

## Caracterización genética y patogénica de aislados de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid y su respuesta al déficit hídrico

Bárbara J. Gutiérrez Cedeño<sup>1\*</sup>, Simón Pérez Martínez<sup>2</sup>, Carmen R. Carvajal Rebanales<sup>1</sup>, Sandy L. Molina Moret<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Maracay, Venezuela <sup>2</sup>Universidad Estatal de Milagro (UNEMI), Ecuador <sup>3</sup>Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Caracas, Venezuela. \*Correo electrónico: barbaragutierrezc@gmail.com

### RESUMEN

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. es un hongo fitopatógeno con amplia variabilidad morfológica, genética, patogénica y fisiológica. Esta versatilidad se incrementa debido a su adaptabilidad a diferentes especies hospedantes y condiciones ambientales estresantes, como deficiencia hídrica y altas temperaturas. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar aislados de *M. phaseolina*, desde el punto de vista genético y patogénico, así como su respuesta al déficit hídrico. Se utilizaron marcadores intermicrosatelites (ISSR) para la caracterización genética de los aislados. Para determinar la patogenicidad se inocularon 30 aislados sobre hojas cotiledonales de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Tacarigua. La respuesta al déficit hídrico se realizó a diferentes concentraciones NaCl *in vitro* sobre el crecimiento del micelio de *M. phaseolina*. Se aplicó la prueba de correlación lineal entre matrices de Mantel para identificar el grado de asociación entre los factores analizados. El hongo exhibió alto polimorfismo, lo que indica diversidad genética entre los aislados provenientes de caraota de diferentes áreas geográficas. En la caracterización patogénica se evidenció la diferenciación de expresiones de la infección en hojas cotiledonales de caraota. También, hubo un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de los aislados en función del potencial osmótico ( $\Psi_o$ ), debido a la presencia de NaCl. La diversidad genética no estuvo relacionada con la patogenicidad, ni con la respuesta a condiciones de déficit hídrico, es decir, se comportaron independientes.

**Palabras clave:** pudrición carbonosa, ISSR, *Phaseolus vulgaris*, potencial osmótico.

## Genetic and pathogenic characterization of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid isolates and their response to water deficit

### ABSTRACT

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. is a phytopathogenic fungus with wide morphological, genetic, pathogenic and physiological variability. This versatility is increased due to its adaptability to different host species and stressful environmental conditions, such as water deficiency and high temperatures. The objective of this work was to characterize *M. phaseolina* isolates, from the genetic and pathogenic point of view, as well as their response to water deficit. Intermicrosatellite markers (ISSR) were used for the genetic characterization of the isolates. To determine the pathogenicity, 30 isolates were inoculated on cotyledonal leaves of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Tacarigua. The response to water deficit was carried out at different concentrations NaCl *in vitro* on the growth of the mycelium of *M. phaseolina*. The linear correlation test was applied between Mantel matrices to identify the degree of association between the analyzed factors. The fungus exhibited high polymorphism, which indicates genetic diversity among the isolates from black bean from different geographical areas. In the pathogenic characterization, the differentiation of expressions of the infection in cotyledonal black bean leaves was evidenced. Also, there was an inhibitory effect on the mycelial growth of the isolates based on the osmotic potential ( $\Psi_o$ ), due to the presence of NaCl. The genetic diversity was not related to pathogenicity, nor to the response to water deficit conditions, that is, they behaved independently.

**Key words:** carbonaceous rot, ISSR, *Phaseolus vulgaris*, osmotic potential.

Recibido: 09/05/18 Aprobado: 06/11/18

## INTRODUCCIÓN

El hongo anamorfo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. es un fitopatógeno facultativo no específico. Su desarrollo se favorece en condiciones estresantes de sequía y altas temperaturas. Es el agente causal de la enfermedad “pudrición carbonosa” en cultivos de importancia económica (Mayek-Pérez *et al.* 2004). Este hongo tiene amplia variabilidad morfológica, genética, patogénica y fisiológica (Edraki y Banihashemi 2010; Purkayastha *et al.* 2006; Reyes-Franco *et al.* 2005), que se incrementa por su adaptabilidad a diferentes especies hospedantes y condiciones ambientales (Mahdizadeh *et al.* 2012; Edraki y Banihashemi 2010; Mayek-Pérez *et al.* 2001). En Venezuela, este patógeno se encuentra presente en diferentes zonas productoras de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) (Gutiérrez *et al.* 2014), pero no existen registros de la enfermedad.

*Macrophomina phaseolina* es altamente tolerante al estrés hídrico y la estimación de la respuesta a la deficiencia hídrica se fundamenta en la medición del estrés osmótico *in vitro*. Este se determina por simulación, con la evaluación del crecimiento del hongo en medios artificiales y uso de azúcares o sales para ajustar el potencial osmótico. En este sentido, *Macrophomina* puede crecer vegetativamente a bajos potenciales hídricos, condición de sequía que es desfavorable al hospedante (Gutiérrez *et al.* 2014; Mayek-Pérez *et al.* 2004; Cervantes-García *et al.* 2003).

Las técnicas de biología molecular permiten la detección de la variabilidad de *M. phaseolina* en la secuencia del ADN. Estudios previos demostraron, un alto grado de variabilidad genética entre las poblaciones de *M. phaseolina* mediante el uso de los marcadores moleculares intermicrosatelites (ISSRs). Al respecto, Mahdizadeh *et al.* (2011) señalaron que no hubo clara diferenciación entre los grupos de *M. phaseolina*, de acuerdo a su hospedante u origen geográfico. Luego, los mismos autores, en una investigación con ajonjolí (*Sesamum indicum* L.), revelaron alta variabilidad genética de *M. phaseolina*; esto lo atribuyeron al amplio rango de hospedantes y a la exposición del

patógeno a diferentes ambientes (Mahdizadeh *et al.* 2012). Por otra parte, Gutiérrez *et al.* (2014) señalaron variabilidad genética en aislados de *M. phaseolina* procedentes de caraota (*P. vulgaris* L.), con la utilización de otros marcadores moleculares como AFLP (por sus siglas en inglés: *Amplified fragment length polymorphism*). Los autores enfatizaron respuesta diferencial al potencial osmótico, es decir, al déficit hídrico; sin embargo, no encontraron una clara correspondencia entre los grupos genéticos de *M. phaseolina* y los grupos con diferentes condiciones hídricas.

Estudios previos (Martínez-Hilders y Laurentin 2012; Linhai *et al.* 2011) refieren que aislados de *M. phaseolina* mostraron un alto polimorfismo genético, sin embargo, no hubo una asociación clara entre el genotipo, la patogenia y la capacidad del hongo de adaptarse a las condiciones de sequía en el ambiente. El objetivo de esta investigación fue caracterizar aislados de *M. phaseolina*, desde el punto de vista genético y patogénico, así como su respuesta al déficit hídrico *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de los aislados de *M. phaseolina*

Los aislados se obtuvieron de muestras de plantas de caraota con presuntos síntomas de la enfermedad pudrición carbonosa, colectadas durante el ciclo norte-verano 2011-2012 (Cuadro 1).

### Aislamiento, purificación e identificación de *M. phaseolina*

Tejidos vegetales sintomáticos se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por 2 min; se lavaron con agua destilada estéril y se seccionaron en segmentos de 2 a 3 mm de longitud. Los mismos se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), para el crecimiento de *M. phaseolina*. Posteriormente, las colonias con caracteres taxonómicos pertenecientes al hongo fueron purificadas a partir de la siembra de un esclerocio por caja. Los cultivos monoescleróticos de cada aislado se

mantuvieron en medio de cultivo PDA acidificado. Todos los procedimientos y la conservación de las cepas, se realizaron en los laboratorios de: Patología de Semillas del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) del Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA) y Fitopatología del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

### Caracteres morfológicos de los aislados

**Patrón de crecimiento:** se tomó un disco de micelio de 3 mm de diámetro, a partir de un cultivo

puro con 4 días de crecimiento y se transfirió a cajas de Petri de 9 cm de diámetro. Estos aislados fueron incubados a 30 °C en la oscuridad, durante 96 h. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con tres replicas por aislado. Cada unidad experimental estuvo constituida por una caja. Se registró el diámetro de la colonia (cm) cada 24 h. Al quinto día, se registraron las características de la colonia: color del anverso y reverso, crecimiento de la colonia, forma y color de los esclerocios.

Cuadro 1. Ubicación geográfica de los aislados de *M. phaseolina* caracterizados genética y patogénicamente, así como su respuesta al déficit hídrico *in vitro*.

| Aislado | Estado     | Municipio         | Coordenadas geográficas    |
|---------|------------|-------------------|----------------------------|
| ARA01   | Aragua     | José Felix Ribas  | 10°17'01,2"N/ 67°36'41,5"O |
| ARA02   | Aragua     | Girardot          | 10°17'01,0"N/ 67°36'41,7"O |
| ARA03   | Aragua     | Girardot          | 10°16'58,3"N/ 67°36'39,6"O |
| ARA04   | Aragua     | Girardot          | 10°17'58,9"N/ 67°36'13,7"O |
| ARA05   | Aragua     | Zamora            | 10°03'35,3"N/ 67°28'11,7"O |
| ARA06   | Aragua     | Zamora            | 10°03'34,2"N/ 67°28'12,9"O |
| ARA07   | Aragua     | Zamora            | 10°03'34,3"N/ 67°28'13,9"O |
| ARA08   | Aragua     | Zamora            | 10°05'59,6"N/ 67°28'07,4"O |
| ARA09   | Aragua     | Zamora            | 10°06'01,1"N/ 67°28'07,6"O |
| ARA10   | Aragua     | Zamora            | 10°05'58,7"N/ 67°28'09,9"O |
| ARA11   | Aragua     | Girardot          | 10°16'08,5"N/ 67°36'16,5"O |
| ARA12   | Aragua     | Girardot          | 10°17'25,9"N/ 67°36'00,1"O |
| BAR01   | Barinas    | Sosa              | 08°39'42,9"N/ 69°33'03,3"O |
| BAR02   | Barinas    | Sosa              | 08°39'36,6"N/ 69°32'54,1"O |
| LAR01   | Lara       | Palavecino        | 10°03'15,7"N/ 69°14'15,3"O |
| MON01   | Monagas    | Maturín           | 09°45'27,0"N/ 63°12'01,1"O |
| POR01   | Portuguesa | Ospino            | 09°22'24,1"N/ 69°22'42,2"O |
| POR02   | Portuguesa | Turen             | 09°12'36,4"N/ 68°54'20,2"O |
| POR03   | Portuguesa | Turen             | 09°12'00,9"N/ 68°54'35,5"O |
| POR04   | Portuguesa | Turen             | 09°11'35,6"N/ 68°53'06,0"O |
| POR05   | Portuguesa | Turen             | 09°11'44,3"N/ 68°54'18,5"O |
| POR06   | Portuguesa | Ospino            | 09°21'27,1"N/ 69°23'46,6"O |
| POR07   | Portuguesa | Turen             | 09°13'51,6"N/ 69°05'11,6"O |
| POR08   | Portuguesa | Turen             | 09°15'24,0"N/ 69°05'43,0"O |
| POR09   | Portuguesa | Santa Rosalía     | 09°12'32,2"N/ 69°06'01,7"O |
| POR10   | Portuguesa | Turen             | 09°14'53,7"N/ 69°03'50,5"O |
| POR11   | Portuguesa | Turen             | 09°12'29,1"N/ 69°03'39,2"O |
| POR12   | Portuguesa | Esteller          | 09°14'31,3"N/ 69°07'41,0"O |
| YAR01   | Yaracuy    | José Antonio Páez | 10°09'18,2"N/ 69°01'13,8"O |
| YAR02   | Yaracuy    | Cocorote          | 10°18'14,9"N/ 68°46'07,6"O |

**Dimensión de los esclerocios:** se registró el largo y ancho de 30 esclerocios de cada aislado, usando un micrómetro adaptado al microscopio Optika B-350 con un aumento de 40x.

### Caracterización genética de los aislados de *M. phaseolina* mediante marcadores intermicrosatelites (ISSR)

**Extracción del ADN.** Los aislados de *M. phaseolina* se colocaron en crecimiento en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, durante 4 a 5 días en medio PDA, para extraer ADN del micelio fresco. Se raspó con una espátula o palillo estéril el micelio de media o caja completa, dependiendo de la abundancia del micelio aéreo, en condiciones estériles. Se colocó en un tubo Eppendorf que contenía 1 ml de buffer de lisis (150 mM EDTA; 50 mM Tris pH 8; 2 % sarkosyl), para su maceración. Las muestras se congelaron a -80 °C durante un mínimo de 1 h.

Seguidamente, las muestras se colocaron a 55 °C, 550 rpm por 5 min en termomixer compact. Se procedió a centrifugar a 4 °C, 14 rpm por 15 min y se transfirieron 700 µl del sobrenadante a un nuevo tubo y se agregaron 490 µl de PEG/NaCl (20 % p/v PEG; 2,5 NaCl); los cuales se incubaron a temperatura de laboratorio (22 °C) durante una hora. Luego, se centrifugó a 14 rpm por 15 min a 4 °C, se procedió a descartar el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 400 µl de Tris 10 mM, pH 8. Posteriormente, se agregaron 8 µl de NaCl y 800 µl de etanol 95 %, incubándose por 1 h a temperatura de laboratorio (22 °C). Nuevamente, se centrifugó a 14 rpm por 15 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se secó el sedimento con los tubos invertidos a temperatura de laboratorio (22 °C). Finalmente, se resuspendió el ADN en 50 µl de TE (buffer pH 8) durante toda la noche a temperatura de laboratorio (22 °C).

**Amplificación de regiones intermicrosatelites.** Se realizó en un termociclador Eppendorff, en un volumen total de 20 µl, que contenían 2 ng de ADN genómico, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, Buffer PCR 1X, 0,2 mM dNTPs, iniciador 0,25 µM, 1U de *Taq* ADN Polimerasa Promega®. Los ciclos de PCR se iniciaron con desnaturalización a 94 °C durante

5 min, seguido de 40 ciclos de amplificación, con desnaturalización a 94 °C por 30 s, temperatura de hibridación entre 50-53 °C por 2 min y 72 °C por 2 min y extensión final a 72 °C por 5 min. Una vez finalizada la PCR, las muestras se conservaron a 4 °C. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5 %, preparados en buffer TBE 1X, que también se usó como buffer de corrida. Como patrón de comparación se usaron 3 µl de 200 pb DNA StepLadder (Promega®). Para la determinación del peso molecular de los patrones de bandas se utilizó el programa Total LabQuant Versión 13.1 (2008). Se emplearon nueve cebadores ISSR de la serie 800-900 de la "University of British Columbia Biotechnology Laboratory (UBCBL)": 815; 824; 834; 835; 841; 850; 855; 864 y 888 (Cuadro 2) seleccionados por su carácter aleatorio y universal (Zietkiewicz *et al.* 1994; Gupta *et al.* 1994).

Cuadro 2. Identificación y secuencia de los iniciadores ISSR.

| Iniciador | Secuencia                  |
|-----------|----------------------------|
| 834       | 5'-AGAGAGAGAGAGAGGCTT-3'   |
| 841       | 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYC3'    |
| 850       | 5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTYC-3' |
| 855       | 5'-ACACACACACACACACCTT-3'  |
| 864       | 5'-ATGATGATGATGATGATG-3'   |
| 888       | 5'-BDBCACACACACACACA-3'    |
| 815       | 5'-CTCTCTCTCTCTCTCTG-3'    |
| 824       | 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3'    |
| 835       | 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGGCTA-3' |

**Análisis de datos.** Los patrones de bandas obtenidos fueron interpretados y codificados en una matriz binaria, de presencia (1) o ausencia (0), según el peso de la banda para cada aislado. Se determinó la capacidad informativa y discriminatoria de los iniciadores y los análisis de conglomerados, con los métodos y cálculos de las distancias correspondientes. Los detalles de cada análisis se indican al pie de figuras y tablas.

Se utilizaron los programas InfoGen (Balzarini y Di Rienzo 2012) e InfoStat ver. 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

### **Caracterización patogénica de aislados de *M. phaseolina* sobre hojas cotiledonales de caraota var. Tacarigua**

Se seleccionaron semillas de caraota de la variedad Tacarigua para el ensayo, por sus antecedentes de susceptibilidad a *M. phaseolina*. También, es la variedad de más amplia distribución en las zonas de producción de caraota en el país. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio 2 % y se sembraron en germinadores con sustrato estéril en condiciones de vivero. Se obtuvieron hojas cotiledonales completamente expandidas y sin daños aparentes por plagas, entre ocho y diez días después de la siembra. Bajo campana de flujo laminar, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 2 % durante 2 min; se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril y se dejaron secar en papel secante estéril. Para la inoculación se emplearon 30 aislados monoescleróticos de cuatro a cinco días de crecimiento en medio PDA, con la finalidad de seleccionar el aislado más agresivo. Para el ensayo se utilizó la técnica de hoja cotiledonal desprendida, según metodología de Bañuelos-Balandrán y Mayek-Pérez (2008). Se midió la longitud de crecimiento de la lesión (cm) causada por el hongo a los cinco días de incubación.

### **Diseño experimental y análisis de datos.**

La unidad experimental fue una hoja cotiledonal dentro de una caja Petri. Se usó un diseño completamente al azar con seis repeticiones por aislado y dos repeticiones del experimento en el tiempo. A partir del análisis de conglomerados considerando los promedios de cada repetición, se seleccionó el aislado con mayor rapidez de crecimiento y agresividad en el sustrato natural. El análisis de conglomerados se realizó a través del programa InfoStat ver. 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

### **Caracterización de aislados de *M. phaseolina* por su respuesta ante condiciones de déficit hídrico *in vitro***

Se evaluó la respuesta al potencial osmótico ( $\Psi_0$ ), inducido con diferentes concentraciones de NaCl, sobre el crecimiento *in vitro* del micelio de *M. phaseolina*. Se utilizaron cuatro concentraciones de NaCl de: 200; 300; 400 y 750 mM, equivalentes a -932; -1 394; -1 854; -3 507 J kg<sup>-1</sup> de  $\Psi_0$  y un tratamiento control sin NaCl, descrito por Cervantes-García *et al.* (2003). Aplicando esa metodología, se tomaron discos de PDA de 0,4 cm con cinco días de crecimiento fúngico de cada aislado; se transfirieron a cajas Petri con PDA ajustadas a las diferentes concentraciones de NaCl, con tres repeticiones por tratamiento. Las cajas se sellaron con cinta Parafilm para minimizar cambios en el  $\Psi_0$  del medio de cultivo e incubadas a  $28 \pm 2$  °C. Se midió el crecimiento radial de las colonias (cm) y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio [PIC= (Crecimiento control – Crecimiento tratamiento/Crecimiento control) x 100] en cada caso con respecto al control a las 48 y 72 h.

**Diseño experimental y análisis de datos.** Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por cada concentración de NaCl. Las diferentes variables respuesta evaluadas se analizaron por técnicas multivariadas a partir de una matriz de 30x8; esta correspondió a los aislados y las medidas de crecimiento en las cuatro concentraciones de NaCl (200; 300; 400 y 750 mM), en dos momentos (48 y 72h), y un tratamiento control sin NaCl. Esta matriz sirvió de insumo para el análisis de conglomerados, cuyos detalles de la métrica se indican al pie de cada figura de resultados. El análisis de conglomerados se realizó a través del programa InfoStat ver. 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

### **Grado de asociación entre la genética, patogenicidad y su respuesta al déficit hídrico de aislados de *M. phaseolina***

Para identificar el grado de asociación entre los factores analizados en este trabajo:

diversidad genética, características patogénicas y respuesta ante déficit hídricos de *M. phaseolina*, se aplicó la prueba de correlación lineal entre matrices de Mantel (Balzarini *et al.* 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación de los aislados de *M. phaseolina*

Se identificaron 30 aislados de *M. phaseolina* procedentes de seis estados productores de cañote en Venezuela: Aragua (ARA01 al ARA12), Barinas (BAR01 y BAR02), Lara (LAR01), Monagas (MON01), Portuguesa (POR01 al POR12) y Yaracuy (YAR01 y YAR02). De acuerdo con las descripciones morfológicas *in vitro* de los aislados y el color de las colonias, en el anverso, varió entre las tonalidades de gris claro (16,7 %), gris medio (3,3 %), gris oscuro (76,7 %) y negro (3,3 %); en el reverso, los tonos variaron entre pardo oscuro (33,3 %) y negro (66,7 %). El crecimiento del micelio sobre PDA se observó liso (sin micelio aéreo 10 %), plumoso, (muy poco micelio aéreo 20 %) y algodonoso (abundante micelio aéreo 70 %). Los microesclerocios presentaron color pardo oscuro (26,7 %) y negro (73,3 %). El aislado con los microesclerocios de mayor tamaño fue ARA07, con valores de 98,21 a 161,12  $\mu\text{m}$  de largo x 90,72 a 128,11  $\mu\text{m}$  de ancho; el de menor tamaño correspondió a LAR01, con valores de 48,99 a 67,67  $\mu\text{m}$  de largo x 17,60 a 22,93

$\mu\text{m}$  de ancho. La forma de los microesclerocios varió desde oval, redonda y globosa. Los aislados con las mayores tasas de crecimiento de la colonia sobre PDA, a las 24 h de incubación, fueron POR04, POR06 y MON01; a las 48 h siguieron la secuencia POR01 y ARA12; a este grupo se le adicionó YAR02 a las 72 h (Datos no mostrados).

### Caracterización genética de aislados de *M. phaseolina* mediante marcadores intermicrosatélites (ISSR)

De las nueve combinaciones de iniciadores ISSR utilizados, siete generaron patrones de bandas de amplificación que revelaron diferentes niveles de polimorfismo entre los 30 aislados de *M. phaseolina*. Se obtuvo un total de 118 bandas, de las cuales 117 (99,15 %) fueron polimórficas (Cuadro 3), lo que indica una alta variabilidad genética. El contenido de información polimórfica muestra la calidad de un marcador (Botstein *et al.* 1980). Su valor dependió del número de alelos y la distribución de las frecuencias.

Todos los valores de información polimórfica obtenidos por los iniciadores (0,29 a 0,35), superaron la mitad del recorrido o rango esperado para el contenido de información polimórfica (0,01 a 0,50). Por lo tanto, estos marcadores son informativos y de utilidad para subsiguientes estudios de caracterización. El iniciador que mostró un mayor grado de confianza para la identificación de los genotipos de *M. phaseolina*, al compararse simultáneamente, fue el 855. Este presentó la

Cuadro 3. Información de los iniciadores que permitieron la caracterización genética de *M. phaseolina*.

| Iniciadores  | Bandas       |              |            | CIP  | E.E.               | PDICMA             |
|--------------|--------------|--------------|------------|------|--------------------|--------------------|
|              | Polimórficas | Monomórficas | Totales    |      |                    |                    |
| 834          | 19           | 1            | 20         | 0,31 | 0,02               | 2,4 <sup>-12</sup> |
| 835          | 16           | 0            | 16         | 0,33 | 0,01               | 5,0 <sup>-16</sup> |
| 841          | 22           | 0            | 22         | 0,33 | 0,01               | 9,6 <sup>-16</sup> |
| 850          | 7            | 0            | 7          | 0,33 | 3,7 <sup>-03</sup> | 1,7 <sup>-15</sup> |
| 855          | 13           | 0            | 13         | 0,33 | 0,01               | 7,1 <sup>-18</sup> |
| 864          | 14           | 0            | 14         | 0,29 | 0,01               | 3,1 <sup>-13</sup> |
| 888          | 26           | 0            | 26         | 0,35 | 0,01               | 1,1 <sup>-16</sup> |
| <b>Total</b> | <b>117</b>   | <b>1</b>     | <b>118</b> |      |                    |                    |

CIP: contenido de información polimórfica; E.E.: error estándar; PDICMA: probabilidad de compartir el mismo alelo al azar.

menor probabilidad ( $7,1^{-18}$ ) de que dos aislados compartan el mismo alelo al azar. El de menor capacidad discriminadora fue el 834, con un valor para la probabilidad de compartir el mismo alelo al azar (PDICMA) de  $2,4^{-12}$ . Los restantes mostraron similar capacidad para reconocer que dos aislados son diferentes.

### Análisis de conglomerados

Los aislados se distribuyeron en tres grupos, de acuerdo al método de agrupamiento jerárquico de Ward y la distancia basada en el coeficiente de similitud de Dice (Figura 1). Los grupos se definieron a una distancia de 0,94. El grupo 1 que se resalta de rojo, agrupa nueve aislados procedentes de Aragua (4), Monagas (1), Portuguesa (2) y Yaracuy (2). En el grupo 2, identificado de azul, se concentraron ocho aislados que incluyen Aragua (3), Barinas (2), Lara (1) y Portuguesa (2). En un tercer grupo señalado de verde se agruparon 13 aislados, de los estados Aragua (5) y Portuguesa (8). Los perfiles moleculares de los aislados ARA02 y POR12 del grupo 1, se unen a menor distancia (0,47) que el resto. El grupo 1

y el 3 se unen a mayor distancia y finalmente se suma el grupo 2 a una distancia de 1,88.

Con base a los resultados del análisis de conglomerados (Figura 1), se pudo evidenciar que los grupos de aislados en este estudio no se diferenciaron claramente de acuerdo al origen geográfico; sin embargo, usualmente tienden a agruparse de manera cercana (Mahdizadeh *et al.* 2011). Ejemplos de esta condición se evidenció en el grupo 1, en el cual, el aislado ARA04 y ARA5 son muy similares. En el grupo 3, también hay similitudes entre POR03 y POR10, ARA11 y ARA12, ARA08 y ARA10, POR04 y POR05, POR07 y POR08. Finalmente, en el grupo 2, se encuentran los aislados ARA01 y ARA03.

Mahdizadeh *et al.* (2011) denotaron que aislados del mismo origen geográfico usualmente tienden a agruparse cerca, aun cuando no haya clara correspondencia en la formación de los grupos usando marcadores ISSR. En investigaciones de Martínez-Hilders y Laurentin (2012), Linhai *et al.* (2011), Muñoz-Cabañas *et al.* (2005) y Beas-Fernández *et al.* (2004), la aplicación de

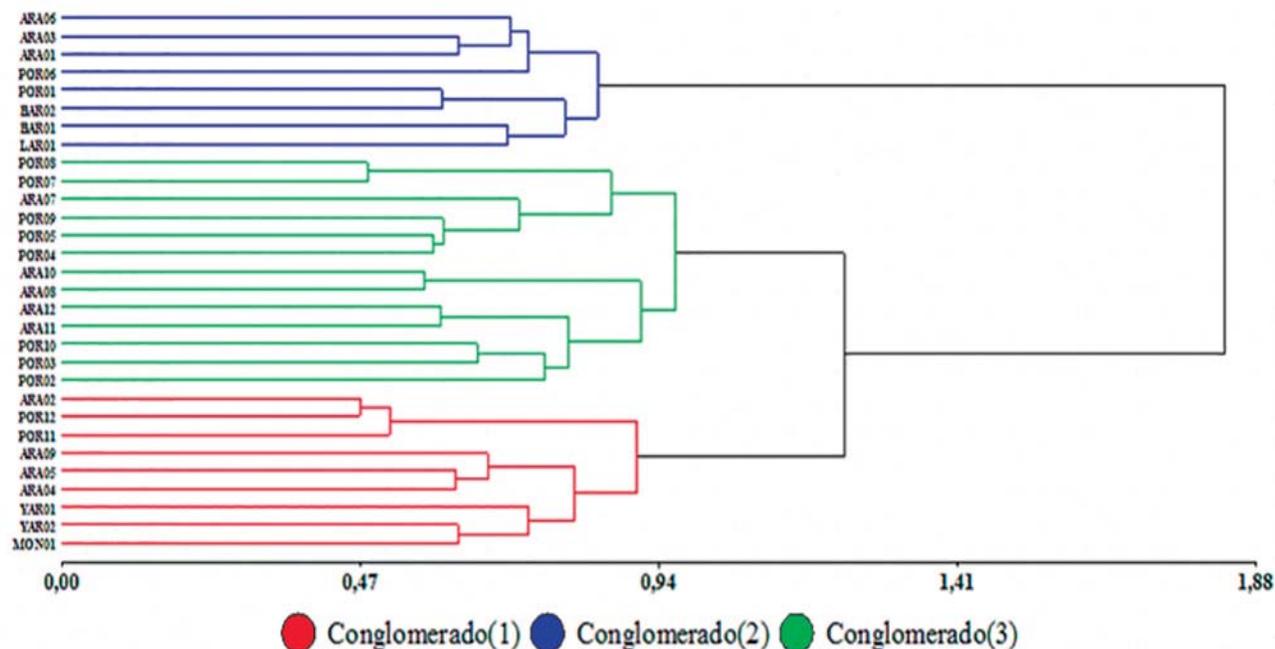


Figura 1. Dendrograma de 30 aislados de *M. phaseolina* procedentes de caraota, basado en el método de Ward y la distancia de similitud de Dice.

otros marcadores moleculares, no han llegado a definir asociación clara del genotipo de *M. phaseolina* con el origen geográfico o el hospedante. En este sentido, parte de los aislados que se estudian en el actual trabajo, tampoco mostraron relación con el genotipado usando marcadores AFLP (Gutiérrez *et al.* 2014).

Los resultados de este estudio revelaron que los marcadores ISSR exhibieron un alto polimorfismo (117/118 bandas). Esto indica alta diversidad genética entre los aislados de *M. phaseolina* provenientes de un hospedante y de diferentes orígenes geográficos. Asimismo, se ha señalado amplia variabilidad genética de aislados *M. phaseolina* a partir de *Sesamun indicum* L., originarios del estado Portuguesa en Venezuela, mediante la técnica RAPD (por sus siglas en inglés: Random Amplified Polymorphic DNA) (Matinez-Hilders y Laurentin, 2012). Mahdizadeh *et al.* (2011) indicaron, que la gran variabilidad genética de *M. phaseolina* es debida a la adaptabilidad del patógeno a diversos climas, amplio rango de hospedantes y traslados del hongo de una zona a otra.

#### Caracterización patogénica de aislados de *M. phaseolina* sobre hojas cotiledonales de caraota var. Tacarigua

Sobre las hojas cotiledonales de caraota de la variedad Tacarigua en condiciones *in vitro*, se mostraron y midieron las lesiones de avance (cm) de los 30 aislados de *M. phaseolina*, tal como se evidencia en la Figura 2. Los promedios de dos repeticiones del ensayo en el tiempo, sirvieron de insumos para el análisis de conglomerados, a los efectos de conocer la diversidad en la agresividad de cada aislado; con base a eso seleccionar el aislado más agresivo.

#### Formación de grupos de crecimiento

Los aislados se constituyeron en tres grupos de crecimientos, de acuerdo al método promedio (Average linkage) y la distancia euclídea (Figura 3). El grupo 1, indicado con líneas rojas, agrupo 12 aislados (POR 08, BAR02, ARA12, POR01, POR11, POR 04, BAR01, POR05, ARA08, POR06, LAR 01 y ARA01), con características

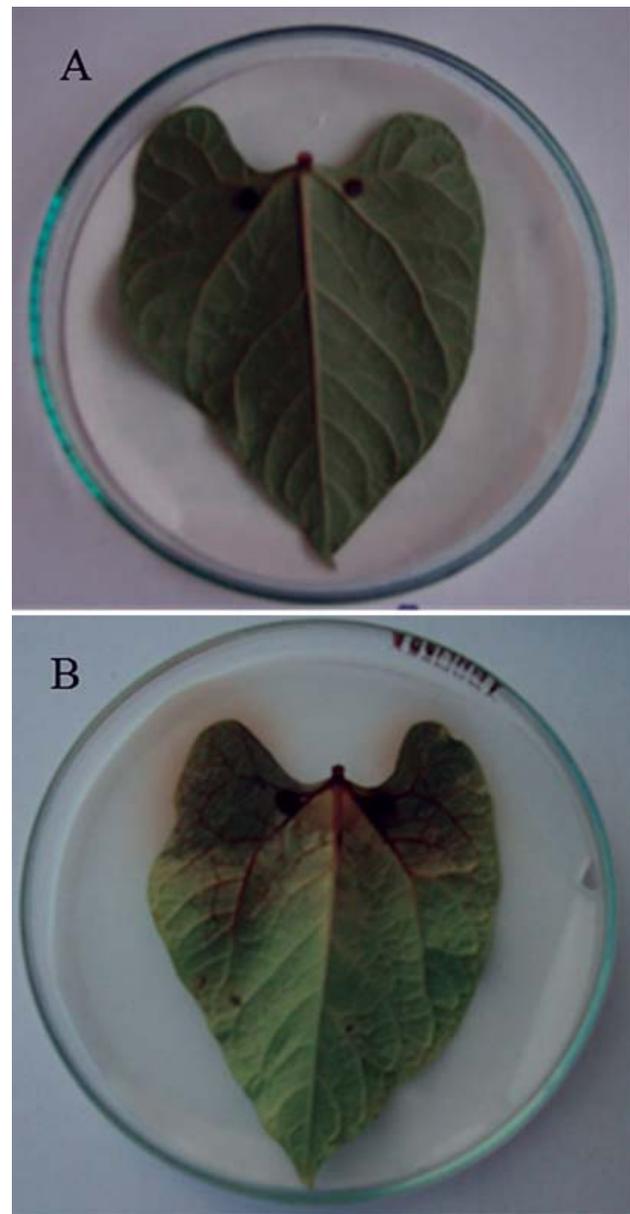


Figura 2. Lesiones inducidas por *M. phaseolina* en hoja cotiledonal de caraota var. Tacarigua, al inicio (A) y a los 5 días de inoculación (B).

de menores crecimientos. En el grupo 3, correspondiente a las líneas verdes, se agruparon 17 aislados con un crecimiento intermedio. En azul (grupo 2) se diferencia, el aislado ARA02 como el de mayor crecimiento sobre hojas cotiledonales.

En caraota se ha utilizado la técnica de hojas desprendidas con resultados confiables, para

evaluar reacciones de germoplasma a diferentes patógenos (Gutiérrez *et al.* 2009; Ragagnin *et al.* 2005; González *et al.* 2000). La técnica utilizada en este estudio fue sugerida por Bañuelos-Balandrán y Mayek-Pérez (2008), como una estrategia sencilla, rápida y confiable para la medición del daño causado por aislados de *M. phaseolina*. Con esa técnica se diferenciaron las expresiones de la infección de los diferentes aislados de *M. phaseolina* en el sustrato natural de hojas cotiledonales de caraota var. Tacarigua. Esto permitió seleccionar al aislado ARA02 (Grupo 2), por su rapidez de crecimiento y agresividad para producir lesiones en las hojas cotiledonales. El aislado tuvo un promedio de necrosis de 4,08 cm sobre las hojas cotiledonales durante los cuatro días de evaluación y crecimiento con abundante micelio aéreo.

### Caracterización de aislados de *M. phaseolina* por su respuesta ante condiciones de déficit hídrico *in vitro*

En función del potencial osmótico ( $\Psi_0$ ) hubo un efecto inhibitorio diferencial en el crecimiento micelial de los aislados de *M. phaseolina*, debido a la presencia de NaCl. Disminuciones de la capacidad del desplazamiento del agua por aumentos de la concentración de solutos, redujo el crecimiento de hongos fitopatógenos como *M. phaseolina* (Tijerina-Ramírez *et al.* 2014; Goudarzi *et al.* 2008; Cervantes-García *et al.* 2003), como consecuencia del déficit hídrico *in vitro*. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración a 750 mM no se inhibió completamente el crecimiento en los aislados de *M. phaseolina*. Tijerina-Ramírez *et al.* (2014) y Cervantes-García *et al.* (2003), han señalado inhibición total del crecimiento a 1 000 mM

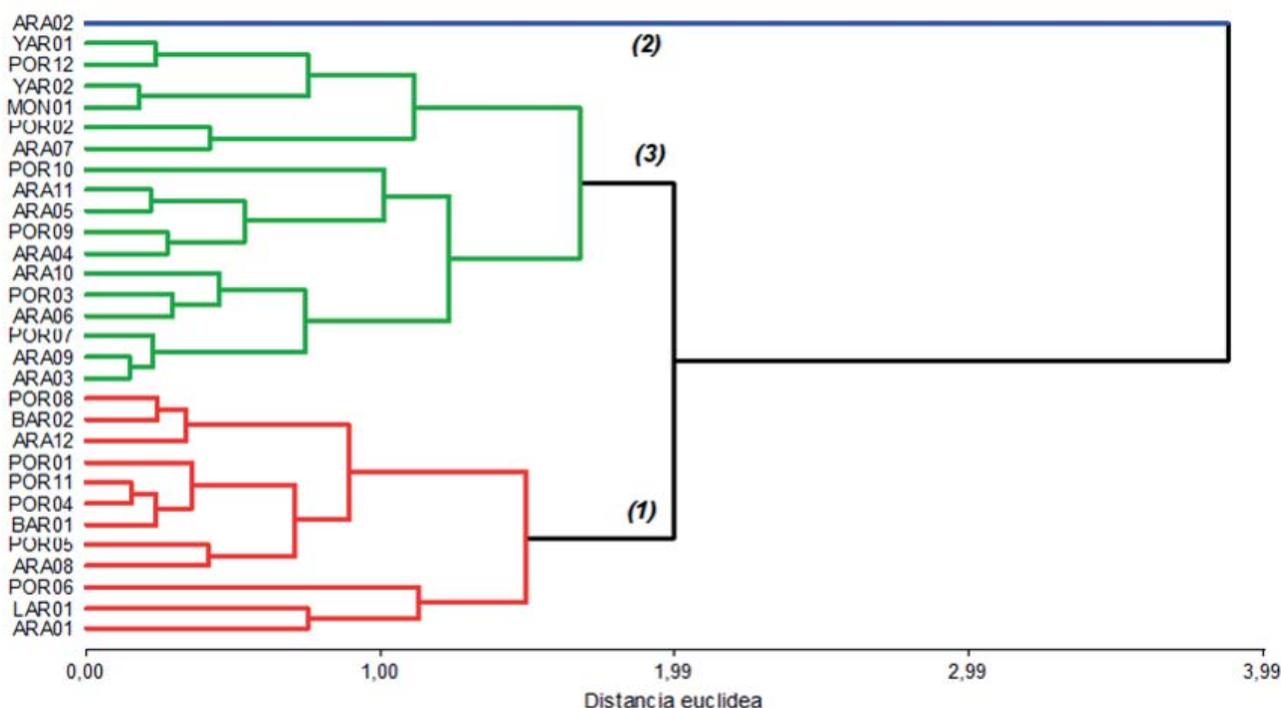


Figura 3. Diferenciación de grupos de crecimiento en 30 aislados de *M. phaseolina* inoculados en caraota var. Tacarigua, por el método de hojas cotiledonales desprendidas.

de NaCl en algunos aislados de este patógeno. Todas estas diferencias individuales de los aislados de *M. phaseolina* fueron maximizadas para su representación mediante el análisis de conglomerados.

### Formación de grupos de crecimiento en función del potencial hídrico

Los aislados se agruparon en cinco grupos de crecimientos de acuerdo al método promedio ponderado (Weighted average linkage) y la distancia euclídea. Con una correlación cofenética de 0,91 y una línea de corte a 4,6. La figura 4, muestra las diferencias entre los grupos (identificados por colores) de crecimiento de los 30 aislados de *M. phaseolina*, en condiciones de déficit hídrico inducido por diferentes concentraciones de NaCl (200; 300; 400 y 750 mM). No hubo clara asociación de los grupos de aislados de *M. phaseolina* por su respuesta ante

condiciones de déficit hídrico con el origen geográfico. No obstante, el 53 % de los aislados del grupo 2 provienen del estado Portuguesa, señalado como la zona agrícola de mayor incidencia de *M. phaseolina* en Venezuela (González *et al.* 2007).

En la figura 5, se muestra el comportamiento del crecimiento a las 72 h de cada grupo de aislados de *M. phaseolina*, bajo diferentes condiciones hídricas (0; 400 y 750 mM de NaCl). A la concentración de 400 mM, el aislado YAR02, ubicado en el grupo 4, tuvo el mayor crecimiento con una media de 9 cm. A este le siguió el grupo 2, con una media de 5,54 cm. A la concentración de 750 mM, el grupo 2 fue el de mayor crecimiento (media 4,25 cm) seguido por el aislado YAR02 (3,90 cm) del grupo 4. Estos grupos demostraron una mayor capacidad de crecer bajo estas condiciones de ensayo; también las medias de crecimientos en condiciones de mayor

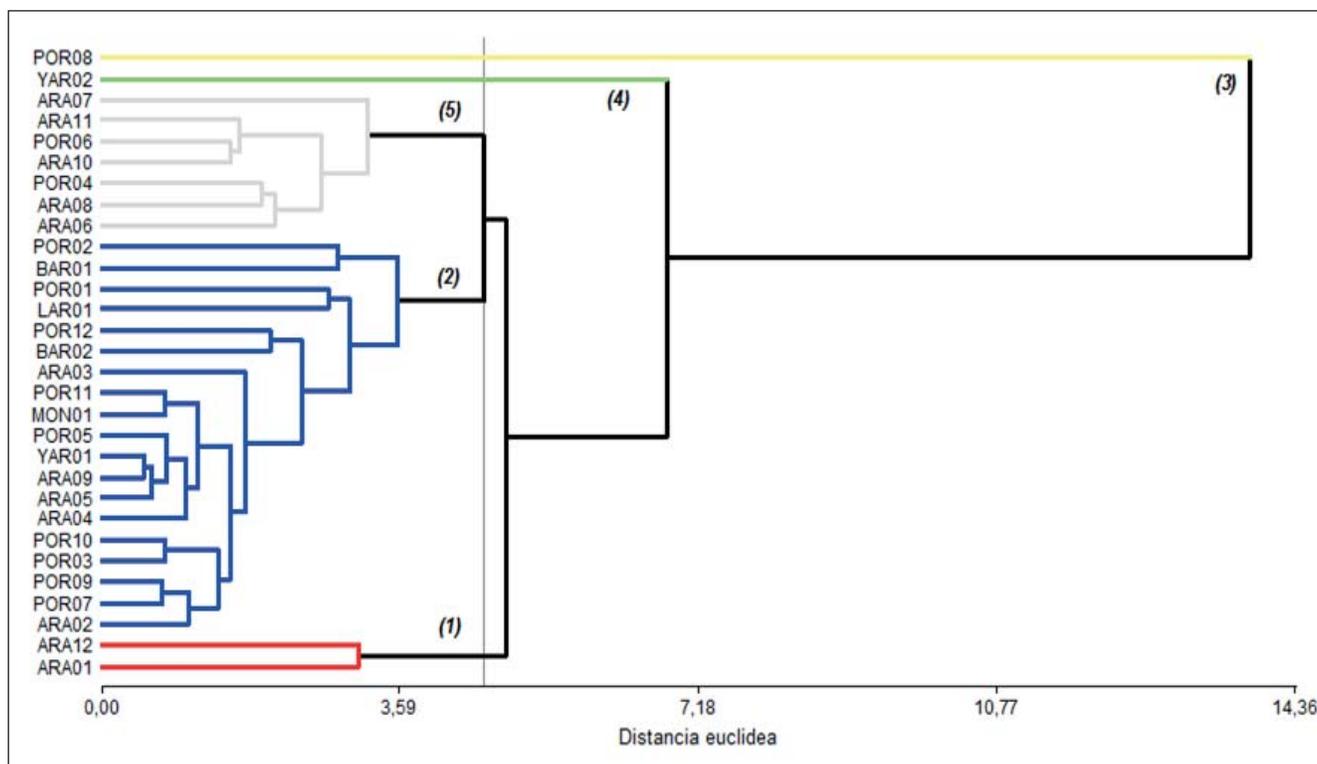


Figura 4. Dendrograma de 30 aislados de *M. phaseolina* diferenciados por su respuesta a potenciales hídricos *in vitro*.

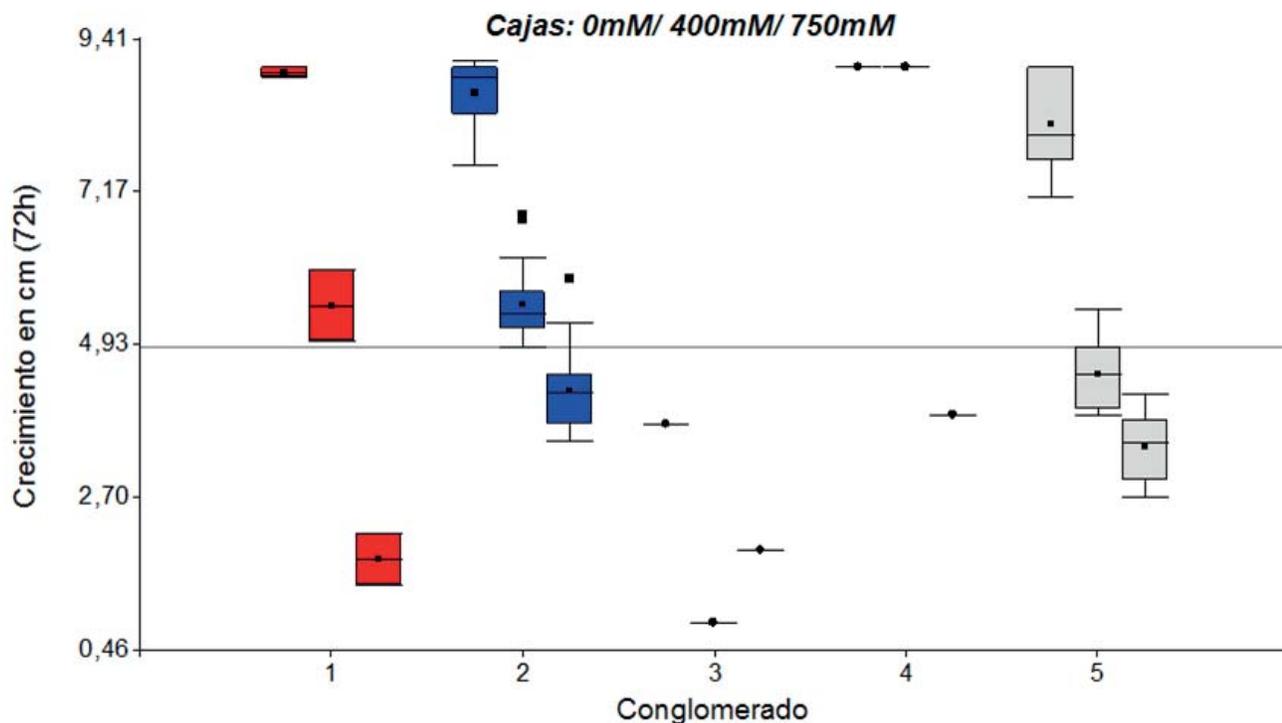


Figura 5. Crecimiento micelial de los grupos de aislados (conglomerados) de *M. phaseolina* a las 72 h, sometidos a tres concentraciones de NaCl (0; 400 y 750 mM).

déficit hídrico, a las 72 h, estuvieron cercanas a la media general de todas las concentraciones de NaCl (4,93 cm). En los otros grupos, disminuyó el crecimiento micelial por debajo de la media cuando disminuyó la disponibilidad hídrica en el medio; de estos el grupo 3 (POR08) fue el más susceptible a estas condiciones de ensayo.

Los resultados muestran que los aislados de *M. phaseolina* que se encuentran dentro de los grupos 2 y 4, presentaron mayor tolerancia; lo que permite suponer más capacidad de sobrevivencia en la naturaleza, en condiciones de bajo contenido hídrico. Según Cervantes-García *et al.* (2003), la adaptación a bajos contenidos hídricos, de los aislados de los grupos 2 y 4 puede ser una estrategia para sobrevivir *M. phaseolina* como saprofito o patógeno latente en tejidos de hospedantes en condiciones áridas. Sin embargo, existen antecedentes de que *M. phaseolina* sintetiza compuestos que le permiten adaptarse a diversos ambientes y

hospedantes (Tijerina-Ramírez *et al.* 2014), lo cual puede estar ocurriendo en estos aislados de los grupos 2 y 4.

De acuerdo a la prueba de Mantel (Balzarini *et al.* 2012) no se encontró correlación lineal ( $r = 0,08$ ) estadísticamente significativa ( $P = 0,151$ ;  $P > 0,05$ ) entre la diversidad genética y las características patogénicas de los aislados de *M. phaseolina*. Tampoco entre la diversidad genética y la respuesta al déficit hídrico ( $r = -0,03$  y  $P = 0,620$ ). La diversidad genética de *M. phaseolina* demostrada en este estudio, no está relacionada con la patogenicidad ni con la respuesta a condiciones de déficit hídrico *in vitro*, se comportaron independientes.

## CONCLUSIONES

La caracterización genética de *M. phaseolina* con uso de marcadores ISSR, presentó alto polimorfismo. Esto indica alta diversidad genética

entre los aislados provenientes de caraota, de diferentes orígenes geográficos.

La caracterización patogénica, en hojas desprendidas, permitió la diferenciación de las expresiones de la infección de los aislados de *M. phaseolina* en hojas cotiledonales de caraota var. Tacarigua.

Hubo un efecto inhibitorio *in vitro* en el crecimiento micelial de los aislados de *M. phaseolina* en función del  $\Psi_0$ , debido a la presencia de NaCl. Los aislados del grupo 4 (YAR02) y del grupo 2 (ARA02, POR07, POR09, POR03, POR10, ARA04, ARA05, ARA09, YAR01, POR05, MON01, POR11, ARA03, BAR02, POR12, LAR01, POR01, BAR01, POR02), se comportaron más tolerantes al déficit hídrico.

La diversidad genética de *M. phaseolina* no estuvo relacionada con la patogenicidad, ni con la respuesta a condiciones de déficit hídrico *in vitro*, demostrándose comportamiento independiente.

#### LITERATURA CITADA

- Balzarini, M; Di Rienzo, JA. 2012. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Bañuelos-Balandrán, JJ; Mayek-Pérez, N. 2008. Evaluación no destructiva de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 26(1):71-75.
- Beas, R; Reyes, MC; Medina, M. 2004. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de Aguascalientes: relación patogénica y genética con aislamientos de otras regiones de México. Revista Mexicana de Fitopatología 22(002):172-177.
- Botstein, D; White, R; Skolmick, H; Davis, R.1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisn. American Journal of Human Genetics 32:314-331.
- Cervantes-García, D; Padilla-Ramírez, DJ; Simpson, J; Mayek-Pérez, N. 2003. Osmotic potential effects on *in vitro* growth, morphology and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina*. Journal of Phytopathology 151:456-462.
- Di Rienzo, JA; Balzarini, M; Casanoves, F; González, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2012. InfoStat, versión 2012. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Edraki, V; Banihashemil, Z. 2010. Phenotypic diversity among isolates of *Macrophomina phaseolina* and its relation to pathogenicity. Iran Journal Plant Pathology 46(4):93-100.
- González, F; Frías, GA; García, A; Flores, A.2000. Resistencia de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a razas de *Colletotrichum lin demuthianum* (Sacc. y Magn.). Revista Mexicana de Fitopatología 18(2):87-91.
- González, R; Pineda, J; Graterol, Y.2007. Cuantificación de inóculo en el suelo e incidencia de *Macrophomina phaseolina* sobre híbridos de sorgo en tres localidades de los llanos centro occidentales de Venezuela. Revista Facultad Agronomía (LUZ) 24:227-241.
- Goudarzi, A; Banihasheni, Z; Maftoun, M. 2008. Effect of water potential on sclerotial germination and mycelial growth of *Macrophomina phaseolina*. Phytopathologia Mediterranea 47:107-114.
- Gupta, CY; Romero-Severson, J; Owen, JL. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics 89(7-8):998-1006.
- Gutiérrez, B; González, MS; Salih, A.2009. Evaluación del tizón foliar causado por *Rhizoctonia solani* en cultivares de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Fitopatología Venezolana 22:21-22.

- Gutiérrez, B; Molina, S; Alvarado-Capó, Y; Pérez-Martínez, S. 2014. Caracterización de aislados de *Macrophomina phaseolina* por su respuesta a diferentes potenciales osmóticos y mediante AFLP. *Biotecnología Vegetal* 14(1):45-53.
- Linhai, W; Yanxin, Z; Donghua, L; Junbin, H; Wenliang, W; Haixia, L. 2011. Variations in the isolates of *Macrophomina phaseolina* from sesame in China based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) and pathogenicity. *African Journal of Microbiology Research* 5:5584-5590.
- Mahdizadeh, V; Safaie, N; Goltapeh, EM. 2011. Diversity of *Macrophomina phaseolina* based on morphological and genotypic characteristics in Iran. *Journal of Plant Pathology* 27(2):128-37.
- Mahdizadeh, V; Safaie, N; Goltapehm, EM. 2012. Genetic diversity of Sesame isolates of *Macrophomina phaseolina* using RAPD and ISSR markers. *Trakia Journal of Sciences* 10(2):65-74.
- Martínez-Hilders, A; Laurentin, H. 2012. Caracterización fenotípica y molecular de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. proveniente de la zona de producción de ajonjolí en Venezuela. *Bioagro* 24(3):187-196.
- Mayek-Pérez, N; López-Castañeda, C; López-Salinas, E; Cumpián-Gutiérrez, J; Acosta-Gallegos, J. 2001. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol común en condiciones de campo en México. *Agrociencia* 35:649-661.
- Mayek, N; López, E; Cumpián, J; Acosta, J. 2004. Reacción de germoplasma de frijol común a *Macrophomina phaseolina* en condiciones de riego-secano en Veracruz, México. *Agronomía Mesoamericana* 15(1):45-51.
- Muñoz-Cabañas, R; Hernández, S; Mayek, N. 2005. Análisis patogénico y genético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes hospedantes. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(001):1-18.
- Purkayastha, S; Kaur, B; Dilbahi, N; Chaudhury, A. 2006. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathology* 55:106-116.
- Ragagnin, V; Sanglard, D; De Sousa, TL; Costa, L; Moreira, M; Barros, E. 2005. A new inoculation procedure to evaluate angular leaf spot disease in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) for breeding purposes. *Bean Improvement Cooperative* 48:90-91.
- Reyes-Franco, MC; Hernández-Delgado, S; Medina-Fernández, M; Mayek-Pérez, N. 2005. Genetic variability of *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot in common beans. The XLVIII Report of the Bean Improvement Cooperative N° 48.
- Tijerina-Ramírez, N; Lira-Méndez, K; Moreno-Medina, V; González-Prieto, J; Mayek-Pérez, N. 2014. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos de *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Micología* 39:31-39.
- Ziethiewicz, E.; Rafalski, A; Labuda, D. 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.