

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación

**Evaluación fenotípica del germoplasma de frijol común para
resistencia a *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.)**

Estudiante

Antonio Lorenzo Lacayo Lopez

Asesores

Raphael Wesly Colbert, Ph.D.

Carolina Avellaneda Barbosa, Ph.D.

Iveth Yassmin Rodriguez, M.Sc.

Honduras, junio 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ROGEL CASTILLO

Director Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	7
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Materiales y Métodos.....	13
Reactivación de los Aislamientos de <i>Macrophomina phaseolina</i>	15
Prueba de Patogenicidad de Aislamientos de <i>Macrophomina phaseolina</i>	15
Adaptación de Técnica de Inoculación de <i>Macrophomina phaseolina</i> en Plantas de Frijol, Utilizando la Técnica de Incisión en el Tallo.....	19
Técnica de Incisión en el Tallo.....	20
Resultados y Discusión.....	24
Prueba de Patogenicidad de Aislamientos de <i>Macrophomina phaseolina</i>	24
Técnica de Incisión en el Tallo.....	34
Conclusiones	42
Recomendaciones.....	43
Referencias.....	44

Anexos.....46

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Líneas avanzadas de frijol común seleccionados para evaluar la resistencia a <i>Macrophomina phaseolina</i> Tassi (Goid.)	13
Cuadro 2 Genotipos de frijol común utilizados para evaluar la técnica de incisión en el tallo infectadas con <i>Macrophomina phaseolina</i> Tassi (Goid.).....	20
Cuadro 3 Las evaluaciones de severidad en las plantas se realizaron a los 7, 14 y 21 días después de inoculación (Viteri y Linares 2017).....	22
Cuadro 4 Severidad de daño (escala 1-9) de tres lecturas de la prueba de patogenicidad en plántulas de 44 genotipos de frijol desarrolladas en cámaras húmedas e inoculadas con sorgo infectado con el aislamiento Mph 32	25
Cuadro 5 Severidad de daño (escala 1-9) de tres lecturas de la prueba de patogenicidad en plantulas de 44 genotipos de frijol crecidas en cámaras húmeda e inoculadas con sorgo infectado con el aislamiento Mph 9	27
Cuadro 6 Separación de medias DUNCAN de severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura de 44 genotipos de frijol a los 10 días después de la inoculación con los aislamientos Mph 32 y Mph 9 en cámaras húmedas.....	30
Cuadro 7 Severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura de 12 genotipos de frijol a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación con el aislamiento Mph 32 en casa malla, utilizando la técnica de incisión en el tallo (Viteri y Linares 2017). Zamorano, Honduras, 2021	34
Cuadro 8 Severidad de daño (mm de tejido dañado) promedio de lectura de 12 genotipos de frijol a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación con el aislamiento Mph 32 en casa malla, utilizando la técnica de incisión en el tallo. Zamorano, Honduras, 2021.....	37

Cuadro 9 Separación de medias DUNCAN de severidad de daño (mm de tejido dañado) promedio de lectura en 12 genotipos de frijol a los 21 días después de la inoculación con Mph 32 en casa malla, utilizando la técnica de incisión en el tallo. Zamorano, Honduras, 2021	38
Cuadro 10 Separación de medias por DUNCAN de severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura en 12 genotipos de frijol a los 21 días después de la inoculación con Mph 32 en casa malla, utilizando la técnica de incisión en el tallo. Zamorano, Honduras, 2021	39

Índice de Figuras

Figura 1 Escala 1-9 para evaluar la severidad de pudriciones radicales y del hipocotíleo en plántulas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) modificada de Rojas-Triviño y Arredondo (2016).....	18
Figura 2 Severidad de daño causado por Mph 32 y Mph 9 de <i>M. phaseolina</i>	19
Figura 3 Severidad de daño causado por Mph 32 de <i>M. phaseolina</i>	22

Índice de Anexos

Anexo A Evolución de severidad (escala 1-9) promedio en el tiempo de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Mph 9 en cámaras húmedas e inoculadas con semilla de sorgo infectado.....	46
Anexo B Evolución de severidad (escala 1-9) promedio en el tiempo de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Mph 32 en cámaras húmedas e inoculadas con semilla de sorgo infectado.....	47
Anexo C Severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura del día 10 de la prueba de patogenicidad del aislamiento Mph 32 en plántulas de 44 genotipos de frijol, crecidas en cámaras húmedas e inoculadas con semilla de sorgo infectada. Zamorano, Honduras, 2021.....	48
Anexo D Severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura del día 10 de la prueba de patogenicidad del aislamiento Mph 9 en plántulas de 44 genotipos de frijol, crecidas en cámaras húmedas e inoculadas con semilla de sorgo infectada. Zamorano, Honduras, 2021.....	49

Resumen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) está siendo afectado por efectos del cambio climático, presentando períodos de sequía prolongados, exceso de lluvias e incrementos en la temperatura. Estas condiciones han generado un incremento en desarrollo de patógenos causantes de enfermedades como la pudrición gris del tallo causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.). El objetivo del presente estudio fue validar las técnicas de inoculación y evaluar la resistencia de líneas avanzadas de frijol común a *M. phaseolina* para su uso futuro en el mejoramiento genético. Se realizaron dos ensayos: 1) una prueba de patogenicidad para 44 líneas de frijol común inoculadas con dos aislamientos del hongo (Mph 32, Mph 9) las cuales fueron evaluadas a los 2, 5 y 10 días posterior a la inoculación; 2) y una optimización de la metodología de inoculación con *M. phaseolina* (Mph 32) utilizando la técnica de incisión en el tallo en 12 líneas de frijol en invernadero, las cuales fueron evaluadas a los 7, 14 y 21 días posterior a la inoculación. Según los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad los genotipos SQF 1616-22, Amadeus 77, SQF 1559-15, SQF 1559-11, SQF 1559-6, Seda, SQF 1559-20 y L88-63 presentaron resistencia a *M. phaseolina* (Mph 32 y Mph 9). La metodología de optimización de la técnica de incisión en el tallo resultó óptima para inducir la enfermedad, en este ensayo el genotipo G-122 presentó resistencia a *M. phaseolina* (Mph 32).

Palabras clave: Pudrición gris del tallo, resistencia genética, severidad de daño, técnica de inoculación.

Abstract

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is being affected by the effects of climate change, with prolonged periods of drought, excess rainfall, and temperature increases. These conditions have generated an increase in the development of pathogens causing diseases such as ashy stem blight caused by the fungus *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.). The objective of the present study was to validate inoculation techniques and evaluate the resistance of advanced common bean lines to *M. phaseolina* for future use in breeding. Two trials were conducted: 1) a pathogenicity test for 44 common bean lines inoculated with two isolates of the fungus (Mph 32, Mph 9) which were evaluated at 2-, 5- and 10-days post inoculation; 2) and an optimization of the inoculation methodology with *M. phaseolina* (Mph 32) using the cut stem method on 12 bean lines in greenhouses which were evaluated at 7-, 14- and 21-days post inoculation. According to the results obtained in the pathogenicity test, the genotypes SQF 1616-22, Amadeus 77, SQF 1559-15, SQF 1559-11, SQF 1559-6, Seda, SQF 1559-20 and L88-63 showed resistance to *M. phaseolina* (Mph 32 and Mph 9). The optimization methodology of the cut stem inoculation technique was effective in inducing the disease, in this trial genotype G-122 showed resistance to *M. phaseolina* (Mph 32).

Key words: Ashy stem blight, genetic resistance, damage severity, inoculation technique.

Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más importantes en la dieta diaria a nivel mundial, su consumo contribuye a la salud por su alto contenido en proteínas, vitaminas y minerales. Es uno de los granos básicos más importantes después del maíz, tanto en términos de superficie cosechada como por la cantidad de grano que consume la población. El frijol común es la principal fuente de proteína para la población rural y urbana de menores ingresos en Centroamérica y el Caribe (Rosas et al. 2000). El frijol es cultivado principalmente en una agricultura a pequeña escala, en la que los pequeños agricultores son dependientes de los patrones de precipitación de las lluvias y bajo uso de insumos lo que favorece el desarrollo de enfermedades resultando en rendimientos bajos e inestables.

El hongo *M. phaseolina* es identificado como un patógeno que se distribuye a través del mundo con más de 500 especies de plantas hospederas, este hongo pertenece a la clase Deuteromicetes. *M. phaseolina* es un hongo que produce microesclerocios formando una estructura vegetativa de resistencia dentro de los tejidos que infecta y sobrevive de forma libre en el suelo (Pearson et al. 1984). De esa manera, este hongo causa la pudrición carbonosa de más de 300 especies de cultivos, obstruyendo el tejido vascular de las raíces y en algunas zonas del tallo que son aledañas al suelo. Las condiciones ambientales indicadas para propiciar su acción sobre el hospedero susceptible son principalmente las altas temperaturas y poca humedad dentro del suelo. Se señala que la identificación adecuada de organismos patógenos de las plantas que se cultivan es un factor crítico al momento de establecer estrategias de manejo y control de enfermedades (Laurentín et al. 2013).

La infección de *M. phaseolina* inicia cuando los microesclerocios, que tienden a sobrevivir durante un periodo de 1 a 3 años, penetra el sistema radicular de la planta. Tomando en cuenta que mientras más temprana ocurra la infección del hospedero se obtendrá un daño mayor. Las

condiciones climáticas adversas limitan la producción agrícola debido a que los cultivos enfrentan los efectos de los cambios climáticos que se observan en el mundo. Honduras y Centro América son afectados por períodos frecuentes de sequía y están siendo afectados por los efectos del calentamiento global. Porch et al. (2007) estiman que la producción agrícola se afectará por un aumento gradual de temperaturas anualmente. Esta variación del clima está ocasionando periodos de sequía prolongadas o periodos de exceso de lluvias que dificultan la producción agrícola.

La pudrición gris del tallo causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid) es una enfermedad que se observa con más frecuencia en Centro América y El Caribe (CA/C) debido a los efectos del cambio climático. El desarrollo de esta enfermedad se ve favorecida bajo condiciones de altas temperaturas (28-35°C) y períodos de sequía (Mihail y Taylor 1995). Sin embargo, esto es un problema serio en zonas bajas y cálidas de CA/C. En Zamorano, la pudrición gris del tallo ha sido reportada en ensayos de tolerancia a la sequía conducidos desde hace 15 años (Frahm et al. 2003). Actualmente, es uno de los énfasis principales de investigación de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Cultivos de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la resistencia de líneas avanzadas de frijol común a *M. phaseolina* agente causal de la enfermedad de la pudrición gris del tallo. Los objetivos específicos de la presente investigación fue optimizar la metodología de inoculación de *M. phaseolina* empleando la técnica de incisión en el tallo, evaluar la resistencia de 44 líneas avanzadas de frijol común a los aislamientos Mph 9 y Mph 32 de *M. phaseolina*, mediante pruebas de patogenicidad *in vitro*.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó durante los meses de diciembre del 2020 a junio del 2021, en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada, y casa malla de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Cultivos (UIDCI), en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

El estudio se inició con 44 líneas avanzadas de frijol común seleccionadas por su adaptación a estrés de sequía y baja fertilidad (SQF) (Cuadro 1). Para evaluar la resistencia de las líneas de frijol se realizó la prueba de patogenicidad utilizando los aislamientos Mph 9 y Mph 32 de *M. phaseolina*. Los aislamientos Mph 32 y Mph 9, se colectaron en el lote 21 y lote B y C, Zona II de Zamorano, respectivamente (Jimenes 2018).

Cuadro 1

*Líneas avanzadas de frijol común seleccionados para evaluar la resistencia a *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.)*

No.	Genotipos	Procedencia
1	SQF 1554A-2	PIF
2	SQF 1559-1	PIF
3	SQF 1559-11	PIF
4	SQF 1559-14	PIF
5	SQF 1559-15	PIF
6	SQF 1559-20	PIF
7	SQF 1559-30	PIF
8	SQF 1559-6	PIF
9	SQF 1611-1	PIF
10	SQF 1611-12	PIF
11	SQF 1611-15	PIF
12	SQF 1611-2	PIF
13	SQF 1612-29	PIF

No.	Genotipos	Procedencia
14	SQF 1612-30	PIF
15	SQF 1613-12	PIF
16	SQF 1613-14	PIF
17	SQF 1613-19	PIF
18	SQF 1613-2	PIF
19	SQF 1616-1	PIF
20	SQF 1616-11	PIF
21	SQF 1616-12	PIF
22	SQF 1616-13	PIF
23	SQF 1616-14	PIF
24	SQF 1616-19	PIF
25	SQF 1616-20	PIF
26	SQF 1616-21	PIF
27	SQF 1616-22	PIF
28	SQF 1616-25	PIF
29	SQF 1616-26	PIF
30	SQF 1616-4	PIF
31	SQF 1616-50	PIF
32	SQF 1616-7	PIF
33	Amadeus 77	PIF
34	Seda	PIF
35	BAT 477	CIAT
36	G-122	CIAT
37	BRT 103-182	PIF
38	MHN 322-49	PIF
39	TARS-LFR1	USDA/TARS-ARS
40	TARS-MST1	USDA/TARS-ARS
41	PR 1217-16	UPR
42	MER 2212-28	PIF
43	SEQ 342-87	PIF

No.	Genotipos	Procedencia
44	L88-63	PIF

Nota. CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia; PIF: Programa de Investigaciones en Frijol de la EAP/Zamorano;

USDA/TARS-ARS: Estación Experimental de Agricultura Tropical del Departamento de Agricultura de los EEUU en Puerto Rico; UPR:

Universidad de Puerto Rico-Mayagüez.

Reactivación de los Aislamientos de *Macrophomina phaseolina*

Se preparó medio de cultivo (Papa Dextrosa Agar 9 g + 125 mL agua destilada) y se esterilizó en autoclave a 121°C /20 minutos, se dejó enfriar durante un período de 1 hora. Anteriormente, los aislamientos fueron inoculados en papel filtro de 10 x 10 mm y almacenados dentro de una bolsa plástica estéril. Luego se mantuvieron en una incubadora refrigerada a -20°C dentro del laboratorio de Biotecnología. Con una pinza estéril, se retiraron los aislamientos de *M. phaseolina*, para luego cortar con un bisturí el papel filtro que porta el aislamiento, colocándolos dentro de los platos Petri con medio PDA. Finalmente, se rotularon los platos Petri y se incubaron durante 7 días a 28°C en completa oscuridad.

Prueba de Patogenicidad de Aislamientos de *Macrophomina phaseolina*

Preparación del Inoculó en Semilla de Sorgo

Se utilizaron 25 g de sorgo (*Sorghum spp.*) para realizar el incremento del inóculo de los aislamientos de *M. phaseolina*. En un beaker de 100 mL se realizó un lavado de la semilla con agua destilada, luego se colocó el sorgo en platos Petri con 50 mL de agua destilada. Además, se realizó una doble esterilización consecutiva en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121°C, luego se dejó enfriar el sorgo durante un periodo de 12 horas, para realizar el mismo procedimiento nuevamente dos veces consecutivas asegurando que el material está libre de microorganismos. Los aislamientos de *M. phaseolina* se colocaron en medio PDA durante un período de cuatro días. Los aislamientos se inocularon dentro de una cámara de flujo laminar desinfectada con alcohol al 70%. En la cual, se colocaron 18 semillas de sorgo con una pinza estéril, cubriendo alrededor del crecimiento

micelial del hongo de cada uno de los platos Petri. Se obtuvo un total de 8 platos Petri inoculados por cada aislamiento, para un total de 16 medios inoculados entre ambas inoculaciones. Así mismo, se rotularon y se sellaron con papel parafinado cada uno de los medios. Después se incubaron los platos Petri durante 7 días a 28°C en completa oscuridad, para que cada aislamiento invadiera cada semilla de sorgo.

Germinación de Semilla y Producción de Plántulas de Frijol

Para realizar la prueba de patogenicidad se utilizaron 33 líneas-F9 de las poblaciones SQF + 11 testigos. La semilla de los 44 genotipos se pre germinó durante 3 días en el laboratorio en bandejas estériles con papel germinador. De la misma manera, se utilizaron 22 canaletas de PVC, lavadas y desinfectadas con una solución de cloro al 2.5%, como sustrato se utilizó arena estéril y se colocaron dentro de una casa malla. Luego se sembraron 396 semillas pre germinadas colocando dos líneas de frijol por canaleta para la producción de plántulas. Por último, se utilizó un sistema de riego automatizado programado para regar 20 segundos cada 30 min.

Inoculación de Plántulas con los Aislamientos

Se prepararon 132 cámaras húmedas de plástico de material PET transparente (Tereftano de Polietileno) con una medida de 16 x 13 x 18cm con tapa, la cual fue esterilizada con una solución al 70% de alcohol y por dentro se le colocó papel estéril para mantener la humedad de la cámara evitando la evaporación rápida del agua destilada estéril. Luego se colocaron bases plásticas con celdas de 12 x 8 cm sobre el papel. En el día 7 de siembra en las canaletas de PVC, se seleccionaron las plántulas de cada línea de frijol, tomando en cuenta que tuvieran un buen desarrollo radicular y una condición sana. Se movilizaron las plántulas seleccionadas dentro del laboratorio, se lavaron con agua destilada y se colocaron tres plántulas por cada cámara húmeda. Una vez preparadas las cámaras húmedas, con una pinza estéril se colocaron tres granos de sorgo por plántula, en la base de la raíz principal e inicio de las raíces secundarias. Al tener inoculadas todas las plántulas con el aislamiento,

se sellaron las cámaras húmedas, seguidamente incubadas durante 10 días a una temperatura de 26°C con un fotoperiodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Durante los 10 días a las cámaras húmedas, se realizaron aspersiones con agua destilada cuando se detectaba un nivel bajo de agua, con el fin de mantener la humedad interna y mantener una atmósfera adecuada para el desarrollo del patógeno.

Evaluación de la Severidad

Las evaluaciones de severidad en las plántulas se realizaron a los 2, 5 y 10 días después de haber sido inoculadas por el hongo, utilizando una escala 1-9 de severidad de daño modificada de Rojas-Triviño y Arredondo (2016) (Figura 1).

Figura 1

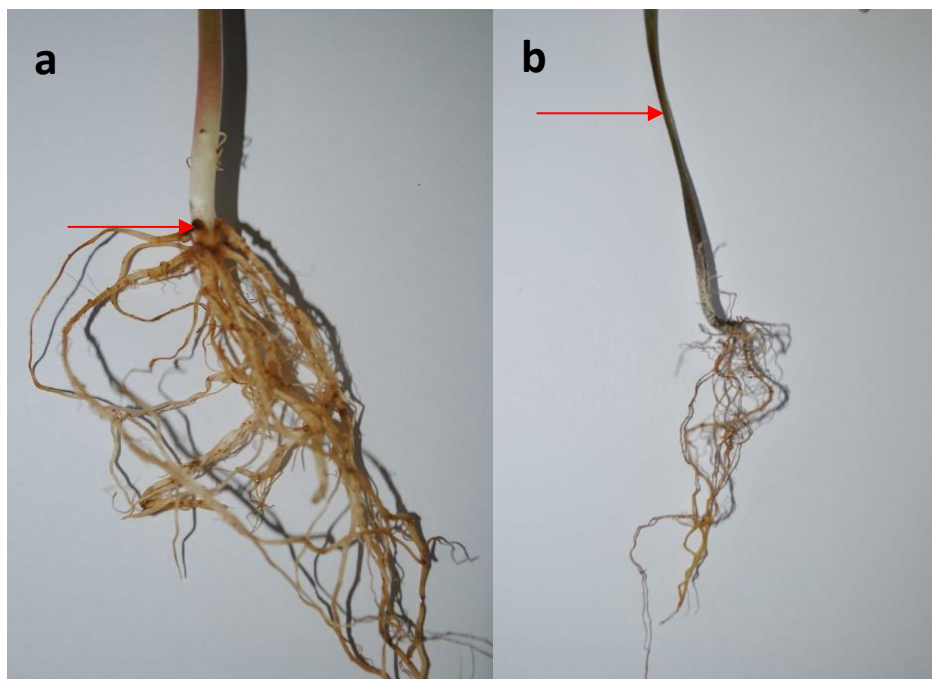
Escala 1-9 para evaluar la severidad de pudriciones radicales y del hipocotíleo en plántulas de frijol

(Phaseolus vulgaris L.) modificada de Rojas-Triviño y Arredondo (2016)

Grado	Descripción				
1	Síntomas iniciales de pudrición en el punto de inoculación y tejido circundante (1% del área afectada).				
3	Cambio de color o ablandamiento de tejidos en el punto de inoculación y tejido circundante (5% del área afectada).				
5	Hipocotíleo y raíces afectadas. Pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido (10% del área afectada).				
7	Hipocotíleo y raíces afectadas. Pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido y presencia de signos del patógeno (25% del área afectada).				
9	Hipocotíleo y raíces afectadas. Pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido y presencia de signos del patógeno (50% del área afectada).				
Grado 1	3	5	7	9	
%	1	5	10	25	50
Etapa fenológica V3					
Área negra= tejido enfermo; área blanca= tejido sano; área punteada= cotiledones.					

Figura 2

Severidad de daño causado por Mph 32 y Mph 9 de *M. phaseolina*.



Nota. Las flechas rojas muestran el daño en *Phaseolus* spp. Genotipo resistente a Mph 9, a. SQF 1616-22 (índice de 1.00) donde presentó síntomas iniciales de pudrición en el punto de inoculación. Genotipo susceptible a Mph 32, b. PR 1217-16 (índice de 8.77) donde el hipocotíleo y raíces son afectadas, pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido y presencia de signos del patógeno.

Adaptación de Técnica de Inoculación de *Macrophomina phaseolina* en Plantas de Frijol, Utilizando la Técnica de Incisión en el Tallo

Se evaluó una técnica de inoculación utilizando un grupo de 12 líneas avanzadas de frijol, dentro de este grupo se incluyeron líneas con reacción susceptible y resistente que fueron identificadas en ensayos previos (Cuadro 1). Para la siembra se utilizó semilla de frijol desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%, y pre germinada durante tres días en condiciones de laboratorio. Luego en casas malla, la semilla pregerminada se sembró en maceteros con un diámetro de 20 cm de diámetro a razón de 3 plantas por macetero. El macetero contenía compost pasteurizado a 63°C durante 30 min para evitar el crecimiento de patógenos que afectaran el desarrollo adecuado de las plantas de frijol.

Técnica de Incisión en el Tallo

El Cuadro 2 describe cuales fueron los 12 genotipos de frijol avanzado utilizados en el ensayo evaluando la técnica de incisión en el tallo (Viteri y Linares 2017) y su respectiva procedencia, para evaluar la resistencia a el aislamiento Mph 32 de *M. phaseolina*.

Cuadro 2

Genotipos de frijol común utilizados para evaluar la técnica de incisión en el tallo infectadas con Macrophomina phaseolina Tassi (Goid.)

No.	Genotipos	Procedencia
1	Amadeus 77	PIF
2	BAT 477	CIAT
3	BRT 103-182	PIF
4	G-122	CIAT
5	L88-63	PIF
6	MER 2212-28	PIF
7	MHN 322-49	PIF
8	PR 1217-16	UPR
9	Seda	PIF
10	SEQ 342-87	PIF
11	TARS-LFR1	USDA/TARS-ARS
12	TARS-MST1	USDA/TARS-ARS

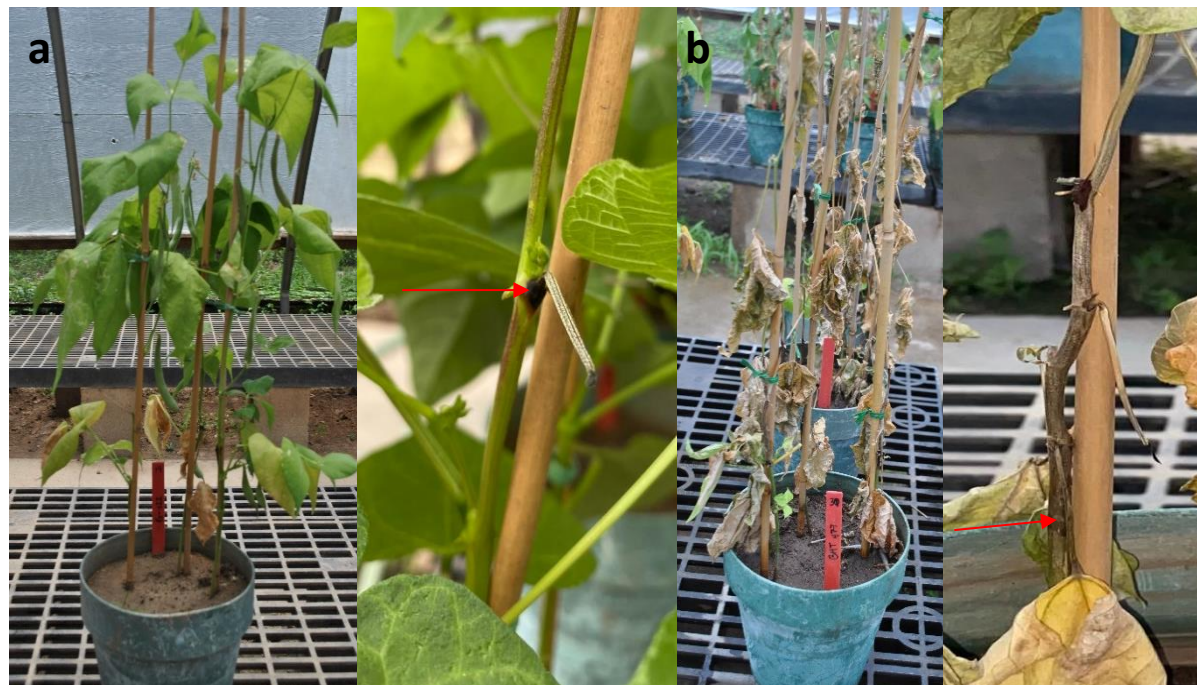
Nota. CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia; PIF: Programa de Investigaciones en Frijol de la EAP/Zamorano; USDA/TARS-ARS: Estación Experimental de Agricultura Tropical del Departamento de Agricultura de los EEUU en Puerto Rico; UPR: Universidad de Puerto Rico-Mayagüez.

Se utilizaron platos Petri con medio PDA con ácido láctico y se colocó un disco de 5 mm con inóculo del aislamiento de *Mph32*. Los platos se rotularon con marcador permanente y se incubaron durante 48 horas a 28°C en completa oscuridad. Las plantas fueron sembradas en maceteros en casa malla, utilizando suelo y arena (2:1), se inocularon utilizando la técnica de incisión en el tallo

desarrollada por Viteri y Linares (2017), indicado en el cuadro 3. Así mismo, se realizó la primera inoculación a los 28 días después de la siembra. Seguidamente, utilizando un bisturí estéril, se realizó un corte en el cuarto entrenudo del tallo principal dejando una longitud de 2.0 cm entrenudo, y se colocó un disco de 2 mm con inóculo del aislamiento encima de la herida manteniendo el contacto directo del moho con la herida. Luego se colocó un disco de 2 mm dentro de una punta Eppendorf de 200 μ L y se introdujo el tallo dentro de ella. De la misma manera, se procedió a realizar una segunda inoculación 7 días después de la primera inoculación con el mismo procedimiento, manteniendo a 35-60% de humedad a una temperatura promedio de 37°C de día y 30°C en la noche (Viteri y Linares 2017) (Figura 3).

Figura 3

Severidad de daño causado por Mph 32 de M. phaseolina



Nota. Las flechas rojas muestran el daño en Phaseolus spp. Genotipo resistente, a. G-122 (índice de 2.8) donde *M. phaseolina* no alcanzó el primer nudo debajo del punto de inoculación, incluso después de 2 inoculaciones/ planta. Planta susceptible, b. BAT 477 (índice de 8.33) donde *M. phaseolina* pasó el tercer nudo después de la inoculación y causó la muerte de la planta (Cuadro 3).

Cuadro 3

Las evaluaciones de severidad en las plantas se realizaron a los 7, 14 y 21 días después de inoculación (Viteri y Linares 2017)

Grado	Descripción
1	No hay signos de infección en el entrenudo inoculado.
3	Invasión de <i>M. phaseolina</i> no pasa el primer nudo.
5	Invasión de <i>M. phaseolina</i> pasa el primer nudo.
7	Invasión de <i>M. phaseolina</i> pasa el segundo nudo.

Grado	Descripción
9	Invasión de <i>M. phaseolina</i> pasa el tercer nudo con o sin muerte de la planta.

Nota. Utilizando una escala (1-9) de severidad de daño, donde 1= no hay signos de infección en el entrenudo inoculado; 3= invasión de *M. phaseolina* no pasa el primer nudo, 5= invasión de *M. phaseolina* pasa el primer nudo; 7= invasión de *M. phaseolina* pasa el segundo nudo; 9= invasión de *M. phaseolina* pasa el tercer nudo con o sin muerte de la planta. Los valores 1-3 se consideran resistentes, 4-6 intermedios y 7-9 susceptibles (Viteri et al. 2015).

Manejo de los Ensayos

El manejo y control de los ensayos en casas malla se hicieron manteniendo un buen crecimiento y desarrollo de las plantas de frijol. Se proporcionaron riegos diarios para mantener la humedad adecuada para las plantas. El control de insectos se realizó de manera preventiva según recomendaciones obtenidas. No se realizó control de enfermedades debido a que evitamos controlar la pudrición gris y afectar la infección y desarrollo de este.

Unidad y Diseño Experimental

Para la prueba de patogenicidad y la técnica de incisión en el tallo se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con medidas en el tiempo repetidas en el tiempo con tres repeticiones por línea. Las variables a medir fueron severidad de daño (escala 1-9) y la longitud (mm) de las secciones de tallo afectadas por la enfermedad. Para la prueba de patogenicidad la unidad experimental fue una cámara húmeda con tres plantas y para la técnica de incisión en el tallo un macetero con tres plantas.

Análisis Estadístico

Los datos de ambos ensayos se analizaron utilizando el programa estadístico SAS versión 9.4. Se realizaron análisis de varianza y separación de medias Duncan con una probabilidad de 5%.

Resultados y Discusión

Prueba de Patogenicidad de Aislamientos de *Macrophomina phaseolina*

En la prueba de patogenicidad evaluando la resistencia de 44 genotipos inoculados con sorgo infectado con los aislamientos Mph 32 y Mph 9 en cámaras húmedas, las plántulas presentaron los primeros síntomas a los 2 días después de la inoculación, correspondiendo al período de incubación del patógeno. Se observó que las cámaras húmedas son un sistema, que le proporciona a los hongos las condiciones de temperatura y humedad necesarias para aumentar su metabolismo. Así mismo, se pudo observar clorosis foliar, marchitez, seguida de necrosis y defoliación. Finalmente, la muerte de las plántulas susceptibles ocurrió a los 10 días después de la inoculación. Las manifestaciones de la enfermedad estuvieron asociadas a la pudrición vascular, presentando lesiones que invadieron la corteza y haces vasculares con severidad variable (Cubillos Hijosa et al. 2011). Así mismo, se utilizó como referencia una escala de daño (1-9) modificada por Rojas-Triviño y Arredondo (2016) (Figura 1).

Según lo mencionado por Higuera (1991), no se recomienda las evaluaciones de la resistencia a *M. phaseolina* en condiciones controladas, dado a que en sus experimentos evaluando diferentes técnicas de inoculación se obtuvo una baja asociación con los resultados en campo. Esto se debe al efecto del ambiente, así como el uso reducido de sustrato en maceteros o a patrones de infección diferentes que ocurren con el cultivo de semillas en agar colonizado, en raíces o en hipocótilos en contacto con el inóculo.

Los cuadros 4 y 5 muestran los promedios de tres lecturas de severidad de daño tomado a los 2, 5 y 10 días después de la inoculación con los aislamientos Mph 9 y Mph 32, y se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos.

Cuadro 4

Severidad de daño (escala 1-9) de tres lecturas de la prueba de patogenicidad en plántulas de 44 genotipos de frijol desarrolladas en cámaras húmedas e inoculadas con sorgo infectado con el aislamiento Mph 32

No.	Genotipos	Día 2	Día 5	Día 10
1	PR 1217-16 [†]	2.11abcde	5.44abcd	8.77a
2	BAT 477	1.44cde	3.66defgh	8.33ab
3	SQF 1559-30	1.88bcde	3.44efghi	8.33ab
4	SQF 1612-29	2.88abc	5.66abc	8.11abc
5	MHN 322-49	2.55abcde	6.33a	8.11abc
6	BRT 103-182	1.66bcde	5.22abcde	8.00abc
7	G-122	3.66a	6.11ab	8.00abc
9	SQF 1613-19	2.55abcde	4.33bcdef	7.88abc
8	SQF 1611-15	1.22de	3.11fghij	7.66abcd
10	SQF 1611-2	3.22ab	5.33abcd	7.66abcd
11	SQF 1616-19	1.66bcde	2.77fghijk	7.66abcd
12	SQF 1616-25	1.66bcde	3.66defgh	7.44abcde
13	SQF 1616-11	3.66a	4.33bcdef	7.22abcdef
14	SQF 1612-30	1.88bcde	3.88cdefgh	7.00abcdef
15	SQF 1554A-2	1.88bcde	2.66fghijk	7.00abcdef
16	TARS-LFR1	2.77abcd	3.44efghi	7.00abcdef
17	SQF 1611-1	2.55abcde	3.44efghi	6.77abcdefg
18	SQF 1613-12	2.55abcde	3.00fghij	6.77abcdefg
19	SQF 1613-14	2.33abcde	4.11cdefg	6.55abcdefgh
20	MER 2212-28	1.33cde	2.55fghijk	6.55abcdefgh
21	SQF 1559-14	2.33abcde	3fghij	5.88bcdefghi
22	SQF 1616-12	1.66bcde	3.88cdefgh	5.88bcdefghi
23	SQF 1559-1	1.66bcde	1.66ijk	5.55cdefghi

No.	Genotipos	Día 2	Día 5	Día 10
24	TARS-MST1	1.22de	2.33ghijk	5.22defghij
25	SQF 1616-13	1.88bcde	2.55fghijk	5.00efghijk
26	SQF 1616-26	1.44cde	2.11hijk	4.77fghijkl
27	SQF 1616-50	1.44cde	1.66ijk	4.44ghijklm
28	SQF 1616-7	1.88bcde	3.00fghij	4.33ghijklmn
29	SQF 1616-14	1.44cde	2.55fghijk	4.33ghijklmn
30	SQF 1616-1	2.11abcde	3.00fghij	4.11hijklmno
31	SQF 1616-20	1.00e	1.00k	4.11hijklmno
32	SQF 1616-21	1.88bcde	2.77fghijk	3.88ijklmno
33	SQF 1613-2	2.33abcde	2.77fghijk	3.55ijklmnop
34	Seda	1.00e	1.00k	3.00jklmnop
35	SQF 1616-22	1.44cde	2.00hijk	2.77jklmnop
36	Amadeus 77	1.44cde	1.66ijk	2.66klmnop
37	SEQ 342-87	1.00e	1.00k	2.55klmnop
38	SQF 1616-4	1.00e	1.66ijk	2.33lmnop
39	SQF 1611-12	1.00e	1.00k	2.11mnop
40	SQF 1559-15	1.00e	1.00k	1.88nop
41	SQF 1559-11	1.00e	1.00k	1.88nop
42	SQF 1559-6	1.22de	1.22jk	1.66op
43	SQF 1559-20	1.00e	1.33jk	1.66op
44	L88-63	1.00e	1.00k	1.22p
	Valor p	0.003	<0.0001	<0.0001
	R ²	0.6	0.78	0.83
	CV (%)	40.4	30.8	24.01

Nota. †Letras diferentes indican diferencia significativa entre los genotipos en el mismo día.

Los resultados de la prueba de patogenicidad con sorgo infectado con el aislamiento Mph 32 en 44 genotipos de frijol indicaron que la severidad aumenta con el tiempo (día 2, 5 y 10), a excepción

de los genotipos L88-63, SEQ 342-87, Seda, SQF 1616-20, SQF 1611-12, SQF 1559-6, SQF 1559-15, SQF 1559-11 y SQF 1559-1 que obtuvieron baja severidad, los cuales se mantuvieron durante los días 2 y 5, luego en el día 10 la severidad de daño incrementó.

Cuadro 5

Severidad de daño (escala 1-9) de tres lecturas de la prueba de patogenicidad en plantulas de 44 genotipos de frijol crecidas en cámaras húmeda e inoculadas con sorgo infectado con el aislamiento Mph 9

No.	Genotipos	Día 2	Día 5	Día 10
1	SQF 1613-2 [†]	1.44ghi	4.00a	5.11a
2	SQF 1612-30	3.22a	3.88a	4.55ab
3	MHN 322-49	1.44ghi	3.00abcd	4.44abc
4	MER 2212-28	2.44abcde	3.44ab	4.22abcd
5	SEQ 342-87	3.00ab	3.44ab	4.00bcde
6	BAT 477	2.00cdefgh	3.33abc	3.88bcdef
7	SQF 1612-29	2.77abc	2.77bcde	3.55bcdef
9	SQF 1613-12	2.44abcde	2.44bcdefgh	3.44cdefh
8	SQF 1559-30	2.00cdefgh	2.44bcdefgh	3.33defhi
10	SQF 1616-13	2.22bcdefg	2.66bcdef	3.22defhi
11	PR 1217-16	1.88defgh	2.33bcdefghi	3.22defhi
12	SQF 1616-4	1.66efghi	2.33bcdefghi	3.22defhi
13	SQF 1611-12	2.22bcdef	2.33cdefghi	3.22defhi
14	L88-63	1.33hi	2.66bcdef	3.00efhij
15	SQF 1559-20	2.66abcd	3.00abcd	3.00efhij
16	SQF 1554A-2	2.22bcdefg	2.22cdefghi	2.88efhijk
17	SQF 1616-1	1.22hi	1.66efghij	2.77fhiijkl
18	BRT 103-182	1.66efghi	2.11defghij	2.77fhiijkl
19	SQF 1559-1	1.22hi	2.33bcdefghi	2.66hijklm

No.	Genotipos	Día 2	Día 5	Día 10
20	SQF 1559-14	2.00cdefgh	2.00defghij	2.66hijklm
21	SQF 1611-15	1.22hi	2.55cdefgh	2.66hijklm
22	Amadeus 77	1.44ghi	2.22cdefghi	2.66hijklm
23	SQF 1559-11	2.33bcdef	2.33bcdefghi	2.66hijklm
24	Seda	1.44ghi	1.55fghij	2.44hijklm
25	SQF 1611-1	1.55fghi	1.55fghij	2.44hijklm
26	SQF 1616-12	1.88defgh	2.44bcdefgh	2.44hijklm
27	SQF 1613-14	1.55fghi	2.33bcdefghi	2.33hijklm
28	SQF 1559-15	1.33hi	1.33hij	2.33hijklm
29	SQF 1611-2	1.33hi	1.55fghij	2.33hijklm
30	SQF 1559-6	2.00cdefgh	2.00defghij	2.22ijklm
31	SQF 1616-14	1.22hi	1.44ghij	2.22ijklm
32	TARS-MST1	1.44ghi	1.66efghij	2.00jklmo
33	SQF 1616-19	1.66efghi	1.66efghij	1.88jklmo
34	SQF 1616-50	1.22hi	1.44ghij	1.88jklmo
35	SQF 1613-19	1.44ghi	1.77efghij	1.77klmo
36	SQF 1616-25	1.22hi	1.44ghij	1.66lmo
37	G-122	1.33hi	1.55fghij	1.55mo
38	SQF 1616-26	1.00i	1.00j	1.55mo
39	SQF 1616-7	1.00i	1.00j	1.44o
40	SQF 1616-11	1.22hi	1.22ij	1.44o
41	SQF 1616-21	1.22hi	1.44ghij	1.44o
42	SQF 1616-20	1.00i	1.00j	1.33o
43	TARS-LFR1	1.33hi	1.33hij	1.33o
44	SQF 1616-22	1.00i	1.00j	1.00o
	Valor p	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	R ²	0.72	0.73	0.80
	CV (%)	25.69	27.25	21.98

Nota. [†]Letras diferentes indican diferencia significativa entre los genotipos en el mismo día.

Según los resultados obtenidos, después de la inoculación con el aislamiento Mph 9, la mayoría de los genotipos presentaron aumento en la severidad de daño con respecto al tiempo. Así mismo, se observó que los genotipos SQF 1554A-2, SQF 1559-11, SQF 1559-14, SQF 1559-15, SQF 1559-6, SQF 1611-1, SQF 1612-29, SQF 1613-12, SQF 1616-11, SQF 1616-19, SQF 1616-20, SQF 1616-26 y SQF 1616-7 obtuvieron baja severidad de daño los cuales se mantuvieron durante los días 2 y 5, luego en el día 10 la severidad de daño incremento. Se puede señalar que al día 2, los genotipos SQF 1559-20, SQF 1613-14, SQF 1613-19, SQF 1616-12, SQF 1616-21 y G-122 obtuvieron baja severidad de daño, luego en el día 5 la severidad de daño incremento, manteniendo la misma severidad de daño al día 10. Sin embargo, los genotipos SQF 1616-22 y TARS-LFR1 obtuvieron baja severidad de daño, el cual se mantuvo durante los 2, 5 y 10 días.

Cabe destacar que en los genotipos L88-63, SEQ 342-87, PR 1217-16, MER 2212-28, MHN 322-49, BRT 103-182, BAT 477, Seda, Amadeus 77, SQF 1616-50, SQF 1616-4, SQF 1616-25, SQF 1616-14, SQF 1616-13, SQF 1616-1, SQF 1613-2, SQF 1612-30, SQF 1611-2, SQF 1611-15, SQF 1611-12, SQF 1559-30 y SQF 1559-1 se observó que la severidad de daño incremento con respecto al tiempo (día 2, 5 y 10).

El Cuadro 6 muestra la severidad de daño promedio de lectura de los 44 genotipos de frijol a los 10 días después de la inoculación con los aislamientos Mph 9 y Mph 32 en cámaras húmedas. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los genotipos.

Cuadro 6

Separación de medias DUNCAN de severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura de 44 genotipos de frijol a los 10 días después de la inoculación con los aislamientos Mph 32 y Mph 9 en cámaras húmedas

Mph-9				Mph-32			
No.	Genotipos	Severidad	Rango	No.	Genotipos	Severidad	Rango
1	SQF 1613-2	5.11a [†]	4-6	1	PR 1217-16	8.77a	7-9
2	SQF 1612-30	4.55ab	4-6	2	BAT 477	8.33ab	7-9
3	MHN 322-49	4.44abc	4-6	3	SQF 1559-30	8.33ab	7-9
4	MER 2212-28	4.22abcd	4-6	4	SQF 1612-29	8.11abc	7-9
5	SEQ 342-87	4.00bcde	4-6	5	MHN 322-49	8.11abc	7-9
6	BAT 477	3.88bcdef	4-6	6	BRT 103-182	8.00abc	7-9
7	SQF 1612-29	3.55bcdef	4-6	7	G-122	8.00abc	7-9
8	SQF 1613-12	3.44cdefh	1-3	8	SQF 1613-19	7.88abc	7-9
9	SQF 1559-30	3.33defhi	1-3	9	SQF 1611-15	7.66abcd	7-9
10	SQF 1616-13	3.22defhi	1-3	10	SQF 1611-2	7.66abcd	7-9
11	PR 1217-16	3.22defhi	1-3	11	SQF 1616-19	7.66abcd	7-9
12	SQF 1616-4	3.22defhi	1-3	12	SQF 1616-25	7.44abcde	7-9
13	SQF 1611-12	3.22defhi	1-3	13	SQF 1616-11	7.22abcdef	7-9
14	L88-63	3.00efhij	1-3	14	SQF 1612-30	7.00abcdef	7-9
15	SQF 1559-20	3.00efhij	1-3	15	SQF 1554A-2	7.00abcdef	7-9
16	SQF 1554A-2	2.88efhijk	1-3	16	TARS-LFR1	7.00abcdef	7-9
17	SQF 1616-1	2.77fhijkl	1-3	17	SQF 1611-1	6.77abcdefg	7-9
18	BRT 103-182	2.77fhijkl	1-3	18	SQF 1613-12	6.77abcdefg	7-9
19	SQF 1559-1	2.66hijklm	1-3	19	SQF 1613-14	6.55abcdefgh	7-9

No.	Genotipos	Severidad	Rango	No.	Genotipos	Severidad	Genotipos
20	SQF 1559-14	2.66hijklm	1-3	20	MER 2212-28	6.55abcdefg	7-9
21	SQF 1611-15	2.66hijklm	1-3	21	SQF 1559-14	5.88bcdefghi	4-6
22	Amadeus 77	2.66hijklm	1-3	22	SQF 1616-12	5.88bcdefghi	4-6
23	SQF 1559-11	2.66hijklm	1-3	23	SQF 1559-1	5.55cdefghi	4-6
24	Seda	2.44hijklm	1-3	24	TARS-MST1	5.22defghij	4-6
25	SQF 1611-1	2.44hijklm	1-3	25	SQF 1616-13	5.00efghijk	4-6
26	SQF 1616-12	2.44hijklm	1-3	26	SQF 1616-26	4.77fghijkl	4-6
27	SQF 1613-14	2.33hijklm	1-3	27	SQF 1616-50	4.44ghijklm	4-6
28	SQF 1559-15	2.33hijklm	1-3	28	SQF 1616-7	4.33ghijklmn	4-6
29	SQF 1611-2	2.33hijklm	1-3	29	SQF 1616-14	4.33ghijklmn	4-6
30	SQF 1559-6	2.22ijklm	1-3	30	SQF 1616-1	4.11hijklmno	4-6
31	SQF 1616-14	2.22ijklm	1-3	31	SQF 1616-20	4.11hijklmno	4-6
32	TARS-MST1	2.00jklmo	1-3	32	SQF 1616-21	3.88ijklmno	4-6
33	SQF 1616-19	1.88jklmo	1-3	33	SQF 1613-2	3.55ijklmnop	4-6
34	SQF 1616-50	1.88jklmo	1-3	34	Seda	3.00jklmnop	1-3
35	SQF 1613-19	1.77klmo	1-3	35	SQF 1616-22	2.77jklmnop	1-3
36	SQF 1616-25	1.66lmo	1-3	36	Amadeus 77	2.66klmnop	1-3
37	G-122	1.55mo	1-3	37	SEQ 342-87	2.55klmnop	1-3
38	SQF 1616-26	1.55mo	1-3	38	SQF 1616-4	2.33lmnop	1-3
39	SQF 1616-7	1.44o	1-3	39	SQF 1611-12	2.11mnop	1-3
40	SQF 1616-11	1.44o	1-3	40	SQF 1559-15	1.88nop	1-3
41	SQF 1616-21	1.44o	1-3	41	SQF 1559-11	1.88nop	1-3
42	SQF 1616-20	1.33o	1-3	42	SQF 1559-6	1.66op	1-3
43	TARS-LFR1	1.33o	1-3	43	SQF 1559-20	1.66op	1-3
44	SQF 1616-22	1.00o	1-3	44	L88-63	1.22p	1-3
Valor P		<0.0001				<0.0001	

CV (%)	24.01	21.98
R ²	0.83	0.80

Nota. [†]Letras diferentes indican diferencia significativa entre los genotipos en el mismo día.

Con respecto con la inoculación con el aislamiento Mph 9, se encontró que el genotipo SQF 1616-22 obtuvo el menor índice de severidad en comparación al resto, alcanzando un valor de 1.00. Cabe mencionar que no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre el genotipo SQF 1616-22 y TARS-LFR1, SQF 1616-20, SQF 1616-21, SQF 1616-11 y SQF 1616-7. Con respecto a la inoculación con el aislamiento Mph 32, el genotipo L88-63 obtuvo el menor índice de severidad en comparación al resto de los genotipos, alcanzando un valor de 1.22. De esa manera, el genotipo L88-63 no difiere ($P \geq 0.05$) de los genotipos SQF 1559-20, SQF 1559-6, SQF 1559-11, SQF 1559-15, SQF 1611-12, SQF 1616-4, SEQ 342-87, Amadeus 77, SQF 1616-22 y Seda.

De acuerdo con lo mencionado por (Viteri et al. 2015) los valores 1-3 se consideran resistentes, 4-6 intermedios y 7-9 susceptibles. Cabe mencionar que los genotipos SQF 1616-22, Amadeus 77, SQF 1559-15, SQF 1559-11, SQF 1559-6, Seda, SQF 1559-20 y L88-63 presentaron resistencia ante los dos aislamientos de *M. phaseolina* (Mph 9 y Mph 32). Estos genotipos mantuvieron valores de severidad bajos, alcanzando un rango entre 1.00 y 3.00. Como resultado, la respuesta a los aislamientos Mph 32 y Mph 9 difiere con anteriores estudios que sugieren a BAT 477 como genotipo resistente a la pudrición gris del tallo (Pastor-Corrales y Abawi 1988; Mayék-Pérez et al. 2001).

Según los criterios el aislamiento Mph 9, durante el estudio no se presentaron variedades susceptibles al patógeno, solamente intermedias. Así mismo se identificaron los genotipos SQF 1612-30, MHN 322-49, MER 2212-28, SEQ 342-87, SQF 1612-29 y BAT 477 como líneas de frijol intermedias, alcanzando un rango entre 3.55 a 5.11 (Cuadro 6).

Debe señalarse que según los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad *in vitro* con los aislamientos Mph 32 y Mph 9 de *M. phaseolina*, se encontró que existe mayor resistencia de los

genotipos evaluados al aislamiento Mph 9 (rango 1 a 5.11) que al aislamiento Mph 32 (rango 1.22 a 8.77). Cabe destacar que el estudio realizado por Jimenes (2018), concuerda con el presente estudio, dado que el aislamiento Mph 32 es el más patogénico.

La prueba de patogenicidad permitió identificar la forma que se presentaba la aparición de signos de los ambos aislamientos. De esta manera, se puede observar si existía cambios en la severidad de daño entre los tiempos e identificar los genotipos resistentes a *M. phaseolina*. Según menciona (Agrios 2005), las pruebas de patogenicidad son rápidas, efectivas y facilitan la detección de un agente infeccioso gracias a la rapidez con que se puede observar sus efectos.

Técnica de Incisión en el Tallo

El Cuadro 7 refleja la existencia de diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los genotipos. Cabe mencionar, que los genotipos de frijol tienen diferentes niveles de resistencia a la infección por *M. phaseolina*. Por lo tanto, todos los genotipos de frijol obtuvieron un grado de severidad de daño durante el curso del experimento, lo que indica que no hubo inmunidad o resistencia completa a *M. phaseolina*.

Cuadro 7

Severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura de 12 genotipos de frijol a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación con el aislamiento Mph 32 en casa malla, utilizando la técnica de incisión en el tallo (Viteri y Linares 2017). Zamorano, Honduras, 2021

No.	Genotipos	Día 7	Día 14	Día 21
1	TARS-MST1	3.22bc [†]	8.77a	9.00a
2	MER 2212-28	3.00bc	8.10abc	9.00a
3	BRT 103-182	4.44a	8.33abc	9.00a
4	TARS-LFR1	2.88c	8.33abc	9.00a
5	MHN 322-49	3.00bc	8.44ab	8.66ab
6	L88-63	3.00bc	6.10de	8.33abc
7	BAT 477	3.00bc	6.99cd	8.33abc
9	Seda	3.44bc	5.88de	7.77abc
8	SEQ 342-87	3.11bc	5.10e	7.55bcd
10	Amadeus 77	3.66b	7.10bcd	7.22cd
11	PR 1217-16	2.99bc	3.11f	6.55d
12	G-122	2.66bc	2.66f	2.88e
	Valor p	0.0022	<0.0001	<0.0001
	R ²	0.70	0.92	0.91

No.	Genotipos	Día 7	Día 14	Día 21
	CV (%)	10.93	10.94	8.40

Nota. †Letras diferentes indican diferencia significativa entre los genotipos en el mismo día.

Los resultados con la utilización de técnica de incisión en el tallo indicaron que la severidad aumenta con el tiempo. Todos los genotipos inoculados presentaron aumento en la infestación con el tiempo, a excepción del genotipo G-122. Cabe destacar que las reacciones de los genotipos susceptibles fueron notables después de la segunda inoculación, donde se pudo observar lesiones con tonalidades variantes de café a negro oscuro, las cuales son ocasionadas por el hongo. A medida transcurrieron los días, las lesiones se expandieron rápidamente, alcanzando los tejidos del tallo, hasta matar la plántula 14 a 21 días después de la inoculación. Las evaluaciones en casa malla ofrecieron condiciones favorables constantes para el desarrollo del patógeno y presión de selección uniforme que favorecen la expresión de la reacción del frijol a *M. phaseolina* en un período más corto de tiempo, optimiza el trabajo y reduce el espacio. Es importante mencionar que la variabilidad patogénica y la adaptación de los genotipos a un ambiente en particular son una función importante en el comportamiento de la planta.

Según mencionan Islam MShahidul et al. (2012), las altas temperaturas (más de 27°C) y poca humedad, son las condiciones óptimas para el desarrollo del patógeno *M. phaseolina*. Las temperaturas en las que se desarrollaron los genotipos inoculados se encontraron dentro de las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo. Por esta razón se facilitó la reproducción del hongo. Para la determinación de la susceptibilidad de los genotipos se utilizó los criterios mencionados por Viteri y Linares (2017) quienes indican que las plantas que presentan valores entre 1-3 se consideran resistentes, 4-6 intermedios y 7-9 susceptibles.

Al día 7, todos los genotipos se encontraron con severidad entre 1-3, a excepción del genotipo BRT 103-182 que presentó una severidad de 4.4. Los genotipos TARS-MST1, MER 2212-28, BRT 103-182, TARS-LFR1, MHN 322-49, L88-63, BAT 477, Seda, SEQ 342-87, Amadeus 77 y PR 1217-16 posterior

a la segunda inoculación (día 14) fueron susceptibles (7-9). A diferencia del genotipo G-122 antes mencionado que presentó una severidad constante de 2.6 durante los 21 días de evaluación, esto quiere decir que genero dicho genotipo desarrollo un mecanismo de resistencia contra *M. phaseolina* (Viteri y Linares 2017). De igual manera el genotipo PR 1217-16 también mostró resistencia con un valor menor a 3 hasta el día 14, sin embargo, la severidad de este aumento a 6.5 en el día 21. Según Islam MShahidul et al. (2012), para que exista susceptibilidad al patógeno *M. phaseolina* se necesita realizar tres inoculaciones, estos resultados no concuerdan con aquellos, ya que los genotipos presentaron susceptibilidad al patógeno con dos inoculaciones.

Cabe destacar que la variación existente en las reacciones se puede explicar a la existencia de una variación natural en la virulencia de las poblaciones del hongo. Los resultados obtenidos en el aislamiento Mph 32 utilizando la técnica de incisión en el tallo difieren con anteriores estudios, los cuales reflejan que genotipos como el BAT 477 presenta resistencia a la pudrición gris del tallo. En el presente estudio se observó que BAT 477 a partir del día 14 es considerado susceptible presentado una severidad de 6.9 (día 14) y 8.3 (día 21) (Pastor-Corrales y Abawi 1988; Mayék-Pérez et al. 2001).

Con respecto a lo que mencionaron Islam MShahidul et al. (2012), la realización de múltiples inoculaciones en el tiempo es importante, ya que las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) pueden estar infectadas varias veces en el crecimiento vegetativo y reproductivo, así mismo el uso de múltiples inoculaciones ayuda a identificar genotipos con mayor resistencia a *M. phaseolina*.

El Cuadro 8 indica que existe diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los genotipos. Cabe mencionar, los resultados obtenidos en la severidad de daño utilizando la escala de 1-9 y el área afectada con el avance del hongo están íntimamente relacionados, las plantas que presentaron una mayor severidad (escala 1- 9) fueron los que presentaron un mayor avance en mm del hongo.

Cuadro 8

Severidad de daño (mm de tejido dañado) promedio de lectura de 12 genotipos de frijol a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación con el aislamiento Mph 32 en casa malla, utilizando la técnica de incisión en el tallo. Zamorano, Honduras, 2021

No.	Genotipos	Día 7	Día 14	Día 21
1	BAT 477	4.11d [†]	60.61a	89.00a
2	TARS-LFR1	8.60abcd	63.5a	88.06ab
3	TARS-MST1	12.53abc	61.38a	86.74ab
4	BRT 103-182	15.52a	53.00ab	85.72ab
5	MER 2212-28	4.81cd	48.32ab	79.11ab
6	Seda	13.62ab	45.05ab	75.06ab
7	MHN 322-49	5.33cd	53.53ab	71.47ab
9	SEQ 342-87	7.41bcd	50.28ab	64.86abc
8	L88-63	9.44abcd	40.33abc	63.56abc
10	PR 1217-16	5.53bcd	29.74bc	58.06abc
11	Amadeus 77	10.01abcd	31.28bc	46.33bc
12	G-122	5.27cd	16.94c	28.98c
	Valor p	0.02	0.01	0.05
	R ²	0.61	0.62	0.53
	CV (%)	40.9	29.65	30.60

Nota. [†]Letras diferentes indican diferencia significativa entre los genotipos en el mismo día.

Se puede señalar que al día 7, se encontró un rango de 4.1 a 15.5. El genotipo BAT 477 obtuvo el menor índice de severidad en comparación al resto con un valor de 4.1. Sin embargo, al día 14 se aumentó el índice de superficie afectada con valores desde 16.9 a 63.5 mm. Cabe destacar que el genotipo G-122 obtuvo el menor rango, con un valor de 16.9 mm. Finalmente, a los 21 días se presentó

el mayor grado de severidad de daño, con rangos entre 28.9 a 89.0 mm, se puede inferir que el genotipo G-122 mostró resistencia, ya que obtuvo una menor área de tejido dañada.

El Cuadro 9, refleja las diferencias en avance del hongo en mm entre los genotipos inoculados al día 21. Según el análisis realizado nos indica que si existen diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en el daño por el hongo de tejido en mm en el día 21, esto nos quiere decir que todos los genotipos inoculados al día 21 presentaron el mismo avance en daño de tejidos. Sin embargo, se puede observar que el genotipo G-122 presenta diferencias en cuanto al daño en mm de tejido dañado, indicándonos un avance de 28.98mm al día 21.

Cuadro 9

Separación de medias DUNCAN de severidad de daño (mm de tejido dañado) promedio de lectura en 12 genotipos de frijol a los 21 días después de la inoculación con Mph 32 en casa malla, utilizando la técnica de incisión en el tallo. Zamorano, Honduras, 2021

No.	Genotipos	Tejido dañado (mm)
1	BAT 477	89.00a [†]
2	TARS-LFR1	88.06ab
3	TARS-MST1	86.74ab
4	BRT 103-182	85.72ab
5	MER 2212-28	79.11ab
6	Seda	75.06ab
7	MHN 322-49	71.47ab
9	SEQ 342-87	64.86abc
8	L88-63	63.56abc
10	PR 1217-16	58.06abc
11	Amadeus 77	46.33bc
12	G-122	28.98c

No.	Genotipos	Tejido dañado (mm)
	Valor p	0.05
	R ²	0.53
	CV (%)	30.60

Nota. †Letras diferentes indican diferencia significativa entre los genotipos.

De igual manera se puede observar que los genotipos que presentaron un mayor avance fueron L88-63, SEQ 342-87, MHN 322-49, Seda, MER 2212-28, BRT 103-182, TARS-MST1, TARS-LFR1 y BAT 477, presentando avances de 58.06mm a 89mm. En segundo lugar, se ubicaría el genotipo Amadeus 77 con 46.33mm y por último el genotipo antes mencionado G-122.

En cuanto al análisis realizado para evaluar la severidad (escala 1-9) del daño ocasionado por Mph 32 en casa malla inoculadas con la técnica de incisión en el tallo, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos. Siendo los genotipos TARS-MST1, MER 2212-28, BRT 103-182, MHN 322-49, L88-63, BAT 477 y TARS-LFR1, los cuales presentaron la mayor severidad con valores entre 7.8 y 9. Según la severidad presentada y utilizando como referencia los criterios por (Viteri et al. 2015), estas variedades presentan susceptibilidad a la cepa del hongo Mph-32.

Cuadro 10

Separación de medias por DUNCAN de severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura en 12 genotipos de frijol a los 21 días después de la inoculación con Mph 32 en casa malla, utilizando la técnica de incisión en el tallo. Zamorano, Honduras, 2021

No.	Genotipos	Severidad
1	TARS-MST1	9.00a [†]
2	MER 2212-28	9.00a
3	BRT 103-182	9.00a
4	TARS-LFR1	9.00a
5	MHN 322-49	8.66ab

No.	Genotipos	Severidad
6	L88-63	8.33abc
7	BAT 477	8.33abc
8	Seda	7.77abc
9	SEQ 342-87	7.55bcd
10	Amadeus 77	7.22cd
11	PR 1217-16	6.55d
12	G-122	2.88e
	Valor p	<0.0001
	R ²	0.91
	CV (%)	8.41

Nota. *Letras diferentes indican diferencia significativa entre los genotipos.

En segundo lugar, en cuanto a susceptibilidad se encuentran los genotipos SEQ 342-87, Amadeus 77 y PR 1217-16, presentando valores de severidad de 6.55 hasta 7.55 considerándolas variedades susceptibles. Cabe destacar que la variedad PR 1217-16 se encontraría como variedad con susceptibilidad intermedia al presentar un promedio de severidad menor a 7. Por último, se encuentra el genotipo que presentó la mayor resistencia al aislamiento Mph 32 el genotipo G-122, el cual presentó un promedio en severidad de 2.89 encontrándose como una variedad que presenta resistencia al aislamiento del hongo.

De acuerdo con Abawi y Pastor Corrales (1990), los procedimientos realizados en casa malla o invernadero tiene su ventaja, ya que proporciona las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad, niveles altos y uniformes de inoculó y una incidencia de infección uniforme y alta. Cabe mencionar, que las expresiones de severidad son visibles en poco tiempo.

Según el presente estudio las diferencias entre las reacciones de los genotipos pueden ser relacionado con la inoculación y la evaluación en diferentes etapas de la planta, el método de inoculación utilizado, concentración del inoculo en 2 tapones miceliales y los días para evaluar Mph

32 (Viteri y Linares 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos de las lecturas de severidad, la técnica de incisión en el tallo funciono exitosamente para poder identificar y diferenciar las reacciones de la inoculación en los genotipos de frijol en casa malla.

Conclusiones

1. La metodología en la técnica de incisión en el tallo realizando dos inoculaciones resultó óptima para infectar plántulas de frijol. Se distinguió con éxito diferencias relativas entre los genotipos de frijol y discriminaron entre reacciones de resistencia y de susceptibilidad a *M. phaseolina*, se distinguió G-122 como genotipo resistente con esta técnica. Cabe destacar, que la técnica de incisión en el tallo podría servir como técnica estándar entre los investigadores, debido a su facilidad de uso y múltiples ventajas sobre las pruebas en campo.

2. Mediante las pruebas de patogenicidad se observó una amplia variación en relación con los genotipos de frijol común a los aislamientos patogénicos (Mph 32 y Mph 9) de *M. phaseolina*, detectándose en genotipos con niveles aceptables de resistencia genética a la pudrición gris del tallo en cámaras húmedas. Entre los genotipos resistentes, los más sobresalientes fueron SQF 1616-22, Amadeus 77, SQF 1559-15, SQF 1559-11, SQF 1559-6, Seda, SQF 1559-20 y L88-63. Se observó que los aislamientos (Mph32 y Mph 9) de *M. phaseolina*, no tiene especificidad patogénica y la única forma mediante la cual se podría controlar es a través de la resistencia genética. Sin embargo, realizar evaluaciones medidas en el tiempo de severidad de daño en el tejido ayudo a visualizar el comportamiento del patógeno a través de los días.

Recomendaciones

Se recomienda seguir realizando estudios de severidad del hongo y los diferentes métodos de inoculación, debido a que se encontraron como susceptibles variedades que fueron determinadas como resistentes por otros autores.

Se sugiere realizar evaluaciones en genotipos de frijol de las líneas SQF de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Cultivos (UIDC) para resistencia a la pudrición gris del tallo, a nivel de campo y no en maceteros, utilizando la técnica de incisión en el tallo.

Referencias

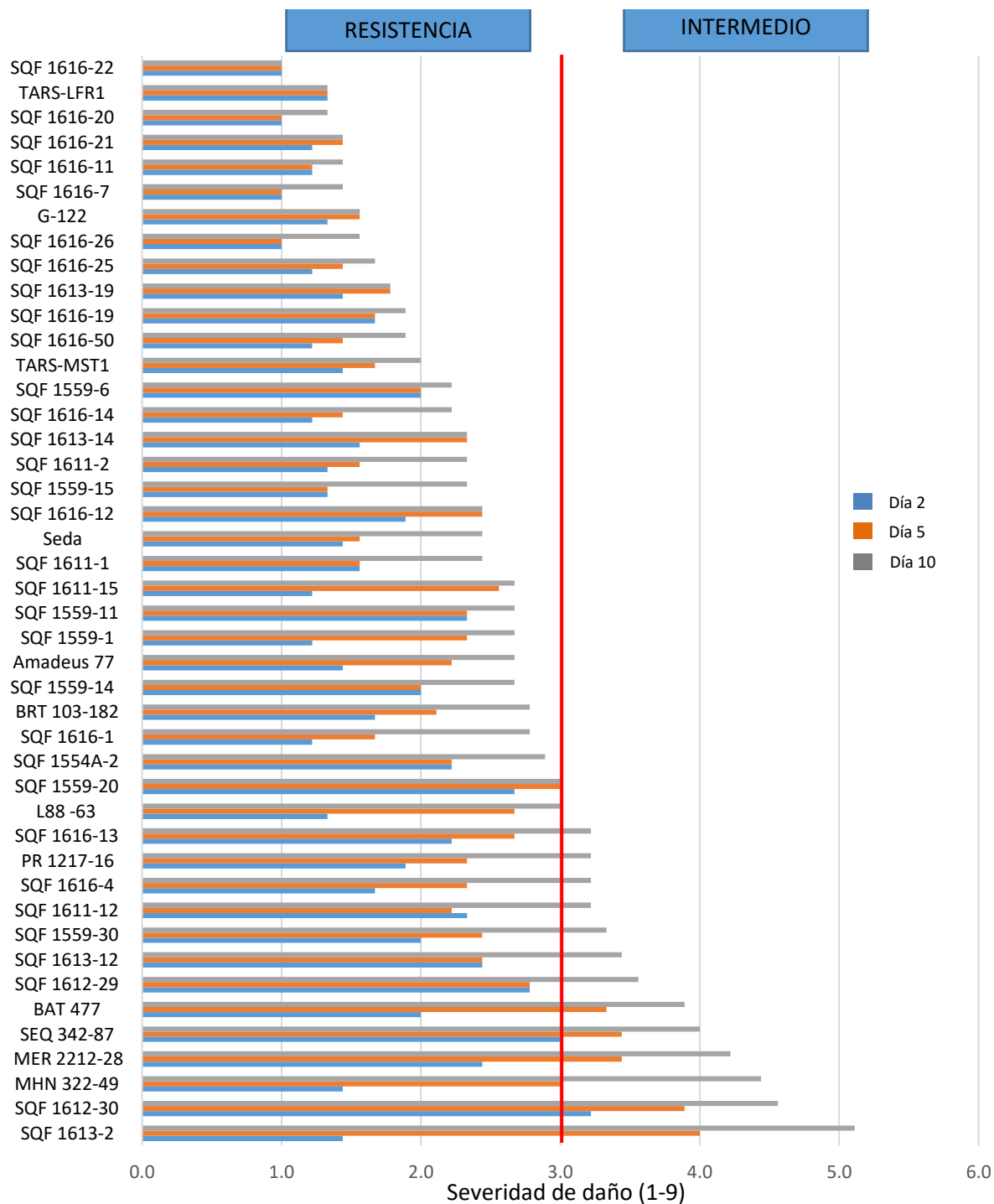
- Abawi GS, Pastor Corrales MA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Cali: CIAT. 114 p. (CIAT. Publication; vol. 35). ISBN: 958-9183-14-X.
- Agrios GN. 2005. Plant pathology. 5ª ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 922 p. ISBN: 0120445654. eng.
- Cubillos Hijosa JG, Redondo AP, Doria LM. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado al complejo "Secadera" en maracuyá, bajo condiciones de invernadero. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín; [consultado el 4 de jul. de 2021]. 1(60):5821–5830. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n1/a08v64n01.pdf>.
- Frahm M, Rosas JC, Mayek N, López E, Acosta JA, Kelly JD. 2003. Resistencia a sequía terminal en frijol negro tropical. Agronomía Mesoamericana; [consultado el 21 de may. de 2021]. 14(2):143–150. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43714203.pdf>.
- Higuera A. 1991. Métodos de inoculación para la detección de germoplasma de frijol resistente la pudrición carbonosa del tallo *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid). Revista de Agronomía; [consultado el 30 de jun. de 2021]. 8(2):73–85.
- Islam MS, Haque MS, Islam MM, Emdad EM, Halim A, Hossen QMM, Hossain MZ, Ahmed B, Rahim S, Rahman MS, et al. 2012. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. BMC Genomics. 13:1–16. eng. doi:10.1186/1471-2164-13-493.
- Jimenes JDP. 2018. Validación de técnicas para el aislamiento y caracterización de la patogenicidad del hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 30 p; [consultado el 28 de may. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6340/1/CPA-2018-T050.pdf>.
- Laurentín H, Ana VC, Viera N. 2013. Morphological characterization and phenetic relationship of improved sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm. Revista de la Facultad de Agronomía UCV. 39(2):51–59. <https://cutt.ly/cnBMorG>.
- Mayék-Pérez N, López-Castañeda C, López-Salinas É, Acosta-Gallegos J, Cumpián-Gutiérrez J. 2001. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol común en condiciones de campo en México. Agrociencia; [consultado el 13 de jun. de 2021]. 35(6):649–661. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/download/148/148>.

- Mihail JD, Taylor SJ. 1995. Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production, and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany*. 73(10):1596–1603. doi:10.1139/b95-172.
- Pastor-Corrales MA, Abawi GS. 1988. Reactions of Selected Bean Accessions to Infection by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*. 72(1):39. doi:10.1094/PD-72-0039.
- C. A. S. Pearson, F. W. Schwenk, F. J. Crowe, K. Kelley. 1984. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*; [consultado el 20 de may. de 2021]. 68(12):1086. https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n12_1086.pdf. doi:10.1094/PD-69-1086.
- Porch T, Bernsten R, Carlos JR, Jahn M. 2007. Climate change and the potential economic benefits of heat-tolerant bean varieties for farmers in Atlántida, Honduras. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 91(3-4):133–148. doi:10.46429/jaupr.v91i3-4.3281.
- Rojas-Triviño A, Arredondo V. 2016. Método de inoculación de patógenos radiculares y del hipocótilo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). [sin lugar]: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 9 p.
- Rosas JC, Castro A, Flores E. 2000. Mejoramiento genético del frijol rojo y negro mesoamericano para centroamérica y el caribe. *Agronomía Mesoamericana*; [consultado el 20 de may. de 2021]. 11(2):37–46. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43711206.pdf>.
- Viteri D, Otto K, Terán H, Schwartz H, Singh S. 2015. Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. *Euphytica*. 204(457-472). doi:10.1007/s10681-015-1366-7.
- Viteri DM, Linares AM. 2017. Reaction of *Phaseolus* spp. genotypes to ashy stem blight caused by *Macrophomina phaseolina*. *Euphytica*. 213(8). doi:10.1007/s10681-017-1989-y.

Anexos

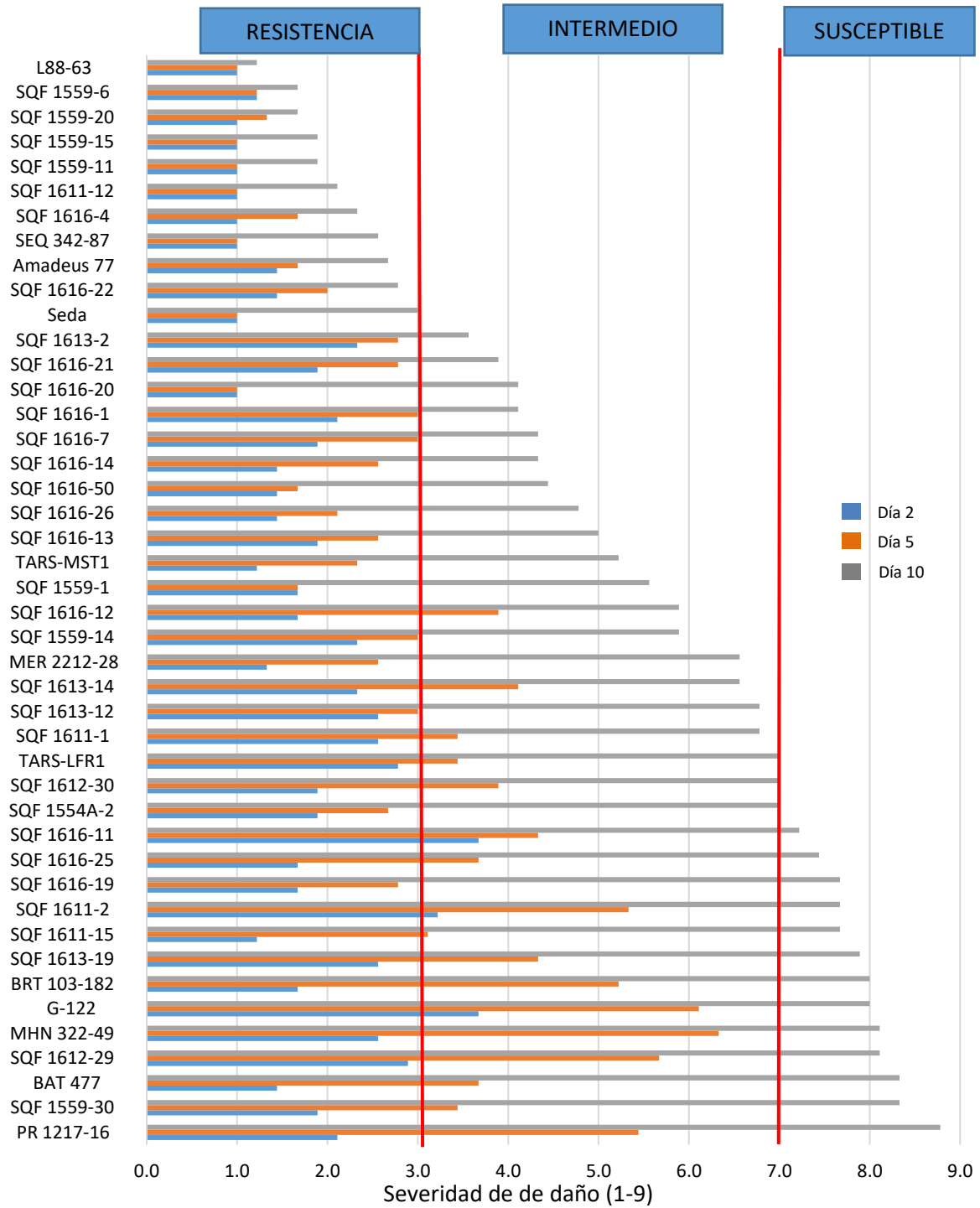
Anexo A

Evolución de severidad (escala 1-9) promedio en el tiempo de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Mph 9 en cámaras húmedas e inoculadas con semilla de sorgo infectado



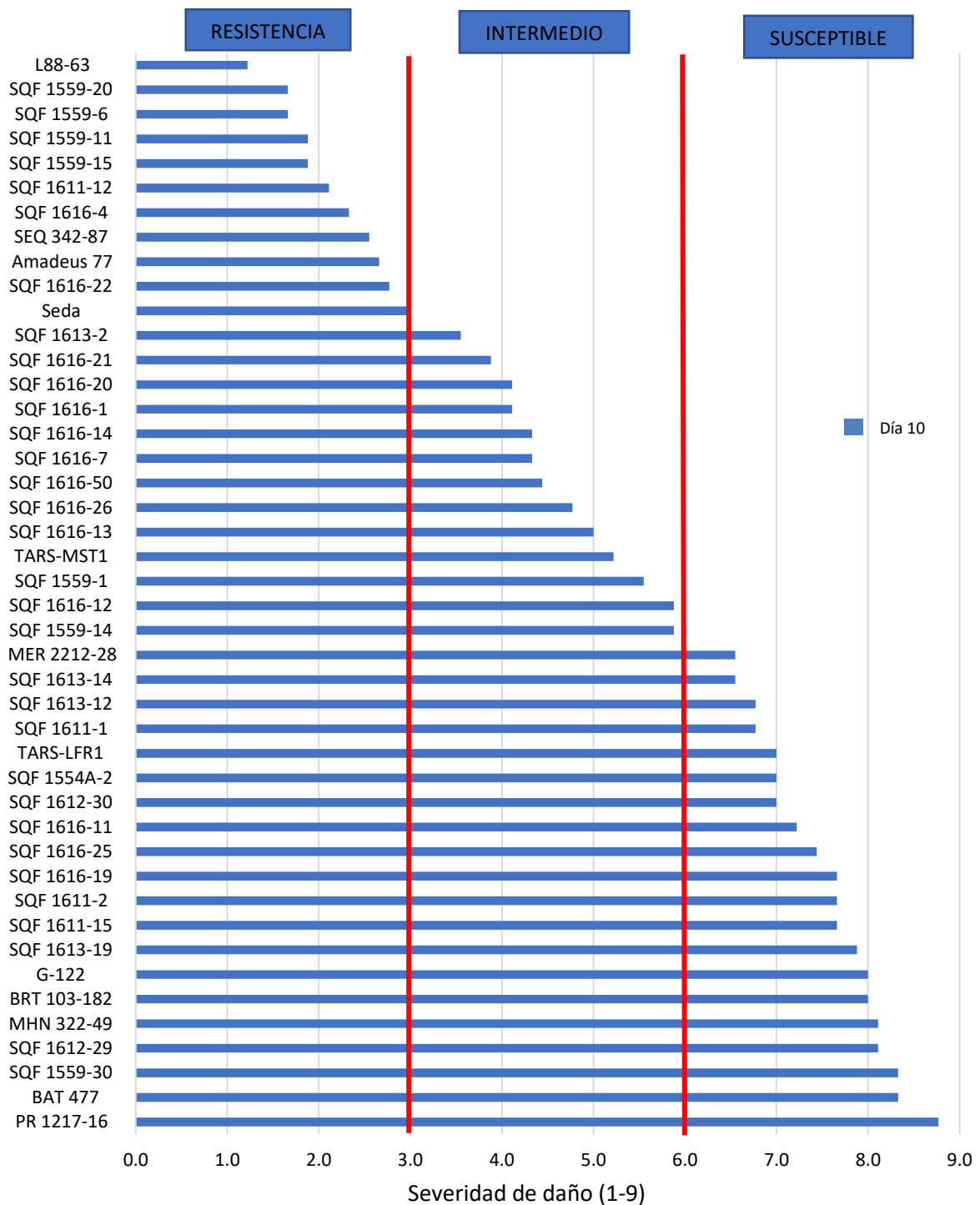
Anexo B

Evolución de severidad (escala 1-9) promedio en el tiempo de la prueba de patogenicidad con el aislamiento Mph 32 en cámaras húmedas e inoculadas con semilla de sorgo infectado



Anexo C

Severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura del día 10 de la prueba de patogenicidad del aislamiento Mph 32 en plántulas de 44 genotipos de frijol, crecidas en cámaras húmedas e inoculadas con semilla de sorgo infectado. Zamorano, Honduras, 2021



Anexo D

Severidad de daño (escala 1-9) promedio de lectura del día 10 de la prueba de patogenicidad del aislamiento Mph 9 en plántulas de 44 genotipos de frijol, crecidas en cámaras húmedas e inoculadas con semilla de sorgo infectado. Zamorano, Honduras, 2021

