

# Validación de técnicas para el aislamiento y caracterización de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en frijol común<sup>1</sup>

Juan David Jiménez

juan.jimenez.2018@alumni.zamorano.edu

Antonio Lorenzo Lacayo

antoniolacayo38@gmail.com

Ginger Export, Cultivos San Antonio, Aldea Palos Blancos, Comayagua,  
1 km Carretera a Guasaule, Choluteca, Honduras

Iveth Yassmin Rodriguez

irodriguez@zamorano.edu

Asistente de Investigación

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria  
Universidad Zamorano, Honduras

Raphael Wesly Colbert<sup>2</sup>

rcolbert@zamorano.edu

Profesor Asociado

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria  
Universidad Zamorano, Honduras

Juan Carlos Rosas Sotomayor

jcrosas@zamorano.edu

Profesor Emérito

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria  
Universidad Zamorano, Honduras

**Resumen.** El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un alimento básico y una de las principales fuentes de proteína en Centro América y El Caribe. El cultivo presenta problemas por el incremento de patógenos causantes de enfermedades debido a los efectos del cambio climático. La pudrición gris del tallo causada por *Macrophomina phaseolina*, una de las enfermedades emergentes en la región, es 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 e identificar genotipos promisorios para su uso en el mejoramiento genético de la resistencia a esta enfermedad. En las pruebas de patogenicidad se utilizaron 34 aislamientos puros provenientes de 40 muestras de plantas con síntomas típicos de la enfermedad procedentes de Zamorano y Nacaome, Honduras, y se seleccionaron los dos aislamientos más patogénicos (Mph-9 y Mph-32). Estos aislamientos fueron utilizados para evaluar las técnicas de inoculación con arroz blanco, palillos de dientes, cinta con PDA, e incisión del tallo en genotipos de frijol en invernadero. 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, e interacciones entre los genotipos y las técnicas. Se sugiere continuar la evaluación de 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, técnicas de inoculación, resistencia genética, severidad de daño.

## Validation of techniques for isolation and characterization of pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in common beans

**Abstract.** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a basic food and one of the main sources of protein in Central America and the Caribbean. The crop present problems for the increment of pathogens that cause diseases due to effects of climate change. Ashy stem blight caused by *Macrophomina phaseolina* is one of the emerging diseases in

<sup>1</sup> Trabajo parcial de JD Jiménez y AL Lacayo para optar el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Zamorano, Honduras.

<sup>2</sup> Autor para correspondencia.

the region due to the increase in the frequency of periods of drought and heat stress. The objective of the study was to validate techniques for the isolation and pathogenic characterization of *M. phaseolina* in common bean, and to identify promising genotypes for their use on genetic improvement of resistance to this disease. In the pathogenic test 34 pure isolates of *M. phaseolina* obtained from 40 bean plant samples with typical symptoms of ashy stem blight from Zamorano and Nacaome, Honduras, were tested and two pathogenic isolates (Mph-9 and Mph-32) were selected. These two isolates were used to evaluate the inoculation techniques using white rice, toothpicks, tape with PDA, and cut stem in common bean genotypes in a screenhouse. Variations on the reactions to inoculation, expressed on disease severity on the bean genotypes, due to the isolates and inoculation techniques, and interactions of the genotypes with the techniques were observed. It is suggested to continue the evaluation 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.

**Keywords:** Ashy stem blight, inoculation techniques, genetic resistance, disease severity.

## 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 bajo uso de insumos 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 la 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.

La pudrición gris (carbonosa) del tallo, causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, es una de las principales enfermedades del frijol común en condiciones cálidas y secas frecuentemente asociada con el estrés de sequía, aunque se puede presentar bajo condiciones tropicales húmedas (Mayek-Pérez y Hernández-Delgado 2010). En Centro América y El Caribe la enfermedad 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, asociada con condiciones de estrés de sequía y altas temperaturas debidos a los efectos del cambio climático (Porch et al. 2007). La pudrición gris del tallo ha sido reportada afectando plantas de frijol en ensayos de tolerancia a la sequía conducidos en Zamorano desde hace muchos 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* 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 girasol (Dhingra y Sinclair 1978). Las estrategias culturales, químicas y biológicas para el manejo de esta enfermedad no son adecuadas para controlarla de manera eficiente y económica. Por ende, la resistencia genética se presenta como una alternativa favorable para reducir los daños 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.

Diversos procedimientos de inoculación han sido utilizados en estudios previos para caracterizar aislamientos patogénicos de *M. phaseolina* y evaluar la resistencia del frijol común a la pudrición gris del tallo. Estos procedimientos incluyendo la técnica de arroz blanco (Castellanos, Jara y Mosquera, 2011), semilla de sorgo infectada (Rojas y Arredondo 2016), palillos de dientes (Echavez-Badel y Beaver 1987), cinta con PDA (Echavez-Badel y Beaver 1987), hojas desprendidas (Bañuelos y Mayek-Pérez 2008), y corte de tallo (Twizeyimana et al. 2012), entre otros. Debido a los efectos de varios factores ambientales durante el desarrollo de la enfermedad, se pueden obtener resultados variables en las evaluaciones lo que dificulta la caracterización de los genotipos resistentes y conducen a errores en su identificación (Mayek-Pérez et al. 2009). Sin embargo, estudios anteriores en germoplasma de *Phaseolus*

identifican a genotipos resistentes a *M. phaseolina* (Pastor-Corrales y Awabi 1988; Mayek-Pérez et al. 2001).

Los objetivos del presente estudio fueron obtener cultivos puros de aislamientos de *M. phaseolina* el agente causal de la pudrición gris del tallo a partir de muestras de plantas de frijol común con síntomas típicos de la enfermedad, seleccionar aislamientos altamente patogénicos mediante pruebas de patogenicidad, y evaluar las técnicas de inoculación y la reacción de genotipos de frijol común a la inoculación con los aislamientos patogénicos de *M. phaseolina* seleccionados.

## **Materiales y métodos**

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y casas de malla de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Cultivos de la Universidad Zamorano, ubicada a una altura de 800 msnm, 14°0'35.62" N, 87°0'40.34" O, en el departamento de Francisco Morazán, Honduras. Esta zona presenta condiciones climatológicas de temperatura promedio anual de 24 °C y precipitación promedio anual de 1,100 mm. Las actividades se iniciaron en el 2018 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. Se continuó con la evaluación de algunas de las técnicas de inoculación disponibles (Echavez-Badel y Beaver, 1987; Awabi y Pastor-Corrales, 1990; Mayek-Pérez y Delgado, 2010; Castellanos, Jara y Mosquera, 2011; Twizeyimana et al. 2012) para caracterizar las reacciones de resistencia o susceptibilidad a la pudrición gris del tallo causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* utilizando un grupo de 10 genotipos de frijol común.

### **Obtención de aislamientos de *Macrophomina phaseolina***

Se colectaron 40 muestras de tallos de plantas de frijol con infección natural y síntomas típicos de la pudrición gris del tallo provenientes de los lotes 21, 24, 25 y 27 de la Zona II del área experimental de la Universidad Zamorano y una muestra colectada en la Escuela Luis Landa, Nacaome, Valle. Las muestras de plantas 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 común 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 hacia el hipocotíleo, a menudo pelando los tallos, para luego estos chancros negros volverse de color gris afectando tallos y vainas (Harveson et al. 2017).

En el laboratorio, el tejido infectado con *M. phaseolina* fue desinfectado en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 min, seguido de un triple lavado con agua destilada estéril y secado en toallas de papel filtro estériles durante 10 min. El fragmento de tejido infectado se colocó en platos Petri conteniendo un medio papa-dextrosa-agar (PDA) a razón de 36 g L<sup>-1</sup>. Los aislamientos fueron incubados durante 7 días a 28 °C en completa oscuridad, observándose el desarrollo y las características típicas de crecimiento en medio de cultivo del hongo *M. phaseolina*. Luego cada aislamiento fue transferido a platos Petri con PDA nuevos y colocados a 28 °C en incubadora. Después de 16 h 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. Con este procedimiento, de las 40 muestras se obtuvieron 34 aislamientos de cultivos monohifales puros.

Para la conservación y almacenamiento de los aislamientos se colocaron 10 cuadros de papel filtro de 10 × 10 mm, previamente esterilizados en cajas Petri con medio de cultivo PDA, y de cada aislamiento puro de *M. phaseolina* se extrajo un disco de 4 mm y se colocó sobre cada cuadro de papel filtro, para luego incubarlo a 28 °C durante 12 d. Después de que cada aislamiento del hongo invadió los cuadros de papel filtro, estos se secaron en incubadora a 28 °C durante 7 d. Finalmente, se transfirieron a bolsas de papel mantequilla estéril y se almacenaron a -20 °C. Para reactivar los aislamientos se extrajeron los cuadros de papel filtro conservados a -20 °C con una pinza estéril y se colocaron individualmente en cajas Petri para ser incubados a 28 °C durante 7 d. Para verificar 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 con micelio el plato Petri.

### ***Prueba de la patogenicidad de los 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 del tallo, se siguió el procedimiento descrito por Rojas y Arredondo (2016). Se utilizaron 20 g de semilla de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) 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 conteniendo 50 mL de agua destilada y se realizó una doble esterilización consecutiva en autoclave a 121 °C durante 20 min, y se dejó enfriar durante 12 h después de cada esterilización. Los 34 aislamientos de *M. phaseolina* previamente reactivados se colocaron en medio de cultivo PDA durante 4 d. 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 incubaron a 28 °C durante 6 d, para lograr que cada aislamiento invadiera las semillas de sorgo.

Para la prueba de patogenicidad de los 34 aislamientos se utilizaron los genotipos de frijol BAT 477 y Amadeus 77 como los testigos resistente y susceptible a *M. phaseolina*, respectivamente. La semilla de ambos genotipos se pregerminó durante tres días en el laboratorio para luego ser sembradas en canaletas de PVC, lavadas y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%, y conteniendo un sustrato de arena estéril. Las canaletas se sembraron con 50 semillas pregerminadas de BAT 477 y Amadeus 77 en el laboratorio para producir las plántulas. 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 transparente de tereftalato de polietileno (PET, siglas en inglés) 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, infectados con micelio de 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 de los aislamientos del patógeno.

La patogenicidad de los aislamientos de *M. phaseolina* en plántulas de frijol común de las líneas BAT 477 y Amadeus 77 fue determinada mediante las evaluaciones de severidad de daño realizadas a los 2, 5 y 10 DDI, utilizando una escala 1-9 de severidad de daño modificada de Rojas y Arredondo (2016), incluyendo los grados 1 (síntomas iniciales de pudrición en el punto de inoculación y tejido circundante con 1% del área afectada), 3 (cambio de color o ablandamiento de tejidos en el punto de inoculación y tejido circundante con 5% del área afectada), 5 (hipocotíleo y raíces afectadas, pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido con 10% del área afectada), 7 (hipocotíleo y raíces afectadas, pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido con 10% del área afectada), y 9 (hipocotíleo y raíces afectadas, pardeamiento o enrojecimiento y ablandamiento del tejido y presencia de signos del patógeno con >50% del área afectada).

### ***Evaluación de técnicas de inoculación de *Macrophomina phaseolina* en plantas de frijol***

En el 2018 se evaluaron tres técnicas de inoculación (arroz blanco, palillo de dientes y cinta con PDA) utilizando 10 genotipos de frijol (BAT 477, Amadeus 77, G-122, BRT 103-182, MHN 322-49, TARS-LFR1, TARS-MST1, PR 1217-16, MER 2212-28 y SEQ 342-87), incluyendo líneas con reacción resistente y susceptible identificadas en ensayos previos (Pastor-Corrales y Abawi 1988; Viteri y Linares 2017). 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 semillas de sorgo en cámara húmeda. En el 2020 se evaluó la técnica de inoculación del corte del tallo incluyendo además de los 10 genotipos de frijol mencionados, la línea L88-63 tolerante a sequía (Frahm et al. 2004) y la variedad criolla Seda de Honduras, y la inoculación se hizo solamente con el aislamiento Mph-32. En ambos periodos, las evaluaciones se realizaron en un invernadero utilizando maceteros de 20 cm de diámetro con tres plantas provenientes de semilla pregerminada conteniendo 4 kg de un sustrato suelo: arena (2:1) pasteurizado para facilitar el crecimiento y desarrollo adecuado de las plantas de frijol.

El manejo de los ensayos en invernadero se hizo 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 del tallo y afectar la infección y desarrollo de la enfermedad. La unidad experimental en invernadero fue el macetero con tres plantas. Para el estudio se utilizó un diseño de bloques completos al azar con ocho repeticiones. 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%.

**Técnica de inoculación con arroz blanco.** Se utilizó la técnica con inóculo incrementado en arroz blanco descrita por Castellanos, Jara y Mosquera (2011). Muestras de 25 g de arroz blanco, se lavaron con agua destilada y se depositaron en platos Petri agregando 12.5 mL de agua destilada y luego esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min, dejando enfriar durante 12 h, seguido de una segunda esterilización con el mismo procedimiento. La suspensión del hongo se realizó agregando 5 mL de agua destilada en cada plato Petri reactivados con los aislamientos Mph-9 y Mph-32, seleccionados en el estudio previo de patogenicidad, para luego raspar la superficie con una espátula estéril y succionar con una pipeta Pasteur la suspensión del hongo. Se agregaron 0.5 mL de la suspensión del hongo en cada plato Petri conteniendo arroz blanco e incubando a 28 °C por 15 d en completa oscuridad. Los platos se destaparon y colocados invertidos por un día en incubadora para eliminar el exceso de humedad. Con una espátula estéril, el arroz fue dividido en pequeños pedazos o trozos, y esparcidos sobre toallas de papel estéril y secados en la cámara de flujo laminar a  $\pm 24$  °C durante 3 d. Seguidamente, el arroz fue molido en licuadora hasta convertirlo en polvo y envasado en un beaker, para posteriormente realizar las inoculaciones en las plantas de frijol crecidas en el invernadero agregando 2 g de inóculo de arroz sobre cada semilla pregerminada a la siembra. La evaluación de la severidad del daño en las líneas de frijol común se hizo mediante la escala 1 a 9 (1-3= sin o pocos daños, 4-6= daños parciales de la planta, y 7-9= daños a la mayor parte de la planta).

**Técnica de inoculación con palillos de dientes.** Se utilizaron platos Petri con medio PDA colocando en el centro un disco de 5 mm con inóculo de los aislamientos Mph-9 y Mph-32. Luego alrededor del disco se colocaron palillos de dientes de 2 cm de largo, previamente esterilizados y se incubaron a 28 °C durante 15 d en completa oscuridad. Las plantas sembradas en maceteros en invernadero fueron inoculadas a los 15 DDS utilizando la técnica de palillos de dientes (Echavez-Badel y Beaver 1987), realizando una punción con los palillos infectados con los aislamientos Mph-9 y Mph-32 de *M. phaseolina* en la base del tallo por debajo del nudo cotiledonal. Las lecturas de la incidencia (%) y severidad de daño en el tejido (mm) causados por el patógeno en las plantas se realizaron a los 35 DDS, cosechando los tallos y abriéndolos con un bisturí por la mitad, para medir con un pie de rey los mm de avance del daño causado por la enfermedad en cada planta.

**Técnica de inoculación de cinta con PDA.** Para inocular las plantas se cortaron discos de 2 mm de PDA de cada aislamiento, y se colocaron en un pedazo de cinta adhesiva de 1.5 cm de largo, luego 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), y se colocó la cinta adhesiva con el pedazo de cultivo del hongo en PDA manteniendo en contacto del inóculo 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 con un pie de rey el avance del daño causado por el aislamiento de *M. phaseolina* en las plantas.

**Técnica de inoculación con corte del tallo.** Platos Petri con medio PDA y ácido láctico conteniendo un disco de 5 mm con inóculo del aislamiento de Mph32 fueron incubados a 28 °C por 48 h en completa oscuridad. Las plantas sembradas en maceteros en invernadero se inocularon utilizando la técnica de corte del tallo (Twizeyimana et al. 2012). La primera inoculación se realizó a los 28 DDS mediante un corte de un peciolo del cuarto entrenudo del tallo principal con un bisturí estéril dejando 2.0 cm de longitud, y colocando un disco de 2 mm de PDA con inóculo encima de la herida y otro disco dentro de una punta de un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ L con la que se cubrió el peciolo cortado. Una segunda inoculación fue realizada 7 días después con el mismo procedimiento en un peciolo del tercer entrenudo del tallo. Después de las inoculaciones se mantuvieron las plantas inoculadas en invernadero a 35-60% de humedad y a temperatura ambiente. Las lecturas de severidad del daño se realizaron con una escala 1 a 9 (1=no presenta síntomas; 9=100% daños).

## Resultados

Siguiendo los procedimientos para el aislamiento y purificación del agente causal de la pudrición gris del tallo en frijol común sugeridos por Castellanos, Jara y Mosquera (2011), en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano se lograron obtener 34 aislamientos puros a partir de cultivos monohifales de 40 muestras de plantas con síntomas típicos de la enfermedad de la pudrición gris del tallo causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* en frijol común (Abawi y Pastor Corrales, 1990; Mayek-Pérez y Hernandez-Delgado, 2010). Las muestras fueron recolectadas en varios lotes de Zamorano y una muestra de la Escuela Luís Landa en Nacaome, Valle.

### Prueba de patogenicidad de aislamientos de *M. phaseolina*

Las evaluaciones en la prueba de patogenicidad en cámara húmeda utilizando semillas de sorgo inoculadas con cultivos puros de los 34 aislamientos en plántulas de Amadeus 77 (susceptible) y BAT 477 (resistente), fueron realizadas utilizando una escala de severidad de daño 1-9 modificada de Rojas y Arredondo (2016). La lectura de la severidad de daño a los 10 DDI de los 34 aislamientos de *M. phaseolina* en plántulas de los genotipos de frijol común BAT 477 y Amadeus 77, mostraron diferencias significativas entre aislamientos, siendo Mph-9 y Mph-32 los que mostraron la mayor patogenicidad (Figura 1). Se pudo confirmar reacciones resistentes (<3) e intermedias (4-6) en BAT 477, e intermedias y susceptibles (>7) en la variedad Amadeus 77 a los diferentes aislamientos de *M. phaseolina*. De acuerdo con los resultados y considerando la mayor patogenicidad registrada en plántulas de los dos genotipos de frijol común, se seleccionaron los aislamientos Mph-9 y Mph-32 para realizar las evaluaciones de las técnicas de inoculación en líneas de frijol crecidas en invernadero.

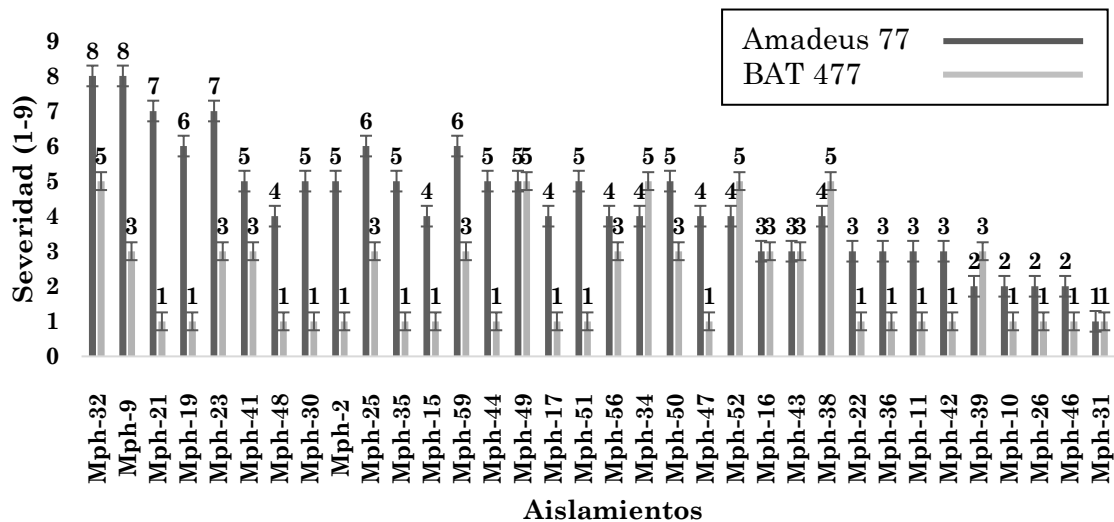


Figura 1. Promedios de severidad de daño (1-9) de la tercera lectura (10 días después de la inoculación) de la prueba de patogenicidad de 34 aislamientos de *Macrophomina phaseolina* en plántulas de Amadeus 77 y BAT 477 crecidas en cámara húmeda e inoculadas con semilla de sorgo infectada. Zamorano, Honduras, 2018.

### Evaluación de técnicas de inoculación en genotipos de frijol en invernadero

**Técnica del arroz blanco.** Los genotipos de frijol presentaron diferencias significativas para la severidad de daño causada por la inoculación con los aislamientos Mph-9 y Mph-32, en plantas crecidas en casa de malla usando la técnica de inoculación con arroz blanco (Castellanos, Jara y Mosquera, 2011). 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 (6.1) que en Mph-32 (4.7) (Cuadro 1). Los coeficientes de variabilidad de la severidad de daños en los genotipos de frijol fueron mayores con Mph-32 que con Mph-9. En general la técnica de inoculación con arroz blanco funcionó mejor para diferenciar las reacciones de los genotipos de frijol a la inoculación con el aislamiento

Mph-9 que con Mph-32 con el que se tuvo un mayor coeficiente de variación. Las reacciones del genotipo susceptible Amadeus 77 y las del resistente BAT 477 fueron intermedias con ambos aislamientos.

**Técnica de palillos de dientes.** La severidad de daño utilizando la técnica de palillos de dientes, presentó diferencias significativas entre los genotipos de frijol inoculados con los aislamientos Mph-9 y Mph-32 en casa de malla, aunque estos promedios indican una mínima diferencia en la severidad de daño en los genotipos de frijol con el aislamiento Mph-9 (15.3 mm) que con Mph-32 (14.4 mm) (Cuadro 1). Aunque los coeficientes de variación de estos ensayos fueron altos, la técnica de palillos fue efectiva en producir daños típicos de la enfermedad con los aislamientos Mph-9 y Mph-32, mostrando diferencias en la respuesta a la inoculación de los genotipos de frijol incluidos en el estudio por su reacción diferenciada en previos estudios. El genotipo BAT 477 considerado resistente a la pudrición gris del tallo, presentó niveles de infección que no fueron diferentes a Amadeus 77 considerado como susceptible, debido a que con frecuencia presenta daños de la enfermedad en lotes de Zamorano.

**Técnica de la cinta con PDA.** En el ensayo de casa de malla con la técnica de PDA descrita por Ramirez y Orrego (2013), 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-9 (5.7 mm, rango 0.0 a 16.1 mm) fue casi similar con Mph-32 (6.6 mm, rango 1.1 a 17.3 mm) (Cuadro 1). En la mayoría de los genotipos se presentó un buen nivel de infección con ambos aislamientos, sin embargo, las diferencias de la severidad de daño entre los genotipos fueron significativas con el aislamiento Mph-9, pero no con el aislamiento Mph-32 que presentó coeficientes de variabilidad muy altos.

Cuadro 1. Promedio de severidad de daño (1-9) causada con la técnica del arroz blanco, y de tejido dañado (mm) con las técnicas de palillos de dientes y cinta con PDA en 10 genotipos de frijol inoculados con los aislamientos Mph-9 y Mph-32 de *Macrophomina phaseolina* en casa de malla. Zamorano, Honduras, 2018.

No. Genotipo	Arroz blanco (severidad 1-9)		Palillo de dientes (mm tejido dañado)		Cinta con PDA (mm tejido dañado)	
	Mph-9	Mph-32	Mph-9	Mph-32	Mph-9	Mph-32
1 MHN 322-49	7.7 a	7.1 a	14.6 abc	12.1 c	2.7 cd	4.6 b
2 TARS-MST1	6.1 bc	5.0 b	15.2 abc	12.3 bc	7.2 bc	7.3 ab
3 PR 1217-16	5.9 bc	4.0 b	17.4 ab	12.2 c	4.7 cd	5.3 b
4 BRT 103-182	7.1 ab	5.4 b	14.9 abc	17.9 ab	5.9 bcd	10.1 ab
5 Amadeus 77	5.7 c	4.2 b	14.7 abc	10.4 c	2.2 cd	4.4 b
6 MER 2212-28	5.4 c	4.1 b	9.8 c	13.5 bc	0.7 d	5.6 b
7 SEQ 342-87	7.7 a	4.9 b	18.4 a	15.0 bc	6.1 a	17.3 a
8 TARS-LFR1	5.3 c	4.8 b	20.9 a	21.9 a	11.2 ab	6.8 b
9 BAT 477	5.1 c	3.8 b	16.4 abc	13.1 bc	6.9 bc	3.8 b
10 G-122	5.1 c	3.8 b	11.0 bc	15.9 bc	0.0 d	1.1 b
Promedio	6.1	4.7	15.3	14.4	5.7	6.6
Valor P	0.000***	.0086**	0.077 <sup>ns</sup>	0.007**	0.000***	0.189 <sup>ns</sup>
DMS (0.05)	1.4	1.7	6.8	5.7	6.1	10.4
CV (%)	23.0	35.9	44.5	39.5	73.5	108.6
R <sup>2</sup>	0.86	0.77	0.31	0.37	0.66	0.34

\*\*\*, \*\*, <sup>ns</sup> Diferencias significativas al P<0.001, P<0.01, y no significativa, respectivamente.

**Técnica del corte de tallo.** Se presentaron diferencias significativas entre los genotipos de frijol común inoculados con el aislamiento Mph-32 de *M. phaseolina* en las lecturas de la severidad de daño a los 7, 14 y 21 DDI, mostrando el progreso significativo de la enfermedad en la mayoría de los 12 genotipos de frijol común evaluados usando la técnica de corte del tallo (Cuadro 2). Las mediciones del tejido dañado a los 21 DDI también mostraron diferencias y daños severos en el tejido de los genotipos. La única excepción fue la accesión G122 que mostró los valores más bajos de severidad (<3 de la escala 1-9) y de tejido dañado (28.9 mm) por el aislamiento Mph-32. Aunque alcanzó un grado alto de severidad (7.2), Amadeus 77 presentó menos tejido dañado (46.3 mm) que BAT 477 (89.0 mm) con esta técnica.

Cuadro 2. Promedios de severidad de daño (escala 1-9) y tejido dañado (mm) de 12 genotipos de frijol común a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación con el aislamiento Mph 32 de *Macrophomina phaseolina* utilizando la técnica de corte del tallo en casa de malla. Zamorano, Honduras, 2020.

No. Genotipo	Severidad de daño (escala 1-9)			Tejido dañado (mm)- Día 21
	Día 7	Día 14	Día 21	
1 TARS-MST1	3.22 bc†	8.77 a	9.00 a	86.7 ab
2 MER 2212-28	3.00 bc	8.10 abc	9.00 a	79.1 ab
3 BRT 103-182	4.44 a	8.33 abc	9.00 a	85.7 ab
4 TARS-LFR1	2.88 c	8.33 abc	9.00 a	88.1 ab
5 MHN 322-49	3.00 bc	8.44 ab	8.66 ab	71.5 ab
6 L88-63	3.00 bc	6.10 de	8.33 abc	63.6 abc
7 BAT 477	3.00 bc	6.99 cd	8.33 abc	89.0 a
8 Seda	3.44 bc	5.88 de	7.77 abc	75.1 ab
9 SEQ 342-87	3.11 bc	5.10 e	7.55 bcd	64.9 abc
10 Amadeus 77	3.66 b	7.10 bcd	7.22 cd	46.3 bc
11 PR 1217-16	2.99 bc	3.11 f	6.55 d	58.1 abc
12 G-122	2.66 bc	2.66 f	2.88 e	28.9 c
Promedio	3.20	6.58	7.77	69.8
Valor P	0.0022**	<0.0001***	<0.0001***	0.05*
R <sup>2</sup>	0.70	0.92	0.91	0.53
CV (%)	10.9	10.9	8.4	30.6

†Letras diferentes indican diferencias significativas entre los genotipos de frijol.

\*, \*\*, \*\*\* Diferencias significativas al P<0.05, P<0.01 y P<0.001, respectivamente.

## Discusión

En las pruebas de patogenicidad en cámara húmeda utilizando semillas de sorgo inoculado con cultivos puros de los 34 aislamientos *M. phaseolina* en plántulas de Amadeus 77 (susceptible) y BAT 477 (resistente), los resultados promedios de tres lecturas de la severidad de daño a los 2, 5 y 10 días después de la inoculación (DDI), utilizando una escala de severidad de daño 1-9 modificada de Rojas y Arredondo (2016), la severidad de los aislamientos fue mayor en Amadeus 77, reportado como susceptible, que en BAT 477, reportado como intermedio a resistente (Pastor-Corrales y Awabi 1988). De acuerdo con los resultados y considerando la mayor severidad causada por los aislamientos Mph-32 y Mph-9, se seleccionaron estos aislamientos para realizar las evaluaciones de patogenicidad en líneas de frijol crecidas en casa de malla.

Se puede indicar que en general la técnica de inoculación con arroz blanco permite diferenciar las reacciones de la inoculación en los genotipos de frijol, con ambos aislamientos en casa de malla. Las reacciones de Amadeus 77 fueron intermedias, pero las de BAT 477 contrastantes en cuanto a los aislamientos, presentando 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).

La severidad de daño utilizando la técnica de palillos de dientes (Echavez Badel y Beaver 1987) evidencia que 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) presentó 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, presentó bajos niveles de infección con la técnica de palillos.

Para la técnica del PDA descrita por Ramirez y Orrego (2013), en la mayoría de los genotipos se presentó un buen nivel de infección con Mph-32. Sin embargo, la alta variación de los resultados sugiere que el uso de la técnica del PDA necesita ajuste con un mayor número de repeticiones. Aunque la técnica del PDA 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, sin embargo, los valores de severidad de daño (mm) fueron relativamente bajos sugiriendo que se requiere una mayor habilidad en el uso de esta técnica.

Los resultados con la utilización de técnica de corte del tallo indicaron que la severidad aumenta con el tiempo. Todos los genotipos inoculados presentaron un aumento en la infección con el tiempo, a excepción del genotipo G-122. Después de la segunda inoculación, todos los genotipos fueron susceptibles a diferencia de G-122 que presentó una severidad constante de 2.6 durante los 21 días de evaluación, lo que evidencia la presencia de un mecanismo de resistencia contra *M. phaseolina* reportado por Viteri y Linares (2017). A medida que transcurrieron los días, las lesiones se expandieron rápidamente, alcanzando los tejidos del tallo, hasta la muerte de la plántula a los 14 a 21 DDI. Las evaluaciones en casa de malla ofrecieron condiciones favorables constantes para el desarrollo del patógeno y una presión de selección uniforme que favorecen la expresión de la reacción del frijol a *M. phaseolina* en un período más corto de tiempo, optimizando el trabajo y reduciendo el espacio. Es importante mencionar que la variabilidad patogénica y la adaptación de los genotipos a un ambiente en particular son una función importante en el comportamiento de la planta. Según mencionan Islam et al. (2012), las altas temperaturas (> 27°C) y poca humedad, son las condiciones óptimas para el desarrollo del patógeno *M. phaseolina*. El genotipo PR 1217-16 también mostró resistencia inicial con un valor <3.0 hasta el día 14, sin embargo, la severidad aumento a 6.5 en el día 21.

Según Islam et al. (2012), para que exista susceptibilidad al patógeno *M. phaseolina* se necesita realizar tres inoculaciones, en los resultados del estudio los genotipos presentaron susceptibilidad al patógeno con solo dos inoculaciones. Cabe destacar que la variación existente en las reacciones se puede explicar a la existencia de una variación natural en la virulencia de las poblaciones del hongo. Los resultados obtenidos con el aislamiento Mph 32 utilizando la técnica de corte del tallo difieren con anteriores estudios, los cuales reflejan que genotipos como el BAT 477 presenta resistencia a la pudrición gris del tallo. En el presente estudio a partir del día 14 BAT 477 presento una severidad de 6.9 (día 14) y 8.3 (día 21) (Pastor-Corrales y Abawi 1988; Mayék-Pérez et al. 2001; Viteri y Linares 2017). Islam et al. (2012) sugieren la realización de múltiples inoculaciones en el tiempo es importante para favorecer la infección de las plantas y ayuda a identificar genotipos con mayor resistencia a *M. phaseolina*.

Teniendo en cuenta las cuatro técnicas de inoculación evaluadas (arroz blanco, palillos de dientes, cinta con PDA y corte del tallo) en plantas crecidas en casa de malla usando dos aislamientos patogénicos de *M. phaseolina* (Mph-9 y Mph-32), se puede concretar que la de palillos de dientes fue más efectiva (mayor tejido dañado) que la de cinta con PDA con ambos aislamientos, siendo los daños mayores con el aislamiento Mph-9. La técnica de la cinta con PDA presentó diferencias significativas entre los genotipos de frijol con el aislamiento Mph-9 pero no con el Mph-32, pero los valores de tejido dañado (mm) fueron más bajos que con la de palillos de dientes. Por otro lado, la técnica del corte de tallo evaluada en un experimento adicional solo con el aislamiento Mph-32, fue la que presentó la mayor severidad de daños tanto en la escala 1-9 como en tejido dañado. Así mismo, el experimento con el corte del tallo se presentó un menor coeficiente de variación que con los experimentos de inoculación con arroz blanco, palillos de dientes y cinta con PDA. Por otro lado, en el experimento de corte de tallo, la evaluación con la escala de severidad 1-9 presentó un coeficiente de variación menor que con las mediciones de tejido dañado, siendo la severidad 1-9 factible de ser registrada en menor tiempo.

## Conclusiones

En las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano se lograron obtener 34 aislamientos y cultivos puros mono-hifales del hongo *Macrophomina phaseolina* a partir de 40 muestras de plantas de frijol común con síntomas típicos de la pudrición gris del tallo colectadas en lotes de Zamorano y Nacaome. Mediante las pruebas de patogenicidad usando semillas de sorgo infectadas se identificaron dos aislamientos altamente patogénicos (Mph-9 y Mph-32) de los 34 aislados de *M. phaseolina*. Estos dos aislamientos fueron posteriormente utilizados en los ensayos para evaluar cuatro técnicas de inoculación en genotipos de frijol crecidos en invernadero. 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 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. Mediante las pruebas de patogenicidad en los genotipos de frijol común, se pudo confirmar la resistencia del genotipo G122 en tres de las cuatro pruebas, pero no en la de palillos de dientes. Cabe destacar la susceptibilidad de la línea BAT 477 a los aislamientos Mph-9 y Mph-32, la

cual ha sido identificada como resistente en estudios previos. Los resultados variaron con los genotipos, aislamientos y técnicas de inoculación evaluadas en el estudio, lo que requiere incluir un mayor número de aislamientos, genotipos resistentes adicionales, perfeccionar el manejo de las técnicas e incluir un mayor número de repeticiones en estudios posteriores.

## Literatura citada

- Abawi GS, MA Pastor-Corrales. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies and management strategies. CIAT, Cali, Colombia, 114p.
- Bañuelos JJ, N Mayek-Perez. 2008. Evaluación no destructiva de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 26:71-75.
- Castellanos G, C Jara, G Mosquera. 2011. Guía Práctica No. 5 *Macrophomina phaseolina*. In: Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol/ G. Castellanos, C. Jara, G. Mosquera. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Publicación CIAT No. 375, Cali, Colombia, 232 p. (ISBN 978-958-694-110-5).
- Dhingra OD, JB Sinclair. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brazil. 166p.
- Echavez-Badel R, JS Beaver. 1987. Resistance and susceptibility of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to ashy stem blight [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid]. Journal of Agriculture of the University of 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., JC Rosas, N Mayek-Perez, E López, JA Acosta y JD Kelly. Resistencia a sequía terminal en frijol negro tropical. Agronomía Mesoamericana 14(2):143-150.
- Harveson B, S Markell, J Pasche, J Osorno y C Urrea. 2017. Pudrición carbonosa o gris *Macrophomina phaseolina*. En: Diagnóstico de Enfermedades de Frijol Común PP1820-8. North Dakota State Univ. Extension Service, ND, EE. UU., 2 p.
- Islam MS, Haque MS, Islam MM, Emdad EM, Halim A, Hossen QMM, Hossain MZ, Ahmed B, Rahim S, Rahman MS, et al. 2012. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. BMC Genomics 13:1–16. eng. doi:10.1186/1471-2164-13-493.
- Mayek-Pérez N, S Hernandez-Delgado. 2010. Charcoal rot or ashy stem blight. Bean Improvement Cooperative Research Techniques. Michigan State University, 14p.
- Pastor-Corrales MA, Abawi GS. 1988. Reactions of selected bean accessions to infection by *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 72:39–41.
- Porch TG, R Bernsten R, JC Rosas, M Jahn. 2007. Climate change and the potential economic benefits of heat-tolerant bean varieties for farmers in Atlantida, Honduras. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 91(3-4):133-148. <https://doi.org/10.46429/jauprv.v91i3-4.3281>
- Rojas-Triviño A; V Arredondo. 2016. Método de inoculación de patógenos radiculares y del hipocótilo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Laboratorio de Patología de Frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Publicación CIAT No. 375, Cali, Colombia, 232 p. (ISBN 978-958-694-110-5).
- Ramirez-Ferreira YC, AL Orrego-Fuente. 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.
- Twizeyimana M, Hill CB, Pawlowski M, Paul C, Hartman GL. 2012. A cut-stem inoculation technique to evaluate soybean for resistance to *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 96:1210–1215.
- Viteri DM, AM Linares. 2017. Reaction of *Phaseolus* spp. genotypes to ashy stem blight caused by *Macrophomina phaseolina*. Euphytica 213:199. DOI 10.1007/s10681-017-1989-y.

Recibido setiembre 28, 2021; aceptado octubre 11, 2021.

Cómo citar: Jiménez JD, Lacayo AL, Rodríguez IY, Colbert RW, Rosas-Sotomayor JC. 2021. Validación de técnicas para el aislamiento y caracterización de la patogenicidad del hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en frijol común. Ceiba. Zamorano Investiga: 102–111.