

## ANEXOS

### Anexo 1: Según: CIAT (1981 b)

#### Etapas de desarrollo de la planta de frijol común.

Etapa <sup>a</sup>	Descripción <sup>b</sup>
VO	<b>Germinación:</b> absorción de agua por la semilla; emergencia de la radícula y su transformación en raíz primaria.
V1	<b>Emergencia:</b> los cotiledones aparecen al nivel del suelo y empiezan a separarse. El epicótilo comienza su desarrollo.
V2	<b>Hojas primarias:</b> hojas primarias totalmente abiertas.
V3	<b>Primera hoja trifoliada:</b> se abre la primera hoja trifoliada y aparece la segunda hoja trifoliada.
V4	<b>Tercera hoja trifoliada:</b> se abre la tercera hoja trifoliada y las yemas de los nudos inferiores producen ramas.
R5	<b>Prefloración:</b> aparece el primer botón floral o el primer racimo. Los botones florales de las variedades determinadas se forman en el último nudo del tallo o de la rama. En las variedades indeterminadas los racimos aparecen primero en los nudos más bajos.
R6	<b>Floración:</b> se abre la primera flor.
R7	<b>Formación de las vainas:</b> aparece la primera vaina que mide más de 2.5 cm de longitud.
R8	<b>Llenado de las vainas:</b> comienza a llenarse la primera vaina (crecimiento de la semilla). Al final de la etapa, las semillas pierden su color verde y comienzan a mostrar las características de la variedad. Se inicia la defoliación.
R9	<b>Madurez fisiológica:</b> las vainas pierden su pigmentación y comienzan a secarse. Las semillas desarrollan el color típico de la variedad.

a. V = vegetativa; R = reproductiva.

b. Cada etapa comienza cuando el 50% de las plantas muestran las condiciones que corresponden a la descripción de la etapa.

**Anexo 2.****Hábito de crecimiento del frijol común, según CIAT (1981 b)**

Para clasificar plantas con hábito de crecimiento determinado, la primera evaluación debe hacerse durante la etapa de desarrollo R6. Debe hacerse una segunda evaluación durante R9 para clasificar plantas cuyo hábito de crecimiento sea indeterminado.

La escala de evaluación para describir el hábito de crecimiento es la siguiente:

- I. Hábito determinado:
- II. Hábito arbustivo indeterminado, con tallo y ramas erectos.
- III. Hábito arbustivo indeterminado, con tallo y ramas débiles y rastreros.
- IV. Hábito de crecimiento voluble, con tallo y ramas débiles, largos y torcidos

*No se uso la subdivisión de cada hábito de crecimiento de a y b.*

**Anexo 3:**

Medio de Cultivos para bacterias de *X. campestris* pv. *phaseoli* (CIAT, 1981a)

YDCA (Yeast, Destrose, Calcium Carbonate, Agar) para crecimiento de bacterias.

Reactivos	Cantidad (1 L)
Levadura	10 gramos
Dextrosa	10 gramos
Carbonato de Calcio	2.5 gramos
Agar	20 gramos

Medio de cultivo MXP (mejorado) para identificar bacterias patogénicas de las no patogénicas del género *Xanthomonas*. (Clafin *et al.*, 1987)

Reactivos	Cantidad (1 L)
<b>Extracto de Levadura</b>	0.7 gramos
<b>Agar</b>	15 gramos
<b>Glucosa</b>	1 gramo
<b>Extracto de papa</b>	8 gramos
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.6 gramos
<b>KBr</b>	10 gramos
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.8 gramos
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1000 ml
<b>NaCl</b>	8.5 gramos

**Anexo 4:****Protocolos para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (CIAT, 1981a).****A. Aislamiento**

1. Cortar un tejido infectado (parte verde con tejido necroso) y sumergirlo en una solución de hipoclorito de sodio (1%) por dos minutos.
2. Enjuagar con agua destilada esterilizada.
3. Colocar tejido desinfectado en mortero y macerarlo (colocar algunas gotas de agua destilada esterilizada si el tejido está muy seco), hasta obtener una solución acuosa verde.
4. Utilizando un asa, tomar un poco de la solución acuosa resultante de la maceración y sembrarla mediante rayados en un plato petri conteniendo YDCA, con el fin de promover el crecimiento de colonias individuales.
5. Incubar los platos a 30° C por 48 horas.
6. Reaislar las colonias características de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* en un nuevo plato petri con YDCA, con el fin de purificar el cultivo.

**B. Preparación y Cuantificación del Inóculo.**

1. Setenta y dos horas antes de la inoculación, reactivar la bacteria almacenada rastillándola en platos petri con medio YDCA en proporción 1:5 de platos rayados: platos a utilizar en la inoculación.
2. Cuarenta y ocho horas antes de la inoculación, transferir mediante rastrillado la bacteria reactivada a nuevos platos petri. Cada plato rastrillado en (1) debe proveer suficiente bacteria para preparar cinco nuevos platos.
3. Una hora antes de la inoculación verter agua en los platos petri y raspar cuidadosamente con el rastrillo, con el fin de separar el crecimiento bacteriano del medio.
4. Colocar la mezcla resultante de cada plato dentro de un recipiente plástico, agitar bien y agregar agua.
5. Con un colorímetro o espectrofotómetro, regular a 650 nanómetros, medir absorbancia a 0.5 =  $5 \times 10^8$  cel/ ml.
6. Tomar 1.2 L de la solución bacteriana (0.5 absorbancia) y añadir a 10.8 L de agua en una motomochila de boquilla cónica de 12 L, para llegar a una dilución de 1:10 =  $5 \times 10^7$  cel/ml.

*NOTA: Utilizar 4 platos Petri con bacteria / bomba de 12 L, para un total aproximado máximo (última inoculación) de 96 platos Petri / ha. La cantidad de bombas dependerá del estado del cultivo; como sugerencia, asumir ~ 16 bombas de 12 L / ha para la primera inoculación.*

## **Anexo 5. Inoculación y evaluación de síntomas en condiciones de campo y controladas**

### **Prueba de patogenicidad para los aislamientos de *Xap* (CIAT, 1981a)**

#### **1 Ensayo a campo abierto**

- a. Sembrar en parcelas de 2 surcos de 4 m de largo por 0,70m de ancho para cada cultivar, a una distancia de siembra de 5cm entre plantas, siguiendo el diseño estadístico de bloques al azar con tres repeticiones. Utilizar controles resistentes (se recomiendan ‘XAN 112’ y ‘Engañador’ (BAT 93) y susceptibles (‘Velasco Largo’ e ‘ICA Pijao’).
- b. La ubicación de los cultivares deba ser: un control resistente y uno susceptible, seguido de cinco cultivares a estudiar, posteriormente, se sitúan nuevamente los controles, pero de forma alterna, el susceptible primero, seguido del resistente, ubicando otros cinco cultivares y así, sucesivamente hasta quedar conformado todo el ensayo para la evaluación de reacción a Bacteriosis común.
- c. No se debe realizar ningún control químico de enfermedades previendo un efecto no favorable sobre la manifestación de los síntomas de la enfermedad.

#### **1.1 Preparación de inóculo (CIAT, 1981a)**

- a. Cuarenta y ocho horas antes de la inoculación, transferir mediante rastrillado la bacteria reactivada a nuevos platos Petri. Cada plato rastrillado en (L) debe proveer suficiente bacteria para preparar cinco nuevos platos.
- b. Una hora antes de la inoculación verter agua en los platos Petri y raspar cuidadosamente con el rastrillo, con el fin de separar el crecimiento bacterial del medio.
- c. Colocar la mezcla resultante de cada plato dentro de un recipiente plástico, agitar bien y agregar agua.
- d. Con un colorímetro o espectrofotómetro, regular a 650 nanómetros, medir absorbancia a  $0.5 = 5 \times 10^8$  UFC
- e. **Para inoculación en campo:** Tomar 1.2 L de la solución bacteriana (0.5 absorbancia) y añadir a 10.8 L de agua en una moto mochila de boquilla cónica de 12 L, para llegar a una dilución de  $1:10 = 5 \times 10^7$  cel/ml. Utilizar 4 platos Petri con bacteria / bomba de 12 L, para un total aproximado máximo (última inoculación) de 96 platos Petri / ha. La cantidad de bombas dependerá del estado del cultivo; como sugerencia, asumir ~ 16 bombas de 12 L / ha para la primera inoculación.

#### **1.2 Inoculación por aspersión en el campo**

- a. Realizar la primera inoculación en la etapa V3 (primera hoja trifoliada abierta y segunda comenzando a desarrollarse).
- b. Realizar inoculaciones subsecuentes con frecuencia semanal hasta antes de R6 (floración) y de ser necesario después de esta, de la ((R7) hasta inicios de la (R8), para un máximo de 5- 6 inoculaciones / ciclo de cultivo.

#### **1.3 Evaluación a realizar.**

- a. Evaluaciones periódicas: hacer lecturas de incidencia de la enfermedad cada 5 días a partir del quinto día de la primera inoculación. En total se hacen de 4 – 5 evaluaciones.
- b. Evaluación única: hacer una sola lectura de incidencia de la enfermedad a mitad de la R8.

## 2 Ensayos en condiciones controladas (CIAT, 1981a)

- a. Utilizar un cultivar susceptible como 'BAT 41', sembrar un total de 24 macetas con tres plantas cada una. Las macetas pueden ser de 2 kg de capacidad, estas deben llenarse con arena esterilizada al vapor.
- b. Durante la conducción del experimento se debe suministrar a las plantas el riego localizado tres veces al día (mañana, medio día y tarde) hasta lograr más de un 85% de humedad
- c. Realizar control de plagas con trampas adhesivas amarillas ubicadas en diferentes lugares del invernadero.

### 2.1 Inoculación en condiciones controladas (CIAT, 1981a)

- a. Punción múltiple: Con un cojín provisto de agujas finas se presiona la hoja sobre una esponja impregnada de la suspensión de bacterias o inóculo.
- b. Corte laminar: Con dos cuchillas de afeitador o bisturís acopladas a una base se presiona la hoja sobre una esponja impregnada de suspensión bacteriana o inóculo y se realiza un corte en la lámina foliar

## Anexo 6: Escala general para evaluar la reacción del frijol a patógenos bacterianos y fungosos, según CIAT (1981b).

Calificación	Categoría	Descripción	Comentarios
1	Resistente	Síntomas no visibles	Germoplasma muy útil para progenitor o variedad comercial.
2		o muy leves	
3			
4	Intermedio	Síntomas visibles y conspicuos que ocasionan un daño económico limitado	Germoplasma utilizable como variedades comerciales como fuente de resistencia a ciertas enfermedades
5			
6			
7	Susceptible	Síntomas severos o muy severos que causan pérdidas considerables en rendimiento o la muerte de la planta	En la mayoría de los casos es germoplasma no útil ni aun como variedad comercial
8			
9			

**Anexo 7. Extracción de ADN de *Xcp* y *Xcpf* para la caracterización genético-molecular de aislamientos de Cuba según Louws *et al.*, (1994).**

**Nota:** No permitir que la bacteria crezca más de 24 horas, ya que su alta producción de polisacáridos dificulta la extracción de ADN.

1. Centrifugar 125  $\mu$ l de bacterias con 1 ml de NaCl a 5 000 rpm por 10 minutos.
2. Botar el líquido con cuidado de no votar el pellet.
3. Adicionar al pellet 1ml de Aguas destilada estéril y centrifugar a 5.000 por 10 minutos.( Cada vez resuspender el pellet agitando con el vortex)
4. Botar el líquido con cuidado de no votar el pellet.
5. Repetir el paso 1 y 3 dos veces para remover la mayor cantidad de polisacáridos.
6. Resuspender el pellet en 500  $\mu$ l de Buffer de extracción caliente con proteinasa K (10  $\mu$ g/ml) , la relación es 1 ml de Buffer por 1 $\mu$ l de Proteinasa K.

*Buffer de extracción 0.2 M Tris-HCl pH 8.0*

*10 mM EDTA, pH 8.0*

*0.5 M NaCl*

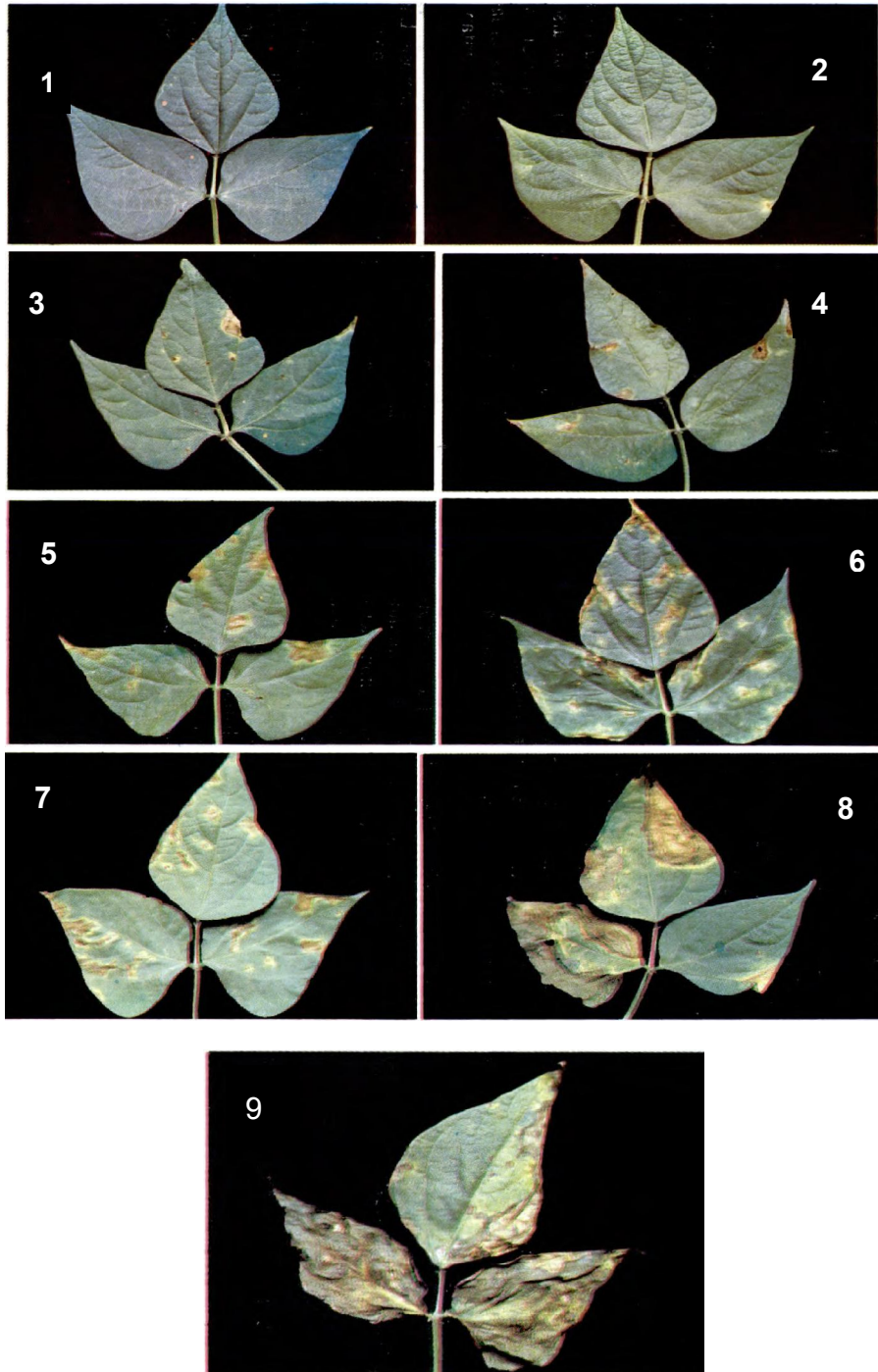
*1% SDS*

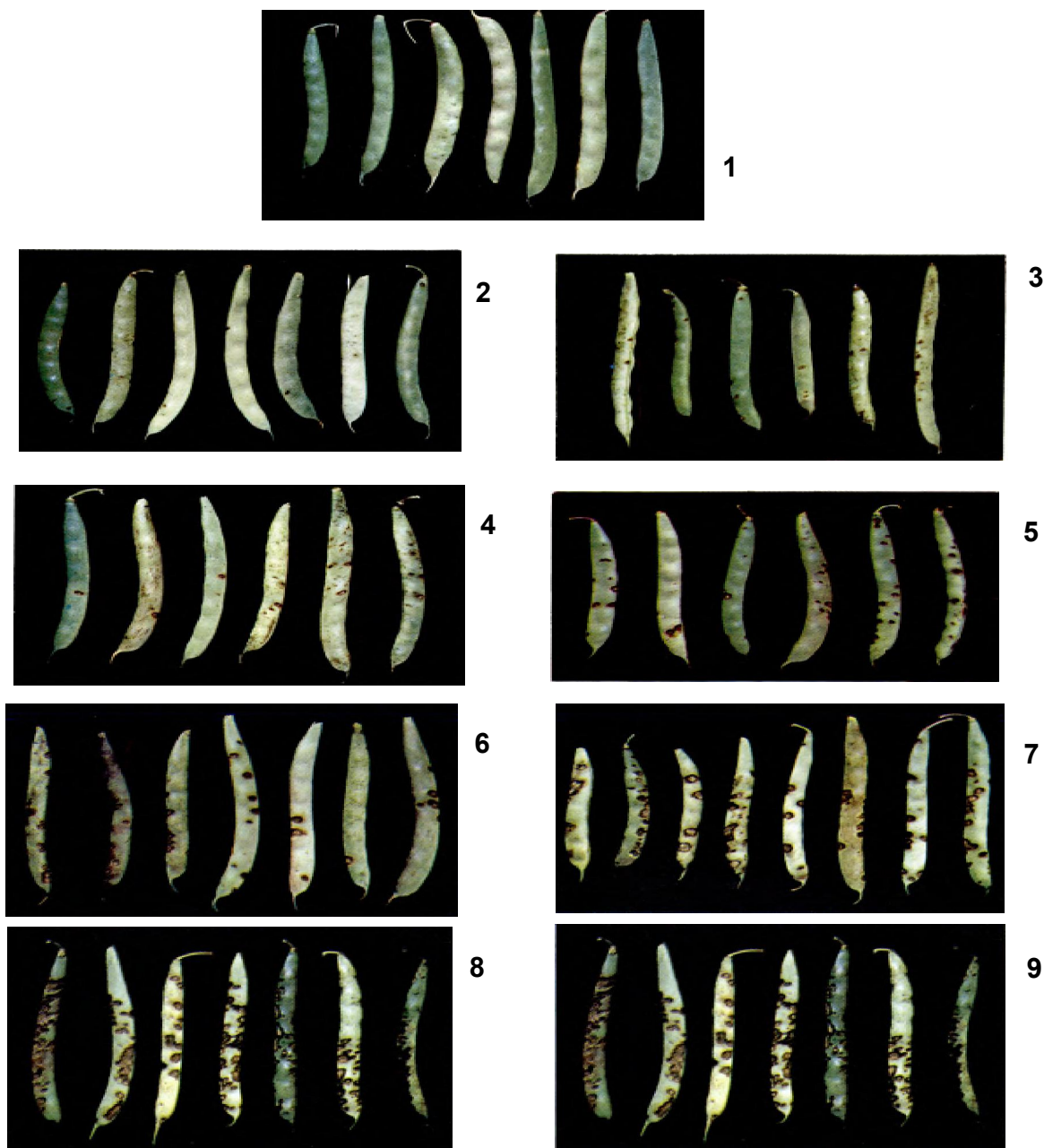
*10  $\mu$ g / ml Proteinase K*

7. Incubar en baño María (55-65°C) por una hora.
8. Retire los tubos del baño María y agregue 1/2 volumen de 7.5 M Acetato de Amonio (300  $\mu$ l). Mezcle con la mano y dejar los tubos a temperatura ambiente por 10 minutos.
9. Centrifugar por 15 minutos a 12 000 RPM para separar las fases.
10. (**Nota:** Si las fases no separan bien, agregan 200  $\mu$ l de Buffer 1 X TE y 100  $\mu$ l de 7.5 M Acetato de Amonio y centrifugan como en el paso 9)
11. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo limpio. Si usted transfiera ruinas, repita el paso 9 y transfiera a un nuevo tubo limpio
12. Agregue un volumen igual de isopropanol (500  $\mu$ l) , mezcle bien invirtiendo los tubos e incube a - 20°C por un mínimo de dos horas a toda la noche.
13. Si las cadenas de ADN son visibles, transfiera éstos a un tubo de microcentrifuga limpio utilizando una pipeta Pasteur. Si no es visible, centrifugar los tubos a 12 000 RPM por 15 minutos. Un pellet pequeño debe estar claramente visible en este momento.
14. Lavar el ADN con 70% etanol frío (800  $\mu$ l), centrifugar por 10 minutos a 10 000 RPM y elimine el sobrenadante con cuidado de no votar el pellet de ADN que podría estar suelto en este momento.
15. Secar el pellet invirtiendo los tubos a temperatura ambiente o utilizando una campana de vacío por 10 minutos.

Resuspender el pellet de ADN en 100  $\mu$ L de Buffer 1 X TE o en agua destilada desionizada estéril.

Anexo 8a: Hojas trifoliadas de frijol que muestran las 9 categorías de la enfermedad (CIAT, 1981b)



**Anexo 8b: Vainas de frijol que muestran las 9 categorías de la enfermedad (CIAT, 1981b)**

Nota: La escala utilizada es la propuesta para evaluar los síntomas de enfermedades fungosas y bacterianas en frijol común.



**Anexo 9a: Extracción de ADN para el análisis de los marcadores SCAR, según Zabala (2003)**

1. Cosechar tejido fresco de plantas (hojas jóvenes) para la extracción del ADN.
2. Agregar 40 ml de hidróxido de sodio (NaOH 0.25 M) en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Calentar las muestras en baño maría a 100 ° C por 30 segundos.
3. Macerar el tejido suavemente usando una barra (*pestle*) de plexiglass de laboratorio.
4. Agregar 40 ml de ácido clorhídrico (HCl 0.25M) y 20 ml Tris ácido clorhídrico (Tris HCl 0.25M).
5. Colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 100 ° C por 2 min.
6. Diluir las muestras extraídas en agua destilada estéril, usando una relación de 1:1.
7. Medir la concentración (ng/ml) de ADN de las muestras; si es necesario; diluir previo a su aplicación.
8. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a - 20 ° C.

**Anexo 9b: Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant TM200).**

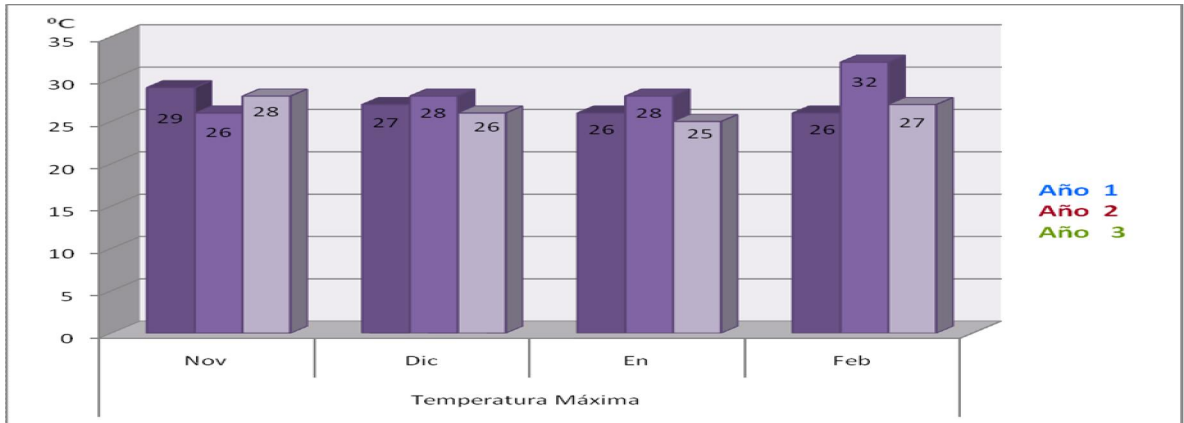
1. Colocar 2 ml de buffer de cuantificación en un cubo (cuvette) limpio y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 ml de muestra de ADN al buffer cuantificador.
3. Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.
4. Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/ml.
5. Vaciar el cubo, enjuagar con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

---

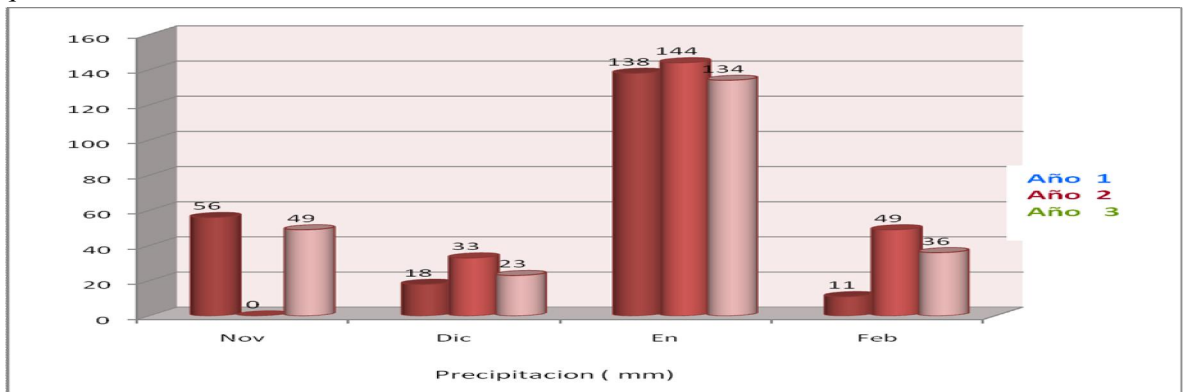
\* Fluorómetro: (Hoefel) TKO-100,  $\lambda_{\text{exc}}$  + 365 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  + 460 nm.

\* Buffer de cuantificación: 10 ml solución para tinción concentrada + 100 ml buffer TNE 1X (pH=7.4)

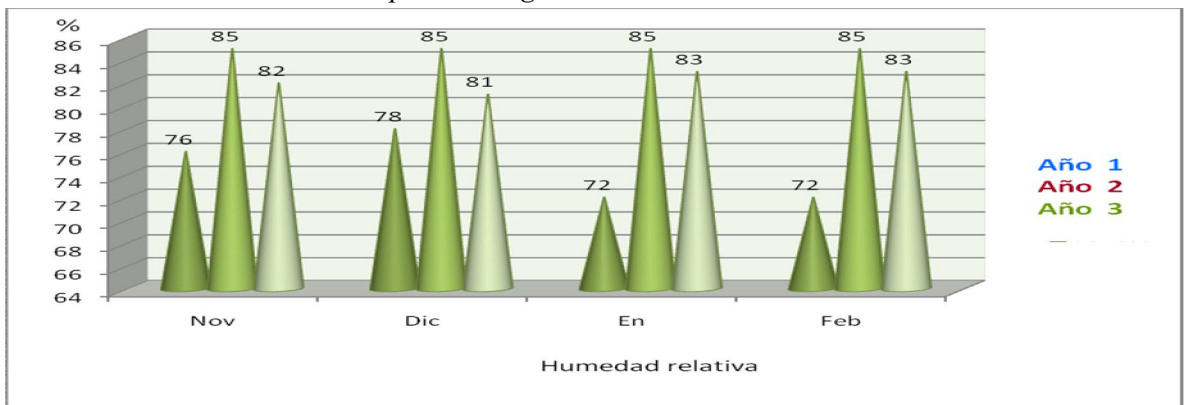
**Anexo 10: Condiciones climáticas de los meses en los que se desarrollo el estudio.**



*Promedios mensuales de temperatura máxima registrados, de los tres años, para los meses en que se desarrolló el estudio.*



*Acumulados mensuales de Precipitación registrados en los tres años de estudio*



*Promedios mensuales de Humedad relativa registrados en los tres años de estudio*

### Anexo 11: Características Generales de los Suelos

Profundidad (0 – 20)	Localidad	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg/100 g de suelo	K <sub>2</sub> O mg/100 g de suelo	K mg/100 g de suelo	Ca mg/100 g de suelo	Mg mg/100 g de suelo	MO (%)
Ferralítico rojo	Quivicán IIHLD	7.05	6.18	39.27	21.13	-	11.18	0.92	1.96
Ferralítico rojo	Alquizar E.E. EL Tomeguín	7.16	6.46	52.23	-	0.64	12.21	0.83	2.51
Técnica Analítica		Potenciometría		Oniani			Maslova		Walkley Black

IIHLD.- Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”

### Anexo 12

**Metodología para la caracterización de aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) y evaluación de la resistencia en cultivares de frijol, mediante evaluaciones fenotípicas.**

- 1. Aislamiento e identificación de las bacterias.**
  - 1.1 Caracterización de los aislamientos.
  - 1.2 Prueba de patogenicidad para los aislamientos de Xap
  - 1.3 Reaislamiento y recuperación del patógeno
- 2. Montaje de ensayos para la evaluación de síntomas de Bacteriosis común en cultivares de frijol**
- 3. Inoculación de aislamientos patogénicos de Xap en condiciones de campo y controladas**
- 4. Evaluación de síntomas de la enfermedad en el follaje y en las vainas**
- 5. Recomendaciones para el control de la enfermedad**
  - 5.1 Control cultural
  - 5.2 Control químico
  - 5.3 Resistencia varietal
- 6. Sugerencia para el control integrado de la Bacteriosis común**