

MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*  
*Departamento de Genética y Mejora de las Plantas*

**EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DE CULTIVARES  
Y LÍNEAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) A  
BACTERIOSIS COMÚN (*Xanthomonas axonopodis* pv.  
*phaseoli*) E IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE  
INTERÉS PARA ESTE CARÁCTER.**



*Tesis presentada en opción al Grado Científico de  
Doctor en Ciencias Agrícolas*

Aspirante: M.Sc. Odile Rodríguez Miranda.

Mayabeque  
2011

MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*  
*Departamento de Genética y Mejora de las Plantas*

**EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DE CULTIVARES  
Y LÍNEAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) A  
BACTERIOSIS COMÚN (*Xanthomonas axonopodis* pv.  
*phaseoli*) E IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE  
INTERÉS PARA ESTE CARÁCTER.**



*Tesis presentada en opción al Grado Científico de  
Doctor en Ciencias Agrícola.*

Aspirante: M.Sc. Odile Rodríguez Miranda.

**Tutores:**

*Dr. C. Rodobaldo Ortiz Pérez*

*Dra. C. María Margarita Hernández Espinosa*

**Consultante:**

*Dra. C. Marta Álvarez Gil*

Mayabeque  
2011

Dedicatoria

*A Dios, por haber hecho posible todo lo que ha acontecido en  
mi vida.*

*A mi hija querida, Karla por ser la luz de mis días.*

*A mi madre Olivia Miranda por ser ejemplo de lucha,  
convicción y valentía.*

*A mi padre José Rodríguez por ser mi amigo, por darme  
todo su amor y confianza.*

*A mis hermanos y familiares por su apoyo y cariño.*

*A Hector por haber devuelto el amor a mi vida.*

*A todos los que de una forma u otra me han ayudado a lograr  
este fin.*

## Agradecimientos

*La realización de esta obra ha sido posible gracias a un conjunto de personas valiosas que siempre han estado a mi lado incondicionalmente. Si por algún motivo sus nombres no constan en este documento no es mi intención pues han sido tantas las personas que han colaborado conmigo que es posible que en este momento no recuerde todos sus nombres, más siempre estarán presentes.*

*A mi tutor Rodobaldo Ortiz por su apoyo, paciencia, experiencia y buenos consejos*

*A mi tutora María Margarita Hernández Espinosa, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en conjunto, por su experiencia y su amistad.*

*A Marta Álvarez por ser una gran amiga.*

*A todos los amigos y colegas del Departamento de Genética y Mejora de las Plantas del INCA, porque siempre han estado ahí cuando más los necesito.*

*A todos muchas gracias por su apoyo, amistad y ayuda.*

## Citación correcta Norma ISO 690

### **Según Sistema de Referencia Numérico**

1. Rodríguez-Miranda, Odile. Evaluación de la reacción de cultivares y líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a bacteriosis común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e identificación de marcadores de interés para este carácter [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2011. 103, XXI p.

### **Según Sistema de Referencia Apellido, año**

Rodríguez-Miranda, Odile. 2011. Evaluación de la reacción de cultivares y líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a bacteriosis común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e identificación de marcadores de interés para este carácter [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 103, XXI p.

## SÍNTESIS

---

En el germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), en Cuba, es posible identificar cultivares o líneas con niveles de resistencia ante aislados patogénicos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) y su variante *fuscans*, a fin de disminuir las pérdidas y aumentar el rendimiento promedio del cultivo en campos infestados este patógeno. Los objetivos de este trabajo estuvieron dirigidos a: caracterizar aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* de Cuba, procedentes de cultivares susceptibles a Bacteriosis común; evaluar la patogenicidad de los aislamientos de *Xanthomonas axonopodis*, en genotipos con respuestas contrastantes; identificar los cultivares y líneas con mejor comportamiento en follaje y vainas, frente a aislamientos; identificar los cultivares y líneas con menores pérdidas de rendimiento en campos infestados por este patógeno y comprobar la presencia de los marcadores moleculares tipo SACR, ligados a los QTLs de resistencia a Bacteriosis común, SU91 y SAP6, en los cultivares y líneas con diferentes niveles de resistencia a ésta enfermedad. Los resultados obtenidos permitieron: la caracterización de 10 de los 12 aislamientos estudiados, como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y 2 como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. Se seleccionaron los genotipos de frijol, con buen comportamiento frente a los dos aislamientos de *Xap* estudiados. La reacción de susceptibilidad a Bacteriosis común determinó la disminución del rendimiento en los cultivares y líneas de frijol estudiados en campo, con inoculación del aislamiento *Xap* 527, de Cuba. Los cultivares comerciales y líneas del Programa de Mejora Nacional no presentaron el marcador SCAR SU91 y si el SAP 6. Se presenta, el marcador SCAR SU91 en todas líneas del Programa de Investigación de frijol de Honduras y de Colombia, excepto en VAX 2. No en todos los casos la presencia de los marcadores SAP 6 y SU91 fue compartible con los valores de resistencia frente a los aislamientos 527 de *Xap* de Cuba y EAP 9506 de Honduras.

## TABLA DE CONTENIDO

---

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	7
2.1. El género <i>Phaseolus</i> . Origen, distribución y domesticación .....	7
2.1.1. Distribución del frijol común .....	7
2.1.2. Domesticación del frijol común .....	7
2.1.3. Importancia económica de frijol común .....	9
2. 2. Agente causal de la Bacteriosis común .....	9
2.2.1. Clasificación y nomenclatura .....	9
2.2.2. Descripción del patógeno y rango de hospederos .....	12
2.2.3. Variabilidad en virulencia del patógeno de la Bacteriosis común .....	13
2.2.4. Distribución geográfica .....	15
2.3. Desarrollo de la enfermedad e infección de la planta .....	16
2. 4. Síntomas de la enfermedad en el cultivo del frijol .....	18
2.4.1. Diseminación y supervivencia de la Bacteriosis común .....	20
2.5. Importancia económica de la Bacteriosis común .....	21
2.6. Fuentes de resistencia, genética y mejoramiento a Bacteriosis común .....	22
2. 6.1. Marcadores Moleculares para la resistencia a Bacteriosis común .....	26
2.7. Métodos y momento de la inoculación de la Bacteriosis común. ....	28
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	31
3.1. Caracterización de los aislamientos .....	32
3.1.1. Aislamiento e identificación de las bacterias .....	32
3.1.2. Prueba de patogenicidad para los aislamientos de <i>Xap</i> .....	33
3.1.3. Reaislamiento y recuperación del patógeno .....	35
3.1.4. Evaluación de la variabilidad molecular presente en los aislamientos cubanos. ....	35
3.2. Respuesta a Bacteriosis común, en los cultivares y líneas estudiados en condiciones de campo. Afectación de los rendimientos por efecto de la inoculación .....	38
3.2.1. Cultivares comerciales frente incidencia natural de la Bacteriosis común .....	42
3.2.2. Cultivares comerciales frente al aislamiento <i>Xap</i> 527 de Cuba .....	42
3.2.3. Líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional frente al aislamiento <i>Xap</i> 527 de Cuba. ....	43
3.2.4. Cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común frente al aislamiento <i>Xap</i> 527 de Cuba. ....	44
3.3. Respuesta a Bacteriosis común, en los cultivares y líneas de Cuba, Colombia y Honduras frente al aislamiento EAP 9506, en condiciones controladas .....	46

3.3.1. Cultivares comerciales, líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional y cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común, procedentes de Cuba .....	47
3.3.2 Líneas de frijol del Programa de Investigación de frijol (PIF), de Honduras y del CIAT de Colombia .....	47
3.4. Identificación de marcadores moleculares SCAR (SAP 6 y SU 91) ligados a genes de resistencia a Bacteriosis común.....	49
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1. Caracterización de los aislamientos .....	52
4.1.1. Aislamiento e identificaron de las bacterias.....	52
4.1.2. Prueba de patogenicidad de los aislamientos de <i>Xap</i> y reaislamiento y recuperación del patógeno.....	54
4.1.3. Evaluación de la variabilidad molecular presente en los aislamientos cubanos.....	58
4.2. Respuesta a Bacteriosis común, en las líneas y cultivares estudiados en condiciones de campo. Afectación de los rendimientos por efecto de la inoculación.....	61
4.2.1. Cultivares comerciales frente a la incidencia natural e inoculación del aislamiento 527 de <i>Xap</i> .....	61
4.2.2. Líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional frente al aislamiento <i>Xap</i> 527 de Cuba.....	68
4.2.3. Cultivares con genes de resistencia, frente al aislamiento 527 de <i>Xap</i> de Cuba.....	73
4.3 Respuesta a Bacteriosis común, en cultivares y líneas de Cuba, Colombia y Honduras frente al aislamiento EAP 9506, en condiciones controladas.....	86
4.3.1. Cultivares comerciales, líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional y cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común, procedentes de Cuba .....	86
4.3.2. Líneas de frijol del Programa de Investigación de frijol (PIF), de Honduras y del CIAT de Colombia.....	91
4.4. Identificación de marcadores moleculares SCAR (SAP 6 y SU91) ligados a genes de resistencia a bacteriosis común .....	93
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES .....	101
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES.....	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	I
ANEXOS.....	i

---



## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

---

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es de las legumbres comestibles de mayor consumo a nivel mundial, proporciona una fuente importante de proteínas (22%), vitaminas y minerales (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn) a la dieta de las poblaciones en América, sobre todo en los países en vías de desarrollo. La producción anual en los países desarrollados excede los 21 millones de toneladas métricas y representa más de la mitad de la producción total de legumbres para el consumo del mundo (Miklas *et al.*, 2006a).

En Cuba, la producción de este cultivo en el año 2009 fue de 110.800 toneladas métricas, con un área cosechada de 150.584 ha (FAO 2010). En la campaña 2010-2011 se debieron producir 80mil toneladas de frijol, en un área de siembra de 85 a 89 mil ha con semilla nacional González (2010). Durante la última década, la producción de frijol en Cuba estuvo a cargo, en su gran mayoría, del sector agrícola no estatal, constituido fundamentalmente por fincas y pequeñas parcelas, con condiciones muy diversas y baja disponibilidad de insumos agroquímicos y energéticos (Miranda *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009). A la falta de insumos se suma el limitado acceso de los productores a los nuevos cultivares, mejoradas o no, con adaptación a las condiciones de la producción agrícola del contexto cubano. Los frijoles producidos por estos agricultores con bajos recursos, son más vulnerables al estrés causado por factores abióticos, como la sequía y la baja fertilidad de los suelos, y al estrés biótico, debido a plagas de campo y almacén.

Dentro de los principales factores que limitan la producción de frijol común en Cuba se encuentra la Bacteriosis común del frijol, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye (*Xap*) y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye (*Xap*) var. *fuscans* (*Xapf*), sinónimo de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye (*Xap*) y *Xanthomonas*

*campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye var. *fuscans* (Xapf) (Hernández., 2008). Esta enfermedad ocupa el segundo lugar dentro de las de mayor importancia económica en Cuba y en el mundo.

La Bacteriosis común afecta las hojas, las vainas y se transmite por la semilla, lo cual hace que su control sea más difícil (Singh *et al.*, 2009 b). La presencia de niveles altos de este patógeno, la presencia de síntomas en los cultivares cubanos usados en la producción y el manejo inadecuado de la semilla, pueden contribuir a elevar, en muy poco tiempo, las pérdidas económicas provocadas por la reducción de los rendimientos.

En Cuba, esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida, sin embargo, aun no se conoce cuánto puede afectar la presencia de niveles altos de este patógeno en el rendimiento de los cultivares comerciales cubanos. En otros países, se han informado índices de infección en vainas hasta de un 48,5 % en cultivares susceptibles, cifras que pueden llegar a ser más altas en el follaje, donde se han encontrado índices de infección por encima del 80 % y pérdidas en rendimiento entre un 17 y 45% (Stefanova, 1996).

Los estudios de genética y mejoramiento para lograr el control de esta enfermedad mediante la resistencia genética, se han desarrollado en los últimos 60 años. La mayoría de las investigaciones fueron orientadas a la búsqueda de nuevos métodos de inoculación, pruebas de patogenicidad y estudios de la diversidad de patógenos causantes de Bacteriosis común (Lema *et al.*, 2007), así como, la selección de genotipos o accesiones tolerantes mediante la mejora, los estudios genéticos de la resistencia a este patógeno y la Selección Asistida por Marcadores Moleculares (MAS, según sus siglas en ingles) (Mutlu *et al* 2008a, Beaver y Osorio, 2009, Liu *et al.*, 2010).

A pesar de ello, la obtención de cultivares de *P. vulgaris* resistentes a Bacteriosis común se ha dificultado, aun cuando hace mas de 40 años se explotan fuentes de resistencia a esta

enfermedad, entre las más utilizadas en el mundo, las introducidas del frijol tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray.) en la Universidad de Nebraska, Lincoln (Coyne y Schuster, 1970). Una dificultad a la que se ha hecho referencia por algunos autores es la alta variabilidad en la virulencia de los aislamientos de *Xap*; así como una interacción inestable entre las poblaciones de frijol y los aislamientos de *Xap* (Cruz- Izquierdo *et al.*, 2001).

En los últimos años, la Selección Asistida por Marcadores (MAS), como herramienta dentro de los Programas de Mejora Genética, ha facilitado la selección de líneas resistentes y/o tolerantes a *Xap* en generaciones tempranas. Existen dos marcadores SCAR (SAP6 y SU91) que permiten seleccionar para tres *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs, por sus siglas en inglés) independientes, ubicados en grupos de ligamiento diferentes (B6, B8 y B10), lo cual tiene un efecto importante en el estudio de la resistencia a este patógeno (O'Boyle *et al.*, 2007). Uno de los QTLs de impacto mayor fue el marcador SCAR SAP6.

En Cuba, se cuenta con una amplia colección de cultivares criollos, comerciales, mejorados e introducidos, con caracteres de interés múltiple para la producción. Sin embargo, la susceptibilidad a la Bacteriosis común, puede limitar la producción de este grano, por la disminución que produce en los rendimientos, al presentarse el patógeno en cultivares susceptibles y con condiciones ambientales favorables para su desarrollo y diseminación.

Los trabajos encaminados a la evaluación de estos cultivares por su reacción a *X. axonopodis* fueron desarrollados desde la década de los 80 por el Programa de Mejoramiento del frijol, en el Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". Estos resultados mostraron el comportamiento de cultivares y líneas de frijol, nacionales y foráneos, frente a la incidencia natural de este patógeno en campo (Hernández y Rodríguez, 1990; Faure *et al.*, 1993a y 1993b; Hernández *et al.*, 1996). Sin embargo, se desconoce el comportamiento de estos cultivares

frente a una presión alta de inóculo, con aislamientos patogénicos de esta enfermedad, en condiciones controladas y en campo; ni el efecto de la inoculación de este patógeno sobre el rendimiento potencial de este cultivo.

El desarrollo de cultivares y líneas resistentes contra el ataque del patógeno o contra niveles altos de severidad de esta enfermedad, deberá ser uno de los objetivos de los programas de mejoramiento genético, por cuanto es una necesidad del país obtener altas producciones de frijol en los próximos años, a fin de abastecer, con producciones nacionales, la demanda de la población cubana (Leyva 2011).

Que los agricultores dispongan de cultivares mejorados con diferentes niveles de resistencia y tolerancia a *X. axonopodis* es la mejor alternativa en el control fitosanitario de este patógeno, evitándose las pérdidas de rendimientos en las áreas de producción. Para lograrlo, es indispensable un estudio minucioso de las poblaciones del patógeno en las áreas productivas del país y la evaluación de las diferentes fuentes de resistencia ante aislados patogénicos y en condiciones de campo, a fin de recomendar como progenitores aquellas que posean, además de una buena respuesta ante aislados patogénicos causantes de la enfermedad, una adecuada respuesta productiva en condiciones de infestación natural.

Teniendo en cuenta los criterios expuestos anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

**Hipótesis:**

*En el germoplasma de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) presente en Cuba, es posible identificar cultivares o líneas con niveles de resistencia ante aislados patogénicos de Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli y su variante fuscans, a fin de disminuir las pérdidas y aumentar el rendimiento promedio del cultivo en campos infestados con este patógeno.*

Para demostrar la hipótesis planteada, el presente trabajo tuvo el siguiente **objetivo general**:

- Seleccionar cultivares o líneas de frijol con resistencia a aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) y poca afectación del rendimiento por Bacteriosis común, para su empleo en la producción nacional y como progenitores en el Programa de Mejora Nacional del cultivo.

**Objetivos específicos:**

- Caracterizar aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* de Cuba, procedentes de cultivares susceptibles a Bacteriosis común.
- Evaluar la patogenicidad de los aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* de Cuba, en genotipos con respuestas contrastantes.
- Identificar los cultivares y líneas con mejor comportamiento en follaje y vainas, frente a aislamientos patogénicos de *Xanthomonas axonopodis*.
- Identificar los cultivares y líneas con menores pérdidas de rendimiento en campos infestados por Bacteriosis común.
- Comprobar la presencia de los marcadores moleculares tipo SCAR, ligados a los QTLs de resistencia a Bacteriosis común, SU91 y SAP6, en los cultivares y líneas con diferentes niveles de resistencia a ésta enfermedad.

**Novedad Científica.**

Por primera vez en Cuba se realizó una caracterización cultural, genético molecular y de patogenicidad de los aislamientos cubanos de *Xap*, de los cuales 10 se clasificaron como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye y dos corresponden a su variante *fuscan*. Se informó el efecto de la Bacteriosis común sobre las pérdidas en el rendimiento del frijol, en diferentes cultivares comerciales, así como el grado de resistencia a Bacteriosis común frente a

aislamientos patogénicos de *Xap* de Cuba y Honduras, lo que incrementa el valor genético de los mismos. Se identificaron líneas y cultivares de frijol con QTLs ligados a genes de resistencia a Bacteriosis común.

#### **Importancia Práctica.**

Los resultados obtenidos posibilitaron conocer la presencia de diversidad de aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y su variante *fuscans* de Cuba, así como identificar los más patogénicos, elemento de importancia para el estudio de la resistencia a este patógeno. Se evaluaron diferentes líneas y cultivares de frijol común, frente a dos aislamientos agresivos de *Xap*. Se recomiendan líneas y cultivares como fuentes de resistencia a Bacteriosis común, los que pueden ser utilizados por los Programas de Mejora Genética del cultivo, además de ser incluidos en las nuevas estrategias de manejo y control de esta enfermedad bacteriana en el país.

#### **Importancia Teórica.**

Se ofrece una información actualizada sobre la resistencia genética de cultivares y líneas de frijol a aislamientos patogénicos de Bacteriosis común en Cuba, lo que contribuye a elevar el conocimiento de este complejo. Se aporta información teórico - práctica de avanzada para la aplicación de los marcadores moleculares en la identificación de nuevas fuentes de genes (QTLs) de resistencia a Bacteriosis común, ligados a los marcadores SCAR SAP6 y SU91. Se propone una metodología de trabajo para caracterización de aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) y evaluación de la resistencia en cultivares de frijol, mediante evaluaciones fenotípicas.

## CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1. El género *Phaseolus*. Origen, distribución y domesticación

Dentro de la familia de las leguminosas se encuentra el género *Phaseolus sensu stricto* (Delgado-Salinas, 1985), en el cual se han identificado hasta el momento 52 especies diferentes y su número cromosómico es  $2n = 2x = 22$  (Singh *et al.*, 1996). Tiene dos centros de origen dentro del continente americano; el Mesoamericano y el Andino, distinguibles a nivel morfológico, fisiológico y molecular (Santos *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2007 y Gepts, 2010).

#### 2.1.1. Distribución del frijol común

En el género *Phaseolus* existen diferentes grupos naturales, en los que se agrupan las especies según sus similitudes morfológicas, afinidades ecológicas y compatibilidad hibridológica (Debouk y Smartt, 1995).

La distribución geográfica del frijol silvestre se extiende desde el norte de México (Chihuahua), hasta el norte de Argentina (San Luis) (Toro *et al.*, 1990). El frijol cultivado se encuentra desde la isla de Chiloe (Chile) hasta Alberta y Saskatchewan (Canadá) (Singh *et al.* 1996).

#### 2.1.2. Domesticación del frijol común

Evidencias basadas en estudios aloenzimáticos, proteínas de las semillas, estudios morfológicos y genéticos (Singh *et al.*, 1991a y 1991b; Beebe *et al.*, 2000), indican que existen dos grupos genéticos: uno de ellos es el Mesoamericano y el otro es el grupo Andino (Delgado-Salinas *et al.*, 2006 y Blair *et al.*, 2007 y Singh y Schwartz, 2010). Estos dos grupos genéticos tienen varios centros de domesticación. Cultivares del grupo genético Mesoamericano predominan en las regiones de México, América Central y Brasil (Blair *et al.*, 2007).

Este grupo mesoamericano, se encuentra dividido en tres razas, la raza Mesoamericana (M), que agrupa frijol cultivado de México y Centro América, y se caracteriza por ser cultivares de

semillas relativamente pequeñas y adaptadas a zonas bajas y climas calientes. La raza Durango (D), está compuesta, fundamentalmente, por genotipos cultivables de semillas de tamaños medianos y adaptados a las zonas secas de México y por último la raza Jalisco (J) se puede encontrar en las regiones más húmedas de México y está compuesta en su mayor parte por cultivares con semillas de tamaño mediano (Beebe *et al.*, 2001).

El grupo genético Andino, esta subdividido también en tres razas (Singh *et al.*, 1991a; Blair *et al.*, 2007 y Blair 2010). Una de estas razas, es la Nueva Granada (N), representada por accesiones de semillas de tamaño mediano o grande, su nombre indica que su origen fue al norte de los Andes. La raza N, es la más cultivada del grupo Andino. La raza Perú (P), agrupa los frijoles adaptados, fundamentalmente, a ambientes de zonas altas por encima de 2000 msnm. La raza Chile (C) es típica de la zona de Chile y sus cultivares se caracterizan por el tamaño mediano de su semilla comercial y su forma redondeada u ovalada, con colores claros (Beebe *et al.*, 2001 y Rodiño *et al.*, 2001).

El frijol cultivado en el Caribe, incluye representantes de los dos centros de origen. Probablemente, los primeros frijoles introducidos a Cuba, alrededor de 950 años antes de Cristo, fueron cultivares de semilla grande, traídos por los Tainos, tribus Arawak, desde los Andes, pasando por las Antillas Mayores. Los de semillas pequeñas podrían haber llegado desde México, de las costas del Caribe de Colombia, Venezuela y Brasil (Blair *et al.*, 2007). Una segunda vía de introducción pudo haber ocurrido desde América Central, siguiendo la ruta desde Yucatán a Cuba y a la Española (hoy en día Haití y República Dominicana) (Blair *et al.*, 2007).



### **2.1.3. Importancia económica de frijol común**

El frijol común cultivable, es la leguminosa comestible de mayor importancia en el mundo (Beebe *et al.*, 2000 y 2001; Voyses, 2000) y proporciona una fuente importante de proteínas (22%), vitaminas, y minerales (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn) a la dieta humana (Shi *et al.*, 2011), sobre todo en los países en vías de desarrollo. En los países del primer mundo la producción anual excede los 21 millones de toneladas métricas (MT) y representa más de la mitad de la producción total de legumbres para el consumo del mundo (Miklas *et al.*, 2006a; Vandemark *et al.*, 2008).

La mayoría de la producción del frijol ocurre en la agricultura de bajos insumos, en las granjas a pequeña escala, en los países en desarrollo. Los frijoles producidos por estos productores de bajos recursos, son más vulnerables a ser afectados por las enfermedades, las plagas y estrés abióticos, como la sequía y la baja fertilidad de los suelos (Miranda *et al.*, 2007 y Telleria *et al.*, 2009). En cambio los productores de frijol con altos insumos tienen más recursos para combatir estos estreses, a través del uso de los pesticidas, fertilizantes, e irrigación. La utilización de tales técnicas, puede aumentar los costos de la producción, así como la contaminación del medio ambiente; además de que el uso de los químicos muchas veces no es eficiente para el control de estas plagas. Los sistemas de cultivo, los estreses bióticos y abióticos, continúan siendo las mayores limitantes en la producción de subsistencia y en el rendimiento económico de frijol común (Miklas *et al.*, 2006a; Rodríguez *et al.*, 2009).

## **2. 2. Agente causal de la Bacteriosis común**

### **2.2.1. Clasificación y nomenclatura**

La Bacteriosis común fue reconocida por Beach en 1812, en New York. En 1817, se describió por primera vez la bacteria asociada a esta enfermedad y se denominó *Bacillus phaseoli*.

Basado en las características del cultivo de esta bacteria, Smith la transfirió, posteriormente, al género *Pseudomonas* en 1901; pero en 1905, la volvió a renombrar como *Bacterium phaseoli* (Zaumeyer y Meiners, 1957).

En 1920, Burkholder aisló una bacteria muy similar a *Bacterium phaseoli*, la cual producía un pigmento carmelita en el medio de cultivo (Zaumeyer y Meiners, 1957). Esta bacteria inducía, además, síntomas muy similares a la Bacteriosis común, pero Burkholder notó diferencias en la habilidad para inducir la enfermedad en algunos cultivares de frijol, cuando la comparó con *Bacillus phaseoli*. La enfermedad inducida por esta bacteria, productora del pigmento carmelita, fue nombrada tizón fuscans y a la bacteria se le denominó *X. campestris* pv *phaseoli* var *fuscans* (Burk) Starr y Beirk, coincidiendo con la descripción hecha anteriormente (Zaumeyer y Meiners, 1957).

Dowson (1943), creó un nuevo género: *Xanthomonas*, donde fueron agrupadas las bacterias gran negativas, con pigmentación amarilla y monótricas, renombrando a la Bacteriosis común como *Xanthomonas phaseoli*. (E.F. Smith) Dowson. Zumayer y Meiners, (1957), la describieron como una enfermedad bacterial del frijol, y se caracterizó por las lesiones que ocasionaba en las hojas y en las vainas de este cultivo.

Desde 1939 hasta 1974, el organismo causal fue conocido como *Xanthomonas phaseoli* y se distinguía de otras *Xanthomonas*, principalmente, por la patogenicidad en su hospedero usual, *Phaseolus vulgaris* L. (Vidaver, 1996). Con el acuerdo del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática, de que el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias se renovara, en 1980, los fitopatólogos iniciaron una clasificación con el objetivo de que el sistema de patovares, mantuviera los nombres de las especies. Fue entonces que el organismo causante de la Bacteriosis común, llegó a ser conocido como *Xanthomonas campestris* pv.

*phaseoli*., porque *Xanthomona phaseoli*, a la cual estaba relacionada, tenía prioridad (Simoes *et al.*, 2007; Araya y Hernández, 2008 y Hernández, 2008).

En la década de los 90, los métodos de análisis nuevos hicieron posible la clasificación de *Xanthomonas* incluyendo estudios moleculares, quimio-taxonómicos y pruebas fisiológicas ampliadas (Zapata 2001, Gongalves *et al.*, 2002 y Simoes *et al.*, 2007). Los estudios más amplios en la clasificación de este género han analizado más de 1000 aislamientos, mediante el uso de electroforesis de proteínas y análisis de ésteres de metil de ácidos grasos (FAME); 183 de éstos, incluyeron aislamientos de *Xcp* y *Xcapf*, que se compararon por hibridación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y análisis fenotípico (Zapata, 1996).

La clasificación de la especie *Xanthomona campestris* ha sido motivo de estudios taxonómicos y se ha propuesto cambiar por *X. axonopodis* (Zapata, 2001). Posteriormente, basados en los resultados obtenidos, se propuso una nueva especie, *Xanthomonas axonopodis*, que incluye también las cepas de Bacteriosis común y fuscans como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, respectivamente.

La Sociedad Americana de Fitopatología (APS) (Vanterin *et al.*, 1991 y Singh y Schwartz, 2010), al igual que muchos fitopatólogos de la región, como Araya y Hernández (2008) y Hernández (2008), reconocen como patógenos de la Bacteriosis común a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye [sinónimo con *X. campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Vanterin *et al.*] y a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye [sinónimo con *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Smith) Vanterin *et al.*]. Estos nombres se utilizan de forma independiente en la actualidad, al referirse al patógeno de la Bacteriosis común del frijol.

Los estudios de taxonomía también se han encaminado a examinar las relaciones existentes entre los aislamientos de *Xap* y *Xapf* de diferentes localidades geográficas. Gilberston *et al* (1987), realizaron pruebas usando secuencias repetitivas de ADN de un plásmido y del genoma de *Xap*. Los resultados preliminares indicaron que aunque estas secuencias se presentaban en todo el genoma de *Xap* y *Xapf*, existían diferencias genéticas claras entre ellos. El descubrimiento de estas diferencias se basó en patrones revelados de Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), de *Xap* y *Xapf*. Sin embargo, los mismos autores plantean que las similitudes entre *Xap* y *Xapf*, hacen justificable mantener a *Xapf* como una variante de *Xap*, pues sólo pueden ser diferenciados por sus patrones de RFLP.

Estudios realizados por Gongalves *et al.* (2002); Simoes *et al.* (2007) y Pastor– Corrales *et al.* (1996), para determinar la diversidad genética de los patógenos que causan la Bacteriosis común del frijol, demostraron que mediante el uso de la técnica de RFLP, se observaron patrones de secuencias muy similares, pero no idénticos entre aislamientos de una misma localidad geográfica. También, permitieron diferenciar *Xap* de *Xapf* y aislamientos de uno y de otro; así como entre las bacterias patógenas (*Xap* y *Xapf*) de las no patogénicas.

### **2.2.2. Descripción del patógeno y rango de hospederos**

Los patógenos de la Bacteriosis común producen células individuales en forma de varillas rectas (0,4 a 0,9  $\mu$ m de diámetro y 0,6 a 2,6  $\mu$ m de longitud), que se mueven por medio de un flagelo polar. Ambas bacterias son Gram – negativas y estrictamente aeróbicas. En medio de cultivo con tirosina, *Xap* y *Xapf* producen colonias amarillas, pero *Xapf* produce otro pigmento melanoide extracelular, el cual es difusible al medio de cultivo (Zapata, 2001; Cruz- Izquierdo, 2001; Singh y Schwartz, 2010). El pigmento marrón no está asociado a la patogenicidad (Pastor- Corrales *et al.*, 1996).

Este organismo crece muy bien en medio con papa dextrosa agar (PDA, por sus siglas en inglés) y en agar nutriente. Generalmente la identificación de la colonia bacteriana se realiza en medio de cultivo agar extracto de levadura (YCDA, por sus siglas en inglés), selectivo para *Xanthomonas*. Las colonias son convexas, circulares, de aspecto mucoso, suave, con bordes enteros de color amarillo brillante, con actividad lipolítica e hidrolizan la gelatina, la caseína y el almidón (CIAT, 1981a; Zapata, 2001 y Cruz- Izquierdo, 2001).

Los hospederos registrados de *Xap* son: frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), frijol mungo (*Vigna mungo* L. Hepper), frijol mungo (*Vigna radiata* L.) Wilczek var. *radiata*), frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray var. *acutifolius*), soya (*Glycine max* L.) Merrill y caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata*), entre otros. También crecen epifíticamente en hojas de especies de cultivos no hospederos como, maíz (*Zea mays* L.), remolacha (*Beta vulgaris* L.), caupí (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*), y malezas como: *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Solanum nigrum* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., y *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauvois (Hernández, 2008).

En Cuba, fueron aisladas *X. axonopodis*, a partir de diferentes malezas localizadas en campos de frijol: escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*), verdolaga (*Portulaca oleracea*), romerillo (*Bindens pilosus*), hierba lechera (*Euphorbia heterophylla*), cardosanto (*Argemone mexicana*), aguinaldo morado (*Ipomea crassicaulis*) y clavel chino (*Emilia sonchifoli*). (Stefanova, 1996; Gent *et al.*, 2005).

### **2.2.3. Variabilidad en virulencia del patógeno de la Bacteriosis común**

Entre las medidas de control recomendadas para la Bacteriosis común del frijol, se encuentra el empleo de cultivares resistentes (Singh y Schwartz, 2010). La incorporación de esta resistencia

permite a un cultivo adquirir defensas, pero también ejerce presión de selección sobre el patógeno, que evoluciona para vencer esa resistencia, creando nuevas formas más resistentes.

Se hace necesario conocer la variabilidad de los patógenos hacia los que se desea obtener la resistencia. En el mismo sitio en que se originó una especie lo hicieron también sus patógenos, los cuales muestran gran variabilidad en esos sitios (Navarrete - Maya *et al.*, 1996). Flor, 1955 citado por Navarrete – Maya, (1996), fue el primero en postular que por cada gen que condiciona resistencia en el hospedante, hay un gen que condiciona la patogenicidad, dando origen así a la “Teoría de un Gen por un Gen”.

Existe un aspecto asociado con la resistencia a la enfermedad y es la variabilidad y la virulencia del patógeno entre las localidades geográficas (Zapata, 2001). También los aislamientos patogénicos y no patogénicos de *Xap* y *Xapf* pueden causar síntomas similares en los cultivares de frijol común susceptible (López, 2003 a y 2006). Existe una amplia diversidad molecular entre y dentro de los aislamientos de *Xap* y *Xapf* en América y África (López *et al.*, 2006; Mkandawire *et al.*, 2004; Mutlu *et al.*, 2008b; Zapata, 1996), por otra parte, se ha reportado que existe mayor diversidad genética entre aislamientos de *Xap* que dentro de las dos especies de *Xanthomonas* (Mkandawire *et al.*, 2004)

Mkandawire *et al.* (2004) reportó diferencias en la patogenicidad entre los aislamientos del Este de África y los de América. Los del este de África fueron altamente patogénicos en los cultivares de frijol Andinos y mucho menos patogénicos en cultivares de frijol de tipo Mesoamericano.

López *et al.* (2006) no encontraron ninguna diferencia patogénica entre aislamientos de *Xap* y *Xapf* de España. Mahuku *et al.* (2006) tampoco encontraron ninguna diferencia patogénica entre 211 aislamientos de *Xap* y 132 asilamientos de *Xapf* de diferentes zonas geográficas del

mundo, pero si fueron identificados mas aislamientos de *Xapf* en África, que en el continente Americano.

Montoya (1997), encontró que aislamientos de este patógeno obtenidos en Colombia y Uganda, fueron más virulentos que los aislamientos obtenidos en Nebraska. Esta variabilidad en la virulencia así como la composición de las poblaciones donde están presentes estos patógenos, afectan los programas de mejoramiento, ya que algunas líneas pueden poseer cierto grado de resistencia en un país, pero en otro pueden ser susceptibles

La variabilidad en virulencia entre aislamientos de *Xap* y *Xapf* no está clara aún, por ejemplo: Zapata (1996), durante 1993, inició una colección de aislamientos en diferentes países de América Central y del Caribe con el fin de determinar variabilidad patogénica en estas bacterias. A partir de sus resultados, establece la presencia de razas fisiológicas dentro de la colección originadas de Costa Rica, Cuba, República Dominicana y Puerto Rico.

Sin embargo, Jara *et al.* (1999) no observaron ninguna reacción en la interacción hospedero-patógeno después de inocular 20 aislamientos de *Xap* de diferentes orígenes geográficos en líneas mejoradas de frijol común, como las conocidas por VAX. (Singh y Muñoz, 1999). Esto puede deberse a los altos niveles de resistencia de las cultivares VAX, las cuales provienen de la piramidación de genes entre frijol común y tepary, lo que les confiere altos niveles de resistencia al patógeno. (Asencio – Manzanera *et al.*, 2005; Beaver y Osorio, 2009),

#### **2.2.4. Distribución geográfica**

La Bacteriosis común se encuentra ampliamente distribuida en Latinoamérica, particularmente, en el este de Argentina, sur-centro de Venezuela, Centro América, Cuba y México (Zapata, 2001), Paraguay, Uganda, Burundi, Zaire, Ruanda, Zambia y el Sur de África (Beaver y Osorio, 2009). Se ha reportado en todas las regiones productoras de frijol de Brasil, siendo de gran

importancia en el estado del Paraná, en el estado de Río de Janeiro y en la zona central de Brasil. En Honduras, la presencia de esta enfermedad se ha observado en la mayoría de las zonas productoras del país. Las pérdidas en rendimiento a nivel de campo causadas por el ataque de *Xap* se consideran significativas, sin embargo, no se sabe su magnitud (Serracin *et al.*, 1991).

En Cuba, la intensidad de la afectación por bacteriosis resulta mayor en la plenitud de la floración ( $R_6$ ) (Anexo 1) o al final de esta fase; sin embargo, un mismo cultivar en la zona oriental del país, presenta valores superiores de infección que en las provincias occidentales, pudiéndose inferir una mayor influencia de las temperaturas y la humedad relativa sobre ellas, ya que el promedio de estos elementos climáticos son más altos en el oriente, que en el resto del país (Stefanova, 1996; Hernández 1996).

### **2.3. Desarrollo de la enfermedad e infección de la planta**

Diferentes estudios indican que *Xap* tiene la habilidad para entrar a las vainas a través del sistema vascular e infestar la semilla causando lesiones en la parte inferior de las vainas. Las bacterias *Xap* que entran a la semilla a través del sistema vascular, frecuentemente, causan una pequeña decoloración amarilla. Estos síntomas no son fácilmente detectables en semillas de frijol coloreado, sin embargo, en semillas de frijol blanco, comúnmente se observa un halo amarillo alrededor del hilum. Las semillas que están ligeramente infestadas sin síntomas visibles, pueden convertirse en ataques severos y violentos de esta enfermedad cuando se siembra de forma sucesiva; es por eso, que la selección de vainas sin síntomas es una forma adecuada de obtener semilla limpia (Hernández *et al.*, 2008), evitando que la infección vascular de la semilla pueda ser un problema de importancia para la producción del frijol (Asensio – Manzanera *et al.*, 2005).



Magabala (1997) encontró, bajo condiciones de campo, que las bacterias de *Xap* puede infestar las semillas de vainas de cultivares susceptibles y resistentes, cuando el patógeno se introduce dentro de plantas jóvenes.

Los niveles elevados de *Xap* en botones florales, flores y vainas juegan un rol importante en la infección de la semilla, puesto que probablemente las poblaciones internas de *Xap* son responsables de la inducción de esta enfermedad. Está comprobado que la presencia de esta bacteria puede reducir la calidad de las vainas y por consiguiente de las semillas. (Asensio – Manzanera *et al.*, 2005; Beaver y Osorio, 2009).

La semilla contaminada desempeña un papel crucial en el ciclo de vida del tizón bacteriano y proporciona una doble función para esta bacteria, diseminación y supervivencia. Esta bacteria puede sobrevivir por largos periodos de tiempo infestando la semilla. Obviamente, la semilla contaminada es una vía extremadamente eficiente de supervivencia, permitiendo la persistencia de la bacteria de estación en estación y por muchos años, lo que constituye un vehículo de diseminación a corto o largo plazo (Asensio- Manzanera *et al.*, 2005).

Al ser usada de forma continua, en la semillas libre de este patógeno, puede reaparecer nuevamente la enfermedad (Gilbertson *et al.*, 1990); aunque pueden existir otros medios de supervivencia de la bacteria, uno de ellos puede ser el inóculo presente en los restos de plantas infectadas en el campo, donde la bacteria puede sobrevivir asociada con los restos de cosecha cuando no son incorporados al suelo durante al menos un invierno (Gilbertson *et al.*, 1990). Esta puede ser una de las causas de la presencia de *Xap* en campo (Serracin *et al.*, 1991). Otros estudios demostraron que las hojas infestadas eran la fuente principal de la infección de las vainas y, por consiguiente, de las semillas (Aggour *et al.*, 1989b).

Para los pequeños productores, en el trópico, las semillas libres de patógenos están escasamente disponibles, por lo que estos producen su propia semilla, obtenida en la misma localidad. En estos casos, la semilla utilizada, frecuentemente, provoca nuevas infecciones en cada época de siembra.

Las bacterias de *Xap* son patógenos de climas cálidos por lo cual, las altas temperatura y los ambientes húmedos, causan mayor daño a las plantas a 28<sup>0</sup> C, que las temperaturas inferiores (Asensio- Manzanera *et al.*, 2005; Araya y Hernández, 2008; Hernández 2008).

El crecimiento óptimo in Vitro de las colonias de estas bacterias fluctúa entre 28 y 32<sup>0</sup> C, y disminuye gradualmente a medida que la temperatura se reduce hasta 16<sup>0</sup> C. (Zapata, 2001). Por otro lado, los cambios ambientales afectan la sobrevivencia y viabilidad de las bacterias fitopatogénicas e influyen en la dinámica de las comunidades microbianas.

#### **2. 4. Síntomas de la enfermedad en el cultivo del frijol**

En frijol, los aislamientos de *Xap* muestran síntomas similares en hojas, tallos, vainas y semillas. Los síntomas foliares aparecen, inicialmente, como manchas acuosas que se agrandan y frecuentemente se unen con lesiones adyacentes. Los tejidos infestados son flácidos y las lesiones a menudo aparecen rodeadas por una zona estrecha de tejido amarillo limón. Entonces se desarrolla la necrosis, que puede llegar a ser lo suficientemente extensa como para causar defoliación o estrangulamiento del tallo (Araya y Hernández, 2008).

Las bacterias *Xap* entran a las hojas e invaden los espacios intercelulares causando una disolución gradual de la lamela media; penetran al tallo a través de los estomas y del epicótilo y alcanzan los elementos vasculares desde las hojas o los cotiledones infectados. La colonización de los tejidos del xilema puede causar el marchitamiento de la planta por taponamiento de los vasos o por la desintegración de las paredes celulares. Se puede producir

una constricción circular del tallo o pudrición de la unión en el nudo cotiledonal, especialmente en plantas que se originan de semillas infectadas, y causar el quiebre de la planta por el nudo (Saettler, 1994).

Las lesiones de las vainas aparecen como manchas acuosas que pueden llegar a tornarse oscuras, rojas y ligeramente hundidas. Si la infección ocurre durante el desarrollo de la vaina y de la semilla, las semillas infestadas se pueden pudrir o arrugar. La infección de la semilla ocurre cuando las bacterias penetran en las suturas de las vainas a través del pedicelo o del sistema vascular de las mismas, y pasan al fonículo y a través del rafe hasta la testa de la semilla. El micrópilo también puede servir como un punto de entrada en la semilla en desarrollo. Si las bacterias entran a través del fonículo, sólo el hilo puede llegar a decolorarse. Los estudios han revelado que se puede hallar semillas infectada aún en vainas que no presentan síntomas de la enfermedad (Weller y Saettler, 1980).

El movimiento de las poblaciones de bacterias a través de los tejidos vasculares, puede depender de los niveles de resistencia a Bacteriosis común (Goodwin *et al.*, 1995). Los cultivares susceptibles acumulan grandes poblaciones de bacterias y éstas se van moviendo rápidamente a través de los tejidos vasculares (Asensio-Mazanera *et al.*, 2005).

Cafati y Saettler en 1980, demostraron que el desarrollo de síntomas en líneas resistentes se demora más tiempo que en cultivares susceptibles. En estos cultivares la velocidad de multiplicación del patógeno es más baja que en cultivares susceptibles, además se requiere una mayor población del patógeno para producir los síntomas de la enfermedad (López *et al.*, 2003b; Monteagudo *et al.*, 2006; Beaver y Osorio, 2009).

En Cuba, los primeros síntomas de la enfermedad, se observan en la fase vegetativa o al inicio de la floración. Los síntomas de la enfermedad bajo las condiciones ambientales de alta

humedad y temperatura, imperantes en Cuba, no difieren de los reportados por otros países de la zona. Estos consisten en pequeñas manchas irregulares de color pardo y aspecto acuoso que se unen y forman zonas necróticas rodeadas de un halo amarillo más ancho o en forma de una línea fina. Cuando la afectación es fuerte produce la caída prematura de las hojas. En las vainas, las manchas son puntiformes al inicio y aparecen, frecuentemente, en los dos extremos de la misma con predominio en la sutura placentar. El exudado amarillo pálido está presente en los tejidos enfermos y en las vainas muy enfermas y pueden envolver completamente las semillas (Stefanova, 1996; Hernández, 1996).

#### **2.4.1. Diseminación y supervivencia de la Bacteriosis común**

En muchos casos, las semillas contaminadas son los medios más importantes de hibernación de esta bacteria. Se hace evidente el uso de semillas libres de patógeno para la producción en regiones de baja humedad; el uso de estas semillas en muchos casos proporciona un control efectivo de esta enfermedad en el frijol (Saetler, 1994; Asencio-Manzanera, 2006 y 2005).

En el campo, la enfermedad se disemina principalmente por las salpicaduras de la lluvia, insectos y roce de hojas mojadas. También el paso de personas o animales entre las plantaciones favorece el transporte de la bacteria a otras plantas. A distancias largas, la semilla sigue siendo el principal medio de diseminación de esta bacteria. (Araya y Hernández, 2008 y Hernández, 2008).

Las medidas de control cultural, incluyendo la rotación de cultivos y el empleo de semillas libres del patógeno se han ido aplicando de forma estricta en regiones donde se cultiva el frijol (Rava *et al.*, 1996; Araya y Hernández, 2008). La incidencia de esta enfermedad puede ser reducida mediante el uso del cultivo intercalado por ejemplo con maíz, así como la rotación con cultivos no susceptibles a la Bacteriosis común, disminuyendo las poblaciones de ésta bacteria

en los residuos de frijol en el campo. El uso de estas prácticas se hace efectivo cuando los niveles de *Xap* son altos, recomendándose como medida fundamental para el control de esta enfermedad el uso de semilla libre del patógeno (Park *et al.*, 1998; Singh y Shwartz, 2010). *Xanthomona* es una bacteria saprofita y los cambios ambientales pueden afectar directamente su sobrevivencia y provocar cambios genéticos de forma permanente. (Zapata, 2001).

### **2.5 Importancia económica de la Bacteriosis común**

La Bacteriosis común, conocida también como tizón bacteriano y tizón fusco, es frecuente en muchas de las regiones donde se cultiva el frijol, con la excepción de las regiones muy secas de los trópicos (Araya y Hernández, 2008). A pesar de no haber sido informado el tizón fusco en Centro América y América del Sur, se han obtenido aislamientos que demuestran su presencia en países como Guatemala, República Dominicana, Brasil, Colombia, Cuba. (Zapata 2001) y Argentina (Maggio y Casalderrey, 2002).

Esta bacteria se presenta en zonas templadas subtropicales y tropicales, y puede causar pérdidas significativas en esas regiones, bajo condiciones ambientales favorables (Shi *et al.*, 2011). Los daños más severos de esta enfermedad, se pueden producir cuando coinciden con altas temperaturas, humedad y precipitaciones, por lo que su control es muy importante en los trópicos (Beaver y Osorio, 2009, Liu *et al.*, 2008 y 2010).

Las pérdidas en rendimiento por efecto de esta enfermedad, varían en dependencia de los niveles de infección, el ambiente, estado de desarrollo del cultivo y del genotipo, (Singh y Muñoz, 1999 y Singh y Shwartz 2010) y en este último, la presencia de cultivares susceptibles puede disminuir significativamente los rendimientos y la calidad de la semilla (Asensio - Manzanera *et al.*, 2005; Mutlu *et al.*, 2008b; Liu *et al.*, 2010).

Las pérdidas en el rendimiento en el frijol, causadas por la incidencia de *Xap* en Ontario, ha sido informada por diferentes autores: Wallen y Jackson (1975) y Seattler 1989 citado por Montoya *et al.*, (1997), observaron pérdidas del 38 % en el rendimiento por causa de *Xap*, en Ontario y en el Estado de Michigan entre 10 y 29 %. Las pérdidas en rendimiento causadas por éste patógeno en el norte y centro de España, pueden estar en el rango de 10 al 40 %, dependiendo de la presión de la enfermedad y las condiciones climáticas (Asensio- Manzanera *et al.*, 2005).

En Cuba, el frijol común, tiene una amplia dispersión territorial. Por tal razón, su cultivo se desarrolla en ambientes muy contrastantes, por lo que es preciso encontrar los cultivares más adecuadas para cada uno de ellos (Quintero *et al.*, 2006). La Bacteriosis común en Cuba, se detecta prácticamente en todos los cultivares comerciales utilizadas en el país (Faure *et al.*, 1993a y b). En la etapa de prefloración (R<sub>5</sub>) (Anexo 1), el índice de infección es bajo (menos de 10 %) y se incrementa significativamente durante la etapa de floración (R<sub>6</sub>) y de formación de la vaina (R<sub>7</sub>). En estas etapas se presentan afectaciones en el follaje entre 15 y 48 %, pudiendo llegar hasta un 80 % en los cultivares susceptibles, mientras que en la etapa de maduración del grano (R<sub>9</sub>), la enfermedad prácticamente se mantiene estable (Stefanova *et al.*, 1996). La presencia de este patógeno en condiciones experimentales, ha provocado la reducción en los rendimientos en este cultivo (Faure *et al.*, 1993 a, b y 1997)

## **2.6. Fuentes de resistencia, genética y mejoramiento a Bacteriosis común**

El desarrollo de cultivares resistentes contra la invasión del patógeno y contra niveles altos de severidad de la enfermedad, es uno de los objetivos de los programas de mejoramiento. La efectividad del uso de la resistencia genética para el control de de la Bacteriosis común constituye la mejor alternativa en el control fitosanitario de este patógeno, pues proporciona

una protección adicional dentro de un sistema integrado de control que permite reducir las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad en el cultivo del frijol (Araya y Hernández, 2008; Simoes *et al.*, 2007). De esta forma, los agricultores podrán contar con cultivares con diferentes niveles de resistencia a éste patógeno adaptadas a sus localidades (Zapata, 2001; Beaver y Osorio, 2009).

Los trabajos de genética y mejoramiento para la resistencia a Bacteriosis común han sido realizados en los últimos 60 años. La mayoría de las investigaciones se han dirigidos a la búsqueda de nuevos métodos de inoculación, en pruebas de patogenicidad para una gran diversidad de aislamientos de *Xap* (Lema *et al.*, 2005 y Cruz- Izquierdo, 2001), estudios de la diversidad del patógeno, la selección de germoplasma mediante la mejora y el estudio de la resistencia a *Xap* (Jara *et al.*, 1999; Singh y Muñoz, 1999; Santos *et al.*, 2003; Mutlu *et al.*, 2008a; Beaver y Osorio, 2009; Liu *et al.*, 2008 y 2010).

En Cuba, el Programa de Mejoramiento Genético del Frijol común incorporó, desde la década de los 80, el estudio de la resistencia a esta enfermedad debido a las pérdidas económicas que ella representa para este cultivo (Hernández y Rodríguez, 1990 y 1996; Faure *et al.*, 1993c). Estos estudios, se realizaron a cielo abierto y bajo la incidencia natural del patógeno. Fueron evaluadas líneas y cultivares procedentes de diferentes países de la región de Centro América y el Caribe, de los cuales se identificaron aquellos que presentaron reacción intermedia a este patógeno en condiciones de incidencia natural y rendimientos potenciales superiores a 1000 kg/ha. Muchos de los resultados de estos experimentos han sido incorporados en esta tesis.

El mejoramiento para la resistencia a Bacteriosis común es de naturaleza cuantitativa; el efecto aditivo para la resistencia, permite una eficiencia alta en la selección, una vez que este efecto

pueda ser fijado durante la homocigosis en una planta autógena como el frijol común (Rava *et al.*, 1996).

La ausencia de una interacción planta-patógeno estable, indica la naturaleza horizontal o poligénica de este tipo de resistencia, y funciona solamente ante determinadas razas fisiológicas del patógeno. Con frecuencia solo aparecen los síntomas cuando la planta llega a la etapa adulta (Valladares-Sánchez *et al.* 1983 y Cruz- Izquierdo *et al.* 2001).

La obtención de cultivares resistentes a *Xap* en *P. vulgaris* se ha dificultado por la variabilidad del patógeno. Existen controversias sobre la herencia de la resistencia, se considera que esta herencia puede ser vertical o raza específica, horizontal o poligénica o de ambos tipos (Silva *et al.*, 1989; Scott y Michaels, 1992; Dursun *et al.*, 1996). Otras investigaciones han demostrado que la resistencia a Bacteriosis común puede ser monogénica dominante recesiva (Kolkman *et al.*, 1994; Shwartz *et al.*, 2006; Singh y Shwartz, 2010) o que se hereda cuantitativamente (Vandermark *et al.*, 2008).

En la mayoría de los estudios realizados sobre heredabilidad para resistencia a este patógeno en *P. vulgaris*, los estimados han sido de intermedios a altos para la heredabilidad en sentido amplio y en sentido estrecho, lo que sugiere la posibilidad de realizar una selección eficiente en las poblaciones segregantes generadas de cruzamientos con padres donantes de genes de resistencia a *Xap* (Beebe, 1991, Blair, 2010). La resistencia a Bacteriosis común en frijol es difícil de evaluar y seleccionar debido a que los caracteres de herencia son complejos y de heredabilidad media (Coyne y Schuster 1974).

Singh (1996), señalaron que la heredabilidad en sentido amplio de la resistencia a Bacteriosis común se considera medianamente alta y plantea que con el uso de técnicas de selección confiables, estas se pueden hacer desde generaciones tempranas.



Aggour y Coyne (1989b), Coyne y Shuster (1974), Dursun (1996) y Santos *et al.* (2003), demostraron que las mismas líneas de frijol pueden tener diferentes reacciones en las hojas y en las vainas, a este patógeno, por ejemplo, PI 207262 presenta resistencia en hojas, pero es susceptible en las vainas; la reacción de estas líneas está bajo el control de diferentes genes, lo que indica que la reacción de las hojas y las vainas debe ser siempre evaluada frente a esta la enfermedad.

Entre las limitantes de los programas de mejoramiento para la resistencia a Bacteriosis común, se destaca la estrecha base genética de las fuentes de resistencia, la pobre adaptación de las plantas a las condiciones tropicales y el efecto ambiental, que aparentemente restringió la expresión de la resistencia para algunos de estos cultivares, tal es el caso de GNN #1, Sel. 27 y PI 207262, (Beebe y Pastor – Corrales, 1991; Freytag y Debouk, 1996 y Arnaud-Santana *et al.*, 1996).

La resistencia a *Xap* encontrada en el frijol común es moderada, sin embargo en otras especies se han encontrado niveles comparativamente altos, en accesiones de *P. coccineus*, y mayores niveles de resistencia en frijol tepary (*P. acutifolius*) (Beaver y Osorio, 2009). Las líneas con resistencia a Bacteriosis común solo se habían desarrollado de cruces entre *P. vulgaris* y *P. coccineus* en Puerto Rico y Canadá (Park y Dhanvantari, 1987).

En estudios, posteriores, se combinó la resistencia a Bacteriosis común de los cultivares GNN #1, Sel. 27, PI 207262 y XAN 159 (Mutlu *et al.*, 2008 y Liu *et al.*, 2008, 2010) con otros genes de resistencia presentes en cultivares procedentes del Programa de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia (CIAT), así como de Brasil, Puerto Rico y Estados Unidos (Miklas *et al.*, 2003; Beaver y Osorio, 2009). Un avance en el mejoramiento para la resistencia a *Xap* se alcanzó con los cultivares 'XAN 159', 'XAN 160' y 'XAN 161',

los cuales se desarrollaron a partir de un cruce entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius* (PI 319443) por la Universidad de Riverside - California (Mc Elroy, 1985; Beebe y Pastor-Corrales, 1991; Dursun *et al.*, 1996).

Se han obtenido, recientes logros como resultado de la incorporación de algunas de estas resistencias dentro de líneas tropicales adaptadas (Silva *et al.*, 1989; Singh, 1998). Una de estas líneas es XAN 112, en la cual la resistencia de G N N#1, Sel. 27 y PI 207262 es combinada, y presenta un alto nivel de resistencia a *Xap*, superior a los parentales, con mejor adaptación a los trópicos, madurez temprana, así como resistencia a otros patógenos importantes.

La hibridación entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius* se inició en el CIAT, Palmira, Colombia, en 1989 (Scott y Michaels, 1992; Mejias - Jiménez *et al.*, 1994). Más de 1000 progenies de generaciones avanzadas se obtuvieron de cruces recurrentes o congruentes, selección por pedigrí y retrocruzas continuas de los híbridos interespecíficos y piramidación de genes (combinación de diferentes fuentes de resistencia a *Xap*) entre especies de *Phaseolus*. Durante algunos años, las progenies se evaluaron sistemáticamente y se seleccionaron en condiciones de campo, esto permitió elevar a seis las líneas resistentes a *Xap* obtenidas por estos mejoradores: VAX 1, VAX 2, VAX 3, VAX 4, VAX 5 y VAX 6 (Jara *et al.*, 1999; Singh y Muñoz, 1999).

Más de un 80% de los cultivares de *P. acutifolius* son altamente resistentes a *Xap*, y al menos el 25% de sus accesiones silvestres poseen similar resistencia (Beaver y Osorio, 2009).

### **2. 6.1 Marcadores Moleculares para la resistencia a Bacteriosis común**

La Selección Asistida por Marcadores Moleculares (MAS) como herramienta dentro de los programas de mejora genética, ha facilitado la selección de líneas resistentes y tolerantes a *Xap* en generaciones tempranas entre la F<sub>1</sub> y la F<sub>4</sub> (Aranda, 2000; Asensio-Manzanera *et al.*, 2003 y González *et al.*, 2005); empleando los marcadores SCAR (SAP6 y SU91), los que permiten

seleccionar para dos QTLs independientes, en grupos de ligamiento distintos (B6 y B8), lo cual tiene un efecto importante en el estudio de la resistencia a este patógeno (Miklas *et al.*, 2000a y 2006b; Kelly *et al.*, 2003). Otros autores han reportado más de 24 QTLs que controlan la resistencia a Bacteriosis común en el tiempo, distribuidos en 11 de los cromosomas del mapa genético del frijol. (Ta'ran *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2003; González *et al.*, 2005; Miklas y Singh, 2006c).

En estudios recientes, muchos mejoradores han identificado al cultivar 'XAN 159' como progenitor donante del marcador SCAR SU91, que condiciona la resistencia a *Xap*. Se reconoce a este cultivar como uno de las fuentes genéticas de mayor importancia en estos días en los programas de mejora en la región (Adams *et al.*, 2004; Mutlu *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2008; 2010; Miklas *et al.*, 2003). Kelly *et al.* (2003); Mutlu *et al.* (2008a); Liu *et al.* (2008) y (2010), reportaron la presencia del marcador SCAR Su91 en el cultivar XAN159.

Uno de los QTLs de mayor impacto en la resistencia a Bacteriosis común fue encontrado en Graet Northern Nebraska # 1. Sel 27 (GNN #1 Sel 27) ligado con el marcador SCAR SAP6 (Miklas y Singh. 2006c).

El nivel de resistencia conferido por un solo QTL puede ser parcial; el desarrollo de líneas mejoradas por el método de piramidación de genes de varias fuentes de resistencia, podría ayudar a aumentar los niveles de resistencia parcial, conferida por un solo marcador (Castro *et al.*, 2003). En un reciente trabajo realizado por Mutlu *et al.* (2005a), se desarrolló la piramidación de múltiples QTLs para la resistencia a *Xap* en un solo genotipo de frijol (*P. vulgaris*. L); esto proporcionó un mayor nivel de resistencia a este genotipo, que el conferido exclusivamente por un solo QTL.

El empleo de la MAS en los programas de mejora genética, no excluye la necesidad de realizar evaluaciones fenotípicas directas en líneas y cultivares de frijol, para la resistencia a *Xap* (O'Boyle *et al.*, 2007). Esta, es una herramienta que nos permite reducir de forma considerable el número de líneas en generaciones tempranas, aumenta la posibilidad de seleccionar líneas y cultivares muy resistentes, disminuir el número de inoculaciones y el espacio requerido para el montaje de los ensayos, lo cual incrementa la eficiencia de los programas de mejora genética.

### **2.7. Métodos y momento de la inoculación de la Bacteriosis común.**

La eficiencia de la inoculación depende de varios factores, dentro de los que se destacan: el ambiente (temperatura, humedad, y luz); la planta (hábito de crecimiento y cultivar, etapa fenológica y apertura de los estomas, nutrición y manejo después de la inoculación) y el patógeno (concentración, edad del inóculo y variación genética). La interacción múltiple de estos factores a gran escala (campo) o a menor escala (invernadero), condiciona la variación o pérdida de patogenicidad durante el manejo de la bacteria en el laboratorio (Cruz- Izquierdo *et al.*, 2001).

El uso de las técnicas de inoculación apropiadas, tanto en el campo como en la casa de cristal, es un aspecto a tener en cuenta por los programas de mejoramiento para la resistencia a Bacteriosis común en el cultivo. Varios autores han realizado estudios comparativos con distintos métodos de inoculación, sin llegar a determinar un método estándar que permita unificar y contrastar los resultados (Zapata *et al.*, 2001; Maggio y Casalderrey, 2002).

Aggour (1989b) y Asensio–Manzanera *et al.* (2003), compararon ambos métodos de inoculación, y concluyó que existían diferencias significativas entre los métodos, así como una interacción significativamente distinta entre los cultivares y métodos de inoculación.

Singh y Muñoz (1999), emplearon el método de inoculación por aspersión para la evaluación de sus poblaciones en condiciones de campo, lo cual les permitió, de forma rápida, descartar la mayor cantidad de cultivares susceptibles. Este, sin lugar a dudas, ha sido el método más empleado en el estudio de la resistencia a *Xap* por su eficiencia alta para evaluar el germoplasma de frijol. El método de aspersión a nivel de campo, se ha usado eficientemente, ya que funciona de manera similar a las infecciones naturales del patógeno (Montoya, 1997).

El uso del método de aspersión podría ser útil para evaluar familias derivadas de plantas resistentes (F1), y en generaciones siguientes en el campo, donde la inoculación por aspersión permite una selección de cultivares tolerantes y/o resistentes a aislamientos de *Xap*, con mayor eficiencia (Asensio– Manzanera *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha comprobado que el método de agujas múltiples se comporta como el método más consistente en cada uno de los ambientes de inoculación ensayados, lo que ha permitido discriminar mejor entre los cultivares susceptibles y resistentes (López, 2003a), sin embargo, no es justificable en condiciones de campo, ya que se requiere de un gran esfuerzo, personal y mayor tiempo.

Así mismo, el estadio vegetativo de la planta en el momento de la infección condiciona, en muchos casos, la severidad de los síntomas ocasionados por el patógeno, de manera que, en general, las plantas de frijol son más susceptibles a Bacteriosis común después de comenzar la etapa de floración, que durante la fase vegetativa (Asensio – Manzanera *et al.*, 2003). Por esta razón, los investigadores suelen inocular las plantas durante la floración y evalúan las reacciones tres o cuatro semanas después. Sin embargo, en los trópicos pueden ser más útiles las inoculaciones a las tres o cuatro semanas después de la siembra, particularmente si el germoplasma varía en su madurez, hábito de crecimiento y adaptación (CIAT, 1981a).

Estudios realizados por Asensio- Manzanera (2001), le permitieron verificar que existen reacciones diferentes a *Xap* en los distintos cultivares para hoja y vaina, tanto en cámara como en campo y, de igual forma, los cultivares reaccionan de forma diferente a la inoculación con *Xap*.

La edad de la planta en el momento de la inoculación, condiciona la severidad de los síntomas ocasionados, siendo esto importante cuando se realizan las inoculaciones con *Xap* en hojas de cultivares con resistencia intermedia, lo que nos obliga a extremar las precauciones en el momento de la evaluación y selección en condiciones de campo y controladas (López, 2003a).

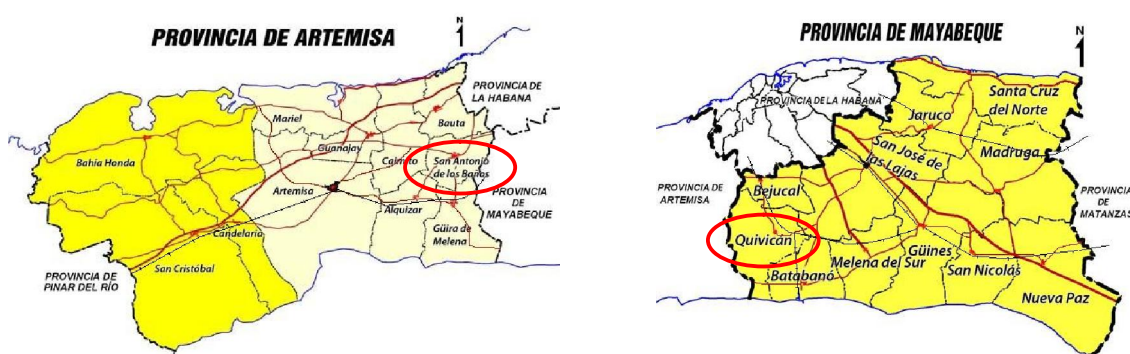
También la concentración del inóculo es uno de los factores importantes cuando se inoculan plantas con aislamientos de *Xap*, pero puede ocurrir que al inocular con bajas concentraciones de inóculos, las líneas susceptibles sean evaluadas como moderadamente resistentes y cuando se usan concentraciones muy elevadas, las líneas que son moderadamente resistentes sean evaluadas como líneas susceptibles (Lema *et al.*, 2007).

Cruz-Izquierdo *et al.* (2004) y Terán *et al.* (2009) han informado que el rango de concentración del inóculo debe ser entre  $3-6 \times 10^7$  ml<sup>-1</sup> CEL/ML (unidades formadoras de colonias) para que se produzcan reacciones que se correlacionen positivamente con las reacciones observadas en el campo. Otros estudios han demostrado que las densidades de inóculos de  $5 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup> CEL/ML han sido utilizadas con buenos resultados en estudios de diversidad genética en frijol común (Mkandawire *et al.*, 2004 y Mahuku *et al.*, 2006). Estas concentraciones deben ser similares a las densidades de poblaciones de bacterias asociadas a las enfermedades en el campo.

### CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- **Localización de las muestras con síntomas de Bacteriosis común.**

Las colectas de las muestras se realizaron en el mes de marzo de 1994, en áreas de campo de la Estación Experimental “El Tomeguín”, en el municipios de San Antonio de los Baños, y en las áreas de campo del Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova” (IIHLD) en Quivicán, Estos municipios se encuentran ubicados en la región occidental de Cuba, en las actuales provincias Artemisa y Mayabeque.



Las provincias mencionadas, limitan al norte con la provincia La Habana y el Estrecho de la Florida; al sur, con el Golfo de Batabanó y la Ensenada de la Broa; por el este con la provincia Matanzas y al oeste con la provincia Pinar del Río. Mayabeque y Artemisa se encuentran ubicadas entre los 22<sup>0</sup>58', 23<sup>0</sup>10' de latitud y los 82<sup>0</sup>30, 82<sup>0</sup>06 de longitud oeste.

- **Cultivares utilizados en el muestreo de síntomas de Bacteriosis común.**

Las colectas de hojas con síntomas similares a los producidos por la Bacteriosis común se realizaron en los cultivares comerciales de frijol común: ‘CC 25-9 (N)’; ‘Velasco Largo’, ‘Red Kloud’, ‘M – 112’ y ‘CC 25-9’, con granos de color rojo; así como ‘Bonita 11’ con grano de color blanco.

### **3.1. Caracterización de los aislamientos**

En el momento de realizar el muestreo, las plantas se encontraban en la etapa reproductiva correspondiente a la fase inicio del llenado del grano ( $R_8$ ) (Anexo 1), en la cual se observan los niveles más altos de afectaciones producidas por este patógeno. Los cultivares muestreados se encontraban sembrados a cielo abierto.

La fase inicial consistió en tomar muestras, en los cultivares comerciales, de los tejidos de las hojas de frijol (trifolios ubicados en la parte media de la planta), preferiblemente de las zonas recién infestadas, con manchas acuosas agrandadas con apariencia flácidas, rodeados por una zona estrecha de tejido amarillo limón. Las muestras se recolectaron al azar en el campo y se colocaron bien extendidas en papel secante para evitar la pudrición por exceso de humedad.

#### **3.1.1. Aislamiento e identificación de las bacterias**

A partir de las muestras tomadas del follaje con síntomas, se aislaron y caracterizaron culturalmente los aislamientos de *Xap* de origen cubano, en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en la ciudad de Palmira, Colombia, en el año 1994. Se siguió la Metodología establecida por CIAT (1981a).

Se incorporaron al estudio dos aislamientos procedentes del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (INIFAT), los cuales se nombraron como: 532 y 533.

Las muestras de las hojas con síntomas típicos de la Bacteriosis común, fueron lavadas con agua corriente, y luego, con unas tijeras previamente esterilizadas, se separó una pequeña porción del tejido enfermo, preferiblemente del borde de la lesión, estas fueron desinfectados al sumergirlos en hipoclorito de sodio al 0,5 por ciento durante 1 a 3 minutos. Posterior a esto se lavaron las porciones de tejido con agua destilada estéril.



Se colocaron los trozos de tejidos desinfectados en un mortero pequeño esterilizado, con algunas gotas de agua destilada estéril y se trituraron. Una pequeña porción del tejido macerado se estrió por agotamiento, con la ayuda de un asa, en medio de cultivo agar nutriente o extracto de levadura, carbonato de calcio, dextrosa y agar bacteriológico (por sus siglas en inglés YCDA) (Anexo 4), para obtener colonias de la bacteria. Las bacterias sembradas en el medio de cultivo (5 placas Petris, por muestra) se colocaron en una incubadora a 27<sup>0</sup> C de temperatura por tres días (CIAT, 1981a).

A los tres días de crecidas las colonias del patógeno, se procedió a discriminar las cepas, para ello se utilizó el medio de cultivo semi-selectivo MXP para *Xap* y *Xapf* compuesto por: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,8 gramos), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,6 g), extracto de levadura (0,7 g), KBr (10 g), glucosa (1g), agar (15 g) y extracto de papa (8 g) (Clafin *et al.*, 1987) (Anexo 4). Se realizó la siembra de los aislamientos en 36 placas con el medio descrito anteriormente y entre 6 y 12 días se procedió a observar la presencia o no del crecimiento e identificación de las bacterias del género *Xanthomonas*, lo cual está determinado por la presencia de un halo de color blanco alrededor de las colonias (Clafin *et al.*, 1987 y Mehta *et al.*, 2005).

### **3.1.2. Prueba de patogenicidad para los aislamientos de *Xap***

Las pruebas de patogenicidad se desarrollaron en las casas de cultivo del Laboratorio de Patología del CIAT, Palmira, Colombia. Se emplearon plantas sanas de los cultivares BAT 41, como genotipo susceptible y 'XAN 112', como resistente. Se sembraron para cada genotipo estudiado un total de 24 macetas con tres plantas cada una. Las macetas utilizadas fueron de 2 kg de capacidad, estas se llenaron con arena esterilizada al vapor por 15 minutos. Durante la conducción del experimento se suministró a las plantas el riego localizado tres veces al día

(mañana, medio día y tarde) hasta lograr más de un 85% de humedad y se realizó el control de las plagas con trampas adhesivas amarillas ubicadas en diferentes lugares del invernadero.

El inóculo se preparó a partir de cada aislamiento puro, descrito en el epígrafe 3.1.2 (Aislamiento de las bacterias). Estos crecieron por 48 horas sobre el medio YCDA, y luego se lavaron con agua destilada estéril. La suspensión obtenida se diluyó con agua destilada hasta lograr una concentración bacteriana de  $5 \times 10^7$  UFC, esta concentración se midió a 650 nm de densidad óptica, a partir de una suspensión patrón, en un espectrofotómetro Milton Roy (*Spectronic 20*) (CIAT, 1981a; Saettler, 1994; Cruz – Izquierdo *et al.*, 2001) (Anexo 4 y 5).

La inoculación se realizó siguiendo el método de corte de la lámina foliar con cuchillas previamente sumergidas en el inóculo (CIAT, 1981a). Tanto en campo como en invernadero la inoculación se realizó en la etapa fenológica de desarrollo del cultivo V<sub>4</sub> (tercera hoja trifoliada expandida) (Anexo 1)

Después de inoculadas las plantas, estas se colocaron en cámara húmeda durante 48 horas a temperatura media diaria de 25 a 31 °C. Este intervalo de temperatura se considera favorable para el desarrollo del patógeno. La humedad relativa se mantuvo superior al 85 % y durante la noche se utilizaron humidificadores eléctricos. El nivel de humedad en el ambiente se monitoreó con un psicrómetro tipo *Assman*. Estas condiciones ambientales se mantuvieron desde el momento de la inoculación hasta la muerte o madurez fisiológica del órgano evaluado.

Las evaluaciones de reacción en follaje y vainas se realizaron según lo establecido por CIAT (1981b) Estas fueron hechas a los 10 y 14 días después de la inoculación (DDI), teniendo en cuenta el efecto de la misma sobre el follaje según la escala general para evaluar la reacción del frijol a patógenos bacterianos y fungosos, donde 1= tejido sano y 9= tejido muerto. En esta

escala las plantas con calificación de 1 a 3 se consideran resistentes, de 4 a 6 intermedias, y de 7 a 9 susceptibles (Anexo 6).

### **3.1.3 Reaislamiento y recuperación del patógeno**

Se procedió al reaislamiento y recuperación de las bacterias de los tejidos afectados por la inoculación de los aislamientos de la prueba anterior. Estos fueron sembrados nuevamente en los medios de cultivo YCDA (CIAT, 1981a) y MXP (Clafin *et al.*, 1987) posterior a esto, se realizó una caracterización macroscópica de los cultivos obtenidos, entre las 36 y 48 horas después de realizada la siembra, estos resultados fueron comparados con los observados en las colonias aisladas inicialmente. De esta forma se dio cumplimiento a los cuatro postulados enunciados por Koch para microorganismos patógenos, según CIAT (1981a).

*Toda la metodología descrita, referente a la siembra del ensayo, atenciones culturales, control de plagas, preparación de inóculo e inoculación, se realizaron de la misma forma para los ensayos experimentales en condiciones controladas.*

### **3.1.4 Evaluación de la variabilidad molecular presente en los aislamientos cubanos.**

El análisis molecular se realizó en el laboratorio de Patología del Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en el año 2000. El análisis permitió estudiar la diversidad genética de estos aislamientos, distinguir las bacterias *Xap* de *Xapf*, e identificar si estos aislamientos pertenecían a las *Xanthomonas* patogénicas del cultivo del frijol.

- **Reaislamiento de las bacterias**

Se reactivaron los 12 aislamientos descritos en el capítulo anterior, que se encontraban en la colección de aislamientos del Laboratorio de Patología del CIAT, desde el año 1994. Para esto se siguió la metodología descrita en el epígrafe 3.1.3 *Reaislamiento y recuperación del*

*patógeno*. Se dejaron en crecimiento las colonias de bacterias, solo por 24 horas, debido a que su alta producción de polisacáridos dificulta la extracción de ADN.

- **Extracción de ADN bacterial de los aislamientos cubanos**

Para la extracción del ADN de los aislamientos bacterianos se siguió el protocolo experimental propuesto por CIAT (1995).

- 1- El crecimiento bacterial de los aislamientos estudiados se mezcló con 125  $\mu$ l con 1ml de NaCl.
- 2- Se centrifugaron a 5 000 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos.
- 3- Se separó el líquido del pellet, a este se le adicionó 1ml de agua destilada estéril, se centrifugó nuevamente a 5.000 (RPM) por 10 minutos y se eliminó nuevamente el líquido.
- 4- Se repitió el paso 1 y 3, dos veces para remover la mayor cantidad de polisacáridos. Seguido, se resuspendió el pellet en 500  $\mu$ l de Buffer de extracción (Anexo 5a.) caliente con proteinasa K (10  $\mu$ g/ml) y se incubaron en baño María (55 - 65°C) por una hora. Posteriormente, se les agregó a cada tubo 1/2 volumen de 7.5 M acetato de amonio (300  $\mu$ l), se mezcló con la mano y se colocaron los tubos a temperatura ambiente, por 10 minutos.

Se centrifugaron por 15 minutos a 12 000 RPM para separar las fases. El sobrenadante, se transfirió a un tubo limpio y se le agregó un volumen igual de isopropanol (500  $\mu$ l), se mezcló bien y se invirtieron los tubos, estos se incubaron a - 20° C por un mínimo de dos horas o toda la noche.

Una vez que se observaron las cadenas de ADN, se pasaron a tubos de micro centrifuga limpios utilizando una pipeta *Pasteur*, se les realizó un lavado con 70% etanol frío (800  $\mu$ ) y se

centrifugaron por 10 minutos a 10 000 RPM, eliminándose el sobrenadante. El pellet de ADN, se secó invirtiendo los tubos y dejándolos a temperatura ambiente, por 10 minutos.

- **Amplificación de las secuencias de *Xap* y *Xapf* por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Los protocolos de amplificación del ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, según sus siglas en inglés) se realizaron según lo descrito por Louws *et al.* (1994 y 1997).

En 12.5 µl de mezcla de reacción, se agregaron 5 nano gramos (ng) de ADN de cada aislamiento, y 20 ng de Taq Polimerasa (Promega), Los cebadores utilizados fueron ERIC y BOX, estos fueron sintetizados por la Tecnologías de ADN Integradas Inc. (*IDT, Coraville, IA, EE.UU.*) y son específicos para identificar *Xanthomonas axonopodis*.

**Tabla 1:** Cebadores utilizados en la caracterización molecular de los aislamientos cubanos de *Xap*.

Cebadores	Secuencia	Referencia
BOX A1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	Versalovic <i>et al.</i> 1994
ERIC 1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	Versalovic <i>et al.</i> 1991
ERIC 2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	Versalovic <i>et al.</i> 1991

Los PCR fueron realizados por un termociclador (*Research PTC*) programado para 100 ciclos termales, usando el programa recomendado por Vera - Cruz *et al.* (1996). Para la corrida de las secuencias de los aislamientos, se utilizaron entre 6.49 y 10 µl de ADN amplificados (según la concentración de ADN obtenida para cada aislamiento) diluidos en 100 µl de agua (bidestilada, estéril y filtrada).

La separación de las secuencias de ADN se realizó en base a su tamaño y carga eléctrica. Se procedió a la separación del ADN en un gel de agarosa a una concentración de 1,5 % (gel de agarosa en 0,75X Tris- acetato- EDTA buffer, 40 mm Tris-HCL y 1mm EDTA, ajustado a pH

7,6, con ácido acético glacial). Mediante electroforesis horizontal (*EC Maxicell* EC 360M, 44 orificios) con una fuente de poder (*Hofer Scientific Instrumentes*, PS 250/2.5 AMP) de 45 voltios. Para la visualización, se diluyeron 2 µl de bromuro de etidio (10 mg/µl) en agua, por gel. Para determinar la longitud de los fragmentos observados, se colocó en el primer pozo de corrida, un marcador de 100 pares de bases. No se presenta en los resultados las fotos de las corridas de electroforesis.

- **Análisis de los datos obtenidos.**

Las secuencias generadas de cada uno de los aislamientos, se evaluaron de forma binaria, considerando el valor 0 como ausencia y 1 como presencia. A partir de la matriz de datos originales, se calculó la similitud genética (*Genetic Similarity*, GS<sub>ij</sub>) entre cada una de los aislamientos, utilizando el paquete estadístico Ntsys-pc 2.02i (Rohlf, 1992). Los agrupamientos se efectuaron con el algoritmo SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested*), utilizando los índices de similitud de Dice, Simple Matching y Jaccard.

El método de agrupamiento empleado fue el de la Media Aritmética No Ponderada (*UPGMA-Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average*). Las matrices de valor cofenético se obtuvieron mediante el algoritmo COPH del paquete estadístico Ntsys-pc y fueron comparadas con la matriz original que se utilizó en los agrupamientos, de acuerdo a la prueba de correspondencia de Mantel y empleando el algoritmo de comparación Mxcomp, lo que permitió seleccionar el índice de similitud más apropiado a utilizar, atendiendo al valor de la correlación.

### **3.2. Respuesta a Bacteriosis común, en los cultivares y líneas estudiados en condiciones de campo. Afectación de los rendimientos por efecto de la inoculación.**

A partir del año 1996 y durante tres campañas consecutivas se realizaron los experimentos correspondientes a la evaluación de la reacción en follaje y vainas (sin inoculación y con

inoculación del aislamiento cubano 527 de *Xap*) de los cultivares comerciales, líneas del Programa de Mejora Nacional del frijol y cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común.

Posteriormente, se realizó la multiplicación de semilla sana y viable de estas líneas y cultivares, en el área de campo del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), ubicado en la provincia de Mayabeque, para garantizar una cantidad adecuada de semilla fresca de la colección de trabajo del INCA, así como, la semilla necesaria para el desarrollo de otros estudios y la evaluación de su comportamiento en diferentes regiones del país.

- **Ubicación del área experimental.**

Los trabajos se realizaron en las áreas experimentales del Departamento de Genética y Semilla, del Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”, en el municipio de Quivicán, localizado en la llanura sur de la provincia Artemisa, en un suelo Ferralítico Rojo compactado (Anexo 11).

- **Material genético evaluado.**

Se evaluaron un total de 48 cultivares, distribuidos en tres grupos: 17 cultivares comerciales (Tabla 2); 16 líneas de frijol desarrolladas por el Programa de Mejora Nacional del Instituto de Investigaciones d Granos” (Tabla 3) y 15 cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común, procedentes del Vivero Regional de Fuentes de Resistencia (VIFURE), constituido por los cultivares promisorios de los Programas de Mejora que formaban parte del Programa Regional del Frijol, para Centro América, México y el Caribe, PROFRIJOL (Tabla 4).

**Tabla 2:** Cultivares comerciales de Cuba, empleadas en el estudio.

<b>Cultivares</b>	<b>Color de la semilla</b>	<b>Progenitores</b>	<b>Lugar de procedencia</b>
'CC 25-9'	Negro	Selección Ticos de Costa Rica	INIFAT
'Bolita 42'	Negro	Selección de Holguín 3	IIG
'ICA Pijao'	Negro	Porrillo Sintético x México 11	IIG
'Güira 89'	Negro	Selección Jamapa	INIFAT
'BAT 304'	Negro	Porrillo Sintético x Compuesto Chimaltenango	IIG
'Tazumal'	Negro	(Sal 22 G4 x 11183N) x (ICA Pijao x Turrialba 1)	IIG
'Holguín 518'	Negro	Negro Jamapa x Turrialba 4	IIG
'BAT 832'	Negro	Jutiapa 72 x Blanco 137	IIG
'CC 25-9'	Rojo	Selección de CC 25-9	INIFAT
'Hatuey 24'	Rojo	(Jamapa x Porrillo 70) x Jamapa x Prs 70)	IIG
'Velasco Largo'	Rojo	-----	INIFAT
'M – 112'	Rojo	Selección de Mulangri	IIG
'Red Kloud'	Rojo	Red Kote x Charlotee	IIG
'Guamá 23'	Rojo	(Diacol Calima x Red Kloud) x Red Kloud	IIG
' <b>Bonita 11</b> '	Blanco	-----	IIG
'Chévere'	Blanco	(Jin 108 x Ica Bunsi)x(Veranic x Jutiapa 72)	IIG
'Engañador'	Crema	(Veranic 2 x G 1320) x (Jamapa x Tara)	IIG

IIG: Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". INIFAT: Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt.

En los anexos 10, 11 y 12 se presentan algunas características de importancia de los cultivares comerciales, líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional y de los cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común estudiados.

En el análisis se emplearon como testigos los cultivares comerciales: 'Engañador', 'Velasco Largo', 'ICA Pijao' y el cultivar regional 'XAN 112' (por su resistente a *Xap*)



**Tabla 3:** Líneas avanzadas del Programa de Mejoramiento Nacional, de semilla de color rojo.

Líneas	Progenitores	Procedencia
<b>Avanzadas</b>		
CUT 39	G 4495 x XAN 112	IIG
CUT 41	BAT 58 x 332 – 8	IIG
CUT 42	BAT 58 x 382 – 6	<b>IIG</b>
CUT 43	BAT 58 x 324 – 20	IIG
CUT 44	BAT 58 x 553 – 7	IIG
CUT 45	XAN 112 x NXDO 10855-3 (P 11)	IIG
CUT 46	XAN 87 x G 4525	IIG
CUT 47	DOR 44 x XAN 112	IIG
CUT 48	XAN 112 x DOR 60	IIG
CUT 49	G 4495 x XAN 117	IIG
CUT 53	DOR 41 x XAN 112	IIG
CUT 55	XAN 112 x DOR 60	IIG
CUT 56	XAN 112 x DOR 60	IIG
CUT 57	DOR 41 x XAN 87	IIG
CUT 58	XAN 87 x DOR 15	IIG
CUT 59	XAN 57 x DOR 15	IIG

IIG: Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”

**Tabla 4:** Cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común estudiados.

Cultivares	Color de la semilla	Códigos y Progenitores	Procedencia
‘AFR 362’	Rosado Moteado	(KABANIMA x G 24216) x ( S 94952 x XAN 112)	Nueva Granada <sup>2</sup>
‘AFR 603’	Rojo Moteado	(G 24219 x XAN 43) x ( FAVETA x XAN 43)	Nueva Granada <sup>2</sup>
‘NY 793755-2’	Negro	G 17340	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘NY 793939-1’	Crema Pinto	-----	Durango <sup>1</sup>
‘CORNELL 10392 BULK’	Rosado	G 18425	Nueva Granada <sup>2</sup>
‘L 81-61 (JUTIAPA)’	Negro	G 18484	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘PI 325751’	Rojo Moteado	-----	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘RXAH 18274-C’	Rojo Brillante	SEL 986 x XAN 263	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘XAN 91’	Gris	BAT 445 x TAMAULIPAS 9-B	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘XAN 155’	Rojo	(BAT 93 x BAT 93)	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘XAN 159’	Gris	<i>P. vulgaris</i> x <i>P. accutifolius</i> (PI319443)	Nueva Granada <sup>2</sup>
‘XAN 273’	Negro	G 6097 x XAN 236	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘XAN 280’	Negro	(XAN 236 x XAN 196) x (BAT 1432 x (RIO NEGRO x(RIO NEGRO x BAT 496)))	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘XAN 286’	Rojo	SEL 931 x DOR 308	Mesoamérica <sup>1</sup>
‘XR 16633’	Negro	XAN 91 x SEL 945	Mesoamérica <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo genético Mesoamericano: Mesoamérica, Jalisco y Durango. <sup>2</sup>Grupo genético Andino: Nueva Granada, Perú y Chile.

### **3.2.1. Cultivares comerciales frente incidencia natural de la Bacteriosis común**

Se sembraron 17 cultivares (Tabla 2) en parcelas de 2 surcos de 4 m de largo por 0,70 m de ancho para cada cultivar, a una distancia de siembra de 5 cm entre plantas. El riego y la fertilización, las atenciones culturales y el control de plagas se realizaron siguiendo lo establecido para el cultivo del frijol (Alfonso *et al.*, 1996).

No se realizó ningún control químico de enfermedades previendo un efecto no favorable sobre la manifestación de los síntomas de la Bacteriosis común.

Se evaluó la severidad de la enfermedad sobre el follaje y las vainas así como el rendimiento. Las evaluaciones de reacción en el follaje, se realizaron utilizando la escala de nueve grados (descrita anteriormente para follaje). CIAT, (1981b) donde 1= sin síntomas visibles; 9 = síntomas de enfermedad muy severos (Anexos 8a y 8b).

La primera evaluación en el follaje se realizó a los 20 días después de la siembra (D.D.S), con un intervalo de 7 días entre una y otra. Se realizaron en total seis evaluaciones de forma consecutiva. Los datos de la reacción en follaje frente a Bacteriosis común, correspondieron al valor tomado en la última evaluación realizada (65 DDS) debido a que este valor fue la máxima reacción expresada por cada cultivar frente a este patógeno. En este mismo momento se realizó la única evaluación para la reacción de las vainas.

*Toda la metodología descrita, referente a la evaluación de síntomas en follaje y vainas, preparación de inóculo e inoculación, se realizó de la misma forma, para el resto de los ensayos experimentales a cielo abierto que se verán a continuación.*

### **3.2.2. Cultivares comerciales frente al aislamiento Xap 527 de Cuba**

Las evaluaciones de severidad de la enfermedad en follaje y vainas se realizaron según se describe en el epígrafe anterior *Cultivares comerciales frente a la incidencia natural de la*

*Bacteriosis común.* La escala empleada fue la descrita en el epígrafe 3.1.2. *Prueba de patogenicidad para los aislamientos de Xap.*

*Esto es válido para todos los ensayos realizados a cielo abierto que serán vistos a continuación.*

De manera simultánea, se sembró un ensayo con los mismos cultivares comerciales, ya mencionados (Tabla 2). El ensayo se conformó siguiendo el diseño estadístico de bloques al azar con tres repeticiones, donde la parcela experimental consistió en dos surcos de cuatro metros de largo por cultivar.

Se utilizaron como controles los cultivares ‘XAN 112’ y ‘Engañador’ y como susceptible el cultivar ‘Velasco Largo’. Los materiales se establecieron de la siguiente manera: un control resistente y uno susceptible, seguido de cinco cultivares a estudiar, posteriormente, se situaron 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.

*De esta misma forma, se distribuyeron los ensayos de los restantes experimentos de campo que se verán a continuación*

### **3.2.3. Líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional frente al aislamiento *Xap* 527 de Cuba.**

Las líneas del Programa de Mejora Nacional se evaluaron en dos campañas consecutivas (Tabla 3). En el segundo año de estudio, se seleccionaron las mejores líneas por su comportamiento frente a la inoculación del patógeno de la Bacteriosis común y los valores de rendimiento, y se incorporaron al grupo de cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común, para una evaluación conjunta.

### 3.2.4 Cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común frente al aislamiento *Xap* 527 de Cuba.

Los cultivares con genes de resistencia a este patógeno (Tabla 4) se sembraron durante tres campañas consecutivas. En este estudio se incluyeron las mejores líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional. Se emplearon como controles susceptibles y resistentes los cultivares ‘Engañador’, ‘XAN 112’, ‘Velasco Largo’ e ‘ICA Pijao’.

- **Inoculación del aislamiento *Xap* 527 de Cuba en los ensayos a cielo abierto**

El inóculo se preparó a partir del aislamiento puro 527 de *Xap*, siguiendo lo descrito en el epígrafe 3.1.2 *Prueba de patogenicidad para los aislamientos de Xap*. No se empleó el aislamiento *Xap* 530 por no lograr un crecimiento bacteriano en cantidades suficientes, para la elaboración del inóculo.

Para el incremento del inóculo se sembró el aislamiento puro sobre un medio YCDA en 10 placas Petri, se dejaron crecer por 48 horas y se lavaron con agua destilada estéril. La suspensión obtenida se diluyó en 12 l de agua destilada (cantidad necesaria para una motomochila de espalda, de boquilla cónica, con motor), hasta lograr una concentración bacteriana de  $5 \times 10^7$  cel/ml, esta concentración se midió a 650 nm de densidad óptica, en un espectrofotómetro Milton Roy (*Spectronic 20*) (CIAT, 1981a; Saettler, 1994; Cruz – Izquierdo *et al.*, 2001) (Anexo 4a y 5).

La inoculación en condiciones de campo, se realizó, en cada uno de los ensayos, por el método de aspersión a presión con motomochila de espalda con motor, para asegurar una infección uniforme de las plantas, en las parcelas experimentales. La primera inoculación se efectuó a los 20 días DDS; las siguientes se efectuaron a los 27, 34, siendo la última a posterior a los 40 DDS, momento en el que los testigos susceptibles (‘Velasco Largo’ e ‘ICA Pijao’) deberán

presentar síntomas severos de la enfermedad. Las inoculaciones, en los ensayos, se realizaron después de las 4:00 pm para evitar que la radiación solar afectara la viabilidad de la bacteria inoculada.

**Datos tomados en los ensayos a cielo abierto y en condiciones controladas.**

- ***Reacción de los síntomas de la enfermedad en follaje y vainas***

La clasificación de las líneas y cultivares se realizó según la reacción en el follaje, teniendo en cuenta el valor de la media de la última evaluación realizada por réplica, por cultivar. En la evaluación de la reacción en vainas, se tomó el valor sólo una vez, en la etapa de formación y llenado del grano ( $R_8$ ), se realizó una evaluación en cada cultivar o línea, en cada una de las réplicas. Para ambas clasificaciones se empleó la escala general para evaluar la reacción del frijol a patógenos bacterianos y fungos (CIAT 1981b).

- ***Rendimiento de granos, por parcela.***

Una vez cosechado el experimento, se tomó el rendimiento en gramos de cada genotipo por parcela y se convirtieron a kg/ ha.

- ***Índice depresivo del rendimiento, por efecto de la inoculación***

Con los valores del rendimiento obtenidos por los cultivares comerciales inoculados y no inoculados con el aislamiento cubano *Xap 527*, se estimó el índice depresivo del rendimiento siguiendo la fórmula:

$$\text{Índice Depresivo} = \frac{\text{Rend. Var. No Inoculada} - \text{Rend. Var. Inoculada}}{\text{Rend. Var. No Inoculada}}$$

- ***Análisis estadísticos.***

Se determinaron los parámetros estadísticos Media (X), Desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) de los tres grupos de cultivares evaluados (cultivares comerciales, líneas

avanzadas y cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común) para el carácter rendimiento. Al cual se le realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, con tres réplicas por año.

Las pruebas de comparación de medias de Duncan, se realizaron para determinar el efecto del genotipo y las diferencias estadísticas entre cultivares para la variable rendimiento. Todos los análisis estadísticos se desarrollaron mediante el método estadístico *Infostat/Profesional*. Versión 2011, sobre *Windows*, según Balzani *et al.* (2008) y Di Rienzo *et al.* (2011).

El coeficiente de correlación de Pearson se estimó para los caracteres cuantitativos antes mencionados, con la finalidad de cuantificar el grado de asociación existente entre las variables cuantitativas reacción en el follaje y en las vainas y el rendimiento, de cada genotipo estudiado por año.

Con el promedio de los tres años, de cada uno de los caracteres evaluados, se realizó un análisis de la estabilidad de cada línea o cultivar. Se empleó para ello el Modelo de Efectos Principales Aditivos e Interacción Multiplicativo (AMMI) (Gauch, 1988).

Se estimaron las coordenadas genotípicas relacionadas con el rendimiento medio, reacciones del follaje y vainas, y ambientes (años) y se construyó un gráfico bidimensional para las líneas avanzadas y tridimensional para los cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común, mediante un modelo biplot (Varela *et al.*, 2005, 2007 y Castillo, 2010).

### **3.3 Respuesta a Bacteriosis común, en los cultivares y líneas de Cuba, Colombia y Honduras frente al aislamiento EAP 9506, en condiciones controladas**

- **Ubicación del área experimental.**

En los meses de octubre-noviembre del año 2007, el experimento se desarrolló en la casa de cultivo del área experimental del Programa de Investigación de Frijol (en lo adelante, PIF) de la

Escuela Agrícola Panamericana/Zamorano, Honduras. Los análisis para la identificación de los QTLs correspondientes a los marcadores SCAR SAP 6 y SU91 fueron desarrollados en el laboratorio de biotecnología de este mismo grupo de investigación.

- **Respuesta a Bacteriosis común, en las líneas y cultivares estudiados en condiciones controladas.**

#### **Material genético evaluado.**

En este estudio se incorporaron los cultivares comerciales y los cultivares con genes de resistencia procedentes de Cuba, con la finalidad de evaluar el comportamiento de los mismos frente al aislamiento EAP 9506 de Honduras. En las tablas 4 y 5, se presentan las líneas y cultivares del PIF de Zamorano, evaluadas en este estudio por el valor genético que posee, en ellas se combinan resistencias a múltiples enfermedades como Bacteriosis común, Mustia hilachosa, Virus del mosaico dorado amarillo del frijol, Roya y altos rendimientos, todos de gran interés para Cuba.

#### **3.3.1 Cultivares comerciales, líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional y cultivares con genes de resistencia a Bacteriosis común, procedentes de Cuba**

*Experimento 1:* Se evaluaron 37 cultivares de frijol procedentes de Cuba, incluyendo 17 cultivares comerciales (Tabla 2); 3 Líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional (CUT 45, CUT 49 y CUT 53), 15 cultivares con resistencia a Bacteriosis común (Tabla 4); como testigos resistente fueron utilizadas los cultivares ‘XAN 112’ y ‘Engañador’.

#### **3.3.2 Líneas de frijol del Programa de Investigación de frijol (PIF), de Honduras y del CIAT de Colombia**

*Experimento 2:* Se evaluaron seis líneas mejoradas del vivero de padres donantes de genes de resistencia (VIPADOGEN), procedentes de Centro Internacional de Agricultura Tropical

(CIAT), Colombia y 16 líneas avanzadas de la cruce: Tío Canela 75/VAX6, del vivero de genes del PIF de Zamorano, Honduras (Tablas 5 y 6), se utilizaron como testigos los cultivares Catrachita y Tío Canela, susceptible y resistente a Bacteriosis común, según Zabala (2003).

*Las siembras de los ensayos y las atenciones culturales en condiciones controladas se realizaron según lo descrito en el epígrafe 3.1.2. Prueba de patogenicidad para los aislamientos de Xap.*

**Tabla 5:** Líneas del vivero de padres donantes de genes de resistencia del CIAT, Colombia.

Cultivares	Color de la semilla
VAX 1	Rojo
VAX 2	Gris
VAX 3	Marrón
VAX 4	Crema oscuro
VAX 5	Negro
VAX 6	Marrón

**Tabla 6:** Líneas avanzadas del Vivero de Genes del PIF de Honduras.

Líneas	Color de la semilla
X069-157-8-5-2-5	Café oscuro brillante
X069-153-9-4-3-2	Café oscuro Opaco
X069-153-9-4-3-3	Café oscuro Opaco
X069-153-9-4-3-5	Café oscuro brillante
X069-157- 12-5-1-4	Café oscuro brillante
X069-157-14-4-1-3	Café oscuro brillante
X069-157-14-4-3-1	Café oscuro brillante
X069-157-14-4-5-5	Café rojizo opaco
X0104-37-5-3-4	Morado opaco
X0104-38-2-1-1	Café oscuro brillante
X0104-45-3-5-5	Café rojizo brillante
X0104-45-5-1-4	Café rojizo opaco
X010452-5-5-3	Café rojizo brillante
X0104-52-5-5-5	Café rojizo brillante
X0104-52-5-5-6	Café oscuro brillante
X0104-52-5-6-2	Café oscuro brillante



- **Inoculación del aislamiento EAP 9506 de Honduras, en los ensayos en condiciones controladas**

Se utilizó el aislamiento EAP 9506 de Honduras, procedente de plantas de frijol colectadas en la localidad de Namasigue, Choluteca de Honduras. Este aislamiento se sembró y se incubó a 28° C por 48 horas en medio de cultivo YDC y se procedió a multiplicar la bacteria en el mismo medio sin agar, para la producción de inóculo líquido (Anexo 5). La inoculación de las plantas se realizó a los 14 días DDS, utilizando el método de punción múltiple (Pastor-Corrales *et al.*, 1996). La reacción en el follaje se evaluó a partir de los 34 DDS correspondiente a la etapa fenológica V4 (Anexo1).

*La preparación del inóculo, la estimación de su concentración, la validación de su patogenicidad y la evaluación de los síntomas en follaje se realizaron siguiendo la metodología descrita en el epígrafe 3.1.2. Prueba de patogenicidad para los aislamientos de Xap.*

### **3.4. Identificación de marcadores moleculares SCAR (SAP 6 y SU 91) ligados a genes de resistencia a Bacteriosis común**

Para la extracción de ADN se empleó la metodología descrita en los Protocolos para Marcadores SCAR de la Universidad de Wisconsin-Madison, adaptado por Aranda (2000) (Anexo 9a).

En la cuantificación y dilución del ADN se utilizó un fluorómetro (*Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant™200*), que permite expresar la cantidad de ADN, en gramos por microlitro (g/μl). Para la cuantificación del ADN se siguió el protocolo del laboratorio de Biotecnología de Zamorano (Anexo 9b), empleando el ADN bovino estándar (100 ng/l) y una solución amortiguadora de cuantificación (TE) para las muestras de tejido.

Se implementó el protocolo para la amplificación los marcadores SCAR SU91 y SAP6. (Pedraza *et al.*, 1997) (Tabla 7), que identifican QTLs de resistencia a aislamientos virulentos de *Xap*.

La amplificación, separación y visualización de las bandas generadas por los marcadores SCAR SAP 6 y SU91 se realizaron siguiendo la metodología descrita por Zabala (2003) y Barrera (2001).

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador (PCR-100™, Programable Thermal Controller, Peltier- Effect Cycling) y su separación se realizó en electroforesis horizontal en geles de agarosa al 5% (EC Maxicell EC 360M, 44 orificios), empleando una fuente de amplificación y regulación de voltaje (Hoefler Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP) en condiciones de corrida constante de 140 v

- **Marcador SU91:** para identificar QTL de resistencia a *Xap*. Mediante perfil térmico se hizo la amplificación para el marcador SU91 iniciando con 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 segundos; acoplamiento a 58°C por 40 minutos y elongación a 72°C por 2 minutos, finalizando con un ciclo de elongación a 72°C por 5 minutos. Las concentraciones usadas fueron: agua 7,1 ml, buffer (5X) 2 ml, dNTP'S (4 mM) 0,7 ml, Primer SU-91A 1 ml, Primer SU-91B 1 ml, Tag-Polimerasa 0,7 ml, ADN (30ng/ml) 2 ml, con un total de 15 ml.
- **Marcador SAP6:** para identificar QTL de resistencia a *Xap*. Utilizando el perfil térmico se hizo la amplificación para el marcador SAP6 iniciando con 34 ciclo de desnaturalización a 94°C por 10 segundos; acoplamiento a 55°C por 40 minutos y elongación a 72°C por 2 minutos, finalizando con un ciclo de elongación a 72°C por 5 minutos. Las concentraciones usadas fueron: agua 6 ml, buffer (5X) 2 ml, dNTP'S (4

mM) 1 ml, Primer SAP6-A 1,4 ml, Primer SAP6-B 1,4 ml, Tag-Polimerasa 0,7 ml, ADN (30ng/ml) 2,5 ml, con un total de 15 ml.

**Tabla 7:** Marcadores de ADN (SCAR) ligados a genes de resistencia a Bacteriosis común en frijol.

SCAR	Marcador de origen	Patógeno	Secuencia del SCAR	Pb*	Locus	GL**	Referencia
SAP6	AP6	<i>Xap</i>	F 5' - GTC ACG TCT CCT TAA TAG TA 3'	820	Mayor QTL	B10	Miklas <i>et al.</i> , 2000 b
SU91	U9	<i>Xap</i>	R 5' - GTC ACG TCT CAA TAG GCA AA 3' F 5'CCA CAT CGG TTAACA TGA GT 3'	700	(GN#1 sel 27) Mayor QTL	B8	Pedraza <i>et al.</i> , 1997
			R 5'CCA CAT CGG TGTC AA CGT GA 3'		(XAN 159)		

\* Pb: pares de bases; \*\*GL: Grupo de Ligamiento

La separación de las secuencias de ADN se realizó de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Se procedió a la separación de las moléculas de ADN a una concentración de 1% agarosa por 60 minutos en un tanque de electroforesis (EC *Maxicell* EC 360M, 44 orificios) usando una fuente de poder manteniendo el voltaje a 140.

Para la tinción de las secuencias y su visualización, se diluyeron 2 µl de bromuro de etidio (10 mg/µl) en agua, por gel. Para determinar la longitud de los fragmentos observados, se utilizó un marcador de ADN de masa molecular (MM) de 100 Pb, así como un testigo positivo (+), un control negativo (-) y las muestras (20) por cada gel. La expresión de las secuencias de ADN que fueron tomadas de los geles de agarosa se identificaron y registraron en fotografías y fueron visualizadas bajo la luz ultravioleta en un transiluminador (*Fotodyne*, Foto/UV® 26).

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de los aislamientos

#### 4.1.1 Aislamiento e identificación de las bacterias

En todos los cultivares muestreados se observaron los síntomas típicos de Bacteriosis común (Anexo 8). Consistieron en manchas necróticas de color amarillo o marrón, bordeadas por un halo amarillo limón; en muchos casos, se observó por el envés de las hojas puntos acuosos, con aspecto de exudado. Estos síntomas coinciden con los reportados por Araya y Hernández (2008) para esta enfermedad.

Los aislamientos obtenidos de las lesiones crecieron bien en el medio YDCA; la coloración de las colonias fue amarillo ámbar para todos los aislamientos obtenidos, durante las primeras 24 a 48 horas después de sembradas (Figura 1). Pasadas las 48 horas se observó que dos aislamientos comenzaban a producir un cambio de coloración en el medio de cultivo, tornando de color marrón la totalidad del mismo. El resto de los aislamientos mantuvo su coloración inicial, amarillo ámbar.

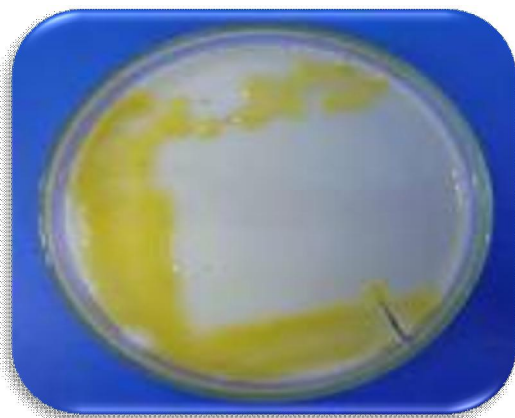


**Figura 1:** Crecimiento de bacterias en medio de cultivo YCDA. A) Crecimiento bacteriano a la 24 h días después de sembradas (D.D.S); B) Cambio de coloración en el medio de cultivo YDC a las 48 horas.

La característica de producir un pigmento melanoide color marrón, difusible en el medio de cultivo, en dos de los aislamientos, permitió confirmar la presencia de *Xanthomonas campestris* var. *fuscans* (*Xapf*) asociados a la Bacteriosis común del frijol en Cuba. La producción del pigmento es uno de los parámetros que facilita detectar la presencia de este patógeno. Resultados similares fueron obtenidos por Mahuku *et al.* (2006); Zapata (2001); Cruz-Izquierdo (2001) y Singh y Schwartz (2010), en estudios de caracterización de 412 aislamientos provenientes de diferentes regiones del mundo, donde diferenciaron a *Xapf* de *Xap*, por la habilidad del primero de producir pigmento difusible de color marrón en el medio YCDA.

Las características macroscópicas de los aislamientos fueron bien definidas: colonias circulares, convexas, con bordes enteros, coloración amarilla y viscosa. Estas características concuerdan con las establecidas en la literatura para bacterias del género *Xanthomonas*. Características similares fueron informadas por CIAT (1981a), Cruz-Izquierdo *et al.* (2001) y Carvalho *et al.* (2008).

En el medio semi selectivo (MXP) para *Xanthomonas axonopodis* y su variante *fuscans* (Figura 2), se observaron colonias bien definidas, bordeadas de un halo de color blanco, producido por la hidrólisis del almidón.



Las pruebas bioquímicas como el medio semi selectivo MXP, permitieron identificar los aislamientos por la coloración blanca presente alrededor de las colonia de las bacterias; cuando esto ocurre, se puede decir que se está en presencia de aislamientos del género *Xanthomonas*, especie *Xanthomonas axonopodis*, lo que las distingue de otras especies dentro del mismo género.

**Figura 2:** Crecimiento de bacterias en medio de cultivo MXP. Cambio de coloración en el medio de cultivo a las 48 horas.

Cruz –Izquierdo *et al.* (2001), Zapata y Graud (2001) y Carvalho *et al.* (2008) al realizar la caracterización de diferentes aislamientos patogénicos de *Xap*, emplearon el medio de cultivo MXP para identificar a las bacterias de este género. A pesar de que en este medio es posible identificar aislamientos de *Xanthomonas*, este no permite diferenciar los patogénicos de los no patogénicos, ni establecer diferencias entre los aislamientos de *Xap* y *Xapf*.

Se hace necesario utilizar otros procedimientos con este fin. Las pruebas de patogenicidad y la caracterización molecular se utilizan para identificar la variabilidad en los aislamientos de este género.

#### **4.1.2. Prueba de patogenicidad de los aislamientos de *Xap* y reisolamiento y recuperación del patógeno.**

En las pruebas de patogenicidad efectuadas a los 10 días después de la inoculación (D.D.I) (1<sup>ra</sup> evaluación) se observó que, en las plantas del cultivar ‘BAT 41’, se presentaron síntomas similares a los desarrollados por la enfermedad en el campo. Los síntomas observados en el follaje, tanto en el cultivar ‘BAT 41’, con reacción entre 4 y 9 (Figura 3), como en el cultivar ‘XAN 112’, con reacción entre 1.5 y 6 (Figura 4), concuerdan con los descritos por Cruz-Izquierdo (2001); Zapata y Graud (2001) y Araya y Hernández (2008) para Bacteriosis común del frijol.

Los aislamientos *Xap* 525, 526, 527, 530 y 535, indujeron en el cultivar susceptible ‘BAT 41’ síntomas en forma de manchas acuosas y flácidas, rodeadas por un área estrecha de tejido amarillo limón. Se observó, además, la formación de pequeñas áreas de tejido necrótico en algunas de las plantas evaluadas, las cuales son propias de una reacción de susceptibilidad alta. Las plantas de la cultivar ‘BAT 41’ tuvieron un valor 7 en la escala empleada, según la cual se evaluaron como susceptibles frente a los aislamientos 525, 526, 527, 530 y 535 de *Xap*.

Transcurridos 14 días después de la inoculación (2<sup>da</sup> evaluación) (Figura 3) en las plantas de este cultivar, se observaron síntomas muy avanzados de la enfermedad frente a todos los aislamientos, con reacción en el follaje, (8) clasificado según la escala como susceptibles.

De los aislamientos empleados (Figura 3), solo *Xap* 527, produjo defoliación total de las plantas en el cultivar ‘BAT 41’ (valor de 9). Los aislamientos de *Xap*: 531, 536, 534 y 533 de *Xapf*, indujeron valores de reacción de 7 grados, según la escala, en la misma evaluación. En estas condiciones, el aislamiento 532 de *Xapf*, fue el que mostró menor patogenicidad con un valor de reacción de grado 5. La alta susceptibilidad presente en ‘BAT 41’ frente a los aislamientos cubanos de *Xap*, nos permite afirmar que todos los aislamientos estudiados, exceptuando a *Xap* 532, son aislamientos patogénicos. Una vez más, se confirma la susceptibilidad de este genotipo frente a una diversidad de aislamientos de *Xap*, de Cuba.



**Figura 3:** Reacción del cultivar ‘BAT 41’ frente a los 12 aislamientos de *Xap* a partir de cultivares de frijol sembrados en Cuba. *Xap*: *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseoli*, *Xapf*: *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseoli* var. *fuscan*., \* 1ra Evaluación: 10 D.D.S, 2da Evaluación: 14 D.D.S; Grados de la escala: Según escala general para evaluar la reacción del Germoplasma de frijol a patógenos bacteriano (CIAT, 1981b) donde 1-2-3=resistente, 4-5-6= intermedio y 7-8-9= susceptible.

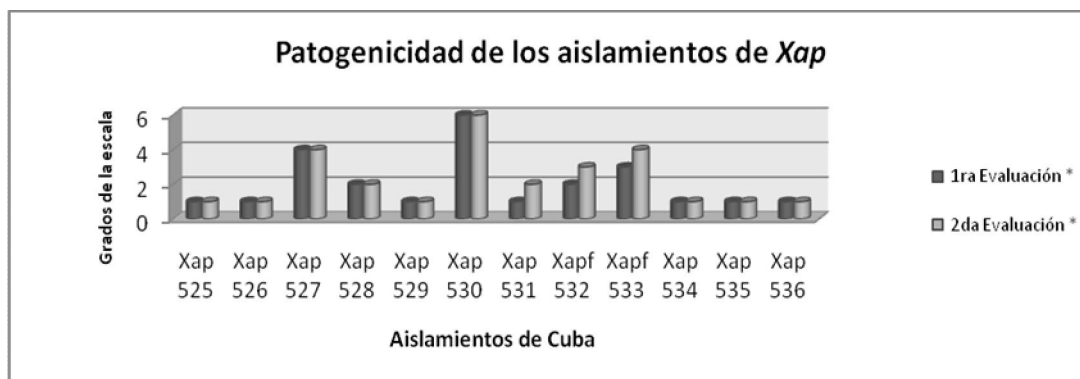
En las evaluaciones realizadas al cultivar ‘XAN 112’, a los 10 y 14 D.D.I (Figura 4), se observaron reacciones de severidad de la enfermedad con síntomas similares, pero en menor intensidad, frente a los aislamientos de *Xap* 527 y 530. Sin embargo, ambos aislamientos, se

destacan nuevamente por su patogenicidad, provocando reacción intermedia entre 4 y 6, en XAN 112. Similar resultado se obtuvo con el aislamiento 533 de *Xapf*, con reacción de 4 grados en la evaluación realizada a los 14 D.D.I.

Las evaluaciones realizadas a los 10 y 14 DDI no mostraron variación de la reacción frente a los aislamientos 525, 526, 528, 529, 534, 535 y 536 lo que demuestra que la enfermedad no se desarrolló más durante estos 4 días. Según los resultados estos aislamientos no se mostraron patogénicos frente al cultivar 'XAN 112'. Esto puede deberse a la presencia de genes de resistencia en el mismo, los cuales pueden frenar el desarrollo del patógeno en la planta. El cultivar 'XAN 112' es reconocido, a nivel regional, como un genotipo resistente frente a aislamientos de *Xap*; sin embargo, presentó reacción de susceptibilidad frente al aislamiento 530. Esto muestra que la resistencia de este cultivar no es igual para todos los aislamientos estudiados, además, nos confirma que la resistencia a Bacteriosis común en frijol no es completa y que está determinada por diferentes genes que pueden expresarse o no, como en este caso. Resultados similares fueron informados por Lema *et al.* (2007), López *et al.* (2003a) quienes obtuvieron reacciones de alta susceptibilidad (8.7–9) en el cultivar 'XAN 112' frente a aislamientos muy patogénicos de *Xap* de los EUA.

La presencia de síntomas de esta enfermedad en el cultivar 'BAT 41', a los 10 y 14 DDI, con grados de severidad entre intermedio y susceptible, permitió clasificar 10 de los 12 aislamientos estudiados como altamente patogénicos. La susceptibilidad del cultivar 'BAT 41' ha sido informada por Mahuku *et al.* (2006), quienes observaron síntomas severos de la enfermedad en el mismo, en estudios de patogenicidad de 412 aislamientos de *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseoli* y su variante *fusco*.





**Figura 4:** Reacción del cultivar XAN 112 frente a los 12 aislamientos de *Xap* a partir de cultivares de frijol sembrados en Cuba. *Xap*: *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseoli*, *Xapf*: *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseoli* var. *fuscan*., \* 1ra Evaluación: 10 D.D.S, 2da Evaluación:14 D.D.S; Grados de la escala: Según escala general para evaluar la reacción del Germoplasma de frijol a patógenos bacteriano (CIAT, 1981b) donde 1-2-3=resistente, 4-5-6= intermedio y 7-8-9= susceptible.

Así mismo, Zapata (1997), en estudios de identificación de razas fisiológicas en aislamientos de *Xap* e identificación de cultivares resistentes frente a aislamientos procedentes de Cuba, República Dominicana y Puerto Rico, clasificó dos aislamientos cubanos como altamente patogénicos frente a cinco cultivares de *P. vulgaris* de la región. La diversidad genética y patogénica entre los aislamientos de *Xap* y *Xapf* en el mundo ha sido informada por Tar'an *et al.* (2001); López *et al.* (2003; 2006) y Muthlu *et al.* (2008a),

Una vez colectadas las muestras de los síntomas en el cultivar 'BAT 41', para cada uno de los aislamientos identificados como patogénicos, y reaisladas las bacterias en condiciones de laboratorio, se confirmaron las características macroscópicas de cada uno de los aislamientos, se observó el crecimiento de las colonias de forma circular, con una elevación convexa, coloración amarillo ámbar y de consistencia mucosa. Se diferenciaron dos de ellas al producir un pigmento color marrón en el medio del cultivo.

Se corroboraron los Postulados de Koch para la identificación de patógenos informados por CIAT (1981a); Cruz- Izquierdo *et al.* (2001) y Carvalho *et al.* (2008), para bacterias del género *Xanthomonas*.

La incorporación de estos aislamientos caracterizados culturalmente, en los estudios de resistencia permitirá realizar una selección más confiable de líneas y cultivares con resistencia y/o tolerancia a Bacteriosis común por parte del Programa de mejora genética de Cuba, lo que contribuirá al perfeccionamiento de nuevas estrategias de mejoramiento y selección de líneas y cultivares para este carácter.

#### **4.1.3 Evaluación de la variabilidad molecular presente en los aislamientos cubanos.**

La técnica de rep-PCR (Versalovic *et al.*, 1994) con los cebadores ERIC y BOX, permitió analizar la diversidad genética existente en los 12 aislamientos. Las pruebas estadísticas normalizadas de Mantel mostraron que las matrices de similitud estaban altamente correlacionadas con  $r = 0.868$ , utilizando el índice de similitud de DICE;  $r = 0.920$  para Simple Matching y  $r = 0.900$  para Jaccard. En la figura 5, se muestra el agrupamiento realizado a los 12 aislamientos cubanos, a partir de la variabilidad o similitud genético molecular,  $r = 0.920$  para Simple Matching, detectado en cada uno de ellos.

En un primer grupo se encuentran por sus similitudes genéticas, los aislamientos de *Xap* 525, 526, 527 y 528, todos procedentes de las áreas de campo de la estación Experimental “El Tomeguín” ubicada en San Antonio de los Baños, provincia Artemisa. Tres de ellos indujeron síntomas severos de la enfermedad con reacciones de susceptibilidad de 8 (*Xap* 525, *Xap* 526) y de 9 (*Xap* 527), al ser inoculados en el cultivar ‘BAT 41’. Solo *Xap* 528 presentó patogenicidad media provocando una reacción de 6 (intermedia) en este mismo cultivar. Es importante destacar, como en este caso coincidieron en un mismo grupo aislamientos de una

misma localidad y una patogenicidad semejante en tres de ellos, lo que demuestra que existió similitud genética entre ellos.

Otro grupo, compuesto por los aislamientos *Xap* variante *fusco* 532, 533 procedentes del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (INIFAT) y 536 del Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”, presentaron similitudes genéticas a pesar de proceder de lugares diferentes, Sin embargo, mostraron diferencias en sus patogenicidades, *Xapf* 533 y *Xap* 536 indujeron reacción de susceptibilidad de 7 en el cultivar ‘BAT 41’, no ocurriendo lo mismo con *Xapf* 532 con una reacción de 5 en este cultivar susceptible. Esto demuestra como aislamientos de una misma localidad con similitudes genéticas moleculares pueden poseer diferencias en sus patogenicidades, y como aislamientos de diferentes localidades pueden presentar similitudes genéticas y patogenicidades iguales, en un mismo cultivar.

Mahuku *et al.* (2006), mediante el empleo de esta misma técnica, demostraron que *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseolii* *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseolivar fuscans* son organismos genéticamente diferentes, y que existe una amplia diversidad genética entre los aislamientos de *Xap* y *Xapf*. Sin embargo, también resaltaron la presencia de aislamientos similares de este patógeno en distintas áreas geográficas del mundo.

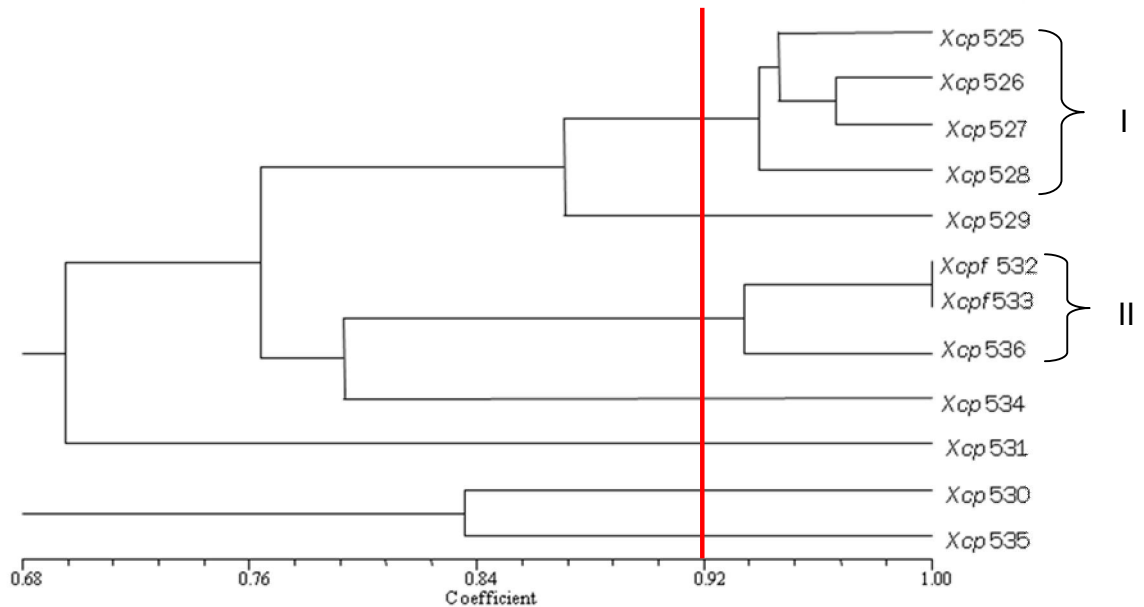
En un tercer grupo se encuentran aquellos aislamientos diferencias en sus características genéticas y moleculares, los cuales se identifican de forma independientes en la figura 5, ellos son *Xap* 529, *Xap* 534, *Xap* 531, *Xap* 530 y *Xap* 535, todos procedentes del Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova” y con alta patogenicidad y reacciones de susceptibilidad en el cultivar ‘BAT 41’ entre 7 y 8, exceptuando a *Xap* 529 con reacción intermedia de 5.

Los resultados presentados muestran como estudios de diversidad genética con métodos convencionales, como las pruebas de patogenicidad y bioquímicas, no siempre permiten distinguir las diferencias genéticas y moleculares existentes entre los aislamientos de *Xap* y *Xapf* y entre ellos, ya sean de una misma localidad o de localidades distantes. Por lo que se hace necesario incorporar en la caracterización de estos aislamientos, estudios genéticos moleculares que permitan conocer tanto la variabilidad, como las similitudes genéticas existentes entre los aislamientos de la Bacteriosis común.

La reacción por PCR de las secuencias repetitivas de DNA del genoma de cada uno de los aislamientos de *Xap* y *Xapf* con los cebadores ERIC y BOX y las pruebas estadísticas normalizadas de Mantel, puede ser una herramienta que permita complementar el estudio de identificación, caracterización de la diversidad genética molecular de los aislamientos de este patógeno. Carvalho *et al.* (2008) concluyeron que con las pruebas bioquímicas se podrían caracterizar aislamientos de *Xap* y *Xapf* y obtener una diferenciación genética con el uso de técnicas moleculares

Resultados similares fueron informados por Cubero y Graham (2002) y Maggio y Casalderrey (2002) al estudiar la diversidad genética de los patógenos que causan la Bacteriosis común del frijol, con los cebadores específicos ERIC y BOX donde lograron diferenciar las bacterias *Xap* de *Xapf* y los aislamientos de uno y de otro de una misma localidad.

Mahuku *et al.* (2006), mediante el empleo de esta misma técnica, demostraron que *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseoli* y su variante *fuscans* son organismos genéticamente diferentes y que existe una amplia diversidad genética entre aislamientos de *Xap* y *Xapf*. Destacaron, además, la presencia de aislamientos similares de este patógeno en distintas áreas geográficas del mundo.



IS

*S. Matchin r = 0.920*

**Figura 5:** Agrupamiento de los 12 aislamientos de *Xanthomonas* estudiados basado en las pruebas estadísticas normalizadas de Mantel.

Estos resultados permitieron caracterizar culturalmente y genético molecular los 12 aislamientos estudiados: 10 como *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye y 2 como *Xanthomonas axonopidis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye var *fuscans* y distinguir con los valores más altos de patogenicidad, en el cultivar susceptible ‘BAT 41, a los aislamientos *Xap* 527 y *Xap* 530.

#### **4.2 Respuesta a Bacteriosis común, en las líneas y cultivares estudiados en condiciones de campo. Afectación de los rendimientos por efecto de la inoculación.**

##### **4.2.1 Cultivares comerciales frente a la incidencia natural e inoculación del aislamiento 527 de *Xap*.**

En la tabla 8, se presentan las evaluaciones de reacción del follaje bajo la incidencia natural del patógeno, se destacan los cultivares ‘Tazumal’ y ‘Hatuey 24’, como los menos afectados ante la

presencia del patógeno, con valores de reacción de 3 (resistente), según escala empleada (CIAT 1981b) (Anexo 8a), similares al valor obtenido por el testigo 'Engañador' (3), seguidas por 'CC25-9 (N)', 'Holguín 518', 'BAT 832', 'CC25-9(R)', 'M-112' y 'Bonita 11', con valores intermedios de 4, frente a este patógeno.

El resto de los cultivares presentaron reacciones entre 5,0 y 6,0, lo que permitió clasificarlos como genotipos de reacción intermedia. Estos resultados coinciden con lo informado anteriormente por Hernández *et al.* (1996) en evaluaciones realizadas a cultivares comerciales y líneas de frijol, en condiciones de incidencia natural de este patógeno.

Una vez realizada la inoculación con el aislamiento de *Xap 527*, se constataron reacciones más severas en el follaje para estos mismos cultivares, sin embargo, 'BAT 304', 'Hatuey 24', 'M-112', 'Guamá 24' y 'Chévere' fueron los menos afectados ante la presencia de este aislamiento, con valores de reacción intermedia entre 5,3 y 6,6; el testigo 'Engañador' se mantuvo en este rango de reacción con un valor de 5,6. El resto de los cultivares evaluados presentaron reacciones de susceptibilidad frente a este aislamiento con valores que oscilaron entre 7,0 y 8,3. Se destacan por la presencia de síntomas severos de la enfermedad y los valores más altos de susceptibilidad en follaje, 'Bolita 42', 'ICA Pijao', 'Güira 89' y 'Velasco Largo', con reacciones entre 8,0 y 8,3.

En la evaluación realizada a las vainas bajo condiciones de incidencia natural (Tabla 8), se observó que en la mayoría de los cultivares comerciales no se presentaron síntomas de la enfermedad y se mantuvieron dentro del rango de reacción de resistencia, según la escala empleada (CIAT 1981b) (Anexo 8b), con valores entre 2 y 3. Se destaca el testigo 'Engañador', dentro del mismo grupo, pero con reacción de resistencia grado 1. Un grupo compuesto por los

cultivares ‘CC 25-9 (N),’ BAT 304’ e ‘ICA Pijao’, presentaron síntomas leves de la enfermedad, lo que los clasifica según sus reacciones, como intermedios con valores de 4,0.

Una vez realizada la inoculación con el aislamiento ya mencionado, se observó en todos los cultivares un aumento de los valores de reacción frente a esta enfermedad en la vainas, incluyendo al testigo ‘Engañador’; estos valores oscilaron entre 4,0 y 6,6 (intermedios). Se destacaron ‘Hatuey 24’, ‘M-112’, ‘Chévere’ y el testigo ‘Engañador’, con los valores más bajos de reacción intermedia entre 4,0 a 4,6. Solo ‘Velasco Largo’ presentó síntomas severos de la enfermedad, lo que permitió su clasificación como susceptible, con un valor de 7,3.

Los resultados expuestos hasta el momento muestran en la mayoría de los cultivares, un comportamiento diferente bajo la incidencia natural y frente a la inoculación con el aislamiento *Xap 527* de este patógeno (Tabla 8), donde el efecto de éste favoreció el incremento de las reacciones en los cultivares, de resistentes a intermedios en algunos casos como: ‘Hatuey 24’ y el testigo ‘Engañador’ y de intermedios a susceptibles en otros, como: ‘CC 25-9 (N)’ y (R), ‘Bolita 42’, ‘ICA Pijao’, ‘Güira 89’, ‘BAT 832’ para el follaje, así como, el cultivar ‘Velasco Largo’, tanto para reacción en el follaje como en las vainas.

Lo que sugiere señalar, que en condiciones naturales de campo, sin inoculación directa del patógeno, se presentan síntomas de Bacteriosis común en los cultivares comerciales que se emplean en la producción en Cuba. Sin embargo, una vez inoculados, la reacción frente a esta enfermedad varía y se manifiesta en menor o mayor grado en dependencia del nivel de resistencia de los cultivares que se evalúan y la presión del inóculo. Por lo que, para una evaluación y selección más confiable de cultivares frente a esta enfermedad, se hace necesario realizar inoculaciones con aislamientos patogénicos de *Xap* y evaluar las reacciones de los

cultivares frente a una alta presión de este patógeno. De no ser así, se corre el riesgo de seleccionar cultivares que no expresen su verdadero potencial, bajo estas condiciones.

Se observó, además, un aumento en los rangos de reacción en el follaje, oscilando entre intermedios y susceptibles (6,0 y 8,3) superando en gran medida a los valores de reacción observados en la vainas, que oscilaron entre los rangos intermedios (4,6 a 6,6). Esto puede deberse a que las reacciones frente a este patógeno observadas en el follaje y en las vainas fueron determinadas por el efecto de diferentes genes.

Afirmaciones que concuerdan con estos resultados fueron expuestas por Santos *et al.* (2003), quienes mostraron que la línea PI207262 presentó diferentes reacciones en las hojas y en las vainas a aislamientos de *Xap*, y que esta estuvo determinada por el efecto de genes diferentes.

Algo muy importante y que debe tenerse en cuenta, es la presencia de síntomas en las vainas, ya que esta afectación puede disminuir la calidad de las mismas. Una semilla dañada o manchada por efecto de esta bacteria puede constituir una fuente de inóculo, seguro, para próximas campañas, y una vía de diseminación efectiva de esta enfermedad, si no se hace un manejo adecuado y una selección de semillas sanas y de calidad, antes de la siembra.

Muchos de estos cultivares están siendo utilizados en la producción de frijol en Cuba. La distribución de los cultivares comerciales y la no implementación de estrategias adecuadas de manejo de esta enfermedad, pueden elevar los niveles del patógeno en los campos por la diseminación de semillas infestadas, facilitando así el rápido desarrollo de la enfermedad y las consecuentes pérdidas en los rendimientos.



**Tabla 8:** Reacción en follaje y vainas inducidos por Bacteriosis común y reducción de los rendimientos en los cultivares comerciales de Cuba.

Cultivares	Severidad frente a <i>Xap</i> 527			Valores de rendimiento kg/ parcelas	Pérdidas de rendimiento (%)	
	Follaje	Categoría <sup>1</sup>	Vainas			Categoría <sup>1</sup>
<b>CC 25-9 (N)</b>						
<i>No inoculado</i>	4,0	I	4,0	I	1424	44,38
<i>Inoculado</i>	7,3	S	6,6	I	792	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,0225***	
<b>Bolita 42</b>						
<i>No inoculado</i>	5,0	I	3,0	R	1188	55,6
<i>Inoculado</i>	8,0	S	5,0	I	527	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,0015***	
<b>ICA Pijao</b>						
<i>No inoculado</i>	5,0	I	4,0	I	1504	48,93
<i>Inoculado</i>	8,0	S	6,0	I	768	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,0001***	
<b>Güira 89</b>						
<i>No inoculado</i>	6,0	I	3,0	R	1244	30,78
<i>Inoculado</i>	8,0	S	5,0	I	861	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,007***	
<b>BAT 304</b>						
<i>No inoculado</i>	5,0	I	4,0	I	1078	31,35
<i>Inoculado</i>	6,3	I	5,3	I	740	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,019***	
<b>Tazumal</b>						
<i>No inoculado</i>	3,0	R	2,0	R	1579	40,21
<i>Inoculado</i>	7,3	S	5,0	I	944	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,0048***	
<b>Holguín 518</b>						
<i>No inoculado</i>	4,0	I	3,0	R	1474	46,47
<i>Inoculado</i>	7,3	S	5,3	I	789	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,0085***	
<b>BAT 832</b>						
<i>No inoculado</i>	4,0	I	2,0	R	1454	42,50
<i>Inoculado</i>	7,3	S	6,0	I	836	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,0005***	
<b>CC 25-9 (R)</b>						
<i>No inoculado</i>	4,0	I	2,0	R	1165	29,78
<i>Inoculado</i>	7,0	S	5,0	I	818	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,020***	
<b>Hatuey 24</b>						
<i>No inoculado</i>	3,0	R	1,0	R	1634	48,77
<i>Inoculado</i>	6,0	I	4,6	I	837	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,007***	
<b>Velasco Largo</b>						
<i>No inoculado</i>	6,0	I	5,0	I	932	52,47
<i>Inoculado</i>	8,3	S	7,3	S	443	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,003***	
<b>M – 112</b>						
<i>No inoculado</i>	4,0	I	2,0	R	848	41,62
<i>Inoculado</i>	6,6	I	4,6	I	495	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,020***	
<b>Red Kloud</b>						
<i>No inoculado</i>	6,0	I	3,0	R	523	0,76
<i>Inoculado</i>	7,3	S	7,0	I	519	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,968 N.S	
<b>‘Guamá 23’</b>						
<i>No inoculado</i>	5,0	I	2,0	R	955	80,73
<i>Inoculado</i>	7,3	S	6,6	I	184	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,0012***	
<b>Bonita II</b>						
<i>No inoculado</i>	4,0	I	3,0	R	1325	29,81
<i>Inoculado</i>	7,6	S	4,6	I	930	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,008***	
<b>Chévere</b>						
<i>No inoculado</i>	5,0	I	3,0	R	1016	28,93
<i>Inoculado</i>	6,6	I	4,0	I	722	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,003***	
<b>Engañador (T)</b>						
<i>No inoculado</i>	3,0	R	1,0	R	1265	3,90
<i>Inoculado</i>	5,6	I	4,6	I	1215	
<i>P</i> <sup>2</sup>					0,771 N.S	

*Xap*: aislamiento patogénico de Cuba. <sup>1</sup> Evaluación de la severidad de la reacción al patógeno según Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol, donde: 1,2,3 = resistente (R); 4,5,6 = Intermedio (I); 7,8,9 = Susceptible (S) (CIAT, 1981b). \*\*\*Significativo para test de T entre plantas inoculadas y no inoculadas con P<0.0001.

Por lo antes expuesto consideramos que se deben tener en cuenta el empleo de los cultivares ‘Hatuey 24’ y ‘Engañador’, por presentar los valores más bajos de reacción en follaje y vainas antes (resistentes) y después (intermedios) de la inoculación con el aislamiento 527 de *Xap*, en áreas donde esté presente el patógeno de la Bacteriosis común. Por el contrario, el cultivar ‘Tazumal’ presentó una afectación más severa en follaje y vainas variando su reacción de resistente antes de la inoculación, a susceptible (follaje) a intermedio (vainas) frente a una alta presión del aislamiento *Xap* 527.

- **Efecto de la inoculación sobre el rendimiento, en los cultivares comerciales de Cuba.**

Al evaluar el rendimiento en condiciones de incidencia natural del patógeno (Tabla 8), se destaca un grupo de cultivares con los valores más altos, en kg/ha, ellos son: ‘Hatuey 24’ (1634), ‘Tazumal’ (1579), ‘ICA Pijao’ (1504), ‘Holguín 518’ (1474), BAT 832’ (1454), y ‘Bonita 11’ (1325), superiores al obtenido por el testigo ‘Engañador’ con 1265. El resto de los cultivares presentaron rendimientos inferiores a estos, oscilando entre 1244 y 523 kg/ha. Resultados similares fueron reportados anteriormente por Faure *et al.* (1993b) al evaluar el comportamiento de algunos de estos cultivares comerciales en la provincia Habana, en las mismas condiciones de incidencia natural del patógeno.

Una vez realizada la inoculación se observó que una disminución significativa en los rendimientos de estos mismos cultivares ‘Hatuey 24’ (837 kg/ha), ‘Tazumal’ (944 kg/ha), ‘ICA Pijao’ (768 kg/ha), ‘Holguín 518’ (789 kg/ha), ‘BAT 832’ (836 kg/ha), y ‘Bonita 11’ (930 kg/ha), El mayor valor fue obtenido por el testigo comercial ‘Engañador’ con 1215 kg/ha, con una afectación mínima de sus rendimientos, por este patógeno

Al analizar los valores de rendimiento alcanzados por los cultivares comerciales, antes y después de realizada la inoculación, utilizando la prueba de tes de T, se observó una disminución significativa de los rendimientos en la mayoría de estos, lo que muestra la efectividad de la inoculación realizada y una mejor evaluación del comportamiento de los rendimientos frente a este patógeno bacteriano (Tabla 8).

Los cultivares ‘Red Kloud’ y ‘Engañador’ (Testigo), no presentaron pérdidas significativas en sus rendimientos por efecto de la inoculación, los valores obtenidos fueron 0,76 y 3,90 respectivamente. Sobresalen con los valores más bajos de perdidas en sus rendimientos frente a la inoculación del aislamiento 527 de *Xap* los cultivares ‘Bonita 11’ con 29, 81; ‘Chévere’ con 28,93; ‘CC 25-9 (R)’ con 29,78; ‘Güira 89’ con 30,78 y ‘BAT 304’ con 31, 35. Todos ellos pueden ser catalogados como cultivares con tolerancia a Bacteriosis común, siempre que recordemos que tolerancia es una cualidad intermedia entre la susceptibilidad y la resistencia (Robinson, 1996) y se cumple cuando la presencia de un parásito sobre una planta tolerante conlleve a menos daño (expresados como menos reducción en sus rendimientos) o que la presencia de los síntomas en ellos, sean más ligeros que en una planta sensible (Niks y Lindhout, 2004).

Resultados similares de perdidas en rendimiento por efecto de la inoculación con aislamientos de *Xap*, han sido obtenidos en México por Cruz-Izquierdo *et al.* (2004) y en España por Lema *et al.* (2007) y Beaver y Osorio (2009) en Puerto Rico.

El valor más alto de pérdidas de rendimiento fue obtenido por el cultivar ‘Guamá 23’ con una reducción desde 955 hasta 184 kg/ha para un 80,73%, acompañado de reacciones de susceptibilidad al ser inoculación con el aislamiento 527 de *Xap* de este patógeno. La

susceptibilidad se expresa como síntomas severos o muy severos de la enfermedad que puede causar pérdidas considerables en rendimiento, o la muerte de la planta (CIAT, 1981a).

Este análisis permitió conocer el comportamiento de los rendimientos de los cultivares comerciales al ser inoculados con el aislamiento patogénico 527 de *Xap* y determinar la reducción de los rendimientos, en condiciones de campo. Se destacan los cultivares tolerantes: ‘Tazumal’, ‘Bonita 11’ y ‘Hatuey 24’, seguidos de ‘CC 25-9 (R)’, ‘BAT 304’, y ‘Güira 89’ porque a pesar de haber presentado diferentes niveles de reacción frente a este aislamiento, sus rendimientos no fueron muy afectados, por efecto de la inoculación. Se sugiere la incorporación de los mismos en las estrategias de manejo para disminuir las afectaciones producidas por la Bacteriosis común, así como, evitar la disminución y pérdidas de los rendimientos de este cultivo en la producción.

Además, incorporar a los cultivares ‘Hatuey 24’, ‘M-112’, ‘Chévere’ y ‘Engañador’ como posibles progenitores, en el Programa de Mejora Nacional para la resistencia a esta enfermedad, liderado por el Instituto de Investigaciones de Granos y el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, por sus reacciones en follaje y vainas bajo la incidencia natural e inoculación del patógeno de la Bacteriosis común, en condiciones de campo.

La obtención de cultivares comerciales con tolerancia a esta enfermedad bacteriana, representa una protección adicional dentro de un sistema de control integrado de plagas para este cultivo, lo que contribuye a disminuir las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad en condiciones de producción.

#### **4.2.2. Líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional frente al aislamiento *Xap* 527 de Cuba**

Se mantienen como testigos tolerantes el cultivar ‘Engañador’ por los resultados obtenidos en la prueba anterior y se incorporó como testigo resistente ‘XAN 112’ por ser uno de los más utilizados en la región, en pruebas de resistencia a Bacteriosis común. (Silva *et al.*, 1989 y Singh, 1998). ‘Velasco Largo’ como testigo susceptible, por presentar los valores más altos de reacción a este aislamiento y bajos rendimientos, vistos igualmente en la prueba anterior.

La severidad de los síntomas inducidos por la inoculación del aislamiento 527 de *Xap*, presentados en la tabla 9, permitió evaluar a las líneas avanzadas del Programa de Mejora Nacional y los testigos, por su reacción en el follaje y las vainas frente a este patógeno, durante dos años consecutivos.

Según la escala empleada (CIAT 1981b) para la evaluación en follaje, el testigo ‘Engañador’ obtuvo síntomas de la enfermedad para una reacción intermedia de 6,6 y 6,0; en el follaje y en las vainas síntomas leves para una reacción intermedio entre 3,6 y 4,0 frente a este aislamiento patogénico; lo cual era de esperar ya que mantuvo un comportamiento similar al obtenido anteriormente (Tabla 9). El testigo ‘XAN 112’ presentó una reacción intermedia para follaje de 6,0 y en vainas de 5,4 y 5,0; este comportamiento no concuerda con los reportes realizados en la región, donde otros autores coinciden en afirmar que este cultivar presenta resistencia a Bacteriosis común (Singh, 1998; Miklas *et al.*, 2003 y Singh *et al.*, 2009 a).

El comportamiento de ‘XAN 112’, coincidió con los resultados obtenidos en el epígrafe 4.1.2 *Prueba de patogenicidad de los aislamientos de Xap*, donde el aislamiento 527 de *Xap* provocó una reacción intermedia a éste cultivar, pero en condiciones controladas. Una vez más los resultados muestran, que la resistencia genética en el frijol común está determinada por el

efecto de muchos genes, los cuales se expresan o no en dependencia de la patogenicidad, la virulencia del aislamiento inoculado, la resistencia del cultivar frente a este patógeno y de la interacción con el ambiente (Zapata, 1996; Asencio – Manzanera, 2001 y Singh *et al.*, 2008a).

En esta misma tabla, sobresalen con los valores más bajos de reacción en el follaje CUT 53 (5,3), CUT 49 (5,6), CUT 45 (5,3), CUT 57 (6,0) y CUT 56 (6,3) con un comportamiento similar y síntomas de la enfermedad de reacción intermedia, frente a este aislamiento, en ambos años de estudio.

El resto de las líneas avanzadas presentaron síntomas en el follaje con reacciones intermedias en el primer año y susceptible en el segundo, o viceversa. Ejemplo: CUT 43, CUT 46 y CUT 48 obtuvieron reacciones intermedias en el follaje entre 6,0 y 6,6 en el primer año y reacciones de susceptibilidad de 7,0 en el segundo año. El testigo susceptible ‘Velasco Largo’, presentó nuevamente síntomas severos de la enfermedad con reacción de susceptibilidad y valores de 7,3 y 8,6.

En las evaluaciones realizadas a las vainas ninguna de las líneas alcanzó reacciones inferiores a las presentadas por el testigo ‘Engañador’ (3,6 y 4,0). No ocurrió lo mismo con los testigos ‘XAN 112’ y ‘Velasco Largo’. Los valores de reacción en las vainas fueron similares para todas las líneas avanzadas en los dos años de estudio.

Se destacan nuevamente las líneas CUT 53 (4,3 y 4,8); CUT 49 (4,6 y 4,3) y CUT 45 (4,0 a 4,3) por presentar síntomas de la enfermedad con los valores más bajos de reacción intermedio en los dos años.