P. 54-68.

## **ANEXOS**

## **Anexo 1.** Protocolo *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*

### Aislamiento

1. Cortar un tejido infectado (parte verde con tejido necroso) y sumergirlo en una solución de hipoclorito de sodio (1%) por dos minutos.
2. Enjuagar con agua destilada esterilizada.
3. Colocar tejido desinfectado en mortero y macerarlo (colocar algunas gotas de agua destilada esterilizada si el tejido está muy seco), hasta obtener una solución acuosa verde.
4. Utilizando un asa, tomar un poco de la solución acuosa resultante de la maceración y sembrarla mediante rayados en un plato petri conteniendo YDCA, con el fin de promover el crecimiento de colonias individuales.
5. Incubar los platos a 30° C por 48 horas.
6. Reaislar las colonias características de *X. axonopodis pv. phaseoli* en un nuevo plato petri con YDCA, con el fin de purificar el cultivo.

### Preparación y Cuantificación del Inóculo

1. Setenta y dos horas antes de la inoculación, reactivar la bacteria almacenada rastillándola en platos petri con medio YDCA en proporción 1:5 de platos rayados: platos a utilizar en la inoculación.
2. Cuarenta y ocho horas antes de la inoculación, transferir mediante rastrillado la bacteria reactivada a nuevos platos petri. Cada plato rastrillado en (1) debe proveer suficiente bacteria para preparar cinco nuevos platos.
3. Una hora antes de la inoculación verter agua en los platos petri y raspar cuidadosamente con el rastrillo, con el fin de separar el crecimiento bacterial del medio.
4. Colocar la mezcla resultante de cada plato dentro de un recipiente plástico, agitar bien y agregar agua.
5. Con un colorímetro o espectrofotómetro, regular a 600 nanómetros, medir absorbancia a  $0.5 = 5 \times 10^8$  ufc ( unidades formadoras de células).
6. Tomar 1.2 L de la solución bacteriana (0.5 absorbancia) y añadir a 10.8 L de agua en una bomba de 12 L, para llegar a una dilución de 1:10 =  $5 \times 10^7$  ufc.

NOTA: Utilizar 4 platos petri con bacteria / bomba de 12 L, para un total aproximado máximo (última inoculación) de 96 platos petri / ha. La cantidad de bombas dependerá del estado del cultivo; como sugerencia, asumir ~ 16 bombas de 12 L / ha para la primera inoculación.

### Inoculación y Evaluación

#### A. Inoculación por aspersión en el campo

1. Realizar la primera inoculación en la etapa V3 ( primera hoja trifoliada abierta y segunda comenzando a desarrollarse).
2. Realizar inoculaciones subsecuentes con frecuencia semanal hasta antes de R6 ( floración) y de ser necesario después de

esta, de la (R7) hasta inicios de la (R8), para un máximo de 5- 6 inoculaciones / ciclo de cultivo.

#### B. Evaluación

1. Evaluaciones periódicas: hacer lecturas de incidencia de la enfermedad cada 5 días a partir del quinto día de la primera inoculación. En total se hacen de 4 – 5 evaluaciones.
2. Evaluación única: hacer una sola lectura de incidencia de la enfermedad a mitad de la R8.

**Anexo 2.** Medio de Crecimiento YDCA (Yeast Destrose Calcium Carbonate Agar), para *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Reactivo	Cantidad (1 litro)
Levadura	10 gramos
Dextrosa	10 gramos
Carbonato de Calcio ( Ca CO <sub>3</sub> )	2,5 gramos
Agar	20 gramos

**Anexo 3.** Extracción de ADN para el análisis de RAPDs (Método de la UW-Madison).

1. Cosechar 0.5-0.75 g de tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas primarias) a los (10-12 días de la siembra).
2. Agregar 50  $\mu$ l del *buffer* de extracción (PEX) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (*pestle*) de plexiglass de laboratorio.
3. Agregar 450  $\mu$ l adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.
4. Lo más pronto posible (antes de 1 hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 ° C durante 30-60 min.
5. Centrifugar la muestra durante 10 min a > 14000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar (*pellet*) los residuos de tejido.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol: Acetato de Amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
7. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugado las muestras a 30000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.
8. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300  $\mu$ l de RNAasa A (concentración de 100  $\mu$ g/ml) + buffer 0.1X TE<sup>a</sup> (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 ° C por 1 hora.
9. Centrifugar las muestras a > 14000 RPM por 1 min (3 min si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
11. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol: Acetato de Sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
12. Agitar bien los tubos manualmente par romper el precipitado, antes de proceder a peletearlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3000 RPM para peletizar el ADN.
13. Vaciar el Etanol/Acetato de Sodio\* y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
14. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14000 RPM.
15. Separar los pellets usando el vortex.

16. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla ( 2-3 horas o de un día para el otro).
17. Rehidratar los pellets agregando 100-200  $\mu\text{l}$  de TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos a 65 °C en baño maría durante 3 min.
18. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), con el fin de preparar las diluciones (4  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) necesarias para efectuar las reacciones para su amplificación.

---

<sup>a</sup> Buffer TE (TRIS 1 mM, pH= 7.5 ; EDTA 0.1 m M, pH=8.0)

\* Usar acetato de sodio 3H<sub>2</sub>O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

**Anexo 4.** Extracción de ADN para el análisis de marcadores SCAR.

1. Cosechar tejido fresco de plantas (hojas jóvenes) para la extracción del ADN.
2. Agregar 40  $\mu$ l de hidróxido de sodio (NaOH 0.25 M) en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Calentar las muestras en baño maría a 100 ° C por 30 segundos.
3. Macerar el tejido suavemente usando una barra (*pestle*) de plexiglass de laboratorio.
4. Agregar 40  $\mu$ l de ácido clorhídrico (HCl 0.25M) y 20  $\mu$ l Tris ácido clorhídrico (Tris HCl 0.25M).
5. Colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 100 ° C por 2 min.
6. Diluir las muestras extraídas en agua destilada estéril, usando una relación de 1:1.
7. Medir la concentración (ng/ml) de ADN de las muestras; si es necesario; diluir previo a su aplicación.
8. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 ° C.

**Anexo 5.** Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Hofer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant TM200).

1. Colocar 2 ml de buffer de cuantificación en un cubo (cuvette) limpio y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 µl de muestra de ADN al buffer cuantificador.
3. Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.
4. Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/ml.
5. Vaciar el cubo, enjuagar con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

---

\* Fluorómetro: (Hoefel) TKO-100,  $\lambda_{ex}$  + 365 nm,  $\lambda_{em}$  + 460 nm.

\* Buffer de cuantificación: 10 µl solución para tinción concentrada + 100 ml buffer TNE 1X ( pH=7.4)

**Anexo 6.** Marcadores moleculares SCAR usados en la evaluación de resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

SCAR	RAPD	Patogeno	Tamaño (pb)	Secuencia del SCAR	Gen	Referencia
SAP6	AP6	CBB	820 (Dominante)	GTGACG TCTCCTT AATAGT A GTCACGT CTCAATA GGCAAA	Mayor QTL  Gen =1	Miklas <i>et al.</i> , 2000
SU91	U9	CBB	700 (Dominante)	CCACATC GGTTAA CATGA CCACATC GGTGTC AACGTG A	Mayor QTL  XAN159 <i>bgm-1</i>	Pedraza <i>et al.</i> , 1997
SR2	R2	VMDAF	530/570 (Codominante)	CACACG TGCCCTA CCAAAA T CACAGC TGCCAC AGGTGG GA		Urrea <i>et al.</i> , 1996

**Anexo 7.** Evaluación fenotípica y molecular de 40 líneas F6 de la población X069 y X0104 empleando marcadores SCAR para Xap y VDMAF. Zamorano, 2003.

N°	IDENT.	<i>bgm-1'(1)</i>	<i>bgm-1'(2)</i>	SU 91'(3)	SU 91'(4)	SAP 6'(5)	SAP 6'(6)
		Genotipo	Fenotipo	Genotipo	Fenotipo	Genotipo	Fenotipo
1	X069-153-9-4-3-2	R	R	P	R	P	R
2	X069-153-9-4-3-3	R	R	P	R	P	R
3	X069-153-9-4-3-5	R	R	P	R	P	R
4	X069-153-9-4-3-5	R	R	P	R	P	R
5	X069-157-8-5-1-5	R	R	A	S	P	R
6	X069-157-8-5-2-5	R	R	P	R	P	R
7	X069-157-8-5-6-1	R	R	A	S	P	R
8	X069-157-8-5-6-1	H	S	A	S	P	R
9	X069-157-8-5-6-5	R	R	A	S	P	R
10	X069-157-12-5-1-4	R	R	P	R	P	R
11	X069-157-14-4-1-3	R	R	P	R	P	R
12	X069-157-14-4-3-1	R	R	P	R	P	R
13	X069-157-14-4-5-5	R	R	P	R	P	R
14	X069-157-14-4-5-6	D	S	P	R	P	R
15	X0104-25-2-4-5	H	S	P	R	P	R
16	X0104-25-2-5-1	H	S	P	R	P	R
17	X0104-37-2-1-1	D	S	P	R	P	R
18	X0104-37-2-1-4	D	S	P	R	P	R
19	X0104-37-5-3-4	R	R	P	R	P	R
20	X0104-38-2-1-1	R	R	P	R	P	R
21	X0104-38-2-1-2	H	S	P	R	P	R
22	X0104-38-2-2-1	H	S	P	R	P	R
23	X0104-38-2-2-2	H	S	A	S	P	R
24	X0104-38-2-3-2	D	S	P	R	P	R
25	X0104-38-2-3-3	D	S	P	R	P	R
26	X0104-38-3-4-2	H	S	P	R	P	R
27	X0104-38-3-4-3	D	S	P	R	P	R
28	X0104-38-3-4-4	H	S	P	R	P	R
29	X0104-38-3-4-5	H	S	P	R	P	R
30	X0104-40-1-5-1	D	S	P	R	P	R
31	X0104-45-3-5-1	D	S	P	R	P	R
32	X0104-45-3-5-2	H	S	P	R	P	R

33	X0104-45-3-5-5	R	R	P	R	P	R
34	X0104-45-5-1-4	R	R	P	R	P	R
35	X0104-49-5-1-4	R	R	P	R	P	R
36	X0104-52-5-5-2	R	R	A	S	P	R
37	X0104-52-5-5-3	R	R	P	R	P	R
38	X0104-52-5-5-5	R	R	P	R	P	R
39	X0104-52-5-5-6	R	R	P	R	P	R
40	X0104-52-5-6-2	R	R	P	R	P	R
T1	VAX 3	D	S	P	R	P	R
T2	Catrachita	D	S	A	S	A	A
P1	Tío Canela 75	R	R	A	S	P	R
P2	VAX 6	D	R	P	R	A	A

R= recesivo (resistente); D= dominante (susceptible); H= heterocigoto (susceptible)  
P= presencia; A= ausencia