

**Validación de técnicas para el aislamiento y
caracterización de la patogenicidad del hongo
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid en
genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*
L.)**

Juan David Jimenez Pardo

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Validación de técnicas para el aislamiento y
caracterización de la patogenicidad del hongo
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid en
genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*
L.)**

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

Presentado por

Juan David Jimenez Pardo

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Validación de técnicas para el aislamiento y caracterización de la patogenicidad del hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Juan David Jimenez Pardo

Resumen. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) principal fuente de proteína en Centro América y El Caribe. La pudrición gris del tallo causada por *Macrophomina phaseolina* es una de las enfermedades emergentes en la región, favorecida por el incremento en la frecuencia de períodos de estrés de sequía y de la temperatura. El objetivo del estudio fue validar técnicas para el aislamiento y caracterización de la patogenicidad de *M. phaseolina* en frijol común, para su uso en el mejoramiento genético de la resistencia a esta enfermedad. En la prueba de patogenicidad de 34 aislamientos puros a partir de 40 muestras con síntomas típicos de la enfermedad procedentes de Zamorano y Nacaome, se seleccionaron los dos aislamientos más patogénicos (Mph-9 y Mph-32). Estos dos aislamientos fueron utilizados para evaluar las técnicas de inoculación con arroz blanco, palillos de dientes y PDA en 10 genotipos de frijol, y en casa de malla y camas de infección. Se presentaron variaciones en la reacción a la inoculación, expresada en severidad de daño en los genotipos de frijol, debidas a los aislamientos, técnicas de inoculación y ambientes, e interacciones entre los genotipos y cada uno de estos factores. Se recomienda evaluar un mayor número de aislamientos patogénicos y técnicas de inoculación, para desarrollar un protocolo efectivo para el mejoramiento genético de la resistencia a la pudrición gris del tallo en frijol común.

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

Abstract. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a main source of protein in Central America and the Caribbean. Ashy stem blight caused by *Macrophomina phaseolina* is one of the emerging diseases in the region due to the increase in the frequency of periods of drought and heat. The objective of the study was the validation of techniques for the isolation and pathogenic characterization of *M. phaseolina* in common bean, and their use on genetic improvement of resistance to this disease. On the pathogenicity test of 34 isolates of *M. phaseolina* obtained from 40 samples of bean plants with typical symptoms of ashy stem blight from Zamorano and Nacaome, two pathogenic isolates (Mph-9 and Mph-32) were selected. These two isolates were used to evaluate the inoculation techniques using white rice, toothpicks and PDA in 10 bean genotypes, in screen house and infection beds. Variation on the reaction to inoculation, expressed on disease severity on the bean genotypes, due to the isolates, inoculation techniques and environments, and interactions of the genotypes with these factors were observed. It is recommended to evaluate of a larger group of pathogenic isolates and inoculation techniques, to develop an effective protocol for the genetic improvement of common bean resistance to ashy stem blight.

Key words: Ashy stem blight, inoculation techniques, genetic resistance, disease severity.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de Cuadros y Figuras	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4. CONCLUSIONES	20
5. RECOMENDACIONES	21
6. LITERATURA CITADA	22

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Identificación de los aislamientos de <i>Macrophomina phaseolina</i> obtenidos de muestras de tallos con síntomas típicos de la pudrición gris colectadas en lotes de investigación de frijol de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano y en la Escuela Luís Landa en Nacaome, Honduras, 2017.....	5
2. Genotipos de frijol común utilizados para evaluar las técnicas de inoculación de <i>Macrophomina phaseolina</i> con arroz infectado, palillos de dientes y PDA.....	8
3. Severidad de daño (escala 1-9) promedio de tres lecturas de la prueba de patogenicidad de 34 aislamientos de <i>Macrophomina phaseolina</i> en plántulas de Amadeus 77 y BAT 477 crecidas en cámara húmeda e inoculadas con sorgo.....	13
4. Severidad de daño (1-9) promedio de 10 genotipos de frijol inoculados con los aislamientos Mph-32 y Mph-9 de <i>Macrophomina phaseolina</i> en casa de malla y camas de infección usando la técnica de arroz. Zamorano, Honduras, 2018.	16
5. Severidad de daño (mm de tejido dañado) promedio en genotipos de frijol a los 35 días después de la inoculación con los aislamientos Mph-32 y Mph-9 de <i>Macrophomina phaseolina</i> en casa de malla y en camas de infección usando la técnica de palillos de dientes. Zamorano, Honduras, 2018.....	17
6. Severidad de daño (mm de tejido afectado) promedio de plantas de 10 genotipos de frijol inoculadas con los aislamientos Mph-32 y Mph-9 de <i>Macrophomina phaseolina</i> en casa de malla usando la técnica de inoculación con PDA.	19
7. Severidad de daño (escala 1-9 y mm de tejido afectado) promedio y valor P de los aislamientos Mph-32 y Mph-9 de <i>Macrophomina phaseolina</i> en camas de infección y casa de malla usando técnicas de inoculación con arroz, palillos y PDA en 10 genotipos de frijol.	19

1. Escala 1-9 para evaluar la severidad de pudriciones radicales y del hipocotíleo en plántulas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) modificada de Rojas y Arredondo (2016)	7
2. Escala de severidad de daño 1-9 (1-3= sin o pocos daños; 4-6= daños parciales de las plantas; 7-9= la mayor parte de la planta presenta daños) por <i>Macrophomina phaseolina</i> utilizada para evaluar la técnica de inoculación con arroz blanco en casa de malla y camas de infección en frijol común.	9
3. Plantas de frijol inoculadas en camas de infección y casa de malla con aislamientos de <i>Macrophomina phaseolina</i> mediante la técnica de palillo de dientes (Echavez-Badel y Beaver 1987).	10
4. Severidad de daño (1-9) promedio de tres lecturas de la prueba de patogenicidad de 34 aislamientos de <i>Macrophomina phaseolina</i> en plántulas de Amadeus 77 y BAT 477 crecidas en cámara húmeda e inoculadas con semilla de sorgo infectada. Zamorano, Honduras, 2018.....	14

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los alimentos básicos y la principal fuente de proteína para la población rural y urbana de menores ingresos en Centroamérica y el Caribe (Rosas *et al.* 2000). El frijol es cultivado mayormente por pequeños agricultores con recursos insuficientes y dependientes de los patrones de precipitación de lluvias, lo que favorece el desarrollo de enfermedades que inciden de manera significativa a que los rendimientos sean bajos e inestables (CIAT 1987).

La región del Corredor Seco Centroamericano, ubicada entre la costa pacífica de Chiapas en México hasta el oeste de Costa Rica incluyendo parte occidental de Panamá, se caracteriza por tener periodos irregulares de lluvias, convirtiéndola en una de las más susceptibles a las variaciones y los cambios del clima a nivel mundial (FAO 2017). En esta zona, se han registrado pérdidas de 281,000 hectáreas de maíz y frijol, destacando la pérdida aproximada del 82% de estos cultivos en Honduras, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria y nutricional de 2.1 millones de personas. Según el Instituto de Investigación Internacional de Clima y Sociedad/Centro de Predicciones Climáticas (IRI/CPC), existe un 60% de probabilidad de que entre septiembre y diciembre de 2018, se inicie un nuevo fenómeno de El Niño en esta región (FAO 2018).

La pudrición gris, causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (Mayek-Pérez y Hernández-Delgado 2010), es una de las principales enfermedades del frijol común en condiciones cálidas y secas frecuentemente asociada con estrés de sequía, aunque se puede presentar bajo condiciones tropicales húmedas. En Centro América y El Caribe se presenta con mayor frecuencia en las siembras de postrera con períodos de sequía terminal y en las de verano bajo riego. Esta enfermedad está apareciendo con mayor frecuencia causando daños severos en Centro América y El Caribe y asociada con condiciones de estrés de sequía y altas temperaturas debidos a los efectos del cambio climático. En Zamorano, la pudrición gris del tallo ha sido reportada afectando plantas de frijol en ensayos de tolerancia a la sequía conducidos desde hace 15 años (Frahm *et al.* 2003), y actualmente es uno de los énfasis de investigación del Programa de Investigaciones en Frijol de Zamorano.

El patógeno causante de la pudrición gris *M. phaseolina* (Tassi) Goid posee una amplia variabilidad patogénica que le permite adaptarse y atacar a hospederos susceptibles en ambientes diversos produciendo micro-esclerocios, micelios y picnidios en tejidos de los hospederos, que incluye además del frijol común, al maíz, sorgo, soya, ajonjolí y algodón. Las estrategias culturales, químicas y biológicas para el manejo de esta enfermedad no son adecuadas para controlarla de manera eficiente y económica. La resistencia genética se

presenta como una alternativa favorable para reducir el daño y las pérdidas de rendimiento causados por el patógeno, y para que los usos de otras medidas de manejo y control del patógeno sean más efectivas y económicas.

El estudio se inicia con la recolección de 34 muestras de plantas de frijol con síntomas típicos de la enfermedad provenientes de dos municipios de Honduras con condiciones climáticas diferentes, Nacaome, departamento de Valle y San Antonio de oriente, departamento de Francisco Morazán, y la evaluación de tres técnicas de inoculación (Echavez-Badel y Beaver 1987; Awabi y Pastor-Corrales 1990; Castellanos *et al.* 2011) para caracterizar las reacciones de resistencia o susceptibilidad a la pudrición gris causada por el hongo *M. phaseolina* utilizando un juego de 10 genotipos de frijol común. Otros métodos citados por Viteri y Linares (2017), Mayek-Pérez y Hernandez-Delgado (2010) serán evaluados en estudios posteriores.

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Obtener aislamientos del hongo a partir de muestras de plantas de frijol con síntomas típicos de la pudrición gris y cultivos puros del agente causal *M. phaseolina*.
- Realizar pruebas de patogenicidad y la selección de aislamientos altamente patogénicos.
- Evaluar técnicas de inoculación y la reacción de 10 genotipos de frijol común a la inoculación con dos aislamientos patogénicos de *M. phaseolina*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se realizó durante el período de noviembre de 2017 hasta septiembre de 2018, en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada, y casas de malla y camas de infección del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada a una altura de 800 msnm, en el departamento de Francisco Morazán, Honduras. Esta zona presentó condiciones climatológicas de temperatura promedio anual de 24 °C y una precipitación de 466.8 mm.

A. Procedimiento experimental para la obtención de aislamientos de *Macrophomina phaseolina*.

Recolección de aislamientos. Se colectaron 40 muestras de tallos de plantas de frijol con infección natural con síntomas típicos de la pudrición gris (*M. phaseolina*), provenientes de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano y la Escuela Luis Landa, Nacaome, Valle (Cuadro 1). Las muestras colectadas en el campo fueron identificadas y traídas al Laboratorio de Biotecnología Aplicada en bolsas de papel.

Los síntomas típicos de la pudrición gris en plantas de frijol empiezan con chancros pequeños e irregulares de color negro en los tallos cerca de la superficie del suelo; los chancros se alargan en ambas direcciones hacía el hipocotíleo, a menudo pelando los tallos, para luego estos chancros negros volverse de color gris afectando tallos y vainas (Harveson *et al.* 2017).

Aislamiento y purificación del hongo. En el laboratorio, el tejido infectado con *M. phaseolina* fue desinfectado en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 minutos; seguido de un triple lavado con agua destilada estéril y secado en toallas de papel filtro estériles durante 10 minutos. El fragmento de tejido infectado se colocó en platos Petri conteniendo un medio papa-dextrosa-agar (PDA) a razón de 36 g/L. Los aislamientos fueron incubados durante 7 días a 28 °C en completa oscuridad, observándose el desarrollo y las características típicas de crecimiento de *M. phaseolina*. Luego cada aislamiento fue transferido a platos Petri nuevos con PDA y colocados a 28 °C en incubadora. Después de 16 horas se observó el crecimiento activo del hongo en un estereoscopio, identificándose las hifas en cada aislamiento y con la ayuda de una aguja de disección se aisló una sección

de la hifa y se sembró en una nueva caja Petri con medio PDA la cual se incubó a 28 °C durante 10 días, obteniéndose un cultivo mono-hifal.

Conservación y almacenamiento en papel filtro a -20 °C. Se colocaron 10 cuadros de papel filtro de 10×10 mm, previamente esterilizados en cajas Petri con medio de cultivo PDA, y de cada asilamiento puro de *M. phaseolina* se sacó un disco (4 mm) y se colocó sobre cada cuadro de papel filtro, para luego incubarlo a 28 °C durante 12 días. Después de que cada asilamiento del hongo invadió los cuadros de papel filtro, estos se secaron en incubadora a 28 °C durante 7 días. Finalmente, se transfirieron a bolsas de papel mantequilla estéril, se rotularon y se almacenaron a -20 °C.

Cuadro 1. Identificación de los aislamientos de *Macrophomina phaseolina* obtenidos de muestras de tallos con síntomas típicos de la pudrición gris colectadas en lotes de investigación de frijol de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano y en la Escuela Luís Landa en Nacaome, Honduras, 2017.

No	Aislamiento	Localidad
1	Mph-2	Lote B y C
2	Mph-9	Lote B y C
3	Mph-10	Lote B y C
4	Mph-11	Lote B y C
5	Mph-15	Lote B y C
6	Mph-16	Lote B y C
7	Mph-17	Lote B y C
8	Mph-19	Lote 24,26
9	Mph-21	Lote 24,26
10	Mph-22	Lote 24,26
11	Mph-23	Lote 24,26
12	Mph-25	Lote 24,26
13	Mph-26	Lote 24,26
14	Mph-30	Lote 21
15	Mph-31	Lote 21
16	Mph-32	Lote 21
17	Mph-34	Lote 21
18	Mph-35	Lote 21
19	Mph-36	Lote 21
20	Mph-38	Lote 21
21	Mph-39	Lote 21
22	Mph-41	Lote 21
23	Mph-42	Lote 21
24	Mph-43	Lote 21
25	Mph-44	Lote 21
26	Mph-46	Lote 21
27	Mph-47	Lote 21
28	Mph-48	Lote 21
29	Mph-49	Lote 21
30	Mph-50	Lote 21
31	Mph-51	Lote 21
32	Mph-52	Lote 21
33	Mph-56	Lote 25-27
34	Mph-59	Nacaome

Reactivación de los aislamientos. Con una pinza estéril se extrajeron los cuadros de papel filtro de los 34 aislamientos del hongo conservados a -20 °C, y se colocaron individualmente en cajas Petri con medio PDA e incubados a 28 °C durante 7 días.

Verificación de morfología y crecimiento del hongo en medio de cultivo PDA. Con el fin de comprobar las características morfológicas y de crecimiento del hongo bajo condiciones de laboratorio, se realizó la incubación de los aislamientos en medio de cultivo PDA. Se registraron la coloración, el tipo de estructuras y el tiempo que tomo para cubrir completamente el plato Petri con micelio.

B. Prueba de patogenicidad de aislamientos de *Macrophomina phaseolina*

Para llevar a cabo la prueba de patogenicidad de los aislamientos de *M. phaseolina* obtenidos de plantas afectadas por la pudrición gris en Zamorano y Nacaome, se siguió el procedimiento descrito por Rojas y Arredondo (2016).

Preparación del inóculo en semilla de sorgo. Se utilizaron 20 g de semilla de sorgo (*Sorghum bicolor*) para incrementar el inóculo de cada uno de los 34 aislamientos. La semilla fue lavada en un beaker con agua destilada, luego se depositaron en platos Petri con 50 mL de agua destilada y se realizó una doble esterilización consecutiva en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, luego se dejó enfriar durante 12 h, para luego esterilizar nuevamente por dos veces consecutivas, bajo las mismas condiciones. Los 34 aislamientos de *M. phaseolina* previamente reactivados se colocaron en medio de cultivo PDA durante 4 días. Con una pinza estéril se colocaron 18 semillas de sorgo, justo en el margen de crecimiento micelial del hongo en cada plato Petri, los cuales se cubrieron y sellaron con papel parafinado. Los platos se rotularon con marcador permanente y se incubaron a 28 °C durante 6 días, para lograr que cada aislamiento invadiera las semillas de sorgo.

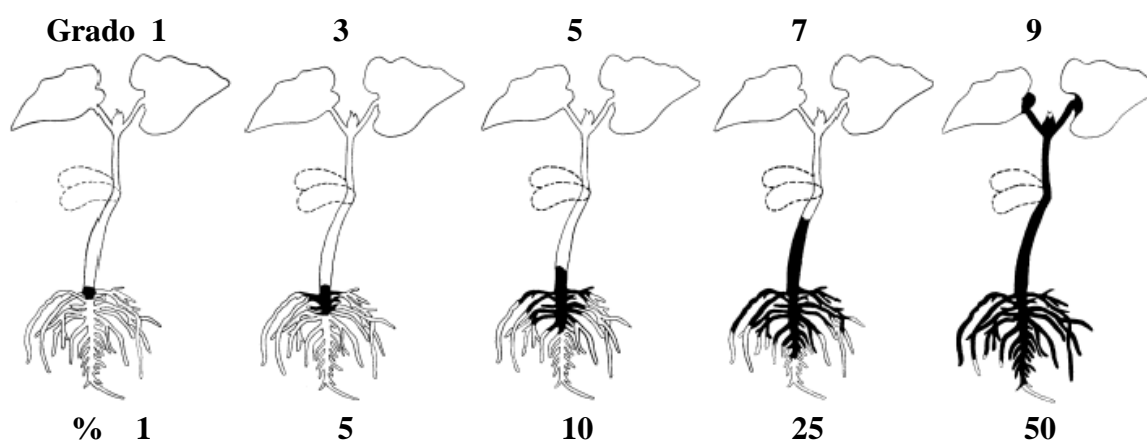
Germinación de semilla y producción de plántulas de frijol. Para la prueba de patogenicidad los genotipos de frijol utilizados fueron BAT 477 y Amadeus 77, resistente y susceptible a *M. phaseolina*, respectivamente. La semilla de ambos genotipos se pre germinó durante tres días. Para las pruebas se utilizaron canaletas de PVC, lavadas y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%. Las canaletas se llenaron de arena estéril y se colocaron en una casa de malla; se sembraron 50 semillas pre germinadas de BAT 477 y Amadeus 77 por cada canaleta para producir plántulas.

Inoculación de plántulas con los aislamientos. A los 10 días de la siembra en las canaletas, se seleccionaron plántulas de BAT 477 y Amadeus 77 que tuvieran raíces bien desarrolladas y sanas. Las plántulas se llevaron al laboratorio, se lavaron con agua destilada y se colocaron tres plántulas por cada cámara húmeda plástica de material PET transparente (tereftalato de polietileno) de 16×13×8 cm con tapa, previamente esterilizadas con alcohol al 70%. Antes de colocar las plántulas en las cámaras húmedas, se colocó un papel toalla estéril humedecido con agua destilada estéril, y sobre el papel se colocaron bases plásticas con celdas de 12×8 cm. Una vez preparadas las cámaras húmedas con las tres plántulas, con la ayuda de una pinza estéril se colocaron tres granos de sorgo por plántula, previamente inoculados con los aislamientos del hongo, en la base de la raíz principal e inicio de raíces

secundarias; luego se sellaron las cámaras y se incubaron durante 10 días a 24 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad. Se realizaron aspersiones con agua destilada dentro de las cámaras cuando fue necesario, para mantener la humedad interna y un ambiente adecuado para el desarrollo del patógeno.

Evaluación y selección de aislamientos patogénicos. Las evaluaciones de severidad en las plántulas se realizaron a los 2, 5 y 10 días después de inoculadas, utilizando una escala 1-9 de severidad de daño modificada de Rojas y Arredondo (2016) que se muestra en la Figura 1.

Grado	Descripción
1	Síntomas iniciales de pudrición en el punto de inoculación y tejido circundante (1% del área afectada).
3	Cambio de color o ablandamiento de tejidos en el punto de inoculación y tejido circundante (5% del área afectada).
5	Hipocotíleo y raíces afectadas. Pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido (10% del área afectada).
7	Hipocotíleo y raíces afectadas. Pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido y presencia de signos del patógeno (25% del área afectada).
9	Hipocotíleo y raíces afectadas. Pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido y presencia de signos del patógeno (50% del área afectada).



Etapa fenológica V3

Área negra= tejido enfermo; área blanca= tejido sano; área punteada= cotiledones.

Figura 1. Escala 1-9 para evaluar la severidad de pudriciones radicales y del hipocotíleo en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) modificada de Rojas y Arredondo (2016).

C. Evaluación de técnicas para la inoculación de *Macrophomina phaseolina* en plantas de frijol

Se evaluaron tres técnicas de inoculación utilizando un grupo de 10 genotipos de frijol incluyendo líneas con reacción resistente y susceptible identificadas en ensayos previos (Cuadro 2). Los genotipos de frijol fueron inoculados con los aislamientos Mph-9 y Mph-32 de *M. phaseolina*, previamente seleccionados en la prueba de patogenicidad llevada a cabo en el laboratorio usando la técnica de infección de plántulas con semilla de sorgo en cámara húmeda. Las técnicas de inoculación utilizadas fueron arroz infectado, palillos de dientes y PDA, utilizando semilla de frijol pre germinada durante tres días en condiciones de laboratorio. Las evaluaciones se realizaron en casas de malla, utilizando maceteros de 8" de diámetro a razón de 3 plantas /macetero conteniendo un sustrato suelo: compost pasteurizado para facilitar el crecimiento y desarrollo adecuado de las plantas de frijol. Las técnicas de inoculación con arroz infectado y palillos de dientes fueron también evaluadas en camas de infección, sembrando semilla de los 10 genotipos en surcos de 1.2 m de largo y a distancias de 0.5 m entre surcos y 0.1 m entre plantas.

Cuadro 2. Genotipos de frijol común utilizados para evaluar las técnicas de inoculación de *Macrophomina phaseolina* con arroz infectado, palillos de dientes y PDA.

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

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

Técnica de inoculación con arroz blanco. Se utilizó la técnica con inóculo incrementado en arroz blanco (Castellanos *et al.* 2011). Se pesaron 25 g de arroz blanco, se lavaron con agua destilada, se escurrieron y se depositaron en un plato Petri agregando 12.5 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C, durante 20 minutos, y se dejó enfriar durante 12 h; concluido este tiempo, se esterilizo nuevamente, en las mismas condiciones.

Se realizó la suspensión del hongo, agregando 5 mL de agua destilada, en cada plato Petri previamente reactivado con los aislamientos Mph-9 y Mph-32 y con la ayuda de una espátula estéril, se raspo la superficie y con una pipeta Pasteur se succionó la suspensión del hongo. Se agregaron 0.5 ml de la suspensión del hongo en cada plato Petri conteniendo arroz, y se incubó durante 15 días a 28 °C en completa oscuridad. Las cajas se destaparon y se invirtieron, y se dejaron un día en la incubadora para eliminar el exceso de humedad. Con una espátula estéril, el arroz fue dividido en pequeños pedazos o trozos, luego esparcido sobre toallas de papel estéril y secados en la cámara de flujo laminar a ± 24 °C durante 3 días. Seguidamente, el arroz fue molido en licuadora hasta convertirlo en polvo y envasado en un beaker, para posteriormente realizar las inoculaciones en plantas de frijol crecidas en casas de malla y camas de infección.

En casas de malla se sembraron tres semillas de frijol por cada macetero que contenía 4 kg de suelo agregando 2 g de inoculo de arroz sobre cada semilla (0.5 g/kg de suelo). Para las camas de infección, se sembraron 10 semillas por surco. Las cinco semillas ubicadas en el centro, se delimitaron con etiquetas de plástico y se le agregaron 6 g de inoculo al fondo del surco antes de cubrir. Las lecturas de severidad de daños (escala 1-9) causados por el patógeno en las plantas, se realizaron a los 21 DDS (Figura 2).



Figura 2. Escala de severidad de daño 1-9 (1-3= sin o pocos daños; 4-6= daños parciales de las plantas; 7-9= la mayor parte de la planta presenta daños) por *Macrophomina phaseolina* utilizada para evaluar la técnica de inoculación con arroz blanco en casa de malla y camas de infección en frijol común.

Técnica de inoculación con palillos de dientes. Se utilizaron platos Petri con medio de cultivo PDA y en el centro se colocó un disco de 5 mm con inóculo de los aislamientos Mph-9 y Mph-32. Luego alrededor del disco se colocaron de palillos de dientes de 2 cm de largo, previamente esterilizados. Los platos Petri con los palillos se incubaron a 28 °C durante 15 días en completa oscuridad.

Las plantas sembradas en maceteros en casas de malla y camas de infección fueron inoculadas utilizando la técnica de palillos de dientes desarrollada por Echavez-Badel y Beaver (1987), realizando una punción con los palillos con *M. phaseolina* en la base del tallo por debajo del nudo cotiledonal a los 15 DDS (Figura 3). Las lecturas de incidencia (%) y severidad (daño de tejido en mm) causados por el patógeno en las plantas, se realizaron a los 35 después de la inoculación, cosechando los tallos y abriéndolos con un bisturí por la mitad, para medir con pie de rey los mm de avance del daño causado por la enfermedad en cada planta.



Figura 3. Plantas de frijol inoculadas en camas de infección y casa de malla con aislamientos de *Macrophomina phaseolina* mediante la técnica de palillo de dientes.

Técnica de inoculación con PDA. Para inocular las plantas se cortaron discos de 2 mm de PDA de cada aislamiento, y se colocaron en un pedazo de tape de 1.5 cm de largo, se realizó una incisión con un bisturí en la base del tallo por debajo del nudo cotiledonal en plantas de 15 DDS siguiendo la técnica de Echavez-Badel y Beaver (1987). Se colocó el tape con

el pedazo de cultivo del hongo en PDA manteniendo en contacto del inoculo con la herida. Las lecturas de severidad de daños causados por el patógeno en las plantas de frijol se realizaron a los 35 DDS, cosechando los tallos y abriéndolos con un bisturí por la mitad, para medir el avance del daño (en mm) causado por el aislamiento de *M. phaseolina* en cada planta con un pie de rey.

Manejo de los ensayos. El manejo de los ensayos en casas de malla y en camas de infección se hicieron procurando un buen crecimiento y desarrollo de las plantas. Se utilizaron riegos diarios para mantener la humedad adecuada para las plantas. El control de insectos se hizo de manera preventiva según recomendaciones. No se realizó control de enfermedades para evitar controlar la pudrición gris y afectar la infección y desarrollo.

Unidad y diseño experimental. La unidad experimental en casas de malla fue maceteros con tres plantas, y en las camas de infección cinco plantas por surco. Para este estudio, se utilizó un diseño de bloques completos al azar con ocho repeticiones en casas malla y cuatro repeticiones en camas de infección.

Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con el programa estadístico INFOSTAT® versión 2018. Se realizaron análisis de varianza y separación de medias por DMS con una probabilidad del 5% ($\alpha=0.05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Obtención de aislamientos puros de *Macrophomina phaseolina*.

Siguiendo los procedimientos sugeridos por Castellanos *et al.* (2011) para el aislamiento y purificación en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada, se lograron obtener 34 aislamientos puros a partir de cultivos mono-hifales de 40 muestras de plantas con síntomas típicos de pudrición gris del tallo causados por el hongo *M. phaseolina* en frijol común (Abawi y Pastor Corrales, 1990; Mayek-Pérez y Hernandez-Delgado, 2010) recolectadas en varios lotes de Zamorano y en la Escuela Luís Landa en Nacaome, Valle.

B. Prueba de patogenicidad de aislamientos de *Macrophomina phaseolina*.

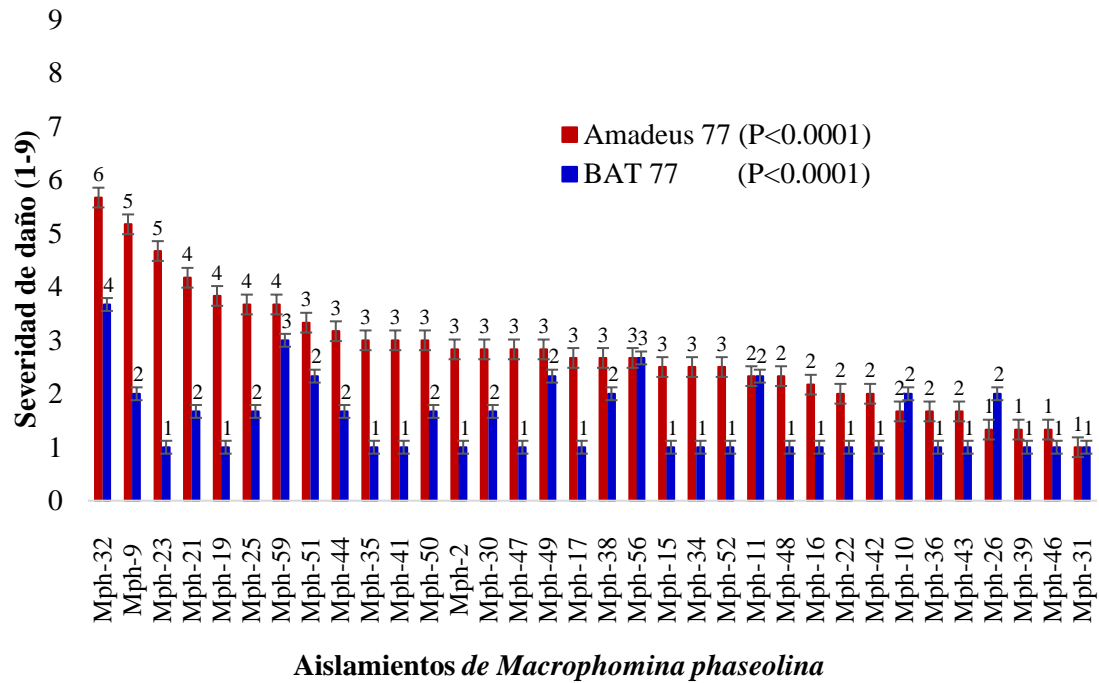
Los resultados promedios de tres lecturas de la severidad de daño a los 2, 5 y 10 días después de la inoculación, de los 34 aislamientos de *M. phaseolina* en plántulas de 10 días de los genotipos de frijol BAT 477 y Amadeus 77 crecidos en cámara húmeda e inoculados con semillas de sorgo infectadas, se presentan en el Cuadro 3.

Los promedios de severidad de daño (escala 1-9) fueron de 2.8 en Amadeus 77 y 1.5 en BAT 477, sugiriendo una baja severidad de la mayoría de los aislamientos; sin embargo, los aislamientos Mph-32 y Mph-9 fueron los de mayor severidad, presentando promedios de 6 y 4 en Amadeus 77, y 5 y 2 en BAT 477, respectivamente (Figura 4). Como se esperaba, la severidad de los aislamientos fue mayor en Amadeus 77, reportado como susceptible, que en BAT 477, reportado como intermedio a resistente. De acuerdo a los resultados y considerando la mayor severidad de los aislamientos Mph-32 y Mph-9, se seleccionaron estos aislamientos para realizar las evaluaciones de patogenicidad en líneas de frijol crecidas en casas de malla y camas de infección.

Cuadro 3. Severidad de daño (escala 1-9) promedio de tres lecturas de la prueba de patogenicidad de 34 aislamientos de *Macrophomina phaseolina* en plántulas de Amadeus 77 y BAT 477 crecidas en cámara húmeda e inoculadas con sorgo.

No.	Aislamiento	Amadeus 77	BAT 477
1	Mph-32	6	4
2	Mph-9	5	2
3	Mph-23	5	1
4	Mph-21	4	2
5	Mph-19	4	1
6	Mph-25	4	2
7	Mph-59	4	3
9	Mph-51	3	2
8	Mph-44	3	2
10	Mph-35	3	1
11	Mph-41	3	1
12	Mph-50	3	2
13	Mph-2	3	1
14	Mph-30	3	2
15	Mph-47	3	1
16	Mph-49	3	2
17	Mph-17	3	1
18	Mph-38	3	2
19	Mph-56	3	3
20	Mph-15	3	1
21	Mph-34	3	1
22	Mph-52	3	1
23	Mph-11	2	2
24	Mph-48	2	1
25	Mph-16	2	1
26	Mph-22	2	1
27	Mph-42	2	1
28	Mph-10	2	2
29	Mph-36	2	1
30	Mph-43	2	1
31	Mph-26	1	2
32	Mph-39	1	1
33	Mph-46	1	1
34	Mph-31	1	1
	Valor p	<0.0001**	0.002**
	Promedio	2.8	1.5
	DMS 0.05	1.4	1.3
	CV (%)	30.2	52.7
	R ²	0.84	0.63

** Diferencia significativa al 1%.



Aislamientos de *Macrophomina phaseolina*

Figura 4. Severidad de daño (1-9) promedio de tres lecturas de la prueba de patogenicidad de 34 aislamientos de *Macrophomina phaseolina* en plántulas de Amadeus 77 y BAT 477 crecidas en cámara húmeda e inoculadas con semilla de sorgo infectada. Zamorano, Honduras, 2018.

C. Evaluación de técnicas de inoculación en 10 genotipos de frijol crecidos en casa de malla y camas de infección.

Técnica del arroz blanco. Los genotipos de frijol presentaron diferencias significativas para la severidad de daño causada por la inoculación de los aislamientos Mph-32 y Mhp-9, en plantas crecidas en casa de malla y camas de infección, usando la técnica de inoculación del arroz blanco (Rojas y Arredondo, 2016). Los promedios de severidad de daño usando la escala 1 a 9 (1= Ausencia de síntomas; 9= Síntomas muy severos, muerte de plantas) fueron ligeramente mayores con el aislamiento Mph-9 (6.5 y 6.1) que en Mph-9 (4.2 y 4.7), en camas de infección y casa de malla, respectivamente (Cuadro 4). Los coeficientes de variabilidad de la severidad de daños en los genotipos de frijol fueron mayores con Mph-32 que con Mph-9, tanto en camas de infección como en casa de malla.

Se puede indicar que en general la técnica de inoculación con arroz blanco, funcionó bien para diferenciar las reacciones de la inoculación en los genotipos de frijol, con ambos aislamientos y en los ambientes de camas de infección y casa de malla. Las reacciones de Amadeus 77 fueron intermedias; y las de BAT 477 contrastantes en cuanto a los aislamientos, con baja severidad de daño con el aislamiento Mph-32 e intermedia a alta con Mph-9. Estos resultados con Mph-9 difieren con anteriores estudios que sugieren a BAT 44 como genotipo resistente (Awabi y Pastor-Corrales, 1990; Echavez-Badel y Beaver, 1978; Viteri y Linares, 2017).

Técnica de palillos de dientes. La severidad de daño utilizando la técnica de palillos de dientes (Echavez Badel y Beaver 1987), presentó diferencias significativas entre los genotipos de frijol inoculados con el aislamiento Mph-32 en casa de malla y camas de infección, y con el aislamiento Mph-9 sólo en casa de malla (Cuadro 5). Los promedios de las reacciones a la inoculación con la técnica de palillos de dientes, expresada en severidad de daño (mm de tejido dañado), en los genotipos de frijol con el aislamiento Mph-32, fueron muy variables tanto en cama de infección (promedio 6.6 mm, rango 1.4 a 10.9 mm) como en casa de malla (promedio 14.4 mm, rango 10.4 a 21.9 mm), donde se presentó un mayor grado de severidad de daño.

En el aislamiento Mph-9, la severidad de daño en genotipos de frijol en camas de infección, fue muy variables (promedio 11.8 mm, rango 3.4 a 21.8 mm). Aunque los coeficientes de variación de este estos ensayos fueron altos, la técnica de arroz fue efectiva en producir daño con los aislamientos, mostrando diferencias en la respuesta a la inoculación en genotipos de frijol elegidos por su reacción diferenciada en previos estudios. El genotipo BAT 477 reportado como resistente a la pudrición gris del tallo anteriormente (Abawi y Pastor Corrales, 1990) presento niveles de infección que variaron de bajo a intermedio bajo las condiciones del estudio. Por otro lado, Amadeus 77 que presenta daños en lotes de Zamorano con la presencia de la pudrición gris del tallo, presento bajos niveles de infección con la técnica de palillos.

Cuadro 4. Severidad de daño (1-9) promedio de 10 genotipos de frijol inoculados con los aislamientos Mph-32 y Mph-9 de *Macrophomina phaseolina* en casa de malla y camas de infección usando la técnica de arroz. Zamorano, Honduras, 2018.

No.	Genotipos	Mph-32		Mph-9	
		Camas de infección	Casa malla	Camas de infección	Casa malla
1	MHN 322-49	8.3 a	7.1 a	8.8 a	7.7 a
2	TARS-MST1	5.9 ab	5.0 b	6.0 bcd	6.1 bc
3	PR 1217-16	5.3 bc	4.0 b	7.4 abc	5.9 bc
4	BRT 103-182	4.7 bc	5.4 b	6.1 bcd	7.1 ab
5	Amadeus 77	4.5 bc	4.2 b	4.2 d	5.7 c
6	MER 2212-28	4.2 bcd	4.1 b	5.3 cd	5.4 c
7	SEQ 342-87	3.3 bcde	4.9 b	8.4 ab	7.7 a
9	TARS-LFR1	3.1 cde	4.8 b	5.1 cd	5.3 c
8	BAT 477	1.5 de	3.8 b	8.2 ab	5.1 c
10	G-122	1.4 e	3.8 b	5.1 cd	5.1 c
	Valor P	0.0009**	0.0086**	0.0064**	0.0003**
	Promedio	4.2	4.7	6.5	6.1
	DMS (0.05)	2.8	1.7	2.6	1.4
	CV (%)	45.8	35.9	27.3	23.0
	R ²	0.64	0.77	0.55	0.86

** Diferencia significativa al 1%.

Cuadro 5. Severidad de daño (mm de tejido dañado) promedio en genotipos de frijol a los 35 días después de la inoculación con los aislamientos Mph-32 y Mph-9 de *Macrophomina phaseolina* en casa de malla y en camas de infección usando la técnica de palillos de dientes. Zamorano, Honduras, 2018.

No.	Genotipos	Aislamiento Mph-32		Aislamiento Mph-9	
		Camas de infección	Casa malla	Camas de infección	Casa malla
1	G-122	10.9 a	15.9 bc	20.5 abc	11.0 bc
2	SEQ 342-87	10.3 a	15.0 bc	21.8 ab	18.4 a
3	TARS-LFR1	8.3 ab	21.9 a	11.7 bcd	20.9 a
4	MHN 322-49	7.4 ab	12.1 c	9.3 cd	14.6 abc
5	TARS-MST1	6.5 ab	12.3 bc	5.3 d	15.2 abc
6	BAT 477	6.2 abc	13.1 bc	5.5 d	16.4 abc
7	PR 1217-16	6.1 abc	12.2 c	25.1 a	17.4 ab
9	MER 2212-28	5.0 bc	13.5 bc	6.9 d	9.8 c
8	Amadeus 77	4.0 bc	10.4 c	3.4 d	14.7 abc
10	BRT 103-182	1.4 c	17.9 ab	8.7 d	14.9 abc
	Valor P	0.020*	0.007**	0.002**	0.077ns
	Promedio	6.6	14.4	11.8	15.3
	DMS (0.05)	5.0	5.7	11.3	6.8
	CV (%)	52.2	39.5	65.8	44.5
	R ²	0.56	0.37	0.59	0.31

*, **, ns Diferencias significativas al 5% y 1%, y no significativa.

Técnica del PDA. En el ensayo de casa de malla con la técnica de PDA descrita por Ramirez-Ferreira y Orrego-Fuente (2013), se presentó mayor severidad de daño (mm de tejido afectado) en las líneas de frijol inoculadas con el aislamiento Mph-32 que con Mph-9 (Cuadro 6). La inoculación se hizo colocando trozos de cultivo puro en PDA de los aislamientos de *M. phaseolina* mencionados, en contacto con una herida de bisturí por encima del nudo cotiledonal y adherido con cinta pegante.

La severidad de daño con el aislamiento Mph-32 (promedio 6.6 mm, rango 1.1 a 17.3 mm) fue casi similar con Mph-9 (promedio 5.7 mm, rango 0.0 a 16.1 mm) en la evaluación de la técnica de PDA en casa de malla. En la mayoría de los genotipos se presentó un buen nivel de infección con Mph-32 pero no se observaron diferencias significativas con este aislamiento. Las diferencias de la severidad de daño entre los genotipos si fueron significativas con el aislamiento Mph-9. Los coeficientes de variabilidad fueron muy altos, lo que sugiere que el uso de la técnica del PDA necesita ser perfeccionada y un mayor número de repeticiones.

Teniendo en cuenta las tres técnicas evaluadas (arroz blanco, palillos de dientes y PDA) en dos condiciones de crecimiento de las plantas (casa de malla y camas de infección) y dos aislamientos de *M. phaseolina* (Mph-9 y Mph-32), se puede concretar que la técnica del arroz blanco más efectiva (mayor severidad de daño) con el aislamiento Mph-32 que con Mph-9, en ambas condiciones de crecimiento de las plantas (Cuadro 7). Por otro lado, la técnica de palillos de dientes fue más efectiva en casa de malla que en camas de infección con el aislamiento Mph-32; y con el aislamiento Mph-9 efectiva en ambos ambientes. La técnica del PDA sólo se evaluó en casa de malla y no presentó diferencias significativas entre los genotipos de frijol con el aislamiento Mph-32 pero si con el Mph-9, pero los valores de severidad de daño (mm) fueron relativamente bajos y la técnica requiere una mayor habilidad en su uso.

Cuadro 6. Severidad de daño (mm de tejido afectado) promedio de plantas de 10 genotipos de frijol inoculadas con los aislamientos Mph-32 y Mph-9 de *Macrophomina phaseolina* en casa de malla usando la técnica de inoculación con PDA.

No.	Genotipo	Mph-32	Mph-9
1	SEQ 342-87	17.3 a	16.1 a
2	BRT 103-182	10.1 ab	5.9 bcd
3	TARS-MST1	7.3 ab	7.2 bc
4	TARS-LFR1	6.8 b	11.2 ab
5	MER 2212-28	5.6 b	0.7 d
6	PR 1217-16	5.3 b	4.7 cd
7	MHN 322-49	4.6 b	2.7 cd
9	AMADEUS 77	4.4 b	2.2 cd
8	BAT 477	3.8 b	6.9 bc
10	G-122	1.1 b	0.0 d
	Valor P	0.189ns	0.000**
	Promedio	6.6	5.7
	DMS (0.05)	10.4	6.1
	CV (%)	108.6	73.5
	R ²	0.34	0.66

** , ns Diferencia significativa al 1% y no significativa.

Cuadro 7. Severidad de daño (escala 1-9 y mm de tejido afectado) promedio y valor P de los aislamientos Mph-32 y Mph-9 de *Macrophomina phaseolina* en camas de infección y casa de malla usando técnicas de inoculación con arroz, palillos y PDA en 10 genotipos de frijol.

Técnica	Mph-32		Mph-9	
	Camas de infección	Casa de malla	Camas de infección	Casa de malla
Arroz blanco^z				
Promedio (1-9)	4.2	4.7	6.5	6.1
Valor P	0.000**	0.009**	0.006**	0.000**
Palillos de dientes^y				
Promedio (mm)	6.6	14.4	11.8	15.3
Valor P	0.021*	0.007**	0.002**	0.077ns
PDA^x				
Promedio (mm)	ND	6.6	ND	5.7
Valor P		0.189ns		0.000**

^zRojas y Arredondo (2016), ^yEchavez-Badel y Beaver (1987), ^xRamirez-Ferreira y Orrego-Fuente (2013).

4. CONCLUSIONES

- En las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada se lograron obtener 34 aislamientos y cultivos puros mono-hifales del hongo *Macrophomina phaseolina* a partir de 40 muestras de plantas de frijol con síntomas típicos de la pudrición gris del tallo colectadas en lotes de Zamorano y Nacaome.
- Mediante las pruebas de patogenicidad se identificaron dos aislamientos altamente patogénicos (Mph-9 y Mph-32) de los 34 aislados de *Macrophomina phaseolina*. Estos aislamientos posteriormente fueron utilizados en los ensayos para evaluar tres técnicas de inoculación en 10 genotipos de frijol crecidos en casa de malla y camas de infección.
- Las técnicas de inoculación fueron relativamente efectivas en identificar variaciones en la severidad de daño causadas por los aislamientos Mph-9 y Mph-32 en los 10 genotipos de frijol, sin embargo, se presentaron altos coeficientes de variación lo que redujo la precisión de los experimentos, por lo que se requiere continuar las evaluaciones y perfeccionar las técnicas.

5. RECOMENDACIONES

- Continuar con la obtención y prueba de patogenicidad de un mayor número de aislamientos de diferentes localidades frijoleras de Honduras donde se presente la pudrición gris del tallo causada por *Macrophomina phaseolina*.
- Continuar evaluando las técnicas de inoculación del estudio y otras nuevas (punta de pipeta, inyección) con nuevos aislamientos patogénicos en casa de malla y camas de infección, incrementando las repeticiones para mejorar la precisión experimental.
- Una vez se tenga un juego de 5-6 aislamientos patogénicos de diversas procedencias y haber perfeccionado el uso de las técnicas más efectivas, proceder a la evaluación de germoplasma y el mejoramiento genético de la resistencia a *Macrophomina phaseolina* agente causal de la pudrición gris del tallo de frijol común.

6. LITERATURA CITADA

- Abawi GS, Pastor-Corrales MA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies and management strategies. CIAT, Cali, Colombia, 114p.
- Castellanos G, Jara C, Mosquera G. 2011. Guía Práctica No. 5 *Macrophomina phaseolina*. In: Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol / G. Castellanos, Jara C., G. Mosquera. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Publicación CIAT No. 375, Cali, Colombia, 232 p. (ISBN 978-958-694-110-5).
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Aart Van Schoonhoven y Marcial A. Pastor-corrales (comps.). Cali, Colombia, 56 p.
- Echavez-Badel R, Beaver JS. 1987. Resistance and susceptibility of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to ashy stem blight [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid]. J. Agric. Univ. Puerto Rico 71:403-405.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017. Cronología del Corredor Seco: El acelerador de la resiliencia en Centroamérica. [consultado 2018 Sep 10]. <http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/1024540/>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. FAO y WFP preocupados por el grave impacto de la sequía entre los más vulnerables de Centroamérica. [consultado 2018 Sep 10]. <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/1150346/>
- Frahm M, Rosas JC, Mayek-Perez N, López E, Acosta JA, Kelly JD. 2003. Agronomía Mesoamericana 14(2):143-150.
- Harveson B, Markell S, Pasche J, Osorno J, Urrea C. 2017. Pudrición carbonosa o gris *Macrophomina phaseolina*. En: Diagnóstico de Enfermedades de Frijol Común PP1820-8. North Dakota State Univ. Extension Service, ND, EEUU, 2 p.

- Mayek-Pérez N, Hernandez-Delgado S. 2010. Charcoal rot or ashy stem blight. Bean Improvement Cooperative Research Techniques. Michigan State University, 14p.
- Ramirez-Ferreira YC, Orrego-Fuente AL, 2013. Eficiencia de diferentes métodos de inoculación artificial de *Macrophomina phaseolina* en soja [*Glycine max.L.(Merril)*]. Investigación Agraria, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 66-71, ago. 2013. ISSN 2305-0683. Disponible en: <<http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/54>>. Fecha de acceso: 24 sep. 2018.
- Rojas-Triviño A, Arredondo V. 2016. Método de inoculación de patógenos radiculares y del hipocótilo del fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.). / Alberto Rojas-Triviño y Victoria Arredondo. Laboratorio de Patología de Fríjol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Publicación CIAT No. 375, Cali, Colombia, 232 p. (ISBN 978-958-694-110-5).
- Rosas JC, Castro A, Flores E. 2000. Mejoramiento genético del frijol rojo y negro mesoamericano para Centroamérica y el Caribe. Agronomía Mesoamericana. 11 (2): 37-46.
- Frahm M, Rosas JC, Mayek-Perez N, López E, Acosta JA, Kelly JD. 2003. Agronomía Mesoamericana 14(2):143-150.
- Viteri DM, Linares AM. 2017. Reaction of *Phaseolus* spp. genotypes to ashy stem blight caused by *Macrophomina phaseolina*. Euphytica 213:199. DOI 10.1007/s10681-017-1989-y.