

**Caracterización de la diversidad patogénica de
Colletotrichum lindemuthianum causante de la
antracnosis del frijol en Honduras**

Jaime Santiago Salazar Pinto

ZAMORANO
Ciencia y Producción Agropecuaria
Diciembre, 2003

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Caracterización de la diversidad patogénica de
Colletotrichum lindemuthianum causante de la
antracnosis del frijol en Honduras**

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

presentado por:

Jaime Santiago Salazar Pinto

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.

Jaime Santiago Salazar Pinto

Honduras
Diciembre, 2003

Caracterización de la diversidad patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* causante de la antracnosis del frijol en Honduras

presentado por:

Jaime Santiago Salazar Pinto

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor Principal

Alfredo Rueda, Ph.D.
Coordinador Área Temática

María Mercedes Doyle, Ph.D.
Asesor

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

Phil Arneson, Ph.D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Jorge Venegas, Ing.Agr.
Asesor

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

DEDICATORIA

A la memoria de mi querido abuelo Jaime y mi querido tío Miguel.

A mi abuela Zoila.

A mi madre Cumandá.

A mi hermana Mariaelena.

A mi sobrina Paula.

A mi tías María Luisa, Cecilia y Magdalena.

A mi familia.

A todos mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al niño Jesús por iluminarme y guiarme.

A mi Mami Cumandá por ser la mejor del mundo.

A mi Hermana por ayudarme a convertir este sueño en realidad.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por ayudarme y compartirme sus conocimientos para la culminación exitosa de este trabajo.

A Jorge Venegas por ser un pilar fundamental de este estudio.

A Maria Mercedes Doyle y Phil Arneson por sus consejos y observaciones para la realización de este estudio.

A Luwbia Aranda y Byron Reyes por su apoyo y amistad.

A todo el personal del Programa de Investigaciones en Frijol de Zamorano: Luz, Tomasa, Rogel, Jorge, Quike, Eduardo, Calixto, por su invaluable ayuda.

A German Blanco, Santiago Saa, Esteban Serrano, Francisco Enriquez, Edison Andrade, Luis Andrade, Wilmer Chiguano, gracias por ayudarme a salir adelante durante estos cuatro años de estudio.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A mi madre Cumandá y hermana Mariaelena, por el gran esfuerzo económico que realizaron para apoyarme estos cuatro años de estudio.

A Zamorano por el apoyo económico brindado durante mis tres primeros años de estudio.

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

Al Programa Bean/Cowpea CRSP (Donación USAID No.GDG-G-00-02-00012-00) por el financiamiento parcial durante mi cuarto año en Zamorano.

A mis tías Cecilia y Magdalena que depositaron un granito de arena para ayudarme a culminar exitosamente mis estudios.

RESUMEN

Salazar Pinto, Jaime Santiago. 2003. Caracterización de la diversidad patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum*, causante de la antracnosis del frijol en Honduras. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 17 p.

Una de las enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris*) más importantes y que más daño causa en zonas mayores de 1000 msnm con temperaturas relativamente bajas y alta humedad relativa, es la antracnosis causada por *Colletotrichum lindemuthianum*. La medida de control más adecuada es la utilización de variedades resistentes, que es afectada ya que el patógeno posee una alta variabilidad patogénica. Para realizar el mejoramiento genético no sólo es necesario conocer los genes de resistencia, sino la reacción de estos genes a las diferentes razas del patógeno. En el presente estudio se determinó la virulencia y la diversidad genética de aislamientos de *C. lindemuthianum* procedentes de zonas frijoleras de Honduras. Para lograr esto se obtuvieron aislamientos monospóricos del hongo, que fueron evaluados en un grupo de 12 genotipos de variedades de frijol que son conocidos como diferenciales y un sistema numérico (binario) de identificación de razas, basado en el espectro de patogenicidad presentado por un aislamiento en los 12 genotipos diferenciales. Se recolectaron muestras de frijol con síntomas de antracnosis de las localidades de El Rancho y La Tigra, departamento de Francisco Morazán; y Jacaleapa, departamento de El Paraíso. De estas muestras se obtuvieron cuatro aislamientos monospóricos identificados como: Co-R1, Co-R6, Co-T1 y Co-J. También se reactivaron los aislamientos monospóricos Co-Z1, Co-L4 y Co-P1 conservados en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano, Honduras. Los tres primeros ensayos, dirigidos a determinar la virulencia de los aislamientos, se efectuaron bajo condiciones controladas en una casa de malla. No se obtuvieron reacciones de virulencia debido a las condiciones climáticas desfavorables para la infección del hongo en las plantas, principalmente altas temperaturas y baja humedad relativa. Posteriormente se inocularon los 12 genotipos diferenciales con los aislamientos Co-P1 y Co-R1 en un lote en la comunidad de Linaca, departamento de Francisco Morazán. La caracterización patogénica de los aislamientos mediante un sistema numérico (binario) de nomenclatura, permitieron identificar las razas 240 y 208 correspondientes a los aislamientos Co-R1 y Co-P1, respectivamente. Para confirmar las razas identificadas en este estudio se recomienda inocular nuevamente estos dos aislamientos bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa.

Palabras clave: Aislamientos monospóricos, diferenciales, humedad relativa, inoculación, sistema binario, temperatura, variación patogénica, virulencia.

CONTENIDO

Portada.....	i
Portadilla.....	ii
Autoría.....	iii
Página de firmas.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Agradecimientos a patrocinadores.....	vii
Resumen.....	viii
Contenido.....	ix
Índice de cuadros.....	xi
Índice de figuras.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	3
METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>C. lindemuthianum</i>	3
Recolección de muestras.....	3
Siembra.....	4
Purificación.....	4
Dispersión.....	4
Cultivo monospórico.....	4
Conservación y reactivación del hongo.....	4
METODOLOGÍA PARA INOCULACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RAZAS DE <i>C. Lindemutianum</i>	5
Preparación del inóculo.....	5
Inoculaciones en casa de malla.....	5
Ensayo 1: Evaluación de los aislamientos Co-Z1, Co-T1 y Co-L4 bajo condiciones de cámara húmeda.....	6
Ensayo2: Evaluación de los aislamientos Co-T1 y Co-L4 bajo condiciones de alta humedad y baja temperatura.....	6
Ensayo 3: Evaluación del aislamiento Co-R6 bajo condiciones de alta humedad y baja temperatura.....	6
Ensayo 4: Evaluación en finca.....	6
RE AISLAMIENTO DEL HONGO.....	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
AISLAMIENTOS.....	9

ENSAYO 1: EVALUACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CO-Z1, CO-T1 Y CO-L4 BAJO CONDICIONES DE CÁMARA HÚMEDA.....	9
ENSAYO 2: EVALUACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CO-T1 Y CO-L4 BAJO CONDICIONES DE ALTA HUMEDAD Y BAJA TEMPERATURA.....	10
ENSAYO 3: EVALUACIÓN DEL AISLAMIENTO CO-R6 BAJO CONDICIONES DE ALTA HUMEDAD Y BAJA TEMPERATURA.....	10
ENSAYO 4: EVALUACIÓN EN FINCA.....	11
RE AISLAMIENTO.....	14
CONCLUSIONES	15
RECOMENDACIONES	16
BIBLIOGRAFÍA	17

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1	Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungosos.....	7
2	Aislamientos obtenidos en el presente estudio, Zamorano, 2003.....	9
3	Temperatura y humedad relativa durante el Ensayo 1. Zamorano, 2003.....	10
4	Variaciones de temperatura y humedad relativa en los ensayos en casa de malla, Zamorano, 2003.....	11
5	Reacción de incidencia y severidad causada por el aislamiento Co-R1 en los testigos Catrachita y Desarrural en finca. Linaca, Honduras 2003.....	11
6	Reacción de los genotipos diferenciales de frijol al aislamiento Co-R1 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en la primera repetición en finca. Linaca, Honduras, 2003.....	12
7	Reacción de incidencia y severidad del aislamiento Co-P1 en los testigos Catrachita y Desarrural en finca. Linaca, Honduras 2003.....	12
8	Reacción de genotipos diferenciales al aislamiento Co-P1 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en finca. Linaca, Honduras, 2003.....	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1	Síntomas de antracnosis en frijol, Linaca, Honduras, 2003.....	3
2	Diagrama de flujo de la metodología para el aislamiento e identificación de <i>C. lindemuthianum</i> , Zamorano, 2003.....	5
3	Diagrama de flujo de la metodología para la inoculación e identificación de razas de <i>C.lindemuthianum</i>	8
4	Distribución de los genotipos diferenciales, Linaca, Honduras, 2003.....	8

INTRODUCCIÓN

En los diversos sistemas de producción de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) a nivel mundial existe una marcada diferencia entre la producción real y la potencial, atribuida principalmente a la reducción del rendimiento por el ataque severo de enfermedades (CIAT, 1982).

La planta de frijol es atacada por diversos organismos patógenos. Muchos de ellos son causantes de enfermedades de poca importancia económica; en otros casos, sin embargo, existen otras enfermedades que, por las reducciones importantes que ocasionan en el rendimiento, son consideradas entre las principales causas de la baja productividad del frijol en América Latina. La antracnosis, producida por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* es una de ellas (CIAT, 1981).

La antracnosis es una enfermedad de clima fresco, alta humedad relativa y lluvias frecuentes. La infección del hongo es favorecida por temperaturas entre 13 y 26° C, con un óptimo de 17° C. Tanto la infección como el desarrollo del hongo son retardados o inhibidos en temperaturas menores de 7°C ó mayores de 33° C. Se requiere una alta humedad relativa, mayor de 92 %, y una lámina de agua durante todos los estados de la germinación de esporas, incubación y esporulación (Pastor-Corrales, 1992).

La resistencia genética, que es la medida de control más adecuada y la que más se ha utilizado en muchas regiones, puede ser afectada por la existencia de diferentes razas o patotipos del hongo *C. lindemuthianum* (CIAT, 1982). No se conoce si en condiciones de campo, los cambios ocurridos en la reacción de los nuevos cultivares de frijol a *C. lindemuthianum*, de resistente a susceptible, se deban a modificaciones en la frecuencia de las razas existentes o a la aparición de nuevas razas por mutación o por migración, o a que el cultivar liberado simplemente no posea los genes de resistencia a las razas presentes en el campo. Por eso, para generar cultivares con resistencia duradera a patógenos variables como *C. lindemuthianum*, es muy importante no solo disponer de genes de resistencia, sino también conocer la reacción de esos genes a las diferentes razas del patógeno (Pastor-Corrales, 1994).

Según Kelly y Miklas (1999), se han identificado marcadores de tipo RAPD (OF10₅₃₀, OQ4₁₄₄₀, B355₁₀₀₀, OH20₄₅₀, OAS13₉₅₀, 0AL9₇₄₀, SAS13₉₅₀, OAB3₄₅₀, OAK20₈₉₀, 0Z4₅₆₀) para cinco genes dominantes independientes (Co-1, Co-2, Co-4², Co-5 y Co-6) que condicionan la resistencia a la antracnosis. Adicionalmente, se han desarrollado marcadores SCAR para dos de estos genes (Co-2 y Co-4²). Para América Central, se estima que la combinación más adecuada de genes resistentes a *C. lindemuthianum* es la del andino Co-1 con los genes mesoamericanos Co-2, Co-4², Co-5 y Co-6.

Para continuar con los estudios genéticos de la antracnosis se determinó la virulencia y la diversidad genética de aislamientos de *C. lindemuthianum* procedentes de zonas frijoleras de Honduras. Para lograr esto se obtuvieron aislamientos monospóricos del hongo, que fueron evaluados en viveros diferenciales para determinar la diversidad de razas de *C. lindemuthianum*. Según Pastor-Corrales (1994) esta información permite entender cómo la diversidad de este patógeno afecta los genes de resistencia, y facilita la conducción de estrategias apropiadas de mejoramiento genético para lograr el desarrollo de variedades de frijol con resistencia duradera a la antracnosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Los trabajos de aislamiento e inoculación de *C. lindemuthianum* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano, Honduras. Las inoculaciones y los ensayos de identificación de razas empleando el vivero de genotipos diferenciales de antracnosis, se realizaron en casas de malla y en una parcela de un productor de frijol en la comunidad de Linaca, Tatumbla, Francisco Morazán.

METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *C.lindemuthianum*

Recolección de muestras. En febrero de 2003 se recolectaron muestras de material experimental de la localidad de El Rancho y el Parque Nacional La Tigra, departamento de Francisco Morazán; y Jacaleapa, departamento de El Paraíso. Siguiendo el primer postulado de Koch, se recolectaron muestras de hojas de frijol con síntomas de antracnosis (figura 1). No se recolectaron hojas muy maduras para evitar contaminación con otros patógenos en el proceso de aislamiento. El tejido recolectado fue guardado en papel toalla dentro de bolsas de papel para evitar daños durante el transporte.



Figura 1. Síntomas de antracnosis en frijol, Linaca, Honduras, 2003.

El propósito de los aislamientos es obtener de las muestras recolectadas con síntomas de antracnosis, una cepa pura monospórica libre de contaminantes para la identificación de razas patogénicas presentes en las localidades mencionadas. Para esto se empleó el protocolo para aislamientos del patógeno de la antracnosis del INIAP (2001)¹, adaptado por Venegas (2002) en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano.

¹ INIAP (2001). Comunicación Personal.

Al aislarse patógenos causantes de enfermedades es común utilizar medios apropiados para su cultivo. Algunos requieren de sustancias específicas para su crecimiento y desarrollo, para lo cual se han creado nutrientes específicos artificiales o de extractos naturales que facilitan la multiplicación de estos patógenos (Cepeda, 1998).

Siembra. Las hojas infectadas fueron cortadas en trozos de tejido de aproximadamente 5 x 3 mm, con un bisturí sobre una paleta de madera. Luego, este tejido fue desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5%, para eliminar cualquier contaminante que se encontrara presente. Posteriormente, se sembraron de 4 a 5 trozos de tejido infectado por plato petri con medio papa dextrosa-agar (PDA) con tetraciclina al 2%; este medio de cultivo posee las características físicas y químicas que facilitan el desarrollo del hongo.

Purificación. Después de seis días de incubación se identificaron y reaislaron las esporas de *C. lindemutianum* entre los contaminantes que se desarrollaron en el medio PDA. El reaislamiento se hizo cortando con un bisturí trozos de 5 x 3 mm de agar con micelio y esporas del hongo, colocándolos en medio Mathur's mejorado por el CIAT con tetraciclina al 2%. Este medio de cultivo posee características nutritivas que le permiten al hongo desarrollarse y esporular apropiadamente.

Dispersión. Luego de que el cultivo purificado esporulara (aprox. 6 - 8 días), se extrajeron esporas con la ayuda de una punta de transferencia, y se hizo una suspensión de conidias. De esta suspensión, se colocaron tres gotas por cada plato petri con agar-agua y con un rastrillo de vidrio se esparcieron por todo el medio de cultivo.

Cultivo monospórico. Después de 24 horas de realizada la dispersión, se extrajeron las esporas individuales y se colocaron con una punta de transferencia en el medio de Mathur's. (Figura 2)

Conservación y reactivación del hongo. Una vez que se obtuvo el cultivo monospórico, se procedió a su conservación para su uso futuro. Existen diferentes métodos de conservación. El utilizado actualmente por el Laboratorio de Biotecnología es el de bajas temperaturas (-20°) y refrigerado a (4°C). Para esto se procedió a cortar y esterilizar pedazos de papel filtro de 2 x 2 cm y se colocó una sección de cultivo monospórico desarrollado sobre cada papel filtro en el plato petri con medio Mathur's. Luego de ocho días, cuando el hongo coloniza el papel filtro, se extrajo este con pinzas y se dejó secar a temperatura ambiente por siete días en platos petri estériles. Luego se colocaron en papel aluminio y en sobres pequeños de manila, se identificaron y se guardaron en la refrigeradora a -20 °C.

Los tres aislamientos monospóricos del Laboratorio de Biotecnología disponibles antes de iniciar este estudio (Co-Z1, Co-L4, Co-P1)² junto con los aislamientos obtenidos de las localidades de El Rancho (Co-R1 y Co-R6) y Jacaleapa (Co-J1) fueron reactivados. Para

² Nomenclatura utilizada por el Laboratorio de Biotecnología donde Co = nombre del patógeno, L= localidad de donde proviene la muestra y 4 = número de aislamiento monospórico.

esto se colocó un pedazo de papel filtro colonizado con *C. lindemutianum* en medio de Mathur's y se incubó a 24°C por seis días hasta su esporulación.

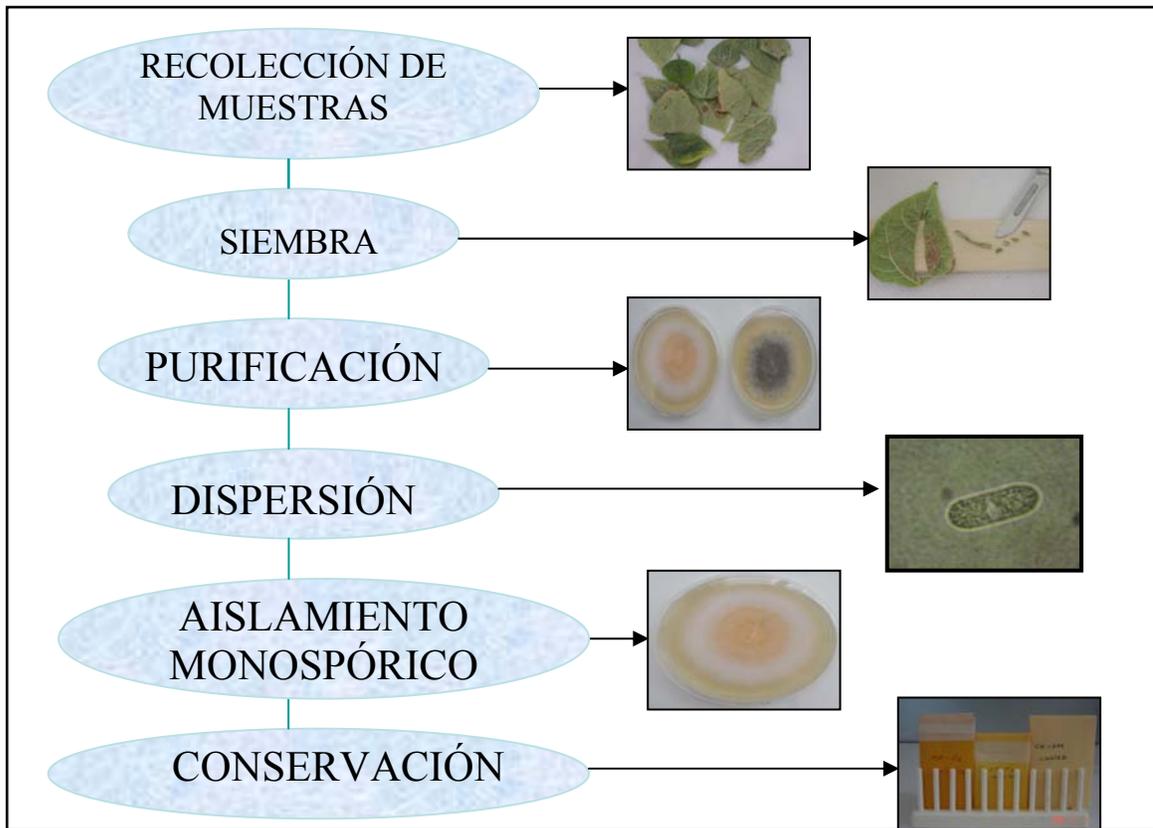


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología para el aislamiento e identificación de *C. lindemuthianum*, Zamorano, 2003.

METODOLOGÍA PARA INOCULACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RAZAS DE *C. lindemutianum*

Preparación del inóculo. La producción de esporas se realizó mediante dispersiones del cultivo monospórico en medio Mathur's. Los cultivos se incubaron durante ocho días a temperatura ambiente para que colonicen en su totalidad los platos petri. Luego, a cada plato se le colocó 30 ml de agua destilada estéril con 1 ul de Tween 20[®] (para dispersar las esporas); después se raspó y filtró el inóculo por una gasa estéril a un beaker de 100 ml. La concentración de esporas se ajustó a 1.2×10^6 conidias/ml mediante el hemacitómetro.

Inoculaciones en casa de malla. Se construyó una casa de malla de 2.05 x 3.05 x 1.88 m (ancho x largo x altura). Dentro de esta, se construyó una cámara húmeda de plástico para obtener las condiciones de humedad que *C. lindemutianum* necesita para su incubación y desarrollo en el hospedero. En esta estructura de malla se realizaron tres ensayos para evaluar la virulencia de los aislamientos obtenidos; en cada ensayo se hicieron

modificaciones de humedad y temperatura para observar la reacción del hospedero / patógeno.

Ensayo 1: Evaluación de los aislamientos Co-Z1, Co-T1 y Co-L4 bajo condiciones de cámara húmeda. Se evaluaron tres aislamientos monospóricos que presentaron excelentes características de desarrollo y esporulación (Co-Z1, Co-T1, Co-L4) en ocho variedades de frijol (Catrachita, G2333, SEL 1360, Cornell 49242, AB136, Desarrural, MDR y TU). Se sembraron dos plantas por macetero de 20 cm debidamente identificados. Se dividió la cámara húmeda con plástico en tres compartimentos, para evitar contaminación cruzada entre aislamientos. Se instaló un higrotermógrafo, para medir las variaciones de temperatura y humedad relativa. Se preparó 100 ml de inóculo de cada aislamiento monospórico y se empleó el atomizador # 15 DeVilbiss® para realizar las respectivas inoculaciones en el haz y el envés de las hojas. Las plantas inoculadas se incubaron en la cámara húmeda durante siete días, controlando la humedad con riegos paulatinos en el suelo de la cámara.

Ensayo 2: Evaluación de los aislamientos Co-T1 y Co-L4 bajo condiciones de alta humedad y baja temperatura. Se evaluaron dos aislamientos monospóricos (Co-T1 y Co-L4) en las variedades de frijol Catrachita (resistente) y Desarrural (susceptible). La siembra se realizó a razón de dos plantas por macetero de 15 cm de diámetro, debidamente identificados. Se dividió la cámara húmeda con plástico en dos compartimentos, para evitar contaminación cruzada entre aislamientos. Se colocó un higrotermógrafo, para medir las variaciones de temperatura y humedad relativa durante el día y la noche. Se instaló dos nebulizadores para mantener la humedad relativa alta, y un sistema de enfriamiento mediante un ventilador radiador. Se preparó 100 ml de inóculo por cada aislamiento monospórico y se realizó la inoculación.

Ensayo 3: Evaluación del aislamiento Co-R6 bajo condiciones de alta humedad y baja temperatura. Se evaluó el aislamiento monospórico Co-R6 en las variedades de frijol Catrachita (resistente) y Desarrural (susceptible). Se sembraron dos plantas por macetero de 15 cm de diámetro debidamente identificados. Posteriormente se las colocó en la cámara húmeda junto a un higrotermógrafo, dos nebulizadores y el sistema de enfriamiento.

Ensayo 4: Evaluación en finca. Debido a que las condiciones climáticas en Zamorano no son las adecuadas para el desarrollo del hongo, se decidió utilizar una parcela ubicada en la comunidad de Linaca, municipio de Tatumbla, departamento de Francisco Morazán. El terreno (155m²) se preparó con arado de tracción animal el 15 de mayo de 2003. Cuatro juegos de diferenciales compuestos de 12 genotipos (Michelite, Michigan Dark Red Kidney, Perry Marrow, Cornell 49242, Widusa, Kaboon, Mexico 222, PI 207262, TO, TU, AB136, y G 2333) fueron sembrados el 29 de mayo de 2003 (figura 4). Dos testigos, susceptible y resistente (Desarrural y Catrachita) fueron sembrados en los bordes de la parcela y cada cuatro genotipos diferenciales para comprobar la virulencia del aislamiento monospórico y para que el testigo susceptible sirviera de dispersor. A los 14 días (13 de junio 2003) se inocularon las plantas con dos aislamientos (Co-P1 y Co-R1) utilizando una bomba de mochila. Se empleó una repetición para el aislamiento Co-P1 y

tres repeticiones para Co-R1, debido a que el aislamiento Co-P1 produjo menor cantidad de esporas que el Co-R1. El 20 de junio se realizó la segunda inoculación con los aislamientos mencionados para crear mayor presión del patógeno sobre los diferenciales y los testigos. El 10 de julio, una vez que los síntomas de la enfermedad se manifestaron, se evaluaron los genotipos de acuerdo al sistema de evaluación 1 a 9 de la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungos (Cuadro 1), (CIAT, 1987). Los materiales se calificaron como resistentes cuando presentaron un nivel de severidad ≤ 3 , y susceptibles cuando presentaron una calificación ≥ 4 .

Cuadro 1. Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungos.

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

Fuente: CIAT (1987).

RE AISLAM IENTO DEL HONGO

Luego de realizadas las evaluaciones en el campo, y aplicando el cuarto postulado de Koch, se recolectaron muestras de tejido enfermo del testigo inoculado con cada aislamiento para su respectivo reaislamiento en el laboratorio, y comparación de sus características culturales con los aislamientos originales.

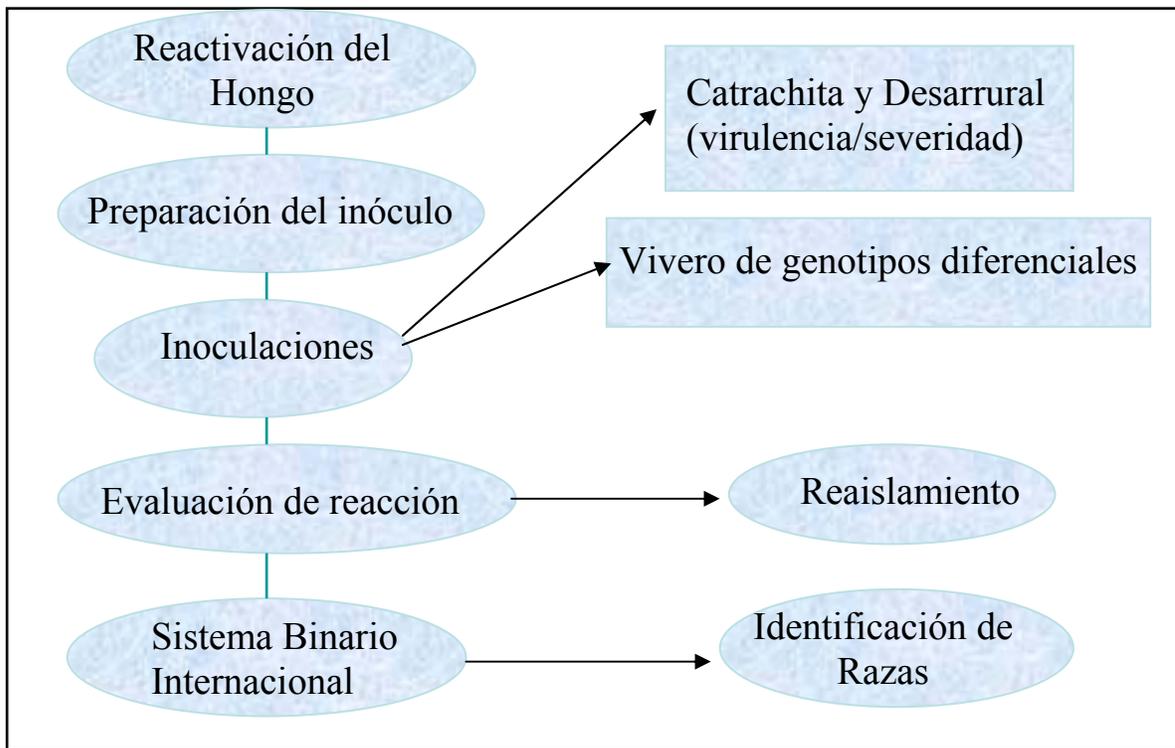


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología para la inoculación e identificación de razas de *C.lindemuthianum*.

Catrachita , resistente y Desarrural, susceptible	Michelite, MDRK, Perry M, Cornell.	Catrachita , resistente y Desarrural, susceptible	Widusa, Kaboon, México, PI.	Catrachita , resistente y Desarrural, susceptible	TO, TU, AB 136, G 2333.	Catrachita , resistente y Desarrural, susceptible
	Michelite, MDRK, Perry M, Cornell.		Widusa, Kaboon, México, PI.		TO, TU, AB 136, G 2333.	
	Michelite, MDRK, Perry M, Cornell.		Widusa, Kaboon, México, PI.		TO, TU, AB 136, G 2333.	
	Michelite, MDRK, Perry M, Cornell.		Widusa, Kaboon, México, PI.		TO, TU, AB 136, G 2333.	

Figura 4. Distribución de los genotipos diferenciales, Linaca, Honduras, 2003.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AISLAMIENTOS

Se reactivaron los aislamientos monospóricos Co-Z1, Co-L4 y Co-P1 conservados en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano. Se procesaron las muestras de plantas de frijol con síntomas de antracnosis obtenidas de las localidades de El Rancho, La Tigra y Jacaleapa obteniéndose los aislamientos monospóricos Co-R1, Co-R6, Co-T1 y Co-J, lográndose ampliar la colección de *C. lindemutianum* a siete aislamientos monospóricos.

Cuadro 2. Aislamientos obtenidos en el presente estudio, Zamorano, 2003.

Origen de la Recolección	Aislamiento	Fecha	Virulencia
El Rancho	Co-R1	Enero 2003	Si
El Rancho	Co-R6	Enero 2003	N/I
La Tigra	Co-T1	Febrero 2003	N/I
Jacaleapa	Co-J1	Mayo 2003	N/I
Los Planes	Co-P1 †	2002	Si
Zamorano	Co-Z1 †	2002	N/I
Lavanderos	Co-L4 †	2002	N/I

† Aislamientos existentes en el Laboratorio de Biotecnología

N/I=Virulencia no identificada.

ENSAYO 1: EVALUACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CO-Z1, CO-T1 Y CO-L4 BAJO CONDICIONES DE CÁMARA HÚMEDA

Después de siete días de la inoculación con los aislamientos Co-Z1, Co-T1 y Co-L4, las plantas no presentaron ningún síntoma típico de antracnosis, concluyendo que los aislamientos no presentaban virulencia o que el microclima no era el adecuado. Según Pastor- Corrales (1992), la temperatura y la humedad relativa óptima para que se desarrolle la enfermedad es de 17 °C y 92 %, respectivamente. En las condiciones del ensayo, la temperatura y humedad relativa presentes durante las horas del día fueron 26 °C y 59 %, y en la noche 20 °C y 90 % (Cuadro 3). Esto indica que durante el día las condiciones no eran favorables para la infección y desarrollo de la enfermedad. Según Bailey y Jerger (1992), los cambios precipitados de temperatura del día con la noche provocan una disminución en el crecimiento del micelio llevando a que la enfermedad se desarrolle con una baja severidad o inclusive la ausencia de infección en la planta.

Cuadro 3. Temperatura y humedad relativa durante el Ensayo 1. Zamorano, 2003.

Días ensayo	Temperatura (°C)		Humedad relativa (%)	
	8 am – 4pm	6pm-6am	8 am – 4pm	6pm-6am
1	27	21	49	73
2	25	18	61	97
3	24	21	74	90
4	26	21	64	90
5	26	20	60	95
6	27	21	52	87
7	27	19	53	96
Promedio	26	20	59	90

ENSAYO 2: EVALUACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CO-T1 Y CO-L4 BAJO CONDICIONES DE ALTA HUMEDAD Y BAJA TEMPERATURA

Para este ensayo se trataron de mejorar las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el día en la casa de malla, empleando un sistema de enfriamiento; este sistema redujo la temperatura en 4.6 °C y aumentó la humedad relativa en 32.3 % (Cuadro 4). Se reactivaron los aislamientos monospóricos Co-T1 y Co-L4; no se utilizó el aislamiento Co-Z1 por falta de esporulación favorable para la producción de conidias. A los siete días después de la inoculación se evaluaron las plantas, pero estas no presentaron síntomas de antracnosis. Se realizó una segunda inoculación al octavo día después de la inoculación, pero no se presentó ningún síntoma debido a que los aislamientos durante su conservación posiblemente habían perdido la viabilidad de sus esporas para infectar las plantas.

ENSAYO 3: EVALUACIÓN DEL AISLAMIENTO CO-R6 BAJO CONDICIONES DE ALTA HUMEDAD Y BAJA TEMPERATURA

Una vez que se logró controlar el microclima, se evaluó el aislamiento monospórico Co-R6 que presentó excelentes características de esporulación en medio de cultivo; Al realizar la evaluación de severidad, las plantas no presentaron los síntomas típicos de antracnosis.

La ausencia de síntomas de la enfermedad, según sugiere Castaño-Zapata (1994), es atribuida a la reducida capacidad de virulencia del patógeno aislado o a las condiciones climáticas que no favorecen la infección. Los patógenos consisten de un gran número de razas, cada una distinguiéndose de las otras por su habilidad para infectar ciertas variedades de una especie de plantas, pero no a otras. Todas las variedades poseen ciertos genes de resistencia o susceptibilidad que reaccionan en una forma diferente contra varias razas de un patógeno y sus genes de virulencia o avirulencia.

Cuadro 4. Variaciones de temperatura y humedad relativa en los ensayos en casa de malla, Zamorano, 2003.

Días ensayo	Temperatura (°C)			Humedad relativa (%)		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
1	27	21	23	49	90	95
2	25	20	23	61	97	82
3	24	20	22	74	96	87
4	26	21	25	64	94	91
5	26	20	23	60	87	88
6	27	20	24	52	95	96
7	27	27	26	53	80	92
Promedio	26	21	24	59	91	90

ENSAYO 4: EVALUACIÓN EN FINCA

Al evaluar el primer grupo de diferenciales inoculados con el aislamiento Co-R1, se observó una reacción de susceptibilidad de la variedad Desarrural, presentando una severidad de 8 y un 95 % de incidencia (Cuadro 5); comprobándose así que este aislamiento es virulento. Lo contrario sucedió con la variedad Catrachita que posee el gen de resistencia Co-6, que presentó resistencia (baja severidad e incidencia) al aislamiento Co-R1.

Cuadro 5. Reacción de severidad e incidencia causada por el aislamiento Co-R1 en los testigos Catrachita y Desarrural en finca. Linaca, Honduras 2003.

Variedad	Severidad †	Incidencia (%)
Catrachita (resistente)	2	10
Desarrural (susceptible)	8	95

† Severidad (1 = ausencia de síntomas; 9 = muerte de la planta)

Una vez confirmada la virulencia del aislamiento Co-R1, se evaluó la reacción presentada por los 12 genotipos diferenciales a este aislamiento. En este grupo se observó infección en Widusa, Kaboon, México 222 y PI207262, presentándose una severidad ≥ 4 . Se procedió a identificar la raza con el valor binario de los diferenciales, determinándose que este aislamiento caracteriza a la raza 240 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Reacción de los genotipos diferenciales de frijol al aislamiento Co-R1 de *Colletotrichum lindemuthianum* en finca. Linaca, Honduras, 2003.

Cultivar diferencial	Genes de resistencia	Valor Binario	Severidad †	Reacción al aislamiento Co-R1
1. Michelite	-----	1	1	-
2. MDRK	Co-1	2	2	-
3. Perry Marrow	Co-1 ³	4	1	-
4. Cornell 49242	Co-2	8	1	-
5. Widusa	-----	16	6	+
6. Kaboon	Co-1 ²	32	6	+
7. México 222	Co-3	64	7	+
8. PI 207262	-----	128	4	+
9. TO	Co-4	256	1	-
10. TU	Co-5	512	1	-
11. AB 136	Co-6, Co-8	1024	3	-
12. G 2333	Co-4 ² , Co-5, Co-7	2048	1	-
Raza				240

† Severidad (1 = ausencia de síntomas; 9 = muerte de la planta)

Con los tres juegos de diferenciales disponibles (3 repeticiones) se evaluó el aislamiento monospórico Co-P1. Se observó una reacción de susceptibilidad en Desarrural, determinándose así la virulencia positiva de este aislamiento (Cuadro 7). La variedad Catrachita presentó síntomas de resistencia.

Cuadro 7. Reacción de severidad e incidencia del aislamiento Co-P1 en los testigos Catrachita y Desarrural en finca. Linaca, Honduras 2003.

Repetición	Catrachita (resistente)		Desarrural (susceptible)	
	Severidad †	Incidencia (%)	Severidad †	Incidencia (%)
2	2	25	6	75
3	3	25	5	60
4	4	40	6	75

† Severidad (1 = ausencia de síntomas; 9 = muerte de la planta)

Se observó una reacción de susceptibilidad en Widusa, Kaboon y PI207262 en dos de las tres repeticiones de los diferenciales. Mediante el cálculo con el valor binario de los diferenciales de dos repeticiones, se obtuvo como resultado que el aislamiento Co-P1 corresponde a la raza 208 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Reacción de genotipos diferenciales al aislamiento Co-P1 de *Colletotrichum lindemuthianum* en finca. Linaca, Honduras, 2003.

Cultivar diferencial	Genes de Resistencia	Valor Binario	Severidad †			Reacción al aislamiento Co-P1		
			Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
1.Michelite	-----	1	1	3	3	-	-	-
2.MDRK	Co-1	2	2	2	1	-	-	-
3.Perry M.	Co-1 ³	4	3	1	3	-	-	-
4.Cornell49242	Co-2	8	2	3	1	-	-	-
5.Widusa	-----	16	6	4	3	+	+	-
6.Kaboon	Co-1 ²	32	1	3	4	-	-	+
7.México 222	Co-3	64	4	6	4	+	+	+
8.PI 207262	-----	128	4	5	3	+	+	-
9.TO	Co-4	256	3	2	5	-	-	+
10.TU	Co-5	512	2	3	3	-	-	-
11.AB 136	Co-6, Co-8	1024	1	2	4	-	-	+
12.G 2333	Co-42, Co-5, Co-7	2048	3	1	1	-	-	-
Raza			208	208	1376			

† Severidad (1 = ausencia de síntomas; 9 = muerte de la planta)

La reacción de susceptibilidad determinada por la severidad de daño en Widusa, México y PI207262, por parte del aislamiento Co-P1 en las dos repeticiones de diferenciales, indica que estos genotipos no presentan genes resistentes a la raza 208 de *C. lindemuthianum*.

En la última repetición de diferenciales se observó una reacción de severidad en los genotipos Kaboon, México 222, TO y AB 136; sólo la variedad México 222 coincide con los datos de las dos repeticiones anteriores. En esta repetición la raza correspondiente al aislamiento Co-P1 fue la 1376 (Cuadro 8). Se asume que esta variación en la infección fue debido a una contaminación de *C. lindemuthianum* de las siembras en los campos vecinos.

La reacción de severidad presentada en los genotipos diferenciales con los aislamientos Co-R1 y Co-P1, es relativamente baja ya que ningún diferencial obtuvo una severidad ≥ 7 . En el cultivar susceptible Desarrural las reacciones fueron de 8 y 6 con los aislamientos Co-R1 y Co-P1, respectivamente; lo cual sugiere que la severidad de daños no fue suficientemente alta en el ensayo. Debido a esto, es necesario repetir la evaluación de los aislamientos en la época de postrera del presente año.

RE AISLAMIENTO

Luego de realizar la evaluación de la reacción en los diferenciales y la determinación de las razas, se recolectaron muestras de tejido enfermo del testigo susceptible Desarrural de cada aislamiento utilizado en las inoculaciones. Al reaislar los aislamientos Co-R1 y Co-P1, estos presentaron las mismas características macro y microscópicas del aislamiento original. Según el cuarto postulado de Koch, esto corrobora que las infecciones de los dos aislamientos en el testigo Desarrural, corresponden a los respectivos cultivos monospóricos procesados en el laboratorio.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron aislamientos monospóricos (Co-R1, Co-R6, Co-T1, y Co-J) provenientes de muestras de frijol recolectados en las localidades de El Rancho y la Tigra, departamento de Francisco Morazán, y Jacaleapa, departamento de El Paraíso.

Se observó que *C. lindemuthianum* es muy exigente a condiciones climáticas favorables (alta humedad relativa y baja temperatura) para la infección de plantas y el desarrollo de la enfermedad.

Se realizó la caracterización patogénica preliminar de aislamientos monospóricos, determinando la raza 240 para el aislamiento Co-R1 y la raza 208 para el aislamiento Co-P1.

RECOMENDACIONES

Buscar alternativas para mejorar las condiciones microclimáticas para la incubación e infección de *C. lindemuthianum* en plantas de frijol a evaluarse en Zamorano.

Confirmar bajo condiciones ambientales controladas, la reacción de los genotipos diferenciales a los aislamientos Co-P1 y Co-R1, para reconfirmar las razas identificadas en el campo.

Hacer evaluaciones periódicas de las reacciones de severidad en los genotipos diferenciales para tener datos más precisos de las razas caracterizadas.

Seguir con los estudios de variabilidad patogénica de *C. lindemuthianum* para crear una base de datos de las razas predominantes en Honduras y facilitar el mejoramiento de la resistencia a la antracnosis.

Usar marcadores moleculares para la identificación de genes y fuentes de resistencia para facilitar el desarrollo de variedades resistentes a la antracnosis.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

Cepeda, M. 1998. Prácticas de fitopatología agrícola. UAAAN, México. 87 p.

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

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. Problemas de campo en los cultivos de frijol en América Latina. Eds. Cardona C.; Flor C. A.; Morales F.J.; Pastor – Corrales M. 2ª.ed. Cali, Colombia. 100p.

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

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

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

Pastor-Corrales, M. A. 1994. Importancia de la diversidad y evolución de *Colletotrichum lindemuthianum* para el logro de cultivares de frijol común con resistencia duradera a la antracnosis. Cali, Colombia, CIAT.

Venegas, J. 2002. Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis. Lic. Ing. Agr. Zamorano, Honduras, EAP. 49 p.

