

**Evaluación de la severidad del daño de
aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv.
phaseoli en líneas de frijol común y
adaptación del protocolo de PCR para el
marcador molecular SCAR BC420**

David Antonio Moreira Cálix

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2016

**Evaluación de la severidad del daño de
aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv.
phaseoli en líneas de frijol común y
adaptación del protocolo de PCR para el
marcador molecular SCAR BC420**

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

Presentado por

David Antonio Moreira Cáliz

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Evaluación de la severidad del daño de aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en líneas de frijol común y adaptación del protocolo de PCR para el marcador molecular SCAR BC420

David Antonio Moreira Cáliz

Resumen. En Honduras el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es componente importante de la dieta básica y provee fuentes de empleo en zonas rurales. La bacteriosis común causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), es la enfermedad bacteriana más importante del frijol y se encuentra comúnmente en zonas bajas e intermedias del país, afectando el rendimiento del cultivo y la calidad del grano y semilla. Los objetivos del estudio fueron identificar niveles de resistencia bacteriosis en 20 líneas de frijol a aislamientos hondureños de *Xap* procedentes de 3 localidades (Zamorano y Guaimaca, en departamento de Francisco Morazán y Namasigüe, Choluteca) y la adaptación del protocolo de PCR para el marcador molecular SCAR BC420. El germoplasma se sembró en maceteros con diámetro de 8” usando una distribución en bloques completos al azar con 4 repeticiones. 15 días después de la siembra (DDS), se inocularon las plantas con el método de punción múltiple con un inóculo líquido (5×10^8 UFC/ml). Luego se evaluó las reacciones del germoplasma a la inoculación con la versión modificada de la escala de severidad del daño del CIAT (1987). Los aislamientos de Guaimaca y Namasigüe expresaron virulencia en la mayoría de líneas. Las líneas VAX 3, VAX 6 y XAN 159 expresaron resistencia a todos los aislamientos. Se logró la adaptación en la concentración de reactivos de la mezcla maestra, temperatura de acoplamiento y el número de ciclos de la PCR.

Palabras clave: Bacteriosis común, *Phaseolus vulgaris*, resistencia, virulencia.

Abstract. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important part of the Honduran staple diet and provides employment in rural areas. Common bacterial blight (CBB) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* [*Xap*] is the most severe bacterial disease of common beans in Honduras due to crop yield losses (>40%) and reduction of grain and seed quality. Objectives were to identify levels of resistance to CBB in 20 bean lines using *Xap* strains from 3 sites (Zamorano and Guaimaca in Francisco Morazán department and Namasigüe, Choluteca) along with adapting the PCR protocol for the SCAR molecular marker BC420. Germplasm was grown inside mesh-houses using 8” diameter plastic pots arranged in a randomized complete block design with 4 replications. Plants were inoculated 15 days later with the liquid *Xap* inoculum (5×10^8 CFU/ml) and evaluated 25 days after using the modified disease severity scale from CIAT (1987). Strains out from Guaimaca and Namasigüe were virulent to most lines. Lines VAX3, VAX6 and XAN159 were resistant to all strains. Protocol adaptation was done by adjusting component concentration in the PCR Master Mix, primer annealing temperature and the PCR cycle steps.

Key words: Common bacterial blight, *Phaseolus vulgaris*, resistance, virulence.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4. CONCLUSIONES	17
5. RECOMENDACIONES	18
6. BIBLIOGRAFIA	19

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Líneas de frijol utilizadas en el estudio de la resistencia a tres aislamientos de <i>Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli</i> . Zamorano, Honduras, 2016.....	5
2. Identificación de aislamientos de <i>Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli</i> utilizados para la inoculación y evaluación de la severidad del daño en líneas de frijol. Zamorano, Honduras, 2016.....	6
3. Severidad de daño de las 20 líneas de frijol inoculadas con aislamientos de <i>Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli</i> . Zamorano, Honduras, 2016.....	12
4. Resultados del análisis de varianza de la severidad del daño (escala 1-9) en 20 líneas de frijol inoculadas con tres aislamientos de <i>Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli</i> . Zamorano, Honduras, 2016.....	13
5. Perfil térmico inicial utilizado en la adaptación del protocolo de PCR para el marcador molecular SCAR BC420 (Yu <i>et al.</i> 2000)	14
6. Variaciones en los reactivos de la mezcla maestra, temperatura de acoplamiento y ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para optimizar el marcador molecular SCAR BC420 del QTL de XAN 159. Zamorano, Honduras, 2016.....	15
Figuras	Página
1. Escala (1-9) de severidad del daño de la bacteriosis común (CIAT 1987, modificada por Valle y Rosas 2016)	11
2. Bandas generadas por el SCAR BC420 en protocolos B, E, G, y L para identificar la presencia de QTL. E: Escalera molecular de 100 pb, C+ (control positivo, XAN 159), C- (control negativo, mezcla maestra sin ADN)	16

1. INTRODUCCIÓN

En Honduras, el frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) forma parte fundamental de la dieta básica y es una fuente de ingreso importante en las zonas rurales. Su cultivo se ve afectado por múltiples limitantes bióticos (enfermedades e insectos) y abióticos (baja fertilidad, sequía e incremento de la temperatura). La bacteriosis común del frijol causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli* [Xap] (Smith 1897) (Vauterin *et al.* 1995), afecta significativamente el rendimiento del cultivo, provocando en las variedades comerciales más susceptibles, pérdidas en rendimientos superiores al 40%. De igual manera provoca un detrimento en la calidad del grano y semilla por lo que se considera la enfermedad bacteriana de mayor importancia para el frijol común en Honduras (Rosas 2003).

En cuanto a su epidemiología, el desarrollo de la bacteria *Xap* se ve favorecido en zonas tropicales bajas a intermedias con temperaturas $\geq 28^{\circ}$ C y una humedad relativa $> 70\%$. La forma más efectiva de sobrevivencia de la bacteria es por medio de la semilla; sin embargo, sobrevive en residuos de plantas de frijol que han sido afectadas por la enfermedad. Adicionalmente, existen medios secundarios de diseminación del patógeno por medio de las gotas de lluvia, agua de riego e insectos, especialmente crisomélidos que facilitan la penetración en el hospedante del patógeno al alimentarse del tejido vegetal (Castaño y Del Rio 1994). El daño causado por la bacteriosis común provoca una sintomatología visible inicialmente en forma de manchas acuosas redondeadas en el envés de las hojas, expandiéndose de manera irregular donde de existir lesiones adyacentes, estas coalescen. Posteriormente, el área infectada se torna flácida hasta convertirse en un tejido necrótico de color marrón. Cuando se ha utilizado como material de siembra, semilla infectada, se puede producir un adelgazamiento del tallo y una pudrición a la altura del nudo cotiledonal, provocando que el tallo se doble y la planta se vuelque. De igual manera, ante la presencia de la bacteria en la xilema, se presenta marchitamiento en la planta. Las lesiones en la vaina se ven como manchas húmedas que crecen gradualmente y se tornan oscuras, rojas y deprimidas. De ocurrir la infección de la vaina cuando se está formando la semilla, se presenta una pudrición y arrugamiento de la misma; sin embargo, la infección de la semilla es difícil de detectar en clases de semilla de colores oscuros (Castaño y Del Rio 1994).

Las prácticas de manejo y control de la enfermedad más efectivas se enfocan en el uso integrado de variedades resistentes, semilla limpia libre del patógeno, la rotación con cultivos no susceptibles, la eliminación de residuos de cosecha y el lavado de los implementos agrícolas. El control químico se recomienda únicamente en estados iniciales de la enfermedad y ante bajos niveles de severidad de daño e incidencia (Pejuán 1999).

Además, se debe evitar el uso de antibióticos debido al riesgo de seleccionar cepas resistentes (Castaño y Del Rio 1994).

La resistencia genética del frijol a la bacteriosis común es de tipo cuantitativo y muestra solamente niveles de heredabilidad bajos e intermedios. Está asociada a la presencia de múltiples genes diferenciales dentro de 22 *loci* de caracteres cuantitativos (*QTL*), que controlan la resistencia en las hojas y vainas (Schuster y Coyne 1983). Ante la presencia del patógeno *Xap*, la planta reduce el impacto de la enfermedad sobre su desarrollo y reproducción haciendo uso de mecanismos que resisten o toleran el establecimiento del patógeno en su tejido, así como rechazan el crecimiento y reproducción del patógeno una vez establecido (Rosas y Young 1992). Así mismo, el ambiente tiene influencia sobre los *QTL* asociados con la resistencia aditiva donde ciertas cepas de *Xap* expresan mayor patogenicidad y adaptabilidad (Mutlu *et al.* 2005). Debido a que los niveles de resistencia varietal reportados en frijol común son bajos, se ha realizado la búsqueda de *QTL* de resistencia dentro de los acervos genéticos primario, secundario (*Phaseolus coccineus*) y terciario (*Phaseolus acutifolius*) (O'Boyle *et al.* 2007).

En la actualidad la selección asistida por marcadores (SAM) permite seleccionar genes y *QTL* específicos de resistencia a la bacteriosis. Esto permite que los programas de mejoramiento puedan por medio de cruza inter específicas entre variedades criollas y resistentes, realizar la introducción de una resistencia poli génica horizontal. Debido a que el uso de fuentes de resistencia de los diferentes centros de origen, asegura una amplia base genética, resultan niveles de resistencia más duraderos y de mayor estabilidad (Kelly *et al.* 2003). Sin embargo la selección fenotípica intermitente es necesaria para retener *QTL* de menor efecto y para seleccionar entre reacciones epistásticas que contribuyan a mejorar la resistencia (Miklas *et al.* 2006).

El descubrimiento de marcadores moleculares fuertemente ligados a genes de resistencia permite que los programas de mejoramiento puedan utilizar fuentes de resistencia de los diferentes centros de origen para asegurar una amplia base genética que resulte en niveles de resistencia más duraderos y de mayor estabilidad (Kelly *et al.* 2003). Las fuentes de resistencia GN#1 Sel 27, XAN 159 y OAC 88-1 contienen dos *QTL* responsables de conferir altos niveles de resistencia en la planta. Para cada *QTL* existen marcadores SCAR (Sequence Characterized and Amplified Región) que están disponibles para contribuir en programas de fitomejoramiento (Miklas 2000). El marcador SCAR BC420 está fuertemente ligado al grupo de enlace B6, el cual está relacionado al *loci* "V" que determina el color púrpura en la flor y los tonos oscuros en el color de la semilla. La fuente del *QTL* de resistencia proviene de XAN 159, derivada de una cruce inter específica entre *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius* (Jung *et al.* 1997). Fuertemente ligado al *QTL* en el grupo B8, se encuentra el marcador SU91 proveniente de la línea XAN159, cuya resistencia proviene del frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) (Pedraza *et al.* 1996). Así mismo la presencia del marcador SAP6 ligado al grupo B10 proveniente de GN#1 Sel 27 a través de

Montana No. 5, permite acceder a fuentes de resistencia del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (Miklas *et al.* 2003).

Se observaron asociaciones entre fenotipos y genotipos que indican que la interacción entre BC420 y SU91 que expresa resistencia a la bacteriosis común, está condicionada por la presencia de una supresión epistática sobre BC420 causada por genotipos homocigotas recesivos de SU91. Esto sugiere que la presencia de SU91 es esencial para la expresión efectiva de los mecanismos de resistencia y además indica que materiales mejorados que estén ligados solamente al marcador BC420 podrían expresar susceptibilidad a la enfermedad (Vandemark *et al.* 2008). El *QTL* de SAP6 en algunos casos se encuentra presente en algunas variedades susceptibles (Catrachita en Honduras) de cultivares Mesoamericanos. Por lo que para poder ser útil en la SAM, se debe primero verificar que los padres donantes contengan el *QTL* ligado a SAP6 y que los padres susceptibles receptores no cuenten con el mismo (Singh y Miklas 2015).

La implementación del método piramidal a través del uso de la PCR múltiple (Multiplex), permite detectar *QTL* de resistencia independientes ligados a distintos orígenes de resistencia, en una sola reacción de PCR (Miklas 2000). De esa manera la eficiencia de la SAM puede incrementarse al utilizar tres marcadores SCAR simultáneamente (BC420, SU91 y SAP6) para introducir fuentes de resistencia de las dos reservas genéticas más grandes (*Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*), contribuyendo a obtener mayores niveles de resistencia a la bacteriosis común causada por el patógeno *Xap* (Miklas 2000).

En la actualidad el PIF cuenta con un protocolo para PCR múltiple que utiliza los marcadores SAP6 y SU91 en la SAM para resistencia a la bacteriosis común (Chavarría 2010). El estudio realizado consistió en la identificación de la resistencia de 20 líneas de frijol a tres aislamientos de *Xap* procedentes de tres localidades de Honduras, mediante la evaluación de la severidad de daño causada por los aislamientos en las plantas. Adicionalmente, se realizaron ajustes en el protocolo para PCR del marcador SCAR BC420 ligado al *QTL* de resistencia que posee la línea de frijol común XAN 159 (Yu *et al.* 2004), para su uso en la SAM en el PIF.

2. MATERIALES Y METODOS

Localización del estudio. Las actividades de siembra, inoculación y evaluación de severidad de daño para determinar el nivel de resistencia en 20 líneas de frijol a tres aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), se realizó en casas de malla y la adaptación del protocolo de la PCR del marcador molecular BC420 fue se realizada en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular, ambos partes de las instalaciones del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana en Zamorano, Honduras, localidad ubicada a 800 msnm, con temperatura promedio anual de 24°C y precipitación promedio anual de 1100mm.

Material experimental para la evaluación fenotípica. Se evaluaron 20 líneas de frijol: 10 líneas derivadas de la cruce Tío Canela 75/ VAX 6, el padre susceptible Tío Canela 75, el padre resistente VAX 6, dos líneas susceptibles (Catrachita y Seda una variedad criolla), dos líneas resistentes VAX 3 y XAN 159, mas cuatro líneas desarrolladas en la Universidad de Puerto Rico (Cuadro 1).

Se utilizaron tres aislamientos de *Xap* provenientes de Honduras: EAP 9503 (Zamorano, F. Morazán), EAP 9504 (Guaimaca, F. Morazán) y EAP 9506 (Namasigüe, Choluteca); previamente identificadas como las más virulentas entre la colección de aislamientos *Xap* hondureños del PIF en Zamorano (Argeñal 1999) (Cuadro 2).

Para determinar los niveles de resistencia en las líneas de frijol, se utilizó la escala (1-9) de la severidad de daño causado por la bacteriosis común (CIAT 1987), modificada por Valle y Rosas (2016).

Cuadro 1. Líneas de frijol utilizadas en el estudio de la resistencia a tres aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Zamorano, Honduras, 2016.

Líneas	Pedigrí
1 Tío Canela 75	DOR 483// DOR 391/ Pompadour J
2 Catrachita	BAT 1225/ G 12727
3 VAX 6	<i>P. vulgaris</i> / <i>P. acutifolius</i>
4 X0-157-8-5-6-1	Tío Canela 75/ VAX 6
5 X0-157-8-5-6-5	Tío Canela 75/ VAX 6
6 X069-157-14-4-1-3	Tío Canela 75/ VAX 6
7 X0153-9-4-3-2	Tío Canela 75/ VAX 6
8 X0104-37-5-3-4	Tío Canela 75/ VAX 6
9 X0104-38-3-4-5	Tío Canela 75/ VAX 6
10 X0104-40-1-5-1	Tío Canela 75/ VAX 6
11 X0104-45-3-5-5	Tío Canela 75/ VAX 6
12 X0104-45-5-1-4	Tío Canela 75/ VAX 6
13 X0104-52-5-5-3	Tío Canela 75/ VAX 6
14 MG 133-1	Línea UPR
15 MG 133-3	Línea UPR
16 PR401-259	Línea UPR
17 PR650-31	Línea UPR
18 SEDA	Variedad criolla
19 VAX 3	(<i>P. acutifolius</i>) G 40001/ <i>P.vulgaris</i>
20 XAN 159	(<i>P. acutifolius</i>)PI 319443/ <i>Vulgaris</i>

Cuadro 2. Identificación de aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* utilizados para la inoculación y evaluación de la severidad del daño en líneas de frijol. Zamorano, Honduras 2016.

Aislamiento de <i>Xap</i>	Procedencia
EAP 9503	Zamorano, Francisco Morazán
EAP 9504	Guaimaca, Francisco Morazán
EAP 9506§	Namasigüe, Choluteca

(§) El aislamiento EAP 9506 pertenece a la variante *fuscans* de *Xap* (Zabala 2003).

Descripción de los ensayos. El primer ensayo consistió en la inoculación de 20 líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con 3 cepas virulentas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, vector de la bacteriosis común del frijol y la evaluación fenotípica del nivel de daño ocasionado en la primera hoja trifoliada de cada línea para poder identificar niveles de resistencia expresados por los genotipos a través de la escala de 1-9 (donde 1 = máxima resistencia, no síntomas y 9 = máxima susceptibilidad, muerte de la planta) propuesta por el CIAT (1987), modificada por Valle y Rosas (2016).

El segundo ensayo involucro la labor de adaptación del protocolo para PCR del marcador molecular SCAR BC420 mediante variaciones en las concentraciones de reactivos de la mezcla maestra de la PCR como ajustes en la temperatura de acoplamiento del perfil térmico original y el número de ciclos de la PCR. Se utilizó la línea XAN 159, único genotipo que posee el QTL BC420, para validar los ajustes realizados al protocolo adaptado y poder ser utilizado por el PIF como herramienta en la selección asistida con marcadores moleculares.

Evaluación fenotípica de la severidad del daño en líneas de frijol común inoculadas con tres aislamientos de *Xap* de Honduras. En el ensayo se utilizó un arreglo factorial bajo un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones. Se evaluó la severidad de daño causado en las 20 líneas de frijol por los tres aislamientos de *Xap*. Las unidades experimentales constaron de un macetero de 8" de diámetro con 2 plantas de frijol para un total de 80 maceteros. Las líneas de frijol fueron evaluadas para cada uno de los tres aislamientos.

Siembra. Las semillas de las líneas evaluadas fueron desinfectadas dos días antes de la siembra con etanol 70% y cloro 5%, luego pre germinadas en papel con agua destilada. Las semillas fueron sembradas en maceteros de 8" de diámetro conteniendo un sustrato de suelo:compost (1:1) en las casas de malla. Cinco días después de la siembra (DDS), se colocaron estacas de bambú para permitir el tutoreo que proporcione soporte estructural a las plantas a medida estas iban desarrollándose. No se realizaron aplicaciones de fertilizantes ni de productos químicos para el control de malezas, plagas ni enfermedades.

Preparación del inóculo de los aislamientos *Xap*. Tres días antes de la inoculación, se preparó el inóculo a partir de cultivos liofilizados agregando a cada ampolleta 8 gotas de agua destilada. Después se maceraron los contenidos de cada ampolla con pipetas hasta obtener una consistencia viscosa. Cada aislamiento fue sembrado en dos platos Petri con medio de crecimiento YDCA (levadura dextrosa carbonato de calcio agar), depositando 5 gotas del inóculo de la ampolla. Luego se realizó el estriado de la bacteria con un asa microbiológica estéril sobre el medio en el plato Petri. Para promover el crecimiento de colonias se incubaron los cultivos a una temperatura de 35°C durante 48 horas.

Inoculación. La producción del inóculo líquido se realizó agregando 10 ml de agua destilada a cada plato Petri para facilitar el raspado del crecimiento bacteriano y la transferencia de las colonias a un beaker. Se agregó agua destilada a la solución hasta completar un volumen de 100 ml para poder obtener una concentración final de la suspensión bacteriana de 5×10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro). A los 15 DDS, durante la etapa de crecimiento V4 (tercera hoja trifoliada), se inocularon las plantas utilizando el método de punción múltiple propuesta por el CIAT (1981). El proceso de inoculación para cada planta consistió en utilizar un inoculador de agujas múltiples para presionar contra una esponja impregnada del inóculo, el foliolo central de la segunda hoja trifoliada más madura de cada planta.

Evaluación de la severidad del daño. A los 28 DDS y a 14 días después de la inoculación (DDI), se evaluó la reacción de las 20 líneas de frijol a la inoculación de los tres aislamientos de *Xap*. Para la evaluación, se asignaron calificaciones entre 1 (máxima resistencia) y 9 (máxima susceptibilidad) según la severidad del daño presente en cada planta de acuerdo a la escala 1-9 propuesta por el CIAT (1987), modificada por Valle y Rosas (2016).

Análisis estadístico. Para los análisis de varianza y la separación de medias por la diferencia mínima significativa (DMS) al $P \leq 0.05$, se utilizó el programa STATISTIX 8.1.

Adaptación del protocolo de PCR para el marcador SCAR BC420. La metodología del proceso de adaptación del protocolo de PCR para el marcador BC420 consistió en pruebas con varios corridos de la PCR utilizando distintas concentraciones de los componentes de la mezcla maestra como variaciones en la temperatura de acoplamiento de primers y en el número de ciclos del termociclador. Para la reacción de PCR se utilizó solo la línea XAN 159, la única línea que posee el QTL (B6) de resistencia fuertemente ligado al marcador SCAR BC420 que proviene de la cruce inter específica entre *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius* (Yu *et al.* 2000). Las muestras de ADN se recolectaron de plantas establecidas en una casa de malla del PIF. Para la extracción de ADN se utilizó la metodología desarrollada por la Universidad de Wisconsin-Madison y adaptada a las condiciones del PIF de El Zamorano.

Extracción de ADN. Se cosecharon 6-8 mitades de hojas jóvenes (meristemas o primordios foliares) y fueron colocadas en micro tubos eppendorf de 1.5 ml. Las muestras fueron llevadas al laboratorio donde se agregaron 50 µl del buffer de extracción (PEX) en cada tubo y se maceraron en el tubo usando un pistilo de plexiglás. Luego se agregaron 450 µl de buffer PEX a cada tubo y en seguida fueron colocados en baño maría a 65°C durante 1 hora. Después los tubos fueron centrifugados durante 10 min a >14,000 RPM para concentrar al fondo del tubo, los residuos del tejido (*pellet*). Posteriormente se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf de 1.5 ml limpios, los que se llenaron con una mezcla 6:1 entre etanol y acetato de amonio 7.5M para lograr precipitar los ácidos nucleicos. Se mezclaron invirtiendo los tubos y se dejaron precipitar por 30 min a temperatura ambiente. Se agitaron manualmente los tubos para romper el precipitado y luego fueron centrifugados a 3,000 RPM durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron a los tubos con los pellets 300 µl de ARNasa (concentración de 100 µg/ml) + buffer TE 0.1X (juntas), se agitaron manualmente y se colocaron en baño maría a 37°C por 1 hora. Seguido, las muestras fueron centrifugadas a >14,000 RPM por 1 min para peletizar los residuos de tejidos y se transfirió el sobrenadante a un micro tubo limpio de 1.5 ml. Luego, se precipito el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3M, se mezclaron los tubos y se dejaron en reposo a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min. Luego se volvieron a agitar los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN. Luego se vació el etanol y acetato de sodio y se lavaron los pellets llenando los tubos con etanol 70% y agitándolos manualmente. Seguido se colectaron los pellets centrifugando los tubos por 15 segundos a 14,000 RPM. Posteriormente se eliminó el etanol de los tubos y se invirtieron sobre papel toalla durante 24 horas para secar los pellets. Se procedió a rehidratar los pellets agregando 100-200 µl de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Para ayudar a disolver los pellets, se colocaron los tubos en baño maría a 65°C durante 15 minutos.

Cuantificación y Dilución del ADN. La cuantificación del ADN (ng/ml) fue realizada mediante el método de fluorometría, usando un “QuantiFluor® dsDNA System” siguiendo el protocolo recomendado por la casa Promega.

Para poder trabajar con el QuantiFluor® se inició preparando 100 µl de solución de trabajo compuesta de una dilución 1:200 del tinte “Dye QuantiFluor” en el buffer TE 1X. Se determinó la cantidad de buffer TE 1X requerida mediante un cálculo según el número de muestras de ADN tomadas:

$$(40 \text{ muestras} \times 100 \mu\text{l} \times 1.10 [\text{error de pipeteo}]) \times 0.005 = 4,378 \mu\text{l de buffer TE 1X [1]}$$

Finalmente se diluyeron las muestras de ADN a una concentración de 30 ng/ml, permitiendo la misma capacidad de amplificación de todas las muestras durante el corrido electroforético de la PCR.

Amplificación del ADN. Una vez realizada la dilución, se amplificaron las muestras de ADN completando la PCR, técnica molecular que permite multiplicar la cantidad de fragmentos específicos de ADN que serán utilizados para realizar la lectura mediante la electroforesis. Al comenzar, se sacaron del congelador las muestras de ADN y se dejaron reposar durante 30 minutos hasta que alcanzaron la temperatura ambiente de laboratorio (25°C). Las pruebas iniciales se realizaron con base en las concentraciones de reactivos de la mezcla maestra del protocolo optimizado para el marcador SCAR SU91 (Pedraza *et al.* 1996). Para la optimización, cada corrido de PCR realizado contó con la preparación de la mezcla maestra de acuerdo a las variaciones en la concentración de los reactivos (dNTP's y la enzima Go Taq®). Una vez mezclados los reactivos se colocó el volumen de la mezcla maestra (µl) en las celdas de los platos de PCR (ABgene® PCR Plates). Seguido se agregó a cada celda conteniendo la mezcla maestra, el ADN (µl) y una gota de aceite mineral estéril, para evitar la evaporación. Luego se selló el plato de PCR con una película de aluminio, papel y plástico (AlumaSeal 96TM) antes de colocarse dentro del termociclador y cerrarse la tapa. El programa de ciclado usado en la amplificación inicial fue realizado mediante la utilización del perfil térmico de PCR para el marcador SCAR BC420 descrito por Yu *et al.* 2000. Para la adaptación del protocolo se realizaron distintas pruebas de PCR con variaciones en el perfil térmico (temperatura [°C] de acoplamiento de primers y el número de ciclos).

Visualización del ADN. La visualización de los fragmentos de ADN, producto de la PCR, fue realizada finalizada la técnica molecular de corrido electroforético (Electroforesis) con el objetivo de identificar la presencia o ausencia de una banda a 900 pb, altura a la que se ubica el SCAR BC420 (Yu *et al.* 2000). La electroforesis de tipo horizontal que se utilizó, contó con un molde de electroforesis (EC Maxicell EC 360M, 44 orificios) en el que se depositó el gel de agarosa preparada al 1.1 % como matriz para la separación del ADN. La corriente eléctrica necesaria para el corrido electroforético provino de una fuente eléctrica de energía (Hoefer Scientific Instrumentes PS 250/2.5 AMP) que posee un potencial eléctrico de 110 y 140 voltios.

El sembrado de los productos de la PCR inicio con la colocación de un peine durante 30 minutos sumergido en el gel sin tocar el fondo del molde para no romper el gel. Luego de polemizarse el gel, se removió el peine y se obtuvieron 10 celdas de gel. Se procedió a colocar el molde con el gel dentro de la cisterna para electroforesis y se realizó de manera ordenada la siembra primero de la escalera molecular (EM) de 100 pb, segundo del control positivo XAN 159 (C+), seguido de mezcla maestra sin ADN como el control negativo (C-) y siete muestras de la línea XAN 159 que contiene el QTL relacionado al marcador SCAR BC420. Una vez sembrados los productos se tapó la cisterna y se conectaron los electrodos a la fuente de energía.

El corrido electroforético se completó regulando la corriente eléctrica a un voltaje de 110 V durante 1 hora. Al terminar el corrido de la electroforesis se desconectaron los cables de la fuente de energía, se removió la tapa de la cisterna y se colocó el gel en un recipiente

conteniendo el buffer TBE 1X y el tinte “Diamond™ Nucleic Acid Dye” durante 30 minutos. Finalizada la tinción del gel se colocó dentro de un recipiente con agua destilada durante 15 minutos. Finalmente, haciendo uso de lentes con filtro UV se realizó la lectura de resultados observando el gel sobre el trans iluminador (luz ultra violeta) y documentando cada producto mediante una fotografía del gel.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación fenotípica de la severidad del daño en líneas de frijol común inoculadas con tres aislamientos de *Xap* de Honduras. Las lecturas obtenidas con la escala de severidad del daño expresan en promedio niveles de virulencia altos para los aislamientos *Xap* EAP 9506 y EAP 9504. Se observaron en las líneas avanzadas de frijol X0, que provienen de la cruce entre Tío Canela 75/ VAX 6, valores >5 de severidad del daño. Las líneas comerciales Tío Canela 75, Catrachita y SEDA presentaron una severidad >6. Los valores de severidad más bajos (<4) se presentaron para XAN 159, seguido por las líneas mejoradas VAX 6 y VAX 3 (Cuadro 3).

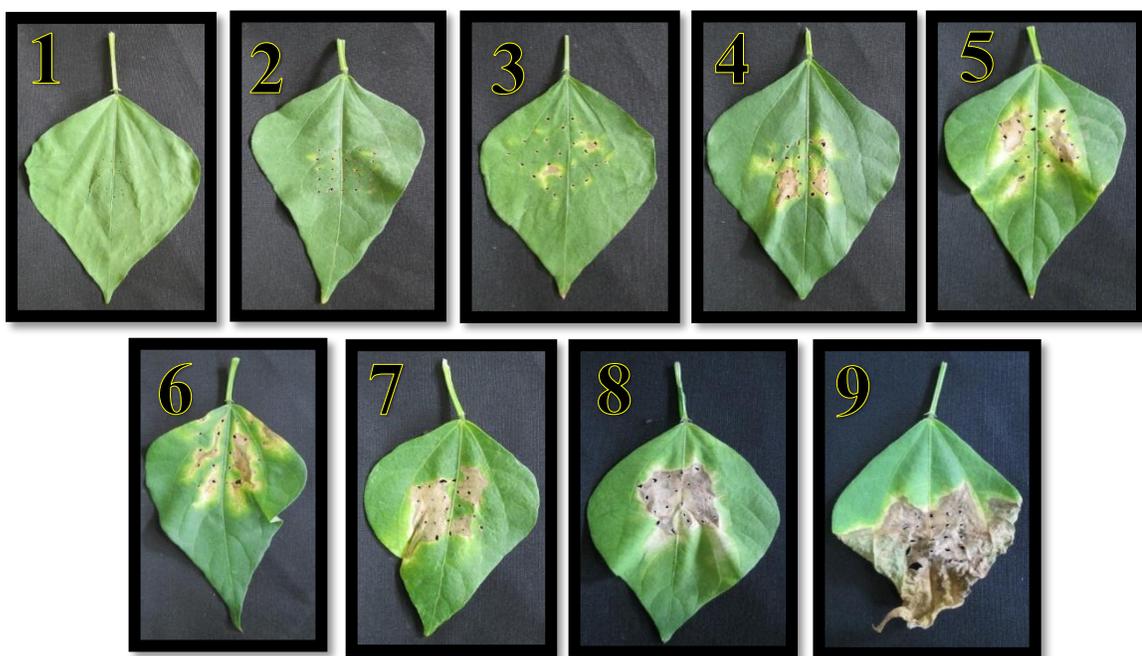


Figura 1. Escala (1-9) de severidad del daño de la bacteriosis común (CIAT 1987, modificada por Valle y Rosas 2016).

Cuadro 3. Severidad de daño de las 20 líneas de frijol inoculadas con aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Zamorano, Honduras, 2016.

Genotipo	Aislamiento			Promedio
	EAP 9503	EAP 9504	EAP 9506	
1 Tío Canela 75	5.5	9	9	7.83
2 Catrachita	9	8.5	9	8.83
3 VAX 6	2.5	4.25	4	3.58
4 X0-157-8-5-6-1	4.5	6.75	8.75	6.67
5 X0-157-8-5-6-5	5	7.5	5	5.83
6 X069-157-14-4-1-3	2.75	2.75	7.25	4.25
7 X0153-9-4-3-2	2.75	6.5	7.75	5.67
8 X0104-37-5-3-4	3.5	3.5	8.75	5.25
9 X0104-38-3-4-5	3	7.75	7.75	6.17
10 X0104-40-1-5-1	3.75	3.25	7.75	4.92
11 X0104-45-3-5-5	3.5	8.5	5	5.67
12 X0104-45-5-1-4	2.75	3.5	7	4.42
13 X0104-52-5-5-3	6.25	7.25	5.75	6.42
14 MG 133-1	2	4	8.5	4.83
15 MG 133-3	5.25	7.75	6.25	6.42
16 PR401-259	4.25	3.5	8.68	5.48
17 PR650-31	5	9	8.68	7.56
18 SEDA	7.75	7.5	9	8.08
19 VAX 3	3.5	3.75	3.68	3.64
20 XAN 159	2.75	3	2.75	2.83
Promedio	4.26	5.88	7.01	
Coef. Variabilidad (%)	24.3	13.3	14.8	
DMS	0.73**	0.55**	0.73**	

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

** Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$)

ns No hay diferencias significativas

La presencia del marcador SCAR BC420 solo fue identificada en la línea XAN 159, la que representa la única fuente de ese QTL de resistencia que posee la colección del PIF. El marcador SCAR BC420 está fuertemente ligado al grupo de enlace B6, el cual está relacionado al *loci* "V" que determina el color púrpura en la flor y los tonos oscuros en el color de la semilla. Por lo que de utilizarse el marcador BC420 para el mejoramiento de líneas criollas comerciales, se podría dar la ruptura del enlace entre el SCAR BC420 y el *loci* "V" y no sería usado más con el propósito de servir como indicador fenotípico de la presencia del QTL BC420. Así mismo debido a la supresión epistática que presentan los marcadores SCAR codominantes BC420 y SU91, la aplicación del marcador en programas

de mejoramiento debe procurar tener la presencia de al menos un alelo dominante de SU91 para permitir expresar niveles de resistencia superiores y de mayor cobertura. De forma similar, el QTL homocigota recesivo de SAP6 que posee la línea Catrachita (Singh y Miklas 2015) podría usarse en la detección de reacciones epispásticas que suprimirían la expresión de resistencia en las plantas de frijol.

El resultado obtenido por el análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los aislamientos, las líneas y la interacción cruzada entre aislamiento \times línea (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados del análisis de varianza de la severidad del daño (escala 1-9) en 20 líneas de frijol inoculadas con tres aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Zamorano, Honduras 2016.

Fuentes de variación	Severidad (1-9)
<u>Aislamientos (A):</u>	
Valor P	0.00**
<u>Líneas de frijol (L):</u>	
Valor P	0.00**
<u>Interacción A x L</u>	
Valor P	0.00**

(**) Altamente significativo ($P \leq 0.01$)

Adaptación del protocolo de PCR para el marcador SCAR BC420. La reacción de PCR es una técnica compuesta de procesos termodinámicos y enzimáticos que facilitan la identificación de fragmentos específicos de ADN. Para permitir la implementación correcta del marcador BC420 en PCR se realizaron ajustes en los reactivos que componen la PCR y se aseguró el cumplimiento de condiciones esenciales para la obtención de productos específicos.

Para la prueba inicial se utilizó el protocolo para PCR del marcador SCAR SU91 (Pedraza *et al.* 1996) y se utilizó el perfil térmico descrito por Yu *et al.* 2000. La visualización del producto de PCR con el protocolo inicial resultó en el marcado difuso del control positivo (C+) aproximadamente a 900 pb.

Cuadro 5. Perfil térmico inicial utilizado en la adaptación del protocolo de PCR para el marcador molecular SCAR BC420 (Yu *et al.* 2000).

Fase	Temperatura (°C)	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización	94		30 segundos
Acoplamiento	50	35	30 segundos
Elongación	72		60 segundos
Elongación final	72		5 minutos

Se realizaron variaciones de acuerdo a la experiencia que posee el equipo de trabajo del PIF, aprendido de los resultados obtenidos a medida que se corrían distintos protocolos de prueba para distintos marcadores. Inicialmente se probaron variaciones en las condiciones del programa de termociclador, reduciendo la temperatura de acoplamiento de los primers y luego incrementando la temperatura durante el ciclado térmico. La reducción en la temperatura de acoplamiento de primers resulto en una pobre amplificación del producto. Sin embargo, el aumento de la temperatura de acoplamiento de primers a 51°C presento una mayor amplificación del producto, pero también resulto en la leve marcación del control negativo (C-).

Debido a que el uso de altas concentraciones de ADN suele interrumpir la actividad enzimática de la polimerasa, se realizaron pruebas en las que en un comienzo se redujo la concentración del ADN y luego se incrementó. Los productos amplificados no marcaron bandas más específicas, sin embargo, al probarse la concentración de ADN y el número de ciclos en el termociclador, se obtuvieron acoplamientos específicos sin marcarse el control negativo (C-), demostrando la ausencia de contaminación entre los productos, pero el marcado de bandas fue aun de calidad difusa.

Siguiendo los resultados favorables obtenidos a través de la reducción en el número de ciclos del termociclador, se buscó reducir el posible bloqueo de actividad enzimática de la polimerasa por medio de la reducción en la concentración de dNTP's en la mezcla maestra, los cuales se presentan al comienzo de la reacción en forma de trifosfatos y al suceder la síntesis/elongación de la cadena de ADN liberan energía necesaria para la formación de enlaces fosfodiester requeridos por la cadena siendo creada.

Con el objetivo de obtener el marcado de bandas claras sin la presencia de productos no específicos o manchas por efecto del corrido electroforético, se realizaron pruebas compuestas por variaciones en la concentración de los cebadores iniciadores (Primer F y Primer R). Los productos obtenidos de la PCR al aumentarse la concentración de los

primers resultaron en bandas claras, marcadas a 900 pb sin presentarse la amplificación de productos no específicos.

Cuadro 6. Variaciones en los reactivos de la mezcla maestra, temperatura de acoplamiento y ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para optimizar el marcador molecular SCAR BC420 del QTL de XAN 159. Zamorano, Honduras, 2016.

Reactivos (μL)	Protocolos				
	A, B, C	D, E	F, G	H, I, J	K, L
ddH ₂ O	7.9	8.4	7.9	8.1	8.3
PCR Buffer	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
dNTP's	1.2	1.2	1.2	1, 0.7, 1	1.2, 0.6
Primer F	0.5	0.5	0.5	0.5	0.3
Primer R	0.5	0.5	0.5	0.5	0.3
Go Taq®	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
ADN	2	1.5	2, 2.5	2	2
Total Mezcla Maestra	15	15	13	14	13.8
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) acople	50, 49, 51	50	50	50	50
Número de ciclos	35	35,30	30	30, 30, 35	35, 30

Buscando la presencia de bandas de ADN claramente definidas que realicen la amplificación de fragmentos específicos de manera eficiente, se desarrolló el protocolo adaptado de PCR para el marcador SCAR BC420 por medio de variaciones al programa de ciclado, reducido al uso de 30 ciclos para la amplificación del ADN en la reacción de PCR. Así mismo se redujo la concentración del volumen de reactivos en la mezcla maestra lográndose la marcación clara y específica de una banda a 900 pb, posición en la que BC420 se encuentra, mediante la implementación de una concentración de 0.6 μL para los dNTP's y una misma concentración para los cebadores (Primer F y Primer R) de 0.3 μL .

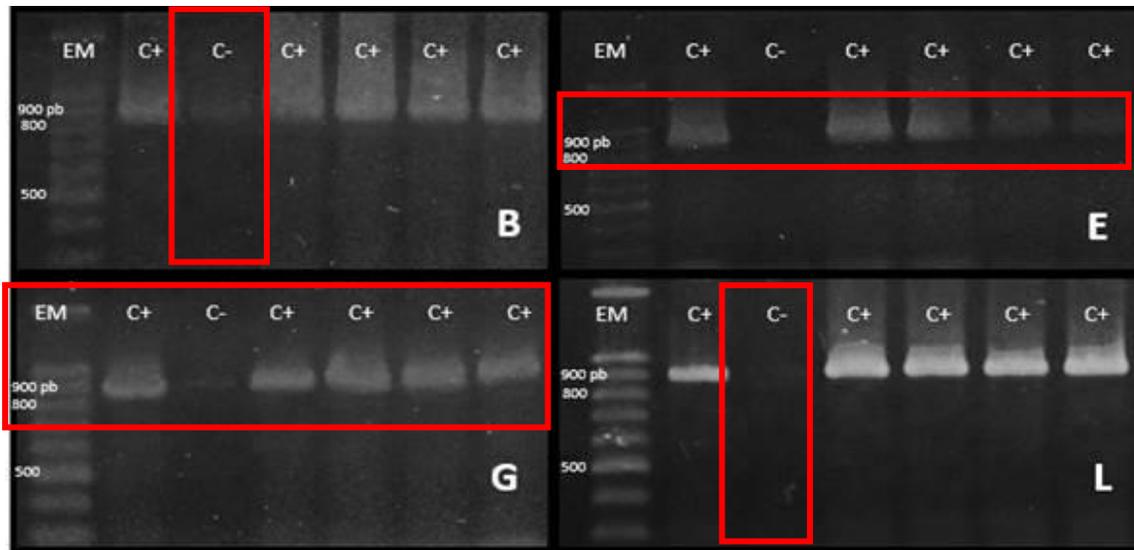


Figura 2. Bandas generadas por el SCAR BC420 en protocolos B, E, G, y L para identificar la presencia de QTL. E: Escalera molecular de 100 pb, C+ (control positivo, XAN 159), C- (control negativo, mezcla maestra sin ADN).

4. CONCLUSIONES

En base a los objetivos establecidos y los resultados obtenidos por medio de los ensayos realizados, se concluyó que:

- Los aislamientos de *Xap* procedentes de Guaimaca (EAP 9504) y Namasigüe (EAP 9506) presentaron los niveles más altos de severidad de daño para la mayoría de las líneas de frijol evaluadas. La virulencia expresada por estos aislamientos, los hace atractivas para utilizarse en el mejoramiento de variedades comerciales del frijol común.
- Las líneas VAX 3, VAX 6 y XAN 159 expresaron reacciones de resistencia hacia los tres aislamientos *Xap* y serian útiles para su uso en mejoramiento genético.
- Se adaptó el protocolo de PCR para el marcador molecular SCAR BC420 ligado al *QTL* de resistencia de XAN 159, mediante ajustes a las concentraciones de reactivos en la mezcla maestra (temperatura de acoplamiento de primers y en el número de ciclos de la PCR).
- Se dispone del marcador BC420 del *QTL* de resistencia a la bacteriosis común para su uso en la selección asistida con marcadores en actividades del PIF.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar las líneas VAX 3, VAX 6 y XAN 159 como progenitores resistentes a la bacteriosis común para actividades de mejoramiento de la resistencia a *Xap*, patógeno causante de esta enfermedad.
- Evaluar otras líneas de frijol para identificar fuentes adicionales de resistencia a la bacteriosis común, utilizando inoculaciones con aislamientos altamente virulentos para la evaluación fenotípica de la resistencia, y de manera molecular usando el protocolo de PCR múltiple con los marcadores SCAR SAP 6, SU91 y BC420.
- Ampliar la cantidad de aislamientos disponibles mediante la identificación, caracterización y evaluación de virulencia de aislamientos de *Xap* dentro de zonas productoras que presenten alta incidencia y severidad de la bacteriosis común.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Castaño J, Del Rio L. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. Zamorano, Escuela Agrícola Panamericana.
- Chavarría RC. 2010. Optimización de los protocolos para el marcador SCAR BAC6 y de PCR múltiple con los marcadores SCAR SAP6 y SU91 de la resistencia a la bacteriosis común del frijol. Tesis Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 20p.
- Jung G, Skroch PW, Coyne DP, Nienhuis J, Arnaud-Santana E, Ariyaratne HM. 1997. Molecular marker based Genetic Analysis of Tepary Bean-derived Common Bacterial Blight Resistance in Different Developmental Stages of Common Bean. *J Am. Soc. Hort. Sci.* 122, 329-337.
- Kelly JD, Gepts P, Miklas PN, Coyne DP. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research* 82 (2-3):135–154. DOI: 10.1016/S0378-4290(03)00034-0.
- Miklas PN. 2000. Marker-assisted Breeding for Pyramided Resistance to CBB in common bean. USDA-ARS, Prosser, WA; USDA-ARS, Mayaguez, PR; Novartis Seeds Inc.
- Miklas PN, Coyne DP, Grafton KF, Mutlu N, Reiser J, Lindgren DT, Singh SP. 2003. A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No5. *Euphytica* 131(1):137–146. DOI: 10.1023/A:1023064814531.
- Miklas PN, Kelly JD, Beebe SE, Blair MW. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses. From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147 (1-2):105–131. DOI: 10.1007/s10681-006-4600-5.
- Mutlu N, Miklas P, Reiser J, Coyne D. 2005. Backcross breeding for improved resistance to common bacterial blight in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Breeding* 124 (3):282–287. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2005.01078.
- O'Boyle PD, Kelly JD, Kirk WW. 2007. Use of Marker-assisted Selection to Breed for Resistance to Common Bacterial Blight in Common Bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132 (3):381–386. Available online at <http://journal.ashspublications.org/content/132/3/381.full>.
- Pedraza F, Gallegos G, Beebe S, Tohme J (1996). *In: Taller de Mejoramiento de Frijol para El Siglo XXI. Marcadores SCAR y RAPD para la Resistencia a la Bacteriosis Común (CBB) del Frijol.* CIAT, Cali; Colombia, p. 130-134.

Pejuán WB .1999. Identificación de fuentes de resistencia utilizando aislamientos hondureños de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y su importancia en el manejo de la bacteriosis común del frijol. Tesis Ing. Agrónomo. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 44 p.

Rosas JC. 200. El cultivo de frijol común en América Tropical. Zamorano, Honduras, Zamorano Academia Press. 52 p.

Schuster ML, Coyne DP. 1983. Sources of *Phaseolus* species resistance and leaf and pod differential reactions to common blight [*Xanthomonas phaseoli*, *Xanthomonas campestris*, vegetable breeding]. HortScience. 18, 901-903.

Singh SP, Miklas PN. 2015. Breeding Common Bean for Resistance to Common Blight. A Review. Crop Science 41:1659–1675. DOI: 10.2135/cropsci2014.07.0502.

Smith EF .1897. Description of *Bacillus phaseolin* sp. In Botanical Gazette 24. 192p.

Vandemark GJ, Fourie D, Miklas PN. 2008. Genotyping with real-time PCR reveals recessive epistasis between independent QTL conferring resistance to common bacterial blight in dry bean. Theoretical and applied genetics 117 (4): 513–522. DOI: 10.1007/s00122-008-0795-2.

Vauterin L, Hoste B, Kersters K., Swings J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 45 (3):472–489. DOI: 10.1099/00207713-45-3-472.

Yu K, Park SJ, Zhang B, Haffner M, Poysa V. 2004. An SSR marker in the nitrate reductase gene of common bean is tightly linked to a major gene conferring resistance to common bacterial blight. Euphytica 138 (1):89–95. DOI: 10.1023/B:EUPH.0000047077.75285.60.