

**Manejo de aislamientos de *Rhizoctonia solani* y  
evaluación de la resistencia a mustia hilachosa en  
frijol**

**Jover Abel Martínez Fernández**

**Honduras  
Diciembre, 2003**

**ZAMORANO**

**Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria**

**Manejo de aislamientos de *Rhizoctonia solani* y  
evaluación de la resistencia a mustia hilachosa en  
frijol**

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

Presentado por:

**Jover Abel Martínez Fernández**

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

---

**Jover Abel Martínez Fernández**

Honduras  
Diciembre, 2003

**Manejo de aislamientos de *Rhizoctonia solani* y evaluación de la  
resistencia a mustia hilachosa en frijol**

Presentado por:

Jover Abel Martínez Fernández

Aprobado:

---

Juan Carlos Rosas, Ph.D.  
Asesor principal

---

Alfredo Rueda, Ph.D.  
Coordinador Área Temática

---

María Mercedes Doyle, Ph.D.  
Asesor

---

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

---

Phil A. Arneson, Ph.D.  
Asesor

---

Antonio Flores, Ph.D  
Decano Académico

---

Jorge Venegas, Ing. Agr.  
Asesor

---

Kenneth Hoadley, D.B.A.  
Rector

## **DEDICATORIA**

A Dios.

A mi padre Tirzo y a mi madre Celina.

A mis hermanos Luis, Eva Maria y Gloria Mabel.

A mi novia Claudia.

A toda mi familia y amigos.

A la colonia paraguaya.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, las Virgencitas de Caacupé y María Auxiliadora y Don Bosco que me han dado la fuerza para llegar a mi objetivo.

A mis padres y mejores amigos Tirzo y Celina que siempre me acompañaron y me alentaron, especialmente en los momentos más difíciles con mucho amor y comprensión.

A mis hermanos Luis Augusto, Eva María, y Gloria Mable que me apoyaron en todo momento.

A Claudia por su amor, comprensión y apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A Jorge Venegas (Valle) por su amistad, comprensión, confianza, dedicación, tiempo y consejos. Mil gracias valle por ayudarme a llegar a la meta final.

Al Doctor Rosas por su apoyo y confianza. Muchas gracias Doctor.

A Kirichi (Juan Carlos) y Ladilla (Juan José) por haberme soportado toda mi estadía en Zamorano y ser como mis hermanos.

A Henry y Carlos Roberto por su amistad y apoyo.

A la familia Martínez - Valle por el cariño, la amistad y el apoyo que me han brindado.

A la familia Monge – Fuentes por su gran cariño comprensión y por considerarme parte de su familia.

Al grupo del Programa de Frijol de Zamorano: Luwbia, Byron, Luz María, Tomasa y los demás trabajadores que me han guiado en la realización de mi tesis.

## **AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES**

Al Fondo Dotal Suizo por el financiamiento brindado en los tres primeros años en Zamorano.

A la Nippon Foundation por el financiamiento brindado durante mi cuarto año.

Al Programa de Investigaciones en Frijol, Programa Bean/Cowpea CRSP, por el apoyo para la ejecución de este trabajo.

## RESUMEN

Martínez Fernández, Jover Abel. 2003. Manejo de aislamientos de *Rhizoctonia solani* y evaluación de la resistencia a la mustia hilachosa en frijol. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 26 p.

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los granos básicos de mayor importancia para los habitantes de Centroamérica. Los principales problemas de los bajos rendimientos son debido al ataque de enfermedades que lo afectan. Una de ellas es la mustia hilachosa, causada por *Rhizoctonia solani* (forma sexual *Thanatephorus cucumeris*) que se presenta en regiones con altas temperaturas (mayor a 30°C) y humedad relativa (mayor a 80%). La tolerancia genética es el método más viable y económico para su manejo. El objetivo del estudio fue adaptar técnicas para el aislamiento de *R. solani*, y evaluar germoplasma de frijol con fines de mejoramiento de la resistencia a la mustia hilachosa. Se introdujeron dos cepas de *R. solani* de la Universidad de Nebraska, Lincoln (H32 y H39); adicionalmente, se aislaron tres muestras de *R. solani* de las localidades de Jamastrán, Sabaneta y Los Limones, Honduras. Se evaluó la virulencia de las cepas y aislamientos en casa de malla. Se sembraron dos parcelas de poblaciones de selección recurrente de Puerto Rico (F4:6) y Zamorano (F6) en el lote de Zorrales, Zamorano, Honduras. Se evaluó la severidad e incidencia con las cepas H32 y H39 de *R. solani* y se seleccionaron las 15 líneas más resistentes de cada población. Diez líneas de la población de Puerto Rico y nueve en la población de Zamorano tienen como línea padre a VAX 6. También se inocularon y evaluaron líneas diferenciales de frijol para mustia hilachosa observándose diferencias significativas de severidad pero no de incidencia. En el análisis de virulencia en la casa de malla, las cepas H32 y H39 y el aislamiento de Jamastrán, presentaron virulencia; pero el aislamiento de Los Limones presentó mayor patogenicidad que los anteriores. De las líneas diferenciales, VAX 6 presentó la menor severidad e incidencia. Las líneas avanzadas de selección recurrente de Puerto Rico y Zamorano, que tuvieron los menores grados de incidencia y severidad foliar, son descendientes de la línea VAX 6. Se deben seguir evaluando las líneas seleccionadas en este estudio y realizar pruebas con diferentes aislamientos en ambientes diversos, para obtener variedades resistentes para una amplia zona geográfica.

**Palabras clave:** Cepas, diferenciales, germoplasma, inoculación, *Phaseolus vulgaris*, selección recurrente, tolerancia genética, virulencia.

## CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| Portada.....  | i         |
| Portadilla.....   | ii        |
| Autoría.....  | iii       |
| Páginas de firmas.....  | iv        |
| Dedicatoria.....  | v         |
| Agradecimientos.....  | vi        |
| Agradecimientos a patrocinadores.....   | vii       |
| Resumen.....  | viii      |
| Contenido.....  | ix        |
| Índice de cuadros.....  | x         |
| Índice de gráficos.....   | xi        |
| Índice de figuras.....  | xii       |
| Índice de anexos.....   | xiii      |
| <br>  |           |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>  |
| <br>  |           |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>3</b>  |
| UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....  | 3         |
| AISLAMIENTOS.....   | 3         |
| Aislamiento y conservación.....   | 3         |
| Producción de inóculo.....  | 4         |
| EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA.....  | 5         |
| Evaluación fenotípica de poblaciones de selección recurrente en campo.....                | 5         |
| Evaluación fenotípica de diferenciales de mustia hilachosa (Prueba de patogenicidad)..... | 5         |
| Ensayo de campo.....  | 5         |
| Ensayo en casa de malla.....  | 5         |
| Variables evaluadas y su medición.....  | 5         |
| Diseño estadístico.....   | 6         |
| <br>  |           |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>7</b>  |
| AISLAMIENTOS.....   | 7         |
| Aislamiento y conservación.....   | 7         |
| EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA.....  | 7         |
| Evaluación fenotípica de poblaciones de selección recurrente en campo.....                | 7         |
| Evaluación fenotípica de diferenciales de mustia hilachosa (Prueba de patogenicidad)..... | 10        |
| Ensayo de campo.....  | 10        |
| Ensayo en casa de malla (comparación de virulencia).....                                  | 12        |
| <br>  |           |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>13</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>RECOMENDACIONES</b> .....            | 14 |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> ..... | 15 |
| <b>ANEXOS</b> .....                     | 17 |

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | Reacción (severidad e incidencia) a la inoculación con los aislamientos de <i>R. solani</i> H32 y H39 del 20 % de las líneas superiores de la población de selección recurrente seleccionada en Puerto Rico. Honduras, 2003.....            | 8  |
| 2 | Reacción (severidad e incidencia) a la inoculación con los aislamientos de <i>R. solani</i> H32 y H39 del 20 % de las líneas superiores seleccionadas de poblaciones de selección recurrente seleccionados en Zamorano. Honduras, 2003..... | 9  |
| 3 | Reacción de severidad e incidencia de la mustia hilachosa en 28 genotipos diferenciales de frijol inoculados con las cepas H32 y H39 de <i>R. solani</i> . Honduras, 2003.....  | 11 |
| 4 | Reacción de severidad de 28 genotipos diferenciales de frijol inoculados con dos cepas y dos aislamientos de <i>R. solani</i> causante de la mustia hilachosa del frijol. Honduras, 2003.....   | 12 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

### Gráfico

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | Relación de la severidad (45 DDS) de líneas seleccionadas en Puerto Rico y Zamorano en las poblaciones de selección recurrente para la resistencia a mustia hilachosa repetidas en ambas poblaciones. Honduras, 2003.....                              | 10 |
| 2 | Relación de la incidencia (% de la planta dañada) a los 45 DDS en líneas seleccionadas en Puerto Rico y Zamorano en las poblaciones de selección recurrente para la resistencia a mustia hilachosa repetidas en ambas poblaciones. Honduras, 2003..... | 10 |

**ÍNDICE DE FIGURAS****Figura**

|   |  |   |
|---|--|---|
| 1 | Hojas desconectadas inoculadas con las cepas H32 y H39.....    | 4 |
| 2 | Escala de severidad de 1 a 9 propuesta por el CIAT (1987)..... | 6 |

## ÍNDICE ANEXOS

### Anexo

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | Protocolo propuesto por Godoy-Lutz para el aislamiento del patógeno de la mustia hilachosa (Godoy-Lutz, Universidad de Nebraska).....                 | 17 |
| 2 | Metodología de producción y cuantificación de inóculo propuesto por Godoy-Lutz para el agente causal de la mustia hilachosa ( <i>R. solani</i> )..... | 19 |
| 3 | Protocolo propuesto por Takegami (2000) para la inoculación de <i>R. solani</i> .....   | 21 |
| 4 | Métodos de conservación de <i>R. solani</i> .....   | 22 |
| 5 | Datos climatológicos durante el periodo de inoculación y de evaluación.....   | 23 |
| 6 | Pedigrí de las líneas seleccionadas de las poblaciones de selección recurrente de Puerto Rico y Zamorano  | 23 |
| 7 | Ciclo reproductivo asexual de <i>Rhizoctonia solani</i> .....   | 25 |
| 8 | Metodología de aislamiento de <i>R. solani</i> , producción de inóculo e inoculación y evaluación de mustia hilachosa.....                            | 26 |

## INTRODUCCIÓN

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

La mustia hilachosa, causada por el hongo *Rhizoctonia solani* (estado asexual), es una de las principales enfermedades limitantes en la producción de frijol en los climas húmedos y cálidos del trópico. Puede ocasionar reducciones en rendimiento del grano hasta el 100% (CIAT, 1982). *Tanathephorus cucumeris* (estado sexual) es un patógeno de casi todas las plantas cultivadas. Su rango de hospederos incluye 200 especies de plantas incluyendo frijol, remolacha, zanahoria, pepino, melón, tomate, sandía, berenjena, forrajes y frutas de plantas no cultivadas (CIAT, 1987).

El desarrollo de la enfermedad está favorecido por temperaturas altas, mayores a 30°C, lluvias intermitentes y humedad relativa cercana al 80% (CIAT, 1982). Las lesiones pueden iniciarse por el micelio y esclerocios (micro y macrosclerocios) que pueden encontrarse en los rastrojos de cosechas anteriores; y también por las basidiosporas, que pueden ser transportadas por el viento. Galindo *et al* (1982), demostraron que la fuente principal del inóculo del hongo en el suelo eran los esclerocios y fragmentos de micelio, los cuales son diseminados en el cultivo por medio de suelo infestado con los propágulos del patógeno.

Los síntomas del frijol conocidos como mustia hilachosa son producidos por el estado sexual y asexual del patógeno. *T. cucumeris* produce lesiones a partir de la diseminación y germinación de las basidiosporas. Las lesiones en la hojas aparecen como numerosas manchas necróticas, pequeñas de 2 a 3 mm de diámetro y de color café o rojo ladrillo con centros de color más claro. En condiciones de alta humedad, las manchas coalescen y forman manchas grandes acuosas. Cuando la humedad es baja, los tejidos necrosados se desprenden dejando la lámina foliar perforada, síntoma que en algunas partes se conoce con el nombre de “ojo de gallo”. En las vainas, las lesiones que provienen de la germinación de basidiosporas aparecen como manchas necróticas pequeñas de forma irregular y de color café, las cuales generalmente permanecen restringidas (CIAT, 1982).

La variabilidad del patógeno se produce por el fenómeno de la anastomosis, que se ha utilizado como un indicativo confiable de dicha variabilidad. Anastomosis se puede

definir como la capacidad del hongo para fusionar sus hifas, mezclar su citoplasma y generar micelio diferente; por lo tanto, se considera que la población de *T. cucumeris* está compuesta por grupos de anastomosis (CIAT, 1982). Inicialmente se reportaron cuatro grupos anastomóticos de *R. solani*, AG-1, AG-2, AG-3 y AG-4; los dos primeros corresponden a la mustia del follaje del frijol y los últimos se relacionan a los daños en papa, crucíferas y lesiones radiculares de varias especies de plantas. Actualmente se han caracterizado nuevos grupos anastomóticos de *R. solani* y cada uno de estos se ha subdividido en otros según estudios culturales y moleculares. Para probar las hipótesis que las poblaciones del patógeno de la mustia hilachosa del frijol en Centro América, Sur América y El Caribe son variables, se examinó la diversidad genética de los aislamientos de campo de la mustia hilachosa, utilizando PCR-RFLP, de las regiones transcribibles del espacio interno y subunidad pequeña ribosomal de la repetición del ADN nuclear (ITS-5.8S-rADN)<sup>1</sup>.

El aporte de este estudio es mejorar los métodos de evaluación para desarrollar plantas altamente resistentes a la mustia hilachosa a través de un enfoque basado en la selección recurrente de poblaciones tolerantes seleccionadas previamente en la Universidad de Puerto Rico y la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La selección recurrente ha sido efectiva para seleccionar características de herencia cuantitativa tales como rendimiento de semillas y resistencia a salta hojas. Los estudios de herencia realizados indican que la resistencia a la mustia es una característica cuantitativa (Beaver *et al*, 2002). Según Godoy *et al* (1992), el uso de variedades tolerantes es considerada una de las estrategias más viables y económicas para el manejo de la mustia hilachosa.

El objetivo general del estudio fue adaptar técnicas para el aislamiento de *R. solani*, y evaluar germoplasma de frijol común con fines de mejoramiento de la resistencia a la mustia hilachosa. En la búsqueda de este objetivo se validaron protocolos para el aislamiento y conservación de *R. solani*; se evaluó la virulencia de los aislamientos de *R. solani* utilizando un vivero de genotipos diferenciales de frijol; también se produjo inóculo para evaluar las poblaciones derivadas de la selección recurrente en condiciones de campo.

---

<sup>1</sup> Graciela Godoy – Lutz. 2003. Técnica para comprobar diversidad genética del agente causal de la mustia hilachosa. Nebraska-Lincoln, EEUU

## MATERIALES Y MÉTODOS

### UBICACIÓN DEL ESTUDIO

La adaptación del protocolo de Godoy - Lutz<sup>1</sup> para el aislamiento y cultivo de *R. solani* se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La implementación del protocolo de Takegami (2000) para la inoculación de *R. solani* en plantas de frijol, se realizó en casas de malla y en el campo. Los ensayos de las poblaciones de selección recurrente y diferenciales de mustia hilachosa se llevaron a cabo en el lote de Zorrales de Zamorano.

### AISLAMIENTOS

#### Aislamiento y conservación

Se introdujeron de la Universidad de Nebraska, Lincoln, EEUU, dos cepas de *R. solani* (H32 y H39) recolectadas en El Barro, Honduras e identificadas por Graciela Godoy-Lutz. Adicionalmente, se recolectaron muestras de tejido de plantas de frijol infectadas con el estado asexual de *R. solani* en las localidades de Jamastrán y Sabaneta de El Paraíso; y Los Limones, municipio de Moroceli, en Francisco Morazán (primer postulado de Koch).

Se adaptó el protocolo propuesto por Godoy–Lutz para el aislamiento y conservación del patógeno de la mustia hilachosa, (segundo postulado de Koch). Se hicieron cortes de lesiones de las hojas infectadas con *R. solani*; se colocaron los cortes en platos petri con medio agar-agua y se observó el crecimiento del hongo a partir de 48 horas de incubación (Anexo 1). Una vez aislado el patógeno se estudió sus características morfológicas en el medio de cultivo, ya que este hongo, al contrario de la mayoría de otros hongos presenta crecimiento micelial rápido e irregular, colonias blancas, ángulo de 90° en las ramificaciones del micelio, y formación de esclerocios y agregados.

Una vez aislado el patógeno se procedió a conservarlo en semilla de remolacha o cosechando sus esclerocios para su uso futuro. En este proceso se tuvo en cuenta que toda conservación de hongos consiste en retardar, mediante alguna técnica, el proceso metabólico del hongo pero conservando su patogenicidad (CIAT, 1981).

La conservación de *R. solani* en semilla de remolacha es estable y viable debido a que hay una relación fuerte entre los exudados de la semilla y el patógeno, haciendo

---

<sup>1</sup> Graciela Godoy – Lutz. 2003. Técnica de aislamiento y conservación de *R. solani*. Nebraska-Lincoln, EEUU.

posible la conservación del hongo por muchos años. Se colocaron de 5-10 semillas estériles de remolacha sobre una colonia de *R. solani* de 48 horas en un medio de papa-dextrosa-agar (PDA). Se extrajeron las semillas luego de siete días de incubación y una vez impregnadas del micelio se colocaron en un plato petri estéril para su secado durante seis días a temperatura ambiente. Posteriormente se guardaron las semillas secas en viales y bajo refrigeración a 4° C (Anexo 4).

La conservación de esclerocios es una técnica muy útil cuando no se tiene disponibilidad de semilla de remolacha; siendo también muy viable ya que estas estructuras son una forma muy efectiva de sobrevivencia de *R. solani* en el campo. Se cosecharon los esclerocios con pinzas estériles del medio agar-agua, donde se producen más esclerocios debido a la falta de nutrientes; y se guardaron en viales o en papel de aluminio a 4° C. Las técnicas de conservación de agentes patógenos producen con el tiempo variación y por lo tanto pérdida de patogenicidad (CIAT, 1981). Por esta razón hay que tener en cuenta todos los factores necesarios antes, durante y después de la conservación para no perder la patogenicidad del agente aislado.

Basándose en el tercer y cuarto postulado de Koch, se inoculó y reaisló *R. solani* empleando la técnica de hojas desconectadas desarrollada por Steadman *et al.* (1997) para evaluar moho blanco en soya y adaptada al frijol por Bautista-Pérez *et al.* (2000). Se inocularon trifolios desconectados de la variedad Tio Canela 75 (susceptible) con las cepas H32 y H39, para acelerar la infección y el reaislamiento de *R. solani*.



**Figura 1.** Hojas desconectadas inoculadas con las cepas H32 y H39.

### **Producción de inóculo**

Se adoptó el método propuesto por Godoy-Lutz<sup>1</sup> para la producción y cuantificación de inóculo de *R. solani* (Anexo 2). Se determinó la concentración final de propágulos ( $1 \times 10^4$  ufc/ml), utilizando el método de número de colonias por plato para obtener un volumen de inóculo adecuado. La inoculación se basó en el protocolo establecido por Takegami (2000), que consiste en la utilización de una bomba de mochila de 15 litros utilizando Tween-20<sup>®</sup> (1-2 gotas por litro) como dispersante y adherente de los propágulos en el follaje del frijol (Anexo 3).

<sup>1</sup> Graciela Godoy – Lutz. 2003. Técnica de conservación producción y cuantificación de inóculo de *R. solani*. Nebraska - Lincoln, EEUU

## EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA

### Evaluación fenotípica de poblaciones de selección recurrente en campo

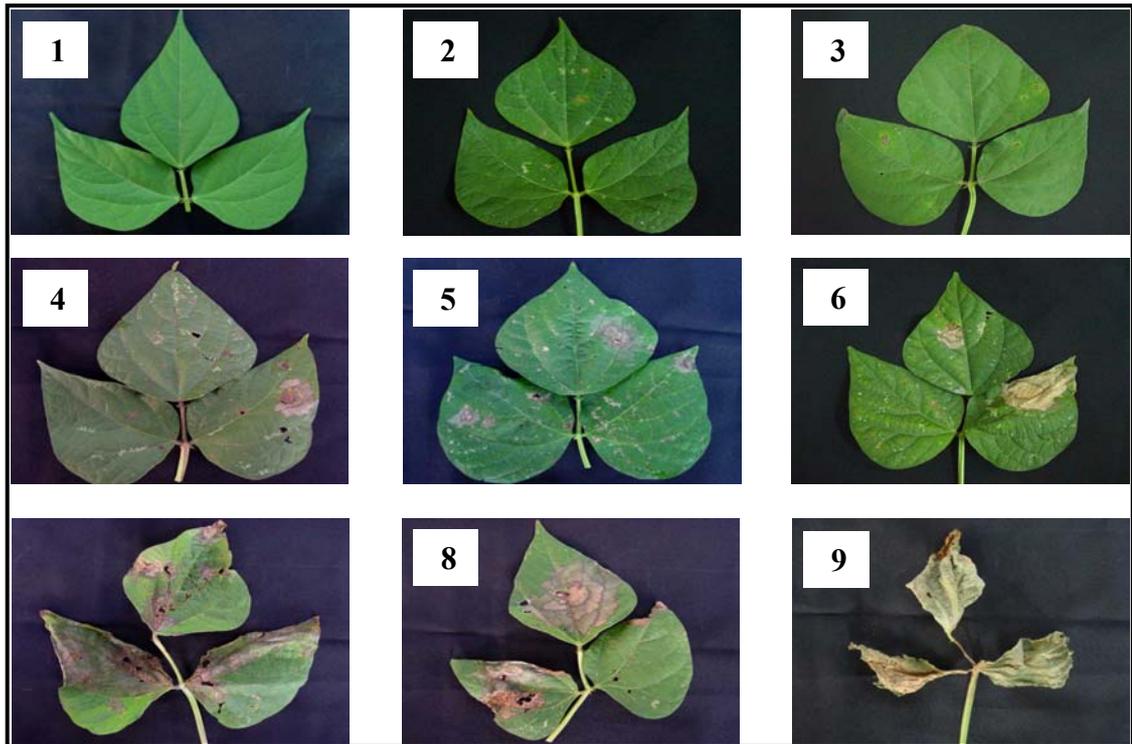
Se sembraron dos parcelas de las poblaciones de selección recurrente en el lote de Zorrales de la Escuela Agrícola Panamericana el 22 de mayo del 2003. Una parcela con las selecciones por resistencia a la mustia hilachosa realizadas en Puerto Rico y la otra con las selecciones obtenidas en Zamorano. La población seleccionada en Zamorano estuvo conformada de 80 líneas avanzadas F6 con tres repeticiones. La población seleccionada en la Universidad de Puerto Rico contenía 75 líneas avanzadas F4:6 con cinco repeticiones. La distancia de siembra en estas dos parcelas fue de 70 cm entre surcos y 10 cm entre plantas. Se obtuvieron 10 plantas/surco en la población de la Universidad de Puerto Rico y 20 plantas/surco en la población de Zamorano, cada bloque para ambas poblaciones contaba con 20 líneas. Las parcelas se inocularon con las cepas de *R. solani* H32 y H39. La primera inoculación se realizó a los 25 DDS con la cepa H39 en la población de Puerto Rico; la segunda inoculación a los 30 DDS con la cepa H32 en la población de Zamorano y la de Puerto Rico. Se realizaron tres evaluaciones, de los síntomas causados por el patógeno; en la primera (45 DDS) y en la segunda (60 DDS) se evaluó la incidencia y severidad de hojas; y en la tercera se evaluaron la incidencia y severidad en las vainas a los 89 DDS. Las condiciones climatológicas promedios, registradas en el periodo de evaluación, fueron de 24 °C de temperatura, 6 mm de precipitación diaria y 83 % de humedad relativa (Anexo 5).

### Evaluación fenotípica de diferenciales de mustia hilachosa (Prueba de patogenicidad)

**Ensayo de campo.** Se sembró una parcela con el grupo de diferenciales de mustia hilachosa en el lote de Zorrales de Zamorano en la misma fecha y condiciones que fueron sembradas las poblaciones de selección recurrente. Esta parcela estuvo constituida por 28 líneas con dos repeticiones. La inoculación de este ensayo fue realizada con la cepa H32 a los 30 DDS y las evaluaciones se realizaron de la misma forma que en las poblaciones de selección recurrente.

**Ensayo en casa de malla.** Se realizó un segundo ensayo para evaluar los diferenciales en casa de malla. Estos fueron inoculados con las cepas H32, H39, y los aislamientos de Los Limones y Jamastrán; también se observó la reacción de las cepas bajo condiciones controladas. Las plantas fueron sembradas en maceteros estándar de 6 pulgadas con dos plantas por macetero y dos repeticiones por grupo de diferenciales. Los primeros síntomas se presentaron de 48 a 72 horas después de la inoculación en condiciones de temperatura y humedad óptimas (28-30 °C y 90%). Se logró mantener alta humedad con la utilización de un sistema de riego con nebulizador sincronizado con un control de tiempo (timer).

**Variables evaluadas y su medición.** Se evaluaron la incidencia (porcentaje del follaje afectado de la planta) y la severidad de los daños utilizando la escala de 1 a 9 propuesta por el CIAT (1987). Esta escala clasifica las reacciones en resistentes (1-3), intermedio (4-6) y susceptible (7-9).



**Figura 2.** Escala de severidad de 1 a 9 propuesta por el CIAT (1987). Esta escala clasifica las reacciones en resistentes (1-3), intermedio (4-6) y susceptible (7-9).

**Diseño estadístico.** Se analizaron los resultados de los ensayos de campo con las dos poblaciones de selección recurrente y el grupo de diferenciales para mustia hilachosa, empleando un modelo de bloques completamente al azar, analizando la varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de 0.05, y la separación de medias cuando las pruebas del análisis de varianza fueron significativas, mediante la prueba de comparación de medias conocida como la diferencia mínima significativa (DMS), con un nivel de significancia de 0.05 de probabilidad de error. Se efectuó un análisis de regresión lineal entre las evaluaciones de cada población de selección recurrente (Zamorano y Puerto Rico). Para estos análisis se utilizó el programa MSTAT-C® (Microcomputer Statistical Program) Versión 1.42.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **AISLAMIENTOS**

#### **Aislamiento y conservación**

Se lograron obtener aislamientos de las muestras de frijol infectadas con el estado asexual del patógeno (*R. solani*), recolectadas en las localidades de Jamastrán y Sabaneta de El Paraíso y Los Limones, municipio de Moroceli en Francisco Morazán. Se conservaron en semilla de remolacha y a bajas temperaturas (4°C), los aislamientos de Jamastrán, Sabaneta y Los Limones y las cepas H32 y H39 de El Barro, los cuales se utilizaron en los estudios de campo y en casa de malla.

### **EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA**

#### **Evaluación fenotípica de poblaciones de selección recurrente en campo**

Se analizaron los dos grupos de poblaciones de selecciones recurrentes de Puerto Rico y Zamorano a través de un análisis estadístico de varianza y separación de medias con un nivel de significancia  $< 0.05$ . Se seleccionó el 20%, del total de líneas, que presentaron mejor desempeño para ambas poblaciones (Cuadro 1 y 2). De las tres evaluaciones realizadas de severidad e incidencia se analizó sólo la primera para el estudio debido a la alta infección del patógeno en las dos últimas evaluaciones. Se seleccionaron las mejores líneas de cada población utilizando como criterio principal la severidad en las hojas, criterio utilizado en otros experimentos realizados por Beaver *et al* (2002).

En el análisis de varianza de las poblaciones de selección recurrente de Puerto Rico se observaron diferencias altamente significativas en las variables evaluadas de severidad ( $p < 0.000$ ) e incidencia ( $p < 0.001$ ). Las medias de la población de Puerto Rico presentó diferencias estadísticas, por lo que se seleccionaron las 15 mejores líneas de acuerdo a la separación de medias (Cuadro 1). Observando el pedigrí de las 15 mejores líneas de la población de Puerto Rico, se pudo notar que 10 de ellas tiene como padre a la línea VAX6 (Anexo 6). Se utilizaron variedades testigos en el experimento para poder compararlas con las líneas avanzadas de selección recurrente, siendo el mejor testigo la variedad VAX 6, que presentó resistencia intermedia alta, mientras que las demás fueron susceptibles o con resistencia intermedia baja.

**Cuadro 1.** Reacción (severidad e incidencia) a la inoculación con los aislamientos de *R. solani* H32 y H39 del 20 % de las líneas superiores de la población de selección recurrente seleccionada en Puerto Rico. Honduras, 2003.

| <b>Líneas</b>       | <b>Severidad</b> | <b>Incidencia</b> |
|---------------------|------------------|-------------------|
| MH 2-18             | 4.6 a*           | 28 a              |
| MH 2-16             | 4.8 ab           | 36 abcde          |
| MH 3-10             | 5.2 abc          | 34 abcd           |
| MH 5-14             | 5.2 abc          | 34 abcd           |
| MH 5-1              | 5.4 abcd         | 42 abcdefgh       |
| MH 2-1              | 5.6 abcde        | 34 abcd           |
| MH 2-2              | 5.6 abcde        | 42 abcdefgh       |
| MH 2-10             | 5.8 abcdef       | 30 ab             |
| MH 53-1             | 6.0 abcdef       | 50 cdefghij       |
| MH 41-18            | 6.2 abcdefg      | 32 abc            |
| MH 59-10            | 6.2 abcdefg      | 48 bcdefghij      |
| MH 2-7              | 6.2 abcdefg      | 48 bcdefghij      |
| MH 55-14            | 6.4 abcdefgh     | 42 abcdefgh       |
| MH 4-9              | 6.4 abcdefgh     | 38 abcdef         |
| MH 43-1             | 6.4 abcdefgh     | 42 abcdefgh       |
| <b>Promedio</b>     | 6.9              | 46.8              |
| <b>Rango (n=75)</b> | (4.6-8.8)        | (28-70)           |
| <b>P</b>            | 0.0001           | 0.0001            |
| <b>DMS (0.05)</b>   | 1.8              | 18.9              |
| <b>CV %</b>         | 21               | 32                |
| <b>Testigos</b>     |                  |                   |
| VAX 6               | 4.8              | 42                |
| Talamanca           | 6.6              | 48                |
| BAT 93              | 7                | 50                |
| Bribri              | 7.4              | 44                |
| Morales             | 7.4              | 66                |
| Tio Canela 75       | 8                | 54                |

**Severidad: (1) Hoja sana – (9) Hoja muerta**      **Incidencia: % de la planta dañada (0 a 100)**

**\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba DMS ( $\alpha = 0.05$ ).**

**En el cuadro 1 aparecen solo las 15 líneas superiores de las 80 líneas evaluadas.**

En la población de selección recurrente de Zamorano, al igual que la de Puerto Rico, se observaron diferencias altamente significativas para las variables de severidad e incidencia. Se seleccionaron al igual que la de Puerto Rico las 15 mejores líneas teniendo como criterio de selección la severidad (Cuadro 2). De las líneas seleccionadas de la población de Zamorano, ocho tienen como padre a la línea VAX 6.

Las diferencias en los niveles de severidad e incidencia entre las poblaciones de selección recurrente de Puerto Rico y Zamorano se debieron a las diferentes fechas de inoculación, Puerto Rico 25 DDS y Zamorano 30 DDS, presentando los menores daños las poblaciones de Zamorano, esto también se debe a que estas plantas se adaptan mejor al lugar, ya que fueron seleccionadas bajo estas condiciones. Los primeros síntomas se presentaron a los cuatro días después de la inoculación, y la evaluación se realizó en la misma fecha para ambas poblaciones (45 DDS).

**Cuadro 2.** Reacción (severidad e incidencia) a la inoculación con los aislamientos de *R. solani* H32 y H39 del 20 % de las líneas superiores seleccionadas de poblaciones de selección recurrente seleccionados en Zamorano. Honduras, 2003.

| <b>Líneas</b>       | <b>Severidad</b> | <b>Incidencia</b> |
|---------------------|------------------|-------------------|
| MH 2-16             | 3.0 a*           | 16.67 abc         |
| MH 57-8             | 3.0 a            | 13.33 ab          |
| MH 5-15             | 3.0 a            | 11.67 ab          |
| MH 9-5              | 3.0 a            | 21.67 abcde       |
| MH 2-2              | 3.3 ab           | 13.33 ab          |
| MH 2-6              | 3.3 ab           | 20.00 abcd        |
| MH 5-10             | 3.3 ab           | 8.33 a            |
| MH 42-10            | 3.3 ab           | 26.67 bcdef       |
| MH 59-10            | 3.3 ab           | 15.00 abc         |
| MH 43-3             | 3.3 ab           | 26.67 bcdef       |
| MH 2-7              | 3.3 ab           | 8.33 a            |
| MH 2-1              | 3.3 ab           | 18.33 abcd        |
| MH 40-16            | 3.3 ab           | 11.67 ab          |
| MH 2-18             | 3.3 ab           | 11.67 ab          |
| MH 2-14             | 3.3 ab           | 23.33 abcde       |
| <b>Promedio</b>     | 4.47             | 20.38             |
| <b>Rango (n=80)</b> | (3-7)            | (8.3-46.7)        |
| <b>DMS (0.05)</b>   | 2.092            | 15.84             |
| <b>P</b>            | 0.008            | 0.001             |
| <b>CV %</b>         | 29               | 48                |
| <b>Testigos</b>     |                  |                   |
| Talamanca           | 3.3              | 16.67             |

Severidad: (1) Hoja sana – (9) Hoja muerta

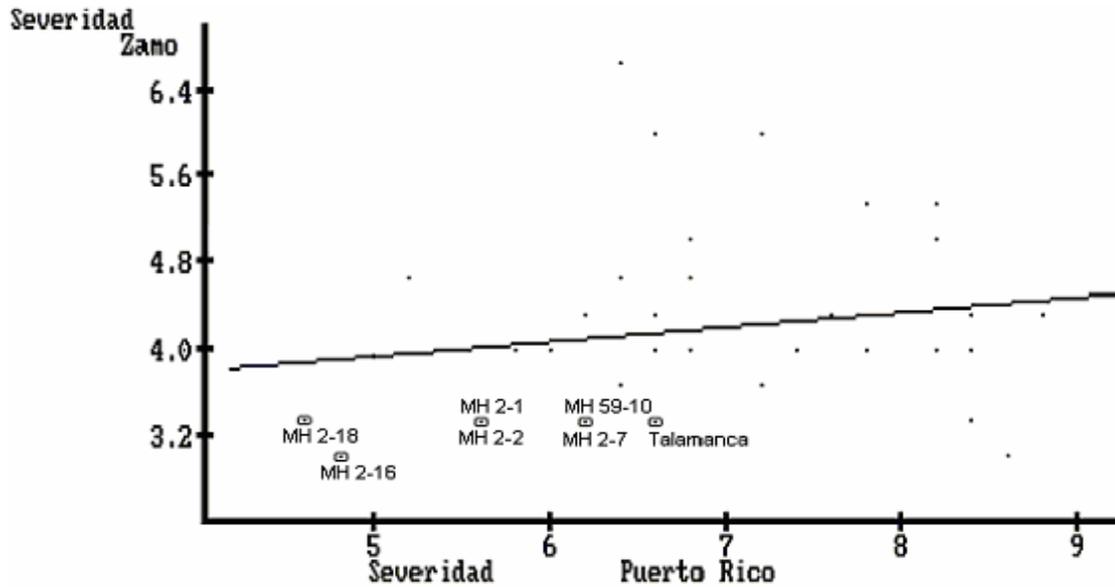
Incidencia: % de la planta dañada (0 a 100)

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba DMS ( $\alpha = 0.05$ ).

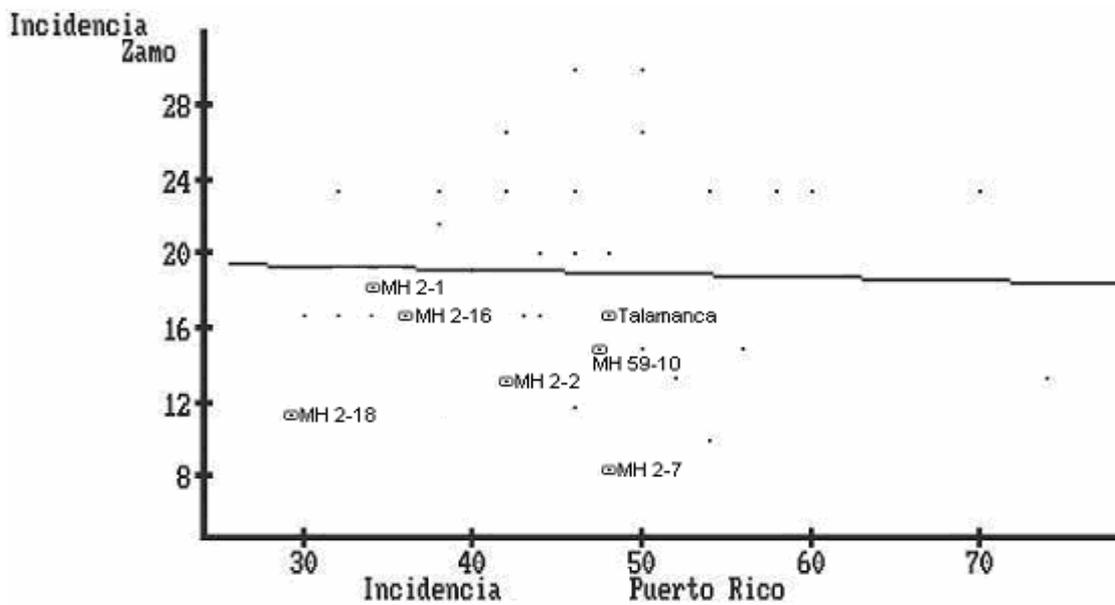
En el cuadro 2 aparecen solo las 15 líneas superiores de las 75 líneas evaluadas.

Los resultados de la separación de medias indicaron similitud entre la reacción de ciertas líneas que se repitieron en las dos poblaciones (Puerto Rico y Zamorano), por lo cual, se procedió a comparar las medias de 39 líneas que se repetían en las dos parcelas de selección recurrente, mediante un análisis de regresión lineal. Se seleccionaron las seis mejores líneas repetidas en ambas poblaciones dentro de las 15 mejores seleccionadas en cada población. Teniendo en cuenta el pedigrí de las seis líneas avanzadas, repetidas en las dos poblaciones y seleccionadas por regresión, se puede observar que cinco tienen como padre a línea VAX 6.

El análisis estadístico de regresión lineal se utilizó para comparar las poblaciones de selección recurrente de Puerto Rico y Zamorano, demostrando que las reacciones de severidad ( $r = 0.0172$ ) e incidencia ( $r = 0.087$ ) tuvieron una correlación baja, lo cual nos indica que la mayoría de las líneas de buen desempeño seleccionadas en Puerto Rico, no necesariamente presentan el mismo desempeño bajo las condiciones de Zamorano o viceversa. Estos resultados sugieren que se deben realizar pruebas con diferentes cepas y localidades, para obtener variedades realmente resistentes para una amplia zona geográfica.



**Gráfica 1.** Relación de la severidad (45 DDS) de líneas seleccionadas en Puerto Rico y Zamorano en las poblaciones de selección recurrente para la resistencia a mustia hilachosa repetida en ambas poblaciones. Honduras, 2003.



**Gráfica 2.** Relación de la incidencia (% de la planta dañada) a los 45 DDS en líneas seleccionadas en Puerto Rico y Zamorano en las poblaciones de selección recurrente para la resistencia a mustia hilachosa repetidas en ambas poblaciones. Honduras, 2003.

Los puntos nombrados (Gráfica 1 y 2) corresponden seis mejores líneas repetidas dentro de las 15 mejores seleccionadas de cada población (Puerto Rico y Zamorano).

### Evaluación fenotípica de diferenciales de mustia hilachosa

**Ensayo de campo.** Este grupo de genotipos diferenciales de mustia hilachosa está compuesto de variedades que presentan resistencia en localidades de Centro América y El Caribe; también se incluyen susceptibles que sirven para establecer parámetros de comparación a la reacción a la enfermedad. Los primeros síntomas de mustia hilachosa en las poblaciones de selección recurrente y los diferenciales se presentaron

a los cuatro días después de la inoculación en el campo, debido a las condiciones climáticas favorables que se presentaron. Esto coincide con lo reportado por Takegami (2000) en Puerto Rico. En el análisis de varianza se puede apreciar que en la variable de severidad hubo diferencias altamente significativas ( $p < 0.013$ ); no hubo diferencias significativas para la variable incidencia ( $p < 0.18$ ). El análisis de separación de medias dio como resultado que el mejor diferencial es la variedad VAX 6 con 4.5 de severidad y 25 % de incidencia. En cuanto a la severidad las mejores correspondieron a PR9607-29, VAX 6 y MUS 181 con 4.5 (resistencia intermedia); en incidencia, las mejores fueron VAX 6 y MUS-N-8 con 25%.

**Cuadro 3.** Reacción de severidad e incidencia de la mustia hilachosa en 28 genotipos diferenciales de frijol inoculados con las cepas H32 y H39 de *R. solani*. Honduras, 2003.

| Líneas                | Severidad | Incidencia |
|-----------------------|-----------|------------|
| MUS 181               | 4.5 a*    | 30         |
| PR9607-29             | 4.5 a     | 40         |
| VAX 6                 | 4.5 a     | 25         |
| MUS-N-8               | 5 ab      | 25         |
| PI307802              | 5 ab      | 45         |
| VAX 3                 | 5 ab      | 30         |
| XAN 226               | 5 ab      | 35         |
| A. L. Negro           | 5.5 abc   | 35         |
| BAT 450               | 5.5 abc   | 55         |
| G13920                | 5.5 abc   | 40         |
| PI309881              | 5.5 abc   | 40         |
| PRF 9702-84           | 5.5 abc   | 40         |
| Talamanca             | 5.5 abc   | 30         |
| Bribri                | 6 abcd    | 35         |
| Morales(S)            | 6 abcd    | 45         |
| PR0003-121            | 6 abcd    | 35         |
| PR9806-37-2           | 6 abcd    | 30         |
| BAT 93                | 6.5 abcde | 35         |
| PR9840-27             | 6.5 abcde | 45         |
| RMC-31                | 6.5 abcde | 50         |
| XAN 176               | 6.5 abcde | 35         |
| HT7719                | 7 bcde    | 35         |
| JB-178(S)             | 7 bcde    | 60         |
| PI141762              | 7.5 cde   | 55         |
| DRK 156               | 8 de      | 70         |
| Tio Canela 75(S)      | 8 de      | 55         |
| PR0003-386            | 8.5 e     | 65         |
| PR9840-28             | 8.5 e     | 55         |
| <b>Promedio</b>       | 6.2       | 42.0       |
| <b>Rango (n = 28)</b> | (4,5-8,5) | (25-70)    |
| <b>DMS (0.05)</b>     | 2.211     | --         |
| <b>P</b>              | 0.013     | 0.18 ns    |
| <b>CV %</b>           | 18        | 34         |

Severidad: (1) Hoja sana – (9) Hoja muerta

Incidencia: % de la planta dañada (0 a 100)

\*Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba DMS ( $\alpha = 0.05$ )

ns (no significativo)

De acuerdo a los resultados obtenidos la resistencia presentada en algunos diferenciales fue intermedia (4-6) lo cual coincide con los resultados obtenidos por Beaver *et al* (2002), donde solo se presentaron niveles moderados de resistencia a la mustia hilachosa.

En la Universidad de Nebraska, Godoy-Lutz *et al.* (2000) realizó una evaluación de variedades para su reacción a la mustia hilachosa utilizando el método de inoculación de hojas desconectadas, lo cual dio como resultado que la variedad BAT 93 como mejor genotipo; el presente estudio la variedad VAX 6 se desempeñó mejor que las demás, esto se debe a que los patrones de virulencia del patógeno varían entre regiones de acuerdo a las cepas de cada lugar.

**Ensayo en casa de malla (comparación de virulencia).** Las cepas H32, H39 y el aislamiento de Jamastrán presentaron aproximadamente el mismo grado de virulencia promedio en las 28 variedades diferenciales en la casa de malla. El aislamiento de Los Limones presentó un mayor grado de virulencia diferenciándose de las demás cepas y aislamiento. Observando el rango de severidad entre las cepas no existieron diferencias evidentes, en todas presentaron similitud en valores máximo y mínimos. Esta similitud de resultados entre H32 y H39 se debe a que ambas cepas pertenecen a un mismo grupo de Anastomosis (AG-1-1B) y provienen del mismo lugar (El Barro, Honduras).

**Cuadro 4.** Reacción de severidad de 28 genotipos diferenciales de frijol inoculados con dos cepas y dos aislamientos de *R. solani* causante de la mustia hilachosa del frijol. Honduras, 2003.

| Líneas                | Cepas |       | Aislamientos |            |
|-----------------------|-------|-------|--------------|------------|
|                       | H32   | H39   | Jamastrán    | L. Limones |
| PR9840-28             | 7     | 5     | 7            | 8          |
| PR0003-386            | 8     | 5     | 5            | 8          |
| Tio Canela 75(S)      | 6     | 8     | 9            | 8          |
| DRK 156               | 8     | 4     | 3            | 9          |
| PI141762              | 9     | 8     | 5            | 9          |
| HT7719                | 7     | 6     | 4            | 9          |
| JB-178(S)             | 7     | 5     | 7            | 9          |
| BAT 93                | 7     | 4     | 3            | 8          |
| RMC-31                | 7     | 7     | --           | 5          |
| XAN 176               | 8     | 8     | 9            | 8          |
| PR9840-27             | 5     | 6     | 3            | 3          |
| PR9806-37-2           | 6     | 7     | 7            | 8          |
| Morales(S)            | 9     | 6     | 5            | 9          |
| Bribri                | 8     | 5     | 4            | 9          |
| PR0003-121            | 5     | 5     | 9            | --         |
| BAT 450               | 6     | 5     | 3            | 9          |
| G13920                | 7     | 7     | 9            | --         |
| A. L. Negro           | 4     | 4     | --           | 7          |
| Talamanca             | 5     | 6     | 6            | 8          |
| PRF 9702-84           | 8     | 5     | 8            | 9          |
| PI309881              | 7     | 7     | 4            | 9          |
| MUS-N-8               | 5     | 8     | 6            | 5          |
| XAN 226               | 7     | 6     | 9            | 8          |
| PI307802              | 4     | 6     | 8            | 8          |
| VAX 3                 | 7     | 6     | 8            | 7          |
| PR9607-29             | 9     | 8     | 9            | 8          |
| VAX 6                 | 3     | 4     | 3            | --         |
| MUS 181               | 9     | 8     | 9            | 8          |
| <b>Promedio</b>       | 6.7   | 6.0   | 6.2          | 7.8        |
| <b>Rango (n = 28)</b> | (3-9) | (4-8) | (3-9)        | (3-9)      |

Severidad: (1) Hoja sana – (9) Hoja muerta

## CONCLUSIONES

Las líneas avanzadas del programa recurrente seleccionadas en Puerto Rico y Zamorano que tuvieron las menores incidencias y severidad foliar son descendientes del VAX 6.

De las líneas diferenciales, VAX 6 presentó la menor escala de severidad y menor incidencia.

Los patrones de virulencia del patógeno varían entre regiones de acuerdo a los aislamientos de cada lugar. En algunos casos se pudieron observar diferencias en las líneas de buen desempeño en Puerto Rico, que no tuvieron el mismo desempeño bajo las condiciones de Zamorano.

Los niveles más altos de resistencia presentados en el estudio fueron de resistencia intermedia alta, siendo la mayoría de las líneas susceptibles y en otras de resistencia intermedia baja.

Los aislamientos H32, H39 y de Jamastrán poseen el mismo grado de virulencia en los 28 diferenciales; mientras que, el aislamiento de Los Limones presentó un mayor grado de virulencia que los aislamientos anteriores.

## **RECOMENDACIONES**

Continuar evaluando otras líneas de frijol en busca de una mayor resistencia.

Utilizar la línea VAX 6 en el desarrollo de nuevas líneas.

Continuar la evaluación de las líneas seleccionadas de la población recurrente que mostraron resistencia en Puerto Rico y Zamorano.

Evaluar las mejores líneas seleccionadas en este estudio, para determinar el nivel de resistencia de las mismas en el campo.

Realizar pruebas con diferentes aislamientos en ambiente diversos para obtener variedades realmente resistentes para una amplia zona geográfica.

Continuar mejorando las técnicas y condiciones de inoculación para garantizar evaluaciones confiables.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bautista, M.; Perez, C. 2000. Methodology for screening common bean resistance to web blight. *J. Agric. of the Univ. of Puerto Rico* 84 : 91 – 94.

Beaver, J; Molina, C. 1997. Mejoramiento de frijol para el Caribe. CIAT. Cali, Colombia. 559p.

Beaver, J.; Godoy, G.; Rosas, J. C.; Steadman, J. 2002. Estrategia para la seleccionar frijol común con mayor resistencia a mustia hilachosa. *Agronomía Mesoamericana* 13(1): 67 – 72.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. La mustia hilachosa del frijol y su control; guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad auditutorial sobre el mismo tema. Contenido científico: Gálvez, G.; Galindo, J.; Castaño, M. Cali, Colombia. CIAT. 20p.

CIAT (Centro internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de frijol. Editorial CIAT. Colombia. 56p.

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

Galindo, J.; Abawi, G.; Tharston, H.; Galvez, G. 1982. Characterization of *Thanatephorus cucumeris* isolates causing web blight in Costa Rica. *Plant Disease* 67 : 1016 – 1021.

Godoy, G.; Mora A.; Steadman J.; Saladin F. 1992. Preliminary characterization of *Thanatephorus cucumeris* causal agent of web blight in dry beans. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 35:90-91.

Godoy- Lutz, G.; Steadman, J.; Powers, R.; Higgins, B. 2000. DNA variation and virulence among isolates causing web blight on common beans. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 43:72-73.

Takegami, J. 2000. Estudio de herencia de resistencia a mustia hilachosa (*Rhizoctonia solani* Kühn) en habichuela común. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez. Puerto Rico. 62p.

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

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

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

## ANEXOS

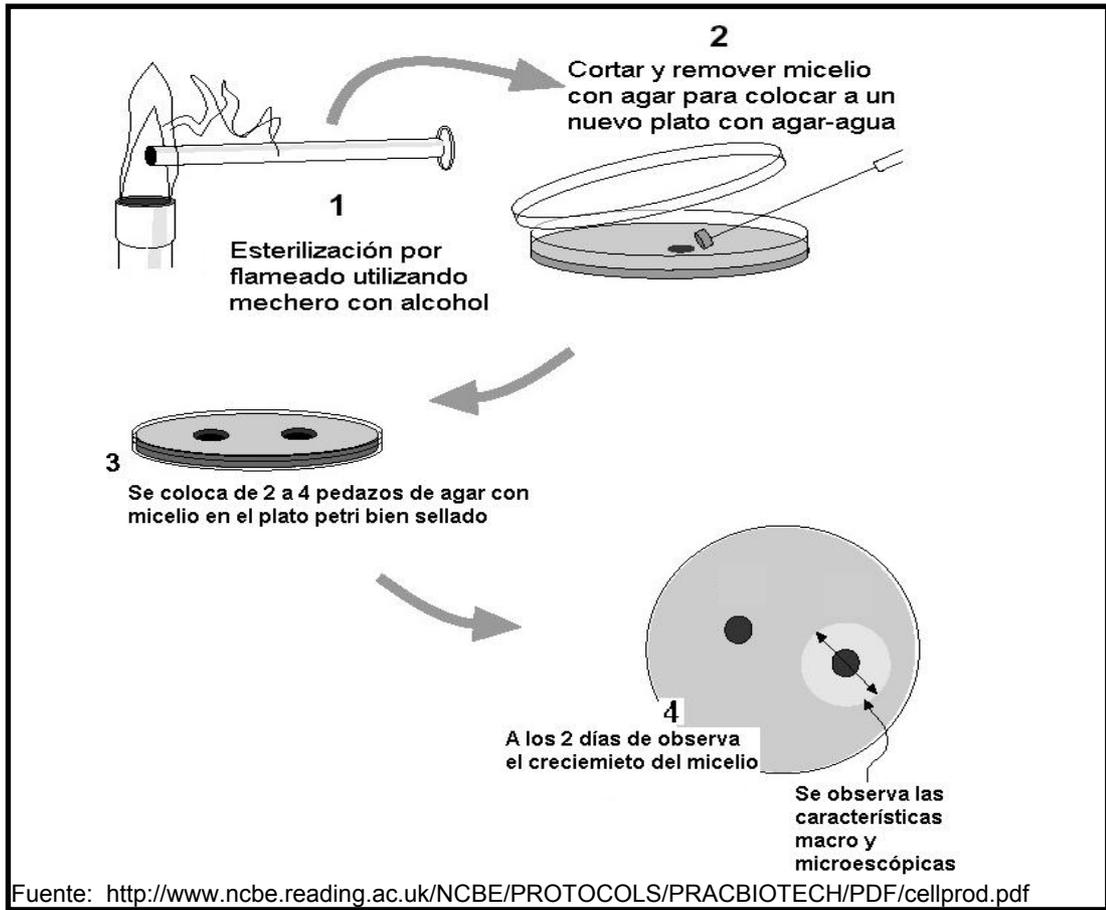
**Anexo 1.** Protocolo propuesto por Godoy–Lutz para el aislamiento del patógeno de la mustia hilachosa (Godoy-Lutz, Universidad de Nebraska).

### **Materiales**

- Mechero
- Cintas Parafilm®
- Cámara de flujo laminar
- Bisturí
- Pinzas
- Papel toalla estéril
- Agua destilada estéril
- Baekers pequeños
- Medio de cultivo (agar agua)
- Puntas de transferencias.

### **Procedimiento**

- Cortar el explante de 5 x 3 mm de hojas infectadas con *R. solani*. Las lesiones no deben estar muy maduras o viejas para evitar que otros patógenos contaminen el medio de aislamiento.
- Posteriormente colocar los pedazos de hojas infectadas en platos petri con agar agua.
- A los dos días observar el crecimiento de los hongos.
- Aislar cada uno de los aislamientos obtenidos y observar cual de ellos presenta septo doliporo, un ángulo de 90° y color de micelio blanco, los cuales son característicos de *R. solani*.
- El hongo se purifica en PDA y cada ocho días se reaísla para mantenerlo puro y activo para su posterior inoculación en las hojas de frijol.

**Aislamiento y purificación de *R. solani*.**

**Anexo 2.** Metodología de producción y cuantificación de inóculo propuesto por Godoy-Lutz para el agente causal de la mustia hilachosa (*R. solani*).

### **Producción de inóculo**

#### **Materiales**

- Medio líquido V8
- Sacabocado de 5 mm de diámetro
- Medio de cultivo PDA
- Puntas de transferencias

#### **Medio líquido V8**

- 1.5 gr de carbonato de calcio
- 100 ml jugo V8
- 400 ml de agua destilada

#### **Procedimiento**

- Pesar 1.5 gr de  $\text{CaCO}_2$  y mezclarlo con 100 ml de jugo V8 y 400 ml de agua destilada. Mantener la mezcla en un agitador por 5 minutos, ya que el  $\text{CaCO}_2$  se sedimenta rápidamente.
- Colocar el medio en autoclave y esterilizarlo por 20 minutos a 121 ° C.

Nota: utilizar 500 ml de medio líquido V8 para aproximadamente 10 platos.

#### **Incremento de inóculo en PDA y V8 líquido**

- Con un sacabocado estéril hacer varios cortes en la periferia (zona de crecimiento) de la colonia de *R. solani* y transferir los cortes a platos con medio PDA (3 cortes por plato) y posicionarlos de manera equidistante.
- Incubar los platos de PDA a 24° C durante 48 horas.
- Después de dos días y cuando cada colonia este suficientemente crecida, se hacen varios cortes de la periferia de cada colonia con un sacabocado y se colocan con ayuda de una punta de transferencia cinco cortes de medio PDA con *R. solani* en cada plato con medio líquido V8.
- Colocar los platos sin sellar con Parafilm<sup>®</sup> bajo oscuridad durante 48 horas.

#### **Cálculo de concentración de inóculo de *R. solani***

Para calcular la concentración original del inóculo del patógeno es necesario contar las colonias individuales crecidas en agar-agua.

## Procedimiento

- Después de 48 horas de incubados los platos con medio V8 y *Rhizoctonia*, el micelio del patógeno ya ha crecido y cubierto toda la superficie del medio; y este es el momento para calcular la concentración real de propágulos viables en el inóculo.
- Extraer el micelio de cinco platos con pinzas estériles y colocarlo en una licuadora previamente limpiada con alcohol, y licuarlo con 200 ml de agua destilada estéril.
- De esta solución madre hacer seis diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) con micropipetas y tubos eppendorf procurando llevar las diluciones a 1000  $\mu$ l.
- De cada dilución colocar 100  $\mu$ l en dos platos petri con agar-agua y dispersarlo con un rastrillo de vidrio.
- Incubar los platos por 24 horas.
- Después de 24 horas contar las ufc (unidades formadoras de colonia) procurando contar platos con no menos de 30 y no más de 300 ufc, ya que diluciones con menos de 30 ufc son estadísticamente no viables y diluciones con más de 300 ufc las probabilidades de error aumenta por agrupación de colonias. Hacer un promedio del conteo de los dos platos por cada dilución para poder hacer los siguientes cálculos:

### Cálculos:

$$\text{No. de colonias en el plato} \times \frac{1}{\text{Dilución de la solución}} \times \text{volumen de inóculo en el plato}$$

### Ejemplo:

No. de colonias en el plato promedio = 115.5

Dilución = el recíproco de  $10^{-2}$  es  $10^2$

Volumen de inóculo en el plato = 0.1 ml ó 100  $\mu$ l

$$115.5 \times 10^2 \times 0.1$$

$$11.55 \times 10^3 \times 0.1$$

$$11.55 \times 10^4 \text{ ufc / ml de inóculo madre}$$

Con el resultado de ufc / ml de inóculo madre se puede hacer los cálculos de concentración para la inoculación utilizando la fórmula  $C_o V_o = C_f V_f$ .

**Anexo 3.** Protocolo propuesto por Takegami (2000) para la inoculación de *R. solani*.**Materiales**

- Medio líquido V8
- Platos petri pequeños o grandes
- Agujas de transferencia
- Licuadora
- Tamiz # 40 de 425  $\mu\text{m}$
- Agua destilada estéril
- Tween 20
- Bomba de espalda

**Procedimiento**

- Después de hacer los cálculos de concentración de inóculo, se prepara más inóculo de *R. solani* en V8 líquido, procurando hacer la cantidad de platos necesarios para el área a inocular.
- Después de 48 horas de incubación de *Rhizoctonia solani* en V8 líquido, licuar el micelio del patógeno. Extraer el micelio de cada plato con unas pinzas flameadas dejando escurrir el medio líquido. Colocar el micelio de cinco o seis platos con 300 ml de agua en la licuadora y licuar por 15 segundos.
- Filtrar el inóculo en un tamiz # 40 de 425  $\mu\text{m}$  para impedir que el filtro interno de la bomba de mochila se obstruya con micelio muy grande.
- Llevar el inóculo al volumen final requerido.
- Colocar 1 o 2 gotas de Tween 20 por cada litro de inóculo.
- Mezclar bien el inóculo y aplicar.
- Inocular las plantas por el haz y el envez de las hojas.
- Incubar las plantas por 24 horas a 28° C y a 95 % HR.

Nota: hacer las inoculaciones al finalizar la tarde o cuando la radiación no sea muy intensa.

Si las condiciones de humedad y temperatura son óptimas para la infección, los primeros síntomas se presentarán de 48 a 72 horas después de la inoculación.

#### **Anexo 4. Métodos de conservación de *R. solani*.**

##### **Conservación en semilla de remolacha**

###### **Procedimiento**

- Colocar 5 o 10 semillas estériles de remolacha sobre una colonia de *R. solani* en PDA de 48 horas. Enterrar las semillas hasta la mitad en el medio PDA e incubar por 7 días.
- Extraer las semillas luego de 7 días de incubación y colocarlas en un plato petri estéril para que se sequen durante seis días.
- Guardar las semillas secas en viales y mantenerlos en el refrigerador a 4° C.
- Cuando se necesite reactivar el patógeno de las semillas se deberá sacar con pinzas estériles las semillas de los viales y colocarlas en medio agar-agua para el crecimiento inicial de *R. solani*.

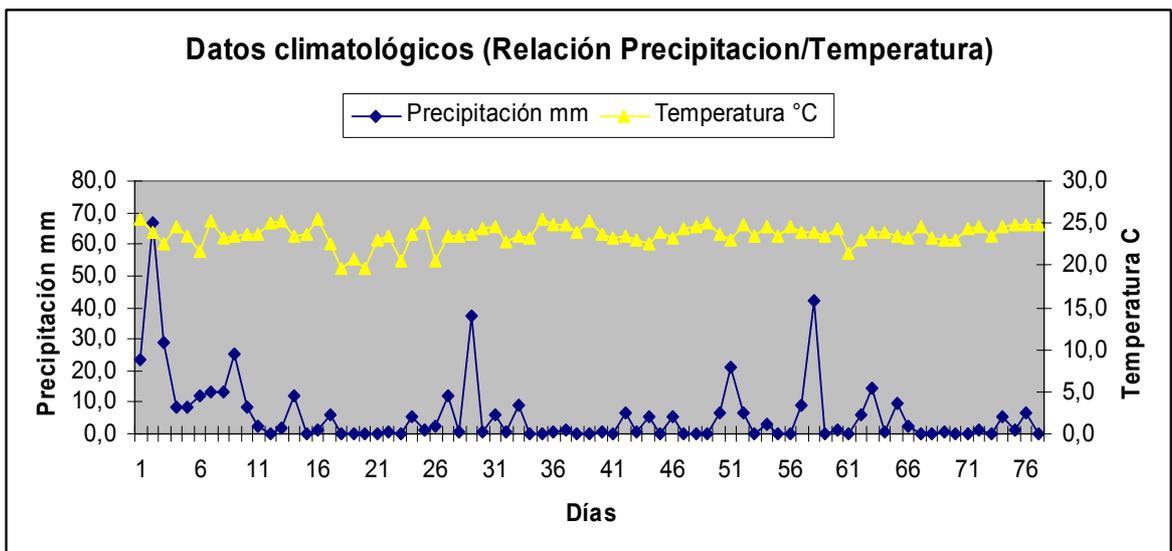
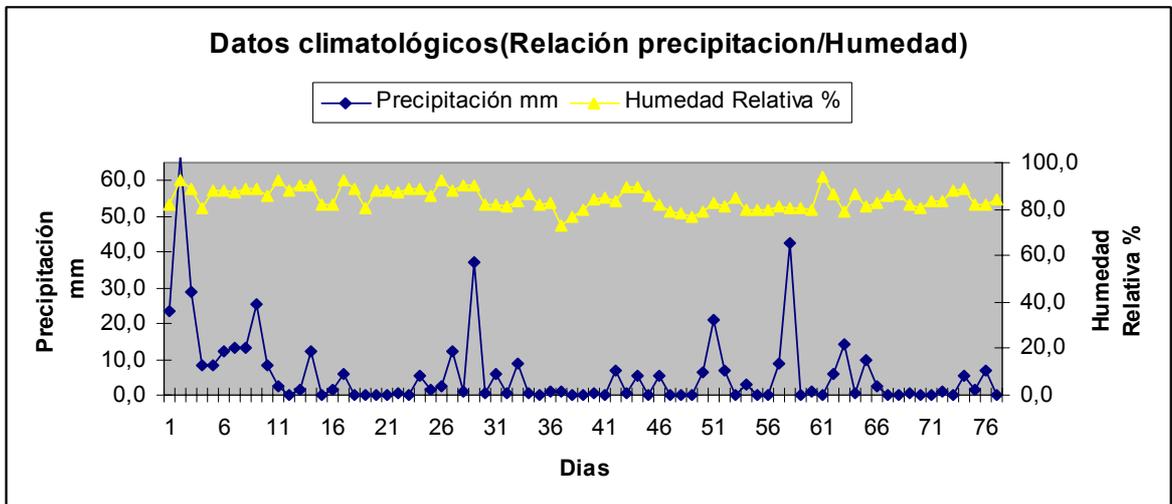
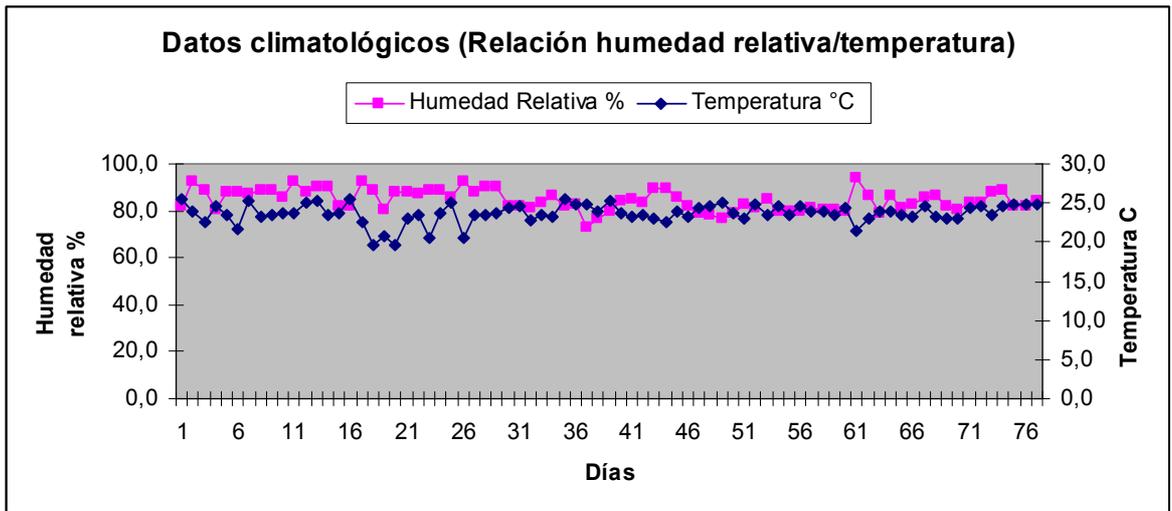
##### **Conservación de esclerocios**

###### **Procedimiento**

- Cosechar los esclerocios con pinzas estériles del medio agar-agua, ya que es en este medio es donde se producen más esclerocios debido a la falta de nutrientes en el agar.
- Guardar los esclerocios en viales o papel aluminio a 4° C.
- Para la reactivación de *R. solani* provenientes de esclerocios se siguen los pasos del aislamiento por medio de microesclerocios.

Según el CIAT (1981), las técnicas de conservación de agentes patógenos producen con el tiempo variación y por lo tanto pérdida de patogenicidad.

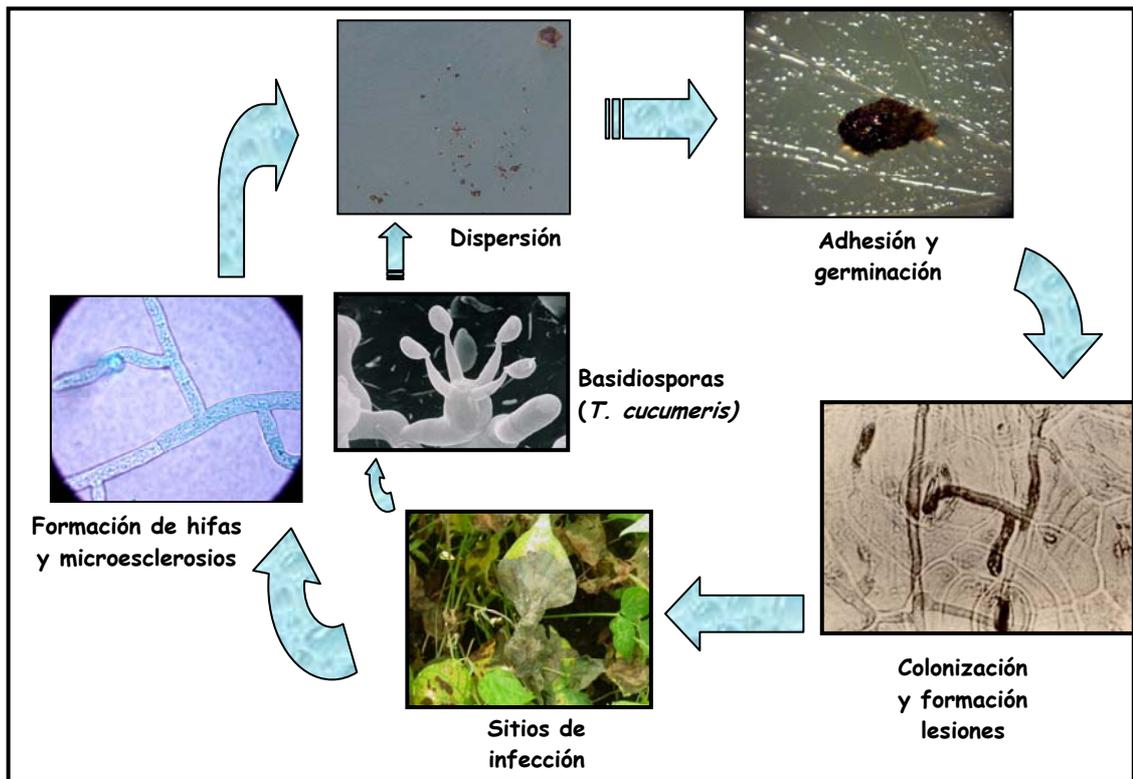
**Anexo 5.** Datos climatológicos durante el periodo de inoculación y de evaluación.



**Anexo 6.** Pedigrí de las líneas seleccionadas de las poblaciones de selección recurrente de Puerto Rico y Zamorano.

| <b>Puerto Rico</b> |  |
|--------------------|--|
| <b>MH 2-18</b>     | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 2-16</b>     | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 3-10</b>     | <b>VAX 6 / UPR 9609-2-2</b>                            |
| <b>MH 5-14</b>     | <b>VAX 6 // MUS 83 / BELNEB // DOR 483 / BAT93</b>     |
| <b>MH 5-1</b>      | <b>VAX 6 // MUS 83 / BELNEB // DOR 483 / BAT93</b>     |
| <b>MH 2-2</b>      | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 2-1</b>      | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 2-10</b>     | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 53-1</b>     | <b>PR 9750-92 // MUS 83 / DOR 483</b>                  |
| <b>MH 41-18</b>    | <b>MUS-PM-31 // DOR 303 / T 968 /// BAT 93</b>         |
| <b>MH 59-10</b>    | <b>PR 9750-92 // BAT 93</b>                            |
| <b>MH 2-7</b>      | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 55-14</b>    | <b>PR 9750 / MUS-PM-32 // DOR 303 / T 968</b>          |
| <b>MH 4-9</b>      | <b>VAX 6 // MUS 83 / DOR 483</b>                       |
| <b>MH 43-1</b>     | <b>BAT 93 / PR 9750-87</b>                             |
| <b>Zamorano</b>    |  |
| <b>MH 2-16</b>     | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 57-8</b>     | <b>PR 9750 // MUS 132</b>                              |
| <b>MH 5-15</b>     | <b>VAX 6 / MUS 83 / BELNEB // DOR 483 / BAT 93</b>     |
| <b>MH 9-5</b>      | <b>MUS N-8 // UPR 9609-2-2</b>                         |
| <b>MH 2-2</b>      | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 2-6</b>      | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 5-10</b>     | <b>VAX 6 / MUS 83 / BELNEB // DOR 483 / BAT 93</b>     |
| <b>MH 42-10</b>    | <b>MUS - PM 31 // DOR 303 / T 968 // BAT 93</b>        |
| <b>MH 59-10</b>    | <b>PR 9750-92 // BAT 93</b>                            |
| <b>MH 43-3</b>     | <b>BAT 93 // PR 9750-87</b>                            |
| <b>MH 2-7</b>      | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 2-1</b>      | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 40-16</b>    | <b>MUS-PM 31 // DOR 303 / T 968 / MUS 83 / DOR 483</b> |
| <b>MH 2-18</b>     | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |
| <b>MH 2-14</b>     | <b>VAX 6 / EAP 9503-32A</b>                            |

**Anexo 7.** Ciclo reproductivo asexual de *Rhizoctonia solani*



**Anexo 8.** Metodología de aislamiento de *R. solani*, producción de inóculo e inoculación y evaluación de mustia hilachosa.

