

**Estandarización de Marcadores Moleculares para la Identificación Taxonómica del
Agente Causal de la Mancha Anillada en Cultivos de Frijol en Colombia**

John Edinson Sepúlveda Castañeda

Trabajo presentado como requisito para optar a título de Biólogo

Directora
Luz Nayibe Garzón Gutiérrez
Ph.D. Ciencias agropecuarias área agraria
Codirector
Fernando Rondón González
Ph.D. Ciencias-Biología

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias Básicas
Escuela de Biología
Bucaramanga
2018

Agradecimientos

Al departamento administrativo de ciencia, tecnología e innovación -COLCIENCIAS- por la financiación de este proyecto y al Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT- por brindar el espacio para desarrollar actividades competentes del proyecto.

A mi familia, especialmente a mis padres Luis Sepulveda y Mariluz Castañeda por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera profesional.

A la profesora Luz Nayibe Garzón Gutiérrez por la oportunidad, la guía y la confianza brindada en la realización de este proyecto.

Al profesor Fernando Rondón por el aporte de sus conocimientos en el desarrollo de este proyecto.

A los integrantes del laboratorio de fitopatología de fríjol en CIAT por su colaboración, enseñanza y acompañamiento.

A mis compañeras de carrera Angie Duarte, Leydy Aceros y Silvia Florez por su amistad, compañía y experiencias vividas en la carrera.

A mis compañeros del laboratorio de Genética y Biotecnología por su apoyo y sus oportunos comentarios en el desarrollo de mi trabajo.

A Yuranis Miranda por su acompañamiento y amistad en la elaboración de este trabajo.

A la Universidad Industrial de Santander y los docentes de la escuela de biología que aportaron a mi desarrollo personal como investigador.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	12
1 Objetivos.....	14
1.1 <i>Objetivo general.....</i>	<i>14</i>
1.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>14</i>
2 Marco referencial	15
2.1 <i>Generalidades del frijol común (Phaseolus vulgaris).....</i>	<i>15</i>
2.1.1 Taxonomía	15
2.1.2 Producción y cultivo de frijol en Colombia.....	15
2.2 <i>La enfermedad de la mancha anillada.....</i>	<i>16</i>
2.2.1 Sintomatología.....	16
2.2.2 Pérdidas de cultivo por la enfermedad.....	17
2.2.3 Especies asociadas a la mancha anillada (taxonomía).....	18
2.3 <i>Aislamiento del patógeno.....</i>	<i>19</i>
2.4 <i>Marcadores moleculares</i>	<i>20</i>
2.5 <i>Estudios con marcadores moleculares relacionados con Boeremia spp y Stagonosporopsis hortensis</i>	<i>20</i>
3 Metodología.....	21
3.1 <i>Cultivo monomicelial a partir de muestras recolectadas en los departamentos de Huila y Tolima</i>	<i>22</i>

3.1.1 Obtención de las muestras.....	22
3.1.2 Aislamiento del patógeno.....	23
3.1.3 Obtención de cultivo monomicelial y conservación..	23
3.2 <i>Identificación taxonómica del agente causal de la mancha anillada, a partir de marcadores moleculares.</i>	24
3.2.1 Extracción de ADN.....	24
3.2.2 Visualización.....	27
3.2.3 Purificación y secuenciación de ADN.....	27
3.2.4 Análisis de datos.....	27
4 Resultados	36
4.1 <i>Aislamientos monomiceliales y colección de patógenos del CIAT.</i>	36
4.2 <i>Estandarización de los marcadores moleculares y resultados en GenBank</i>	37
4.3 <i>Marcadores moleculares para la determinación taxonómica del agente causal de la mancha anillada</i>	41
5 Discusión.....	45
6 Conclusiones.....	54
Referencias Bibliográficas.....	56
Apéndices.....	63

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Síntomas de la mancha anillada en frijol, anillos concéntricos en hoja (A) y en vaina (B).	17
Figura 2. Diferencias morfológicas entre las muestras colectadas nivel de síntomas (A) y en la tonalidad de la colonia (B).	37
Figura 3. Productos de PCR con los marcadores TUB e ITS 5-4.	40
Figura 4. Productos de PCR con los marcadores EF-1 α -C y CAL.	40

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Aislamientos de la colección de mancha anillada del CIAT utilizados en el presente estudio.	24
Tabla 2. Marcadores moleculares evaluados en ocho aislamientos de la colección de mancha anillada del CIAT.....	29
Tabla 3. Condiciones de amplificación para quince marcadores moleculares según lo reportado por cada autor.....	33
Tabla 4. Condiciones de amplificación de 10 marcadores estandarizados.....	39
Tabla 5. Identificación del agente causal de la mancha anillada con BLAST.....	41

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Protocolo modificado de limpieza de productos de PCR con kit PROMEGA.....	63
Apéndice B. Alineamiento de los aislamientos con la secuencia KY484672.1 correspondiente a <i>B. noackiana</i> con el marcador ITS 1-4.	64
Apéndice C. Alineamiento de los aislamientos con la secuencia MF435055.1 correspondiente a <i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i> con el marcador ITS 5-4.....	65
Apéndice D. Alineamiento de los aislamientos con la secuencia KY484730.1 correspondiente a <i>B. diversispora</i> con el marcador LSU.....	66
Apéndice E. Alineamiento de los aislamientos con la secuencia GU237514.1 correspondiente a <i>B. noackiana</i> con el marcador TUB.....	67
Apéndice F. Alineamiento de los aislamientos con la secuencia KY484730.1 correspondiente a <i>B. noackiana</i> con el marcador EF-1 α -C.....	68
Apéndice G. Alineamiento de los aislamientos con la secuencia KT389581.1 correspondiente a <i>B. noackiana</i> con el marcador rpb2.	69
Apéndice H. Alineamiento de los aislamientos con la secuencia KY484626.1 correspondiente a <i>B. noackiana</i> con el marcador CAL.....	71
Apéndice I. Alineamiento de los aislamientos con la secuencia EU880881.1 correspondiente a <i>B. noackiana</i> con el marcador ACT.....	73
Apéndice J. Tabla resumen de los resultados obtenidos en BLAST.	74

Resumen en Español

TÍTULO: ESTANDARIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA ANILLADA EN CULTIVOS DE FRÍJOL EN COLOMBIA*

AUTOR: JOHN EDINSON SEPULVEDA CASTAÑEDA**

PALABRAS CLAVES: MARCADOR MOLECULAR, COMPLEJO PHOMA, ITS, *ASCOCHYTA*, *BOEREMIA*.

DESCRIPCIÓN:

La mancha anillada del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), a nivel global, es una enfermedad asociada a tres especies fúngicas (*Boeremia diversispora*, *B. exigua* var. *exigua* y *Stagonosporopsis hortensis*) que puede ocasionar grandes pérdidas en producción. A pesar del gasto que genera el manejo de esta enfermedad no se conoce cuál de las tres especies asociadas a la mancha anillada es la que afecta a los cultivos de los principales departamentos productores del país. Por esta razón, el presente estudio logró ampliar la colección de patógenos del frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) con 206 aislamientos monomiceliales provenientes de los departamentos de Huila y Tolima. Adicional a esto, con fines de realizar la identificación taxonómica del agente causal de esta enfermedad se tomaron ocho aislamientos en los que se evaluaron quince marcadores moleculares: cuatro asociados a regiones del ADN ribosomal, dos al gen del citocromo c oxidasa, tres marcadores especie-específicos de tipo SCAR y seis marcadores asociados a genes codificantes para proteínas. Diez marcadores se estandarizaron, de los cuales se destacan los de actina, calmodulina y β -tubulina, dado que permitieron identificar con mayor precisión seis aislamientos como la especie *B. noackiana* y dos como *B. exigua* (diferentes variedades). Estos resultados son relevantes ya que es el primer trabajo que se realiza en el país enfocado al estudio de este patógeno, la evaluación preliminar con ocho aislamientos muestra que existen al menos dos especies asociadas a esta enfermedad y por primera vez se identifica a *B. noackiana* como patógeno asociado a la mancha anillada en frijol.

* Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Directora: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez

Resumen en Ingles

TITLE: STANDARDIZATION OF MOLECULAR MARKERS FOR THE TAXONOMIC IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF ASCOCHYTA BLIGHT IN COMMON BEAN CROPS IN COLOMBIA*

AUTHOR: JOHN EDINSON SEPULVEDA CASTAÑEDA**

KEYWORDS: MOLECULAR MARKERS, PHOMA COMPLEX, ITS, *ASCOCHYTA*, *BOEREMIA*.

DESCRIPTION:

Ascochyta blight of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L), globally, is a disease associated with three fungal species (*Boeremia diversispora*, *B. exigua* var. *exigua* y *Stagonosporopsis hortensis*) that can cause large losses in production. Despite the expense generated by the management of this disease, it is not known which of the three species associated to Ascochyta blight is the one that affects the crops of the main producing departments of the country. For this reason, the present study was able to expand the collection of bean pathogens of the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) with 206 monomycelial isolates from the departments of Huila and Tolima. In addition to this, for the purpose of taxonomic identification of the causal agent of this disease, eight isolates were taken in which fifteen molecular markers were evaluated: four associated with ribosomal DNA regions, two with the cytochrome c oxidase gene, three species-specific SCAR type molecular markers, and six molecular markers associated with protein-coding genes. Ten molecular markers were standardized, of which actin, calmodulin and β -tubulin stand out, since they allowed to identify with greater precision six isolates as the species *B. noackiana* and two as *B. exigua* (different varieties). These results are relevant because it is the first work carried out in the country focused on the study of this pathogen, the preliminary evaluation with eight isolates shows that there are at least two species associated with this disease and for the first time *B. noackiana* is identified as a pathogen associated with the Ascochyta blight of common bean.

* Thesis

**Faculty of basic sciences. Biology school. Director: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez

Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la leguminosa más importante en la agricultura a nivel global, debido a sus características nutricionales, su capacidad como fijador de nitrógeno y facilidad de cultivo en amplios rangos altitudinales que pueden llegar hasta los 3000 m s. n. m. (Pérez de la Vega, Santalla, y Marsolais, 2017). Sin embargo, esta planta se ha visto limitada por diversos factores, entre ellos, la presencia de agentes fitopatógenos fúngicos que provocan enfermedades, los cuales generan grandes pérdidas de rendimiento y conllevan altos costos de producción para su control (Arias Restrepo, Rengifo Martínez, y Jaramillo Carmona, 2007).

Una de las principales enfermedades que limita la producción de esta leguminosa y que ha sido reportada en Colombia es la mancha anillada, conocida como ascoquita del fríjol o «la gota». Esta enfermedad fúngica, afecta la planta tanto a nivel foliar como en vaina, ocasionando pérdidas en producción que pueden llegar hasta el 43% (Schwartz, 1981). A nivel global, se ha asociado a tres especies de hongos que producen una sintomatología similar: *Boeremia diversispora* (Bubák) Aveskamp, Gruyter y Verkley, *Boeremia exigua* var. *exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter y Verkley; y *Stagonosporopsis hortensis* (Sacc. y Malbr.) Petr (Boerema *et al.*, 1981; Ferreira, Campa y Pérez-Vega, 2016; Schmit y Baudoin, 1992). En Colombia esta enfermedad se ha asociado únicamente a *B. exigua* y *B. diversispora* (Castellanos *et al.* 2016).

En el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), se cuenta con una colección de aislamientos de hojas y vainas con síntomas característicos de la mancha anillada, provenientes de los departamentos de Antioquía, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca. En esta colección, sin embargo, no se han realizado aislamientos a partir de muestras de Huila y Tolima, a pesar de ser reconocidas como regiones con una amplia producción a nivel nacional. Además, un estudio preliminar con algunos aislamientos de esta colección (Blair *et al.*, 2011;

Garzón *et al.*, 2011) sugiere que el patógeno en las diferentes regiones puede presentar variación, teniendo en cuenta que al inocular los mismos genotipos de fríjol con aislamientos provenientes de varios departamentos, se obtuvo una respuesta de resistencia/susceptibilidad diferencial. Sin embargo, no se tiene certeza si esta respuesta se debe a variaciones del patógeno a nivel intraespecífico o interespecífico, puesto que nunca se ha realizado una caracterización taxonómica con los aislamientos de la colección. Las razones expuestas, entre otras, evidencian la falta de estudios de la mancha anillada en fríjol en varios aspectos, por lo que de manera interinstitucional (UIS, CIAT y la Universidad Nacional de Colombia) se está llevando a cabo el macroproyecto titulado «Análisis de la distribución y diversidad genética de *ascochyta* (*Boeremia* spp) en frijol, como herramienta para el desarrollo de cultivares mejorados y de la pequeña agricultura en Colombia», del cual hace parte el presente trabajo de grado. De esta manera, como primer objetivo en el presente trabajo se logró ampliar la colección de patógenos del CIAT mediante aislamientos monomiceliales de muestras de hoja y vaina con síntomas de la mancha anillada, colectadas en Huila y Tolima. Los otros objetivos se enfocaron en la estandarizaron de las condiciones de amplificación de varios tipos de marcadores moleculares y en un análisis preliminar en algunos aislamientos para determinar cuál era el más eficiente en la identificación taxonómica del patógeno. De esta manera se respondió a la pregunta de investigación ¿Cuál es el marcador molecular más eficiente para determinar la especie asociada a la enfermedad de la mancha anillada, presente en algunos cultivos de fríjol en los principales departamentos productores de Colombia? La información generada en el presente proyecto está siendo utilizada para la evaluación de la colección, lo que permitirá obtener un diagnóstico del agente causal de la enfermedad a nivel nacional.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar taxonómicamente el agente causal de la enfermedad de la mancha anillada del fríjol mediante el uso de marcadores moleculares en algunos aislamientos provenientes de regiones productoras en Colombia.

1.2 Objetivos Específicos

- Obtener los aislamientos monomiceliales del patógeno de muestras de hoja y vaina, infectadas con síntomas característicos de la mancha anillada, en los departamentos de Huila y Tolima.
- Estandarizar las condiciones de amplificación de los marcadores asociados a las regiones ITS, LSU, CAL, ACT, SSU, RPB2, TUB2, EF1a, COX I, COX II y marcadores moleculares específicos de tipo SCAR, en aislamientos provenientes de hojas con síntomas típicos de mancha anillada.
- Establecer el tipo de marcador más eficiente para la determinación taxonómica del agente causal de la mancha anillada, a partir de la evaluación de las regiones ITS, LSU, CAL, ACT, SSU, RPB2, TUB2, EF1a, COX I, COX II y marcadores moleculares específicos de tipo SCAR.

2. Marco Referencial

2.1 Generalidades del Frijol Común (*Phaseolus vulgaris*)

2.1.1 Taxonomía. La clasificación taxonómica más reciente es soportada por el grupo para la filogenia de las angiospermas -APG - (del inglés Angiosperm Phylogeny Group) (APG IV, 2016):

Clase:	Eudicotyledoneae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae (sin: Leguminoseae)
Subfamilia:	Faboideae (sin: Papilionoideae)
Género:	<i>Phaseolus</i>
Especie:	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Linnaeus, 1753)

2.1.2 Producción y Cultivo de Frijol en Colombia. A nivel global para el año 2016 la producción de frijol abarcó 26.833.394 t según el último registro de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). De este total, Colombia reportó tan solo 146.737 t (0.55%). Estas cifras reflejan el bajo desarrollo del cultivo en el país, lo que ha hecho que la producción no alcance para suplir la demanda interna y por esto se tengan que realizar importaciones que en algunos años han superado las 40.000 t (FAOSTAT, 2018).

En todas las regiones del país, el frijol es consumido por su alto valor nutricional que consta de proteína, fibra, carbohidratos complejos, vitaminas y micronutrientes, especialmente en su grano, aunque en algunas regiones y en dependencia de la variedad, pueden ser utilizadas otras partes de la planta (Lim, 2012). En el año 2017, según estadísticas aportadas por la Federación

Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas (Fenalce) , en el país se registró una producción total de 115.609 t, de las cuales Antioquia, Huila y Tolima aportaron 46.727 t, lo que equivale al 40 % de la producción nacional (Fenalce, 2018).

En estos departamentos la planta es cultivada desde los 800 a 2.900 m s. n. m. con temperaturas que oscilan entre los 10 °C y 27 °C (Jara y Giraldo, 2016; Lim, 2012). Estas condiciones de cultivo facilitan la aparición de múltiples variables medioambientales que limitan la producción, siendo las más comunes la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), la roya del fríjol (*Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*), el tizón bacteriano del fríjol (*Xanthomonas campestris*), el virus del mosaico común del fríjol (BCMV), el virus del mosaico dorado del fríjol (BGMV), la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) y la enfermedad de la mancha anillada (*Boeremia* spp, *S. hortensis*) (Graham y Ranalli, 1997; Pastor Corrales y Schwartz, 1994).

2.2 La Enfermedad de la Mancha Anillada

2.2.1 Sintomatología. La enfermedad de la mancha anillada también conocida como ascoquita del frijol (Peralta, Murillo, Mazón, Rodríguez, y Vega, 2016), phomopsis (Ferreira Rodríguez, 2013), *ascochyta blight* (Castellanos, Jara, y Mosquera, 2016), *black node disease* (G. H. Boerema, 2004), y reconocida por los agricultores del país como «la gota», es una enfermedad fúngica considerada emergente que se desarrolla en cultivos presentes en altitudes superiores a 1.500 m s. n. m., con temperaturas ambientales entre los 12 y 20 °C, y una humedad ambiental entre 80% y 100% (Castellanos et al., 2016; Peralta et al., 2016). Los síntomas de esta enfermedad pueden aparecer en cualquier parte de la planta, siendo más visibles en las hojas, donde en cada foliolo las lesiones se presentan como manchas pardas oscuras a negras que van

aumentando de tamaño, formando anillos concéntricos (**Figura 1B** **Figura 1A**). En la parte central de estas manchas se encuentran los cuerpos fructíferos (picnidios) como masas pequeñas de color negro. En los tallos se presenta necrosis en los nudos, la cual puede rodear el tallo, provocar su ruptura y la posterior muerte de la planta. Puede causar la putrefacción de las vainas y en las vainas maduras se presentan los anillos concéntricos característicos de este hongo, por lo que la semilla puede llegar a ser infectada (**Figura 1B**), convirtiéndose en un vector de transmisión (Buruchara, Mukaruziga, y Ampofo, 2010; Ferreira Rodríguez, 2013; Jara y Giraldo, 2016; Sartorato y Rava, 1994).

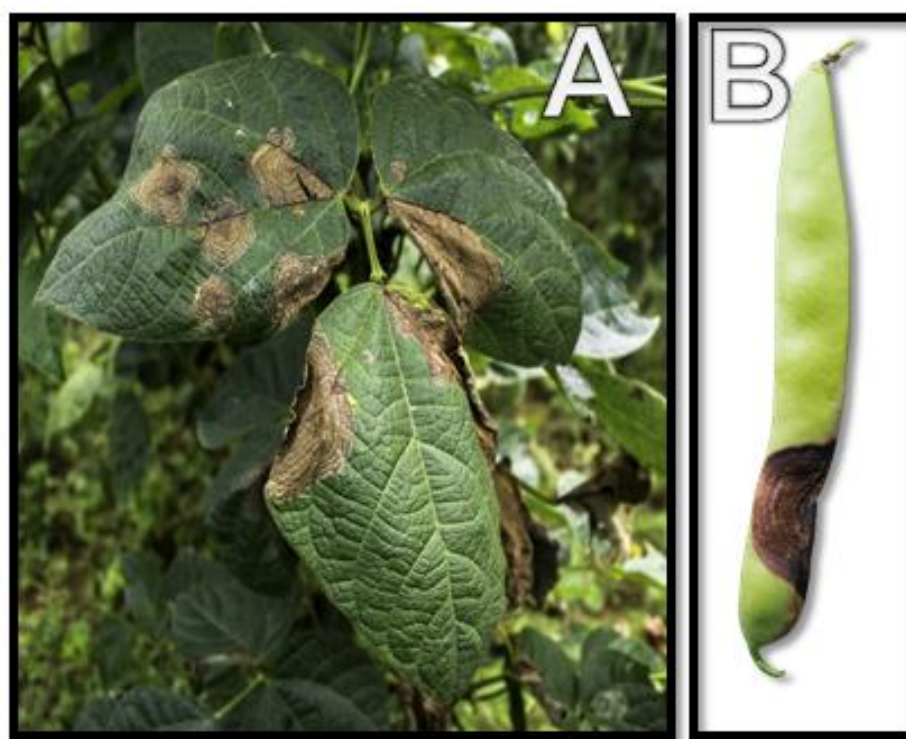


Figura 1. Síntomas de la mancha anillada en frijol, anillos concéntricos en hoja (A) y en vaina (B).

2.2.2 Pérdidas de Cultivo por la Enfermedad. Según Schwartz (1981) en cultivos controlados esta enfermedad puede ocasionar pérdidas desde 43% y si está asociada a otras enfermedades fúngicas como la mancha blanca de la hoja (*Pseudocercospora albida*) puede

llegar hasta a un 75 %. Por este motivo se ha establecido como una de las enfermedades con mayor incidencia y es considerada de importancia económica en varios países de Suramérica y África (Pastor Corrales y Schwartz, 1994).

2.2.3 Especies Asociadas a la Mancha Anillada (Taxonomía). Múltiples autores (G. Boerema et al., 1981; Castellanos et al., 2016; Ferreira et al., 2016; Pastor Corrales y Schwartz, 1994; Schmit y Baudoin, 1992) concuerdan en que la enfermedad de la mancha anillada es un término general que se designa a las infecciones ocasionadas por tres agentes fúngicos del filo Ascomycota, que pertenecen a la familia *Didymellaceae*: *Boeremia diversispora* (Bubák) (sinónimo: *Phoma diversispora*, *P. exigua* var. *diversispora*), *B. exigua* (Desm.) (Sinónimo: *Ascochyta phaseolorum* y *P. exigua* var. *exigua*) y *Stagonosporopsis hortensis* (Sacc. y Malbr.) (Sinónimo: *A. hortensis*). Desde su descripción inicial, estas especies se han agrupado en distintos géneros tales como *Phoma* o *Ascochyta* basándose únicamente en sus caracteres morfológicos y patogénicos (G. H. Boerema, 2004; G. H. Boerema, Pieters, y Hamers, 1993; de J. Gruyter, Noordeloos, y Boerema, 1998; Petrak, 1921; Van der Aa, Boerema, Gruyter, y others, 2000). Actualmente, mediante estudios de identificación de algunos estados teleomórficos, análisis filogenéticos con marcadores moleculares y otros caracteres morfológicos se han aceptado como pertenecientes a los géneros *Boeremia* y *Stagonosporopsis* (M.M. Aveskamp, de Gruyter, Woudenberg, Verkley, y Crous, 2010). Por esta razón, es frecuente encontrar ambigüedades taxonómicas en la literatura cuando se refiere a esta enfermedad.

2.3 Aislamiento del Patógeno

En las plantas se pueden diagnosticar múltiples enfermedades por observación directa. No obstante, la identificación de su agente causal puede ser más compleja y llevar a resultados erróneos, ya que más de un patógeno puede ocasionar visualmente los mismos síntomas, la sintomatología puede estar asociada a un complejo de especies o no haber producido las estructuras características de fructificación o esporulación (Agrios, 2005). Por esta razón, es necesario realizar el aislamiento del patógeno para observar las características macroscópicas (p.ej. color, forma, tasa de crecimiento de la colonia) y microscópicas (p.ej. forma de la conidia, presencia de picnidios), que permitan la identificación correcta. En hongos este procedimiento se puede realizar mediante cultivos monospóricos o monomiceliales (también conocidos como monohifales). En el caso de los cultivos monospóricos, se realiza el aislamiento a partir de una sola espora o conidia germinativa, esta técnica es utilizada en hongos con esporulación rápida y abundante. Los cultivos monomiceliales parten del aislamiento de una sola punta de hifa, y son útiles en hongos con esporulación tardía o poco abundante. Tanto la conidia como la hifa se siembran en un medio rico en nutrientes, con el fin de obtener una única colonia fúngica (Rangaswami y Bagyaraj, 2005).

El aislamiento mediante estos métodos asegura una cepa genéticamente pura, es decir, se garantiza que el cultivo proviene de una sola especie y cepa, de esta manera puede ser utilizada en pruebas de patogenicidad, caracterización morfológica, extracción de ADN micelial, entre otros (Castellanos et al., 2016).

2.4 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares consisten en un fragmento particular de ADN que es representativo en cierta región del genoma. Por lo cual, son considerados una herramienta biotecnológica que se emplea en estudios de diferenciación entre individuos, análisis filogenético y taxonómico, selección asistida, obtención de huella genética, entre otros (Canales, 2007). En comparación con otro tipo de marcadores como por ejemplo bioquímicos y morfológicos, los marcadores de ADN son estables y detectables en todos los tejidos, independientemente del crecimiento, diferenciación, desarrollo o estado de defensa de la célula (Ravi, Baunthiyal, y Saxena, 2014), y tienen la ventaja de cubrir ampliamente el genoma, lo que permite evaluar más eficientemente la diversidad genética en diferentes loci (Tigano-Milani et al., 1995). Entre los tipos de marcadores moleculares más comunes están aquellos que se basan en la técnica de PCR como los RAPDs, AFLP, microsatélites, SCAR, ITS y SNP (Ravi et al., 2014).

2.5 Estudios con Marcadores Moleculares Relacionados con *Boeremia spp* y *Stagonosporopsis hortensis*

Uno de los primeros estudios filogenéticos que implica a una de las especies asociadas con la enfermedad de la mancha anillada fue realizado por Abeln, Stax, De Gruyter, y Van Der Aa (2002), utilizando uno de los marcadores moleculares propuestos por White, Bruns, Lee, y Taylor (1990), asociados a la región del espaciador transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés). Posteriores estudios que incluyen a las tres especies que producen la enfermedad, han utilizado además de la región ITS, otros marcadores asociados al ADNr como aquellos que amplifican la región de la subunidad mayor del ribosoma (LSU) y la subunidad menor del ribosoma (SSU) (M.M. Aveskamp et al., 2010; Chen, Jiang, Zhang, Cai, & Crous, 2015),

marcadores que amplifican regiones codificantes de proteínas como el gen de actina (ACT), calmodulina (CAL), β – tubulina (TUB), la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (rpb2) y el factor de elongación de traducción 1 α (EF-1 α) (Maikel M. Aveskamp, Woudenberg, et al., 2009; M.M. Aveskamp et al., 2010; Berner et al., 2015; Chen et al., 2015; J. de Gruyter et al., 2012). Adicionalmente, para algunas especies del género *Boeremia* se desarrollaron marcadores moleculares especie-especifico de tipo SCAR (Maikel M. Aveskamp, Woudenberg, et al., 2009). Por otro lado, de manera general se ha sugerido que se utilicen marcadores moleculares asociados a regiones del citocromo c oxidasa (COX) como código de barras para hongos, ya que ha demostrado ser eficiente en otros grupos taxonómicos que involucran plantas y animales (Gupta y Singh, 2017).

Ferreira *et al.* (2016) desarrolló un estudio que tenía como uno de sus objetivos la identificación del patógeno que ocasiona esta enfermedad en cultivos de frijol al norte de España, en el cual mostró la efectividad del marcador de tipo ITS con el que determinó que el patógeno pertenecía al género *Boeremia* y con el marcador de tipo SCAR sugirió que la especie infectiva era *B. diversispora*.

3. Metodología

En el año 2017 se realizaron muestreos en los departamentos de Huila y Tolima con el fin de obtener hojas y vainas de frijol infectados con los síntomas característicos de la enfermedad de la mancha anillada. Estas muestras fueron enviadas al laboratorio de fitopatología del CIAT, donde se realizaron los procedimientos de limpieza, aislamiento del patógeno, cultivo monomicelial, conservación del aislamiento en la colección de patógenos y extracción de ADN siguiendo los protocolos establecidos en «*Bean pathogens: practical guide for lab and greenhouse work*»

propuesto por Castellanos *et al.* (2016). Se utilizaron quince marcadores moleculares asociados a distintas regiones del genoma, los amplicones del tamaño esperado fueron purificados y secuenciados. Finalmente, mediante el análisis de estas secuencias se estableció el marcador molecular más apropiado para la identificación taxonómica del agente causal de la mancha anillada, en muestras procedentes de algunas zonas productoras de fríjol en Colombia. Cada una de estas actividades se detalla a continuación.

3.1 Cultivo Monomicelial a partir de Muestras Recolectadas en los Departamentos de Huila y Tolima

3.1.1 Obtención de las Muestras. El muestreo en los departamentos de Huila y Tolima hizo parte del proyecto «Distribución, incidencia y severidad de la mancha anillada (*Boeremia* spp.) del fríjol en los departamentos de Antioquia, Tolima y Huila, Colombia» (Miranda-Montero *et al.*, 2018). Por lo tanto, la metodología respectiva se menciona de manera general. Por departamento se escogieron los cinco municipios con la más alta producción según el reporte de Fenalce (2018), y sin limitaciones en las vías de acceso. En cada uno se identificaron cinco veredas con cultivos en etapas R7 y R8, en las cuales se recolectaron hojas y vainas afectadas por el patógeno. En cada finca se realizó un trayecto en zig-zag y se tomaron cinco muestras de hoja y/o vaina. Las muestras se colocaron en servilletas y se almacenaron en bolsas de papel debidamente rotuladas, estas se mantuvieron en frío en una cava de icopor con hielo seco, hasta que se enviaron al laboratorio de fitopatología de fríjol en CIAT para realizar el aislamiento y el cultivo monomicelial e incluirlas en la colección de patógenos de esta institución.

3.1.2 Aislamiento del Patógeno. Cada muestra se cortó en trozos con tejido enfermo y sano de aproximadamente 0.5 cm y se desinfectaron de otros contaminantes, sumergiendo el tejido en una caja Petri de 60 mm con solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 minutos, etanol al 70% por 2 minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada en otra caja Petri. Los trozos se colocaron sobre toallas de papel estéril durante 30 minutos. Una vez secas, las muestras se sembraron en medio de cultivo agar de papa y dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) y se incubaron a 20 °C durante 10 días, tiempo en el que el hongo produjo micelio, picnidios y masas de conidias.

3.1.3 Obtención de Cultivo Monomicelial y Conservación. Se tomó un cuadrado de 0.5 cm del aislamiento obtenido en el acápite 3.1.2, se transfirió a una caja Petri y se incubó a 24 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo por medio de un estereoscopio se identificó la punta de una hifa en crecimiento, la cual se extrajo realizando un corte al agar con un alfiler estéril. El corte se llevó a una caja Petri con PDA fresco y se incubó a 24 °C por 10 días.

Este aislamiento monomicelial se utilizó para realizar la conservación del hongo, con el método de suspensión en solución de peptona [0.1 g/mL]-sucrosa [0.2 g/mL] en papel filtro. Para esto, se tomó el cultivo y se agregaron 2 mL de solución peptona-sucrosa y con una espátula se raspó la superficie del aislamiento para obtener una suspensión de micelio y conidias, en la cual se impregnaron 20 cuadros de papel filtro esterilizados de aproximadamente 0.5 cm; para eliminar el exceso de solución, se colocaron en un sobre de papel filtro y se incubaron a 24 °C por 7 días. Pasado este tiempo los cuadros correspondientes a cada aislamiento, se rotularon y almacenaron en sobres estériles de papel mantequilla y se conservaron a - 20°C.

3.2 Identificación Taxonómica del Agente Causal de la Mancha Anillada, a partir de Marcadores Moleculares.

3.2.1 Extracción de ADN. Para el proceso de estandarización de los marcadores, se seleccionaron siete aislamientos de manera aleatoria de los departamentos de Antioquia, Huila y Tolima, junto con el aislamiento ASC 001 del departamento del Cauca, el cual es utilizado por los investigadores del CIAT en inoculaciones tanto en campo como en invernadero (**Tabla 1**).

Tabla 1.

Aislamientos de la colección de mancha anillada del CIAT utilizados en el presente estudio.

ID	Departamento	Municipio	Variedad de hospedero
ASC 001	Cauca	Popayán	N/A
ASC 310	Antioquia	Marinilla	Cargamanto rojo
ASC 353	Antioquia	El Santuario	Cargamanto rojo
ASC 451	Tolima	Santa Isabel	Cargamanto rojo
ASC 485	Tolima	Anzoátegui	Bola roja
ASC 540	Huila	El Pital	Bola roja
ASC 571	Huila	Santa maría	Bola roja
ASC 617	Huila	La Plata	Cargamanto blanco

Para la reactivación de los aislamientos se tomó uno de los cuadros impregnados con el hongo y se sembró en el centro de una caja Petri con medio PDA. Al cabo de aproximadamente 10 días los aislamientos contaron con suficiente micelio para realizar el procedimiento de raspado con una espátula estéril. Se introdujeron en viales de vidrio de 5 mL rotulados, y se realizó el proceso de secado por liofilización a una temperatura de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 horas. La muestra

lío filizada se maceró con nitrógeno líquido, y se tomaron 0.3 g los cuales se depositaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Para la lisis celular, por muestra se precalentaron 700 μ L de buffer de extracción en baño María a 65°C, pasados 10 minutos se le adicionó al buffer 2.1 μ L de proteinasa K [10 mg/mL] (relación 3:1000) y esta mezcla se agregó al tubo que contenía el micelio macerado, se homogeneizó por vórtex y se precalentó en baño María mezclando por inversión del tubo cada veinte minutos, durante una hora. Posteriormente, para la precipitación de proteínas y otros contaminantes se agregó 350 μ L de acetato de amonio a 7.5 M, se mezcló por inversión, se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos. Para la precipitación de otras posibles moléculas remanentes del procedimiento anterior y evitar la aparición de espuma (reacción provocada por el sobrante del SDS en el buffer de extracción) se tomó el sobrenadante, se agregó 700 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo, se agregó isopropanol frío en relación 1:1 para aumentar la tasa de precipitación del ADN, se homogenizó por inversión y se incubó a -20 durante toda la noche. Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Para continuar con el proceso de limpieza y solubilizar las sales restantes se añadió 800 μ L de etanol frío al 70% y se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet por inversión a temperatura ambiente. Para mantener el ADN estable, el pellet se diluyó en 100 μ L de buffer TE 1X y para remover la posible presencia de ARN en la muestra se adicionaron 2 μ L de RNAasa [1mg/mL] con una incubación a 37 °C durante una hora. Finalmente, se almacenó a -20 °C. La concentración y calidad de las muestras se cuantificaron mediante un nanodrop 2000 (Thermo scientific) y se realizaron alícuotas con 20 ng/ μ L para los análisis posteriores.

Estandarización de marcadores moleculares para identificación taxonómica. En el Laboratorio de Genética y Biotecnología (LGB-UIS), adscrito a la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander, se llevó a cabo la estandarización de los marcadores moleculares. La selección de estos marcadores se realizó con base en distintos trabajos de filogenia relacionados con esta especie y con otras especies en su mayoría fúngicas. Estos marcadores se especifican en la **Tabla 2** y pueden ser agrupados en 3 tipos:

- Marcadores moleculares asociados a regiones específicas del ADN del patógeno: espaciador transcrito interno (ITS), subunidad mayor del ribosoma (LSU), subunidad menor del ribosoma (SSU), gen parcial de la calmodulina (CAL), gen parcial de actina (ACT), la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (rpb2), gen parcial de β -tubulina (TUB2) y factor de elongación de traducción 1α (EF- 1α -C-. -C hace referencia al marcador reportado por Carbone y Kohn (1999), se utilizó esta nomenclatura para diferenciarlo de otro marcador asociado a esta región).
- Marcadores moleculares específicos de tipo SCAR: H-CCT específico *Boeremia exigua* var. *exigua*, marcador de actina específico para *B. diversispora*, H-CCT específico *B. noackiana*.
- Marcadores moleculares de regiones de otras especies de hongos: factor de elongación de traducción 1α (EF- 1α -O. -O hace referencia al marcador reportado por O'Donnell *et al* (1998)), Citocromo oxidasa I (COX I), Citocromo oxidasa II (COX II).

En el proceso de estandarización por PCR se utilizaron reacciones de 10 μ L con 1.5 μ L de ADN genómico [\sim 20 ng/ μ L], 0.6 de cada primer [10 uM], 5 μ L de GoTaq® Green Master Mix [400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP y 3mM MgCl₂] y agua HPLC. Inicialmente se usaron las condiciones de amplificación propuestas por los autores (**Tabla 3**), sin

embargo, fue necesario realizar algunas modificaciones en el gradiente de temperatura, número de ciclos, volumen de primer y cantidad de ADN molde.

3.2.2 Visualización. El producto de PCR amplificado se verificó por electroforesis en gel de agarosa ultrapure (InvitroGen) al 2%, con buffer Tris (TBE) a 0.5 X y 2 μ L de SYBR *safe*, Hydragreen o EZ *vision*. El tiempo de corrida fue de 80 minutos a 100 V. Se sembraron 6 μ L de cada amplicón y 2 μ L de marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Scientific). La visualización de los fragmentos amplificados se realizó en trans-iluminador UV TFX-35 M (Life Technologies).

3.2.3 Purificación y Secuenciación de ADN. Los productos de PCR en los cuales se obtuvo una amplificación específica o se visualizó el fragmento del tamaño esperado, se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo un protocolo modificado de producto PCR, con base en lo propuesto por el distribuidor (Apéndice A). Finalmente, los fragmentos purificados fueron enviados a la empresa Macrogen, inc., donde se obtuvieron las secuencias en ambas direcciones (5'- 3' y 3'- 5').

3.2.4 Análisis de Datos. Las secuencias obtenidas se editaron con el software CodonCode Aligner v. 8.0.1 (CodonCode Corporation, www.codoncode.com) en el cual se eliminaron los extremos de cada secuencia que presentaran calidad inferior a 20 basado en el valor de Phred, de esta manera se obtuvo un *conting* de ambas secuencias. Se utilizó el software MEGA7: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets* (Kumar, Stecher, y Tamura, 2016), donde se realizó el alineamiento para cada marcador mediante el algoritmo de *Muscle* manteniendo los parámetros por defecto. Las secuencias obtenidas se compararon con las

publicadas en la base de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica en USA (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) por medio de la herramienta BLAST (Altschul, Gish, Miller, Myers, y Lipman, 1990; Morgulis et al., 2008)

Para definir el mejor marcador(es) para la identificación taxonómica del agente causal de la mancha anillada, se tuvo en cuenta el tamaño de la secuencia, el porcentaje de identidad y cobertura con las secuencias almacenadas en GenBank y la capacidad del marcador para discriminar a nivel de género y especie

Tabla 2.

Marcadores moleculares evaluados en ocho aislamientos de la colección de mancha anillada del CIAT.

Tipo de marcador	Marcador	Cebador	Secuencia	Forward/ Reverse	Referencia
Espaciador transcrito interno	ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	F	White <i>et al.</i> , (1990)
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	R	
		ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	F	
Subunidad menor del ribosoma	SSU	NS1	GTAGTCATATGCTTGCTC	F	
		NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	R	
Subunidad mayor del ribosoma	LSU	LR0R	GTACCCGCTGAACTTAAGC	F	Rehner y Samuels, (1994)
		LR7	TACTACCACCAAGATCT	R	Vilgalys y Hester, (1990)
Segunda subunidad	rpb2	RPB2- 5F2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	F	Liu, Whelen, y Hall, (1999)

Tipo de marcador	Marcador	Cebador	Secuencia	Forward/ Reverse	Referencia
mayor de la ARN polimerasa II		fRPB2-7cR	CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G)C CCAT	R	
gen parcial de β -tubulina	TUB	Btub2Fd	GTBCACCTYCARACCGGYCARTG	F	Woudenberg, Aveskamp, de Gruyter, Spiers, y Crous, (2009)
		Btub4Rd	CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTT GTC	R	
Gen parcial de la calmodulina	CAL	CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	F	Carbone y Kohn, (1999)
		CAL-737R	CATCTTTCTGGCCATCATGG	R	
Gen parcial de actina	ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	F	

Tipo de marcador	Marcador	Cebador	Secuencia	Forward/ Reverse	Referencia
		ACT- 783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	R	
Citocromo c oxidasa I	COX I	OomCox I-Levup	TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAA C	F	Bala, Robideau, Désaulniers, de Cock, y Lévesque, (2010)
		Fm85mo d	RRHWACKTGACTDATRATACCA AA	R	
Citocromo c oxidasa II	COX II	FM66	TAGGATTTC AAGATCCTGC	F	Martin, (2000)
		FM58	CCACAAATTC ACTACATTGA	R	
Factor de elongación de traducción 1 α	EF-1 α -C	EFI- 728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	F	Carbone y Kohn, (1999)
		EFI- 986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	R	

Tipo de marcador	Marcador	Cebador	Secuencia	Forward/ Reverse	Referencia
	EF-1 α -O	EF1	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC	F	O'Donnell, Kistler, Cigelnik, y Ploetz, (1998)
		EF2	GGAAGTACCAGTGATCATGTT	R	
SCAR <i>B. noackiana</i>	H-CCT	Noa 1-1	AGCCTCCAACGATCATAAG	F	Aveskamp, Woudenberg, <i>et al.</i> , (2009)
		Noa 1-2	TCAAGCACAAGTAGCACAAAAA	R	
SCAR <i>B. diversispora</i>	H-CCT	ACTdiv 76F	CAGCAGCACCCCTCCATTA	F	
		ACT- 783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	R	
SCAR <i>B. exigua</i> var. <i>Exigua</i>	Actina	Ex2-1	GCCCTGCAGACAATTTACGA	F	
		Ex2-2	GCCGATGAAAAGGAAAACCT	R	

Tabla 3.

Condiciones de amplificación para quince marcadores moleculares según lo reportado por cada autor.

Marcador	Ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Extensión		Pares de bases*	Fuente
		°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo		
TUB	35	94	30 seg	52	30 seg	72	30 seg	333	Woudenberg, Aveskamp, de Gruyter, Spiers, y Crous, (2009)
ACT	35	95	15 seg	61	20 seg	72	60 seg	300	Carbone y Kohn, (1999)
CAL	35	95	15 seg	55	20 seg	72	60 seg	350	
EF-1 α -C	35	95	15 seg	58	20 seg	72	60 seg	250	
ITS 5-4	25	95	30 seg	58	30 seg	72	2 min	315	White <i>et al.</i> , (1990)
ITS 1-4	25	95	30 seg	58	30 seg	72	2 min	290	
SSU	25	95	30 seg	56	30 seg	72	2 min	1152	
EF-1 α -O	35	95	35 seg	46	55 seg	72	90 seg	700	Leong, Latiffah, y Baharuddin,

Marcador	Ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Extensión		Pares de bases*	Fuente
		°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo		
									(2010)
RPB2	5 5 30	94	45 seg	60 58 54	45 seg	72	2 min	599	Chen et al., (2015)
LSU	35	94	1 min	50	1 min	72	2 min	~1400	Rehner y Samuels, (1994)
H-CCT <i>b.noa</i>	40	94	30 seg	60	30 seg	72	80 seg	482	Aveskamp, Woudenberg, <i>et al.</i> , (2009)
Actina <i>b.div</i>	40	94	30 seg	62	30 seg	72	80 seg	190	
H-CCT <i>b.exigua</i>	40	94	30 seg	60	30 seg	72	80 seg	368	
COX I	35	95	1 min	55	1 min	72	1 min	727	Robideau et al., (2011)

Marcador	Ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Extensión		Pares de bases*	Fuente
		°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo		
COX II	35	94	1 min	56	1 min	72	2 min	610	Bala et al., (2010)

Nota: El número de pares de bases presentado en esta tabla hace referencia a lo reportado por el correspondiente autor (es).

4. Resultados

4.1 Aislamientos Monomiceliales y Colección de Patógenos del CIAT.

Para el departamento del Tolima se procesaron 100 muestras, de las cuales se obtuvieron 99 aislamientos; en el caso de Huila a partir de 112 muestras fueron viables 107 aislamientos. En cada trifolio y vaina colectada se observaron los síntomas característicos de la enfermedad con algunas variaciones en área de infección y tonalidad (**Figura 2. A**). En medio PDA algunas colonias presentaron variaciones en la tonalidad de la coloración (gris oliváceo a oliváceo) (**Figura 2. B**) y la cantidad de picnidios y su agrupación (confluentes, solitarios o segregados). Sin embargo, la variación en estas características fue reportada por Boerema (2004), por lo cual dichas muestras no se descartaron. Los 206 aislamientos en total se incluyeron en la colección de patógenos del CIAT por lo que actualmente cuenta con 619 muestras del patógeno relacionado con la mancha anillada del fríjol en Colombia.



Figura 2. Diferencias morfológicas entre las muestras colectadas nivel de síntomas (A) y en la tonalidad de la colonia (B).

4.2 Estandarización de los Marcadores Moleculares y Resultados en GenBank

De los quince marcadores moleculares propuestos se estandarizaron diez (**Tabla 4**). Algunos detalles de los cinco marcadores que no se lograron estandarizar se presentan a continuación:

- Con las condiciones de amplificación reportadas y las modificaciones realizadas (a nivel de temperatura y concentración de ADN) para los marcadores COX I, COX II y el

marcador H-CCT para la especie *B. exigua* var. *exigua* no fue posible la amplificación por PCR y por lo tanto en la electroforesis no se visualizaron bandas.

- Uno de los marcadores moleculares relacionados al factor de elongación de traducción 1α (EF- 1α -O) presentó múltiples bandas inespecíficas, y a pesar de las modificaciones realizadas buscando la eliminación de estas, no fue posible su estandarización.
- Otro de los marcadores de tipo SCAR para la especie *B. diversispora* amplificó bandas tenues y por su calidad no fue posible obtener secuencias.

En los otros diez marcadores el procedimiento de estandarización fue efectivo, en la mayoría los aislamientos se obtuvo una banda de tamaño similar, por ejemplo, en la **Figura 3** se observa que todos los aislamientos amplificaron con el marcador asociado a la región de la β -tubulina con un tamaño cercano a las 380 pb, y el marcador de tipo ITS 5-4 con una banda de aproximadamente 530 pb. Sin embargo, para el marcador EF- 1α -C (**Figura 4**), el aislamiento 485 presentó una banda tenue con un tamaño de aproximadamente 500 pb, mientras que los demás aislamientos presentaron bandas con un tamaño aproximado de 320 pb, y en el marcador CAL únicamente el aislamiento 571 mostró una banda adicional cercana a las 800 pb.

Con los diez marcadores que se lograron estandarizar, en total se obtuvieron 80 secuencias, de las cuales seis no pudieron ser editadas debido a baja calidad. En la **Tabla 4** se presentan las condiciones finales de amplificación para cada marcador, el tamaño aproximado en pares de bases de acuerdo con la visualización en gel de agarosa y la secuencia final resultante del proceso de edición y alineamiento.

Tabla 4.*Condiciones de amplificación de 10 marcadores estandarizados.*

Marcador	Ciclos	Desnaturalización		Hibridación		Extensión		pb aprox*	pb final **
		°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo		
TUB	35	95	30 seg	57	30	72	80	380	342
ACT	35	94	30 seg	55.8	30	72	30	290	244
CAL	38	94	30 seg	48.2	30	72	30	460 /800	491
ITS 5-4	22	95	30 seg	48.5	30	72	80	540	529
ITS 1-4	22	95	30 seg	48.5	30	72	80	500	466
EF- 1 α -C	30	95	15 seg	51.2	20	72	60	500 /320	298
rpb2	35	95	45 seg	56	30	72	120	980	643
SSU	35	94	30 seg	54.1	30	72	30	120 0	994
LSU	35	94	60 seg	49	60	72	120	135 0	112 7
H- CCT	35	94	30 seg	54.4	30	72	80	490	416

*Nota:** En todos los casos la condición de desnaturalización inicial fue de 94 °C por 4 min y la extensión final de 72 °C por 10 min.

* Pares de bases aproximadas basándose en la visualización del gel de agarosa al 2%.

** Para de bases obtenidas después de la edición y el alineamiento de la secuenciación.

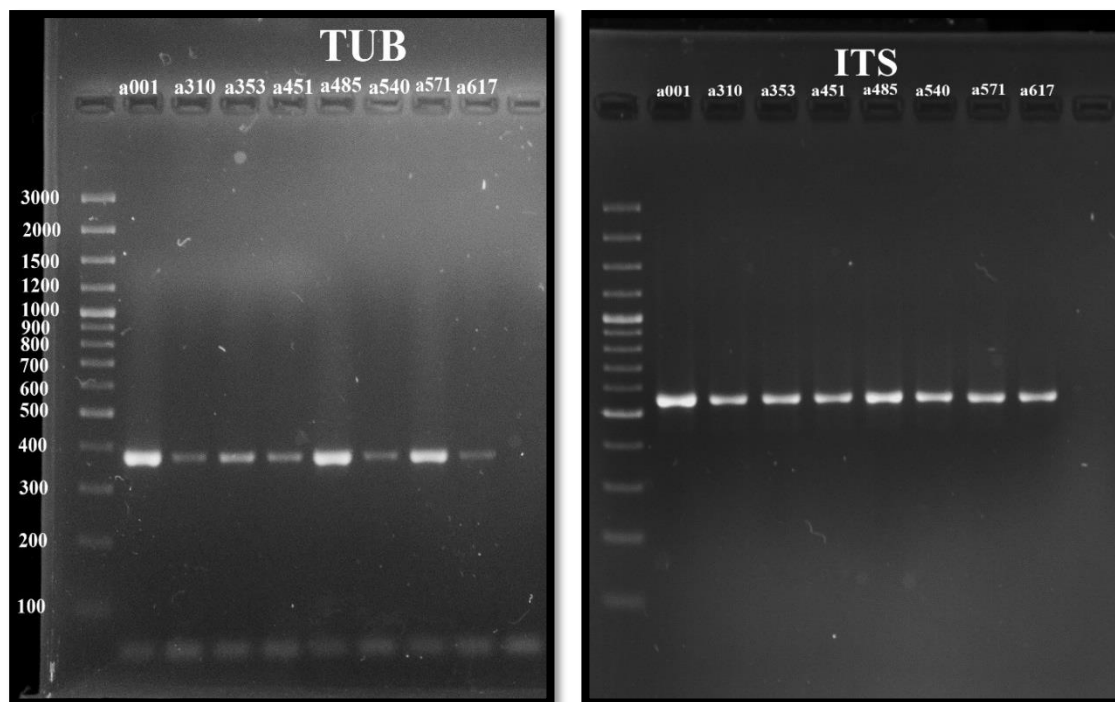


Figura 3. Productos de PCR con los marcadores TUB e ITS 5-4

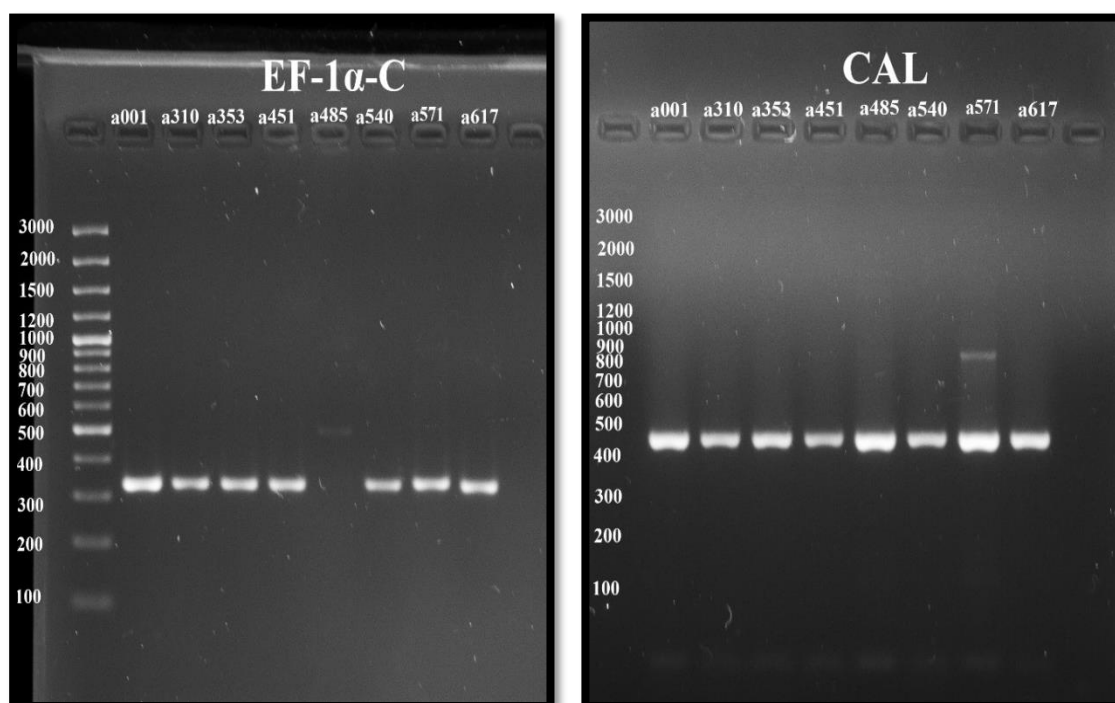


Figura 4. Productos de PCR con los marcadores EF-1 α -C y CAL.

4.3 Marcadores Moleculares para la Determinación Taxonómica del Agente Causal de la Mancha Anillada

En la **Tabla 5** y apéndice J se presentan los resultados de la identificación obtenidos mediante el análisis de las secuencias en BLAST. La mayoría de los marcadores identificaron para los aislamientos ASC 001, 310, 353, 451, 540 y 617, la especie *B. noackiana*, mientras que los demás aislamientos para la especie *B. exigua*.

Tabla 5.

Identificación del agente causal de la mancha anillada con BLAST.

Aislamiento	Marcador molecular	Análisis BLAST		
		Especie	Identidad	GenBank no.
ASC 001	ITS 1-4	<i>B. exigua</i>	100	AF268188.1
	ITS 5-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	MF435055.1
	SSU	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	AB454232.1
	LSU			
	TUB	<i>B. noackiana</i>	100	GU237514.1
	CAL	<i>B. noackiana</i>	100	KY484627.1
	ACT	<i>B. noackiana</i>	100	EU880881.1
	rpb2	<i>B. noackiana</i>	100	KT389581.1
	EF-1 α -C	<i>B. noackiana</i>	100	KY484729.1
	H-CCT	<i>B. noackiana</i>	99	EU880842.1
ASC 310	ITS 1-4	<i>B. exigua</i>	100	AF268188.1
	ITS 5-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	MF435055.1

Aislamiento	Marcador molecular	Análisis BLAST		
		Especie	Identidad	GenBank no.
	SSU	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	AB454232.1
	LSU	<i>B. diversispora</i>	100	GU237929.1
	TUB	<i>B. noackiana</i>	100	GU237514.1
	CAL	<i>B. noackiana</i>	100	KY484626.1
	ACT	<i>B. noackiana</i>	100	EU880881.1
	rpb2	<i>B. noackiana</i>	100	KT389581.1
	EF-1 α -C	<i>B. noackiana</i>	100	KY484730.1
	H-CCT	<i>B. noackiana</i>	99	EU880842.1
ASC 353	ITS 1-4	<i>B. exigua</i>	100	AF268188.1
	ITS 5-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	MF435055.1
	SSU	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	AB454232.1
	LSU	<i>B. diversispora</i>	100	GU237929.1
	TUB	<i>B. noackiana</i>	100	GU237514.1
	CAL	<i>B. noackiana</i>	100	KY484627.1
	ACT	<i>B. noackiana</i>	100	EU880881.1
	rpb2	<i>B. noackiana</i>	100	KT389581.1
	EF-1 α -C	<i>B. noackiana</i>	100	KY484729.1
	H-CCT	<i>B. noackiana</i>	99	EU880842.1
ASC 451	ITS 1-4	<i>B. exigua</i>	100	AF268188.1
	ITS 5-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	MF435055.1
	SSU	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	AB454232.1

Aislamiento	Marcador molecular	Análisis BLAST		
		Especie	Identidad	GenBank no.
	LSU	<i>B. diversispora</i>	99	GU237929.1
	TUB	<i>B. noackiana</i>	100	GU237514.1
	CAL	<i>B. noackiana</i>	99	KY484626.1
	ACT	<i>B. noackiana</i>	100	EU880881.1
	rpb2	<i>B. noackiana</i>	100	KT389581.1
	EF-1 α -C	<i>B. noackiana</i>	100	KY484729.1
	H-CCT	<i>B. noackiana</i>	99	EU880842.1
ASC 485	ITS 1-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	MH859844.1
	ITS 5-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	MH859610.1
	SSU	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	AB454232.1
	LSU	<i>B. exigua</i>	100	KR653195.1
	TUB	<i>B. exigua</i>	99	KT309470.1
	CAL	<i>B. exigua</i> var. <i>linicola</i>	99	KY484604.1
	ACT	<i>B. exigua</i>	100	LT158234.1
	rpb2	<i>B. trachelospermi</i>	99	KY064033.1
	EF-1 α -C			
	H-CCT			
ASC 540	ITS 1-4	<i>B. exigua</i>	100	AF268188.1
	ITS 5-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	MF435055.1
	SSU	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	AB454232.1
	LSU	<i>B. diversispora</i>	100	GU237929.1

Aislamiento	Marcador molecular	Análisis BLAST		
		Especie	Identidad	GenBank no.
	TUB	<i>B. noackiana</i>	100	GU237514.1
	CAL	<i>B. noackiana</i>	100	KY484627.1
	ACT	<i>B. noackiana</i>	100	EU880881.1
	rpb2	<i>B. noackiana</i>	100	KT389581.1
	EF-1 α -C	<i>B. noackiana</i>	100	KY484730.1
	H-CCT	<i>B. noackiana</i>	99	EU880842.1
ASC 571	ITS 1-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	MH859844.1
	ITS 5-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	MH859610.1
	SSU	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	AB454232.1
	LSU	<i>B. exigua</i>	100	KR653195.1
	TUB	<i>B. exigua</i>	99	MG029464.1
	CAL	<i>B. exigua</i> var. <i>linicola</i>	99	KY484604.1
	ACT	<i>B. exigua</i>	99	LT158234.1
	rpb2	<i>B. trachelospermi</i>	99	KY064033.1
	EF-1 α -C	<i>B. exigua</i> var. <i>pseudolilacis</i>	92	KT216075.1
H-CCT				
ASC 617	ITS 1-4			
	ITS 5-4	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	MF435055.1
	SSU	<i>B. exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	AB454232.1
	LSU	<i>B. diversispora</i>	100	GU237929.1
	TUB	<i>B. noackiana</i>	100	GU237514.1

Aislamiento	Marcador molecular	Análisis BLAST		
		Especie	Identidad	GenBank no.
	CAL	<i>B. noackiana</i>	100	KY484626.1
	ACT	<i>B. noackiana</i>	99	EU880881.1
	rpb2	<i>B. noackiana</i>	100	KT389581.1
	EF-1 α -C	<i>B. noackiana</i>	100	KY484730.1
	H-CCT	<i>B. noackiana</i>	99	EU880842.1

Nota: Las casillas grises corresponden a las secuencias que no pudieron ser analizadas.

5. Discusión

1. Cultivo Monomicelial.

Entre los métodos más comunes para la obtención de un micelio puro se encuentra el aislamiento mediante una espora o conidia (monospórico) y el aislamiento desde de una punta de hifa (monomicelial o monohifal) (Rangaswami y Bagyaraj, 2005). Aunque su objetivo es el mismo, en la práctica, estos procesos difieren en la estructura que se toma y el tiempo que transcurre mientras el hongo las produce. A pesar que la literatura generalmente muestra el método de cultivo monospórico como el más utilizado (Ferreira et al., 2016; Pfenning et al., 2014; Rivera, 2007), cuando se trabaja con una cantidad considerable de aislamientos, el cultivo monomicelial resulta ser más eficiente. Esto se debe a que para el cultivo monospórico se requiere el desarrollo completo de las estructuras reproductivas (picnidios). En el caso del agente causal de la mancha anillada, y según observación realizada en algunos aislamientos del laboratorio (datos no mostrados), la formación de picnidios y liberación de conidias se dio siempre entre el quinto y séptimo día después de la siembra, mientras que, para el cultivo

monomicelial las puntas de hifa pudieron ser tomadas al tercer o cuarto día después de la siembra, acelerando considerablemente el proceso.

Por esta razón, en el presente estudio se decidió realizar el cultivo monomicelial para los 206 aislamientos y como se observa en los resultados demuestra ser un método efectivo y recomendado.

2. Estandarización de Marcadores Moleculares.

En el proceso de estandarización de los marcadores moleculares se utilizó la solución GoTaq® Green Master Mix (Promega), la cual contiene todos los reactivos necesarios para la reacción PCR (Taq, dNTPs, y MgCl₂), por lo tanto, no se utilizaron las condiciones de amplificación sugeridas por los autores en cuanto a concentración de estos reactivos, sin embargo, para el procedimiento de amplificación por PCR se siguieron los parámetros establecidos en dichos estudios (**Tabla 3**). Debido a que no se logró visualizar una única banda, y, por el contrario, se observaron múltiples bandas inespecíficas, tenues y en algunos casos no se visualizó nada, para optimizar el protocolo de PCR se realizó una prueba de gradiente, lo cual permitió identificar la temperatura de hibridación óptima para diez de los quince marcadores moleculares propuestos. Estos resultados están acordes a lo establecido por Kennedy y Oswald (2011), quienes mencionan que uno de los factores más importantes en el proceso de amplificación por PCR es la temperatura de hibridación.

3. Marcadores no Estandarizados.

Dos de los cinco marcadores moleculares que no se lograron estandarizar corresponden a regiones que codifican para el gen del citocromo C oxidasa del ADN mitocondrial. Recientemente el Consorcio del Código de Barras de la Vida (CBOL) ha propuesto este gen como un marcador molecular por defecto para animales, algunos hongos y ficomicetes

(Dentinger, Didukh, y Moncalvo, 2011; Gilmore, GräFenhan, Louis-Seize, y Seifert, 2009; Gupta y Singh, 2017; Seifert et al., 2007). Los cebadores asociados a este gen y que fueron utilizados en el presente estudio han demostrado ser eficientes para la determinación de múltiples especies, principalmente del género *Phytium* y *Phytophthora*, motivo por el cual se han propuesto como marcadores útiles en código de barras (Martin, 2000; Robideau et al., 2011). Sin embargo, en las pruebas realizadas con los marcadores COX I y COX II en las cuales se utilizó un aislamiento de *Phytium* como control positivo, únicamente se visualizó la banda esperada con el marcador COX II en esta especie. Aun así, este resultado no es sorprendente debido a la distancia filogenética entre los hongos relacionados a la enfermedad de la mancha anillada y ficomicetes como aquellos del género *Phytium*.

Otro de los marcadores en los que no fue posible obtener una estandarización eficiente fue uno de los asociados al factor de elongación 1 alfa (EF-1 α -O), el cual amplifica una banda aproximada de 650 pb (O'Donnell, Kistler, Cigelnik, y Ploetz, 1998). En todas las pruebas realizadas con los aislamientos relacionados con la mancha anillada, siempre se obtuvieron dos bandas: una entre 600 y 700 pb y otra entre 1000 y 1100 pb, excepto para el aislamiento 485 en el cual no se observó amplificación. Debido a la presencia de la banda inespecífica no se consideró enviar a secuenciar estos amplicones. Aunque este marcador ha sido utilizado ampliamente para la determinación de especies de hongos del género *Fusarium* (Abd Murad, Mohamed Nor, Shohaimi, y Mohd Zainudin, 2017; Chehri, 2017; Li et al., 2014), en el presente estudio se determinó que con las condiciones evaluadas, no es adecuado para la determinación taxonómica del agente causal de la mancha anillada.

Los últimos marcadores moleculares que no fueron estandarizados son los especie-específicos desarrollados por Maikel M. Aveskamp, Woudenberg, *et al.*, (2009). El marcador H-CCT que

amplifica una banda de 368 pb, en la especie *B. exigua* var. *exigua* no amplificó, ni siquiera en los aislamientos ASC 485 y 571, los cuales de acuerdo con otros marcadores en el presente proyecto pertenecerían a la especie *B. exigua*. Suponiendo la efectividad del marcador como discriminante para *B. exigua* var. *exigua*, la falta de amplificación podría mostrar que ninguno de los aislamientos pertenece a esta variedad. Sin embargo, no es posible concluir algo al respecto, puesto que no fue posible incluir un control positivo.

Por otro lado, con el marcador de actina específico para *B. diversispora* (Aveskamp *et al.*, 2009), se obtuvo la banda esperada (aunque tenue) de aproximadamente 200 pb en todos los aislamientos, a excepción del 485 y el 571. Sin embargo, con el marcador H-CCT específico para la especie *B. noackiana*, también se observó una banda con el tamaño esperado en todos los aislamientos a excepción del 485 y el 571. Por tanto, en el presente trabajo ambos marcadores amplificaron una banda del tamaño esperado, por lo que no permiten llegar a una conclusión acerca de si corresponden a *B. diversispora* o a *B. noackiana*. Los amplicones obtenidos con el marcador H-CCT, se enviaron a secuenciar debido a la calidad de la banda obtenida, y esto permitió confirmar que los aislamientos que amplificaron la banda pertenecían a la especie *B. noackiana*. Estos resultados contrastan con lo expresado por Aveskamp *et al.* (2009), quienes propusieron el marcador de actina como específico para *B. diversispora*. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que este marcador puede estar amplificando una región conservada para *B. diversispora* y *B. noackiana*, ya que en estudios de análisis filogenéticos con hongos de la familia Didymelaceae estas dos especies siempre se agrupan en el mismo cluster (Abenl, 2002; Aveskamp *et al.*, 2010; Chen, 2015).

4. Marcadores Estandarizados Relacionados al ADNr

De los diez marcadores estandarizados y secuenciados, cuatro pertenecen a regiones asociadas al ADN ribosomal (ITS, SSU, LSU), cinco a regiones codificantes para proteínas (TUB, CAL, ACT, RPB2, EF-1 α -C) y el marcador H-CCT especie-específico de tipo SCAR para la especie *B. noackiana*. Según el análisis de las secuencias con los diferentes marcadores se conformaron dos grupos, el primero formado por los aislamientos 001, 310, 353, 451, 540 y 617 (denominado grupo 1) y un segundo grupo conformado por los aislamientos 485 y 571 617 (denominado grupo 2).

El marcador ITS el cual amplifica la región 5.8 S del ADN ribosomal (ADNr), tiene varias características que permiten su uso como marcador molecular para código de barras (Gupta y Singh, 2017; Schoch et al., 2012; Stielow et al., 2015). Sin embargo, algunos autores concuerdan en que tiene un bajo poder discriminativo para especies fúngicas estrechamente relacionadas, como los hongos asociados a la enfermedad de la mancha anillada (Abeln et al., 2002; M.M. Aveskamp et al., 2010; Chen et al., 2015; Kiss, 2012). En el presente estudio, los marcadores utilizados para amplificar esta región no fueron informativos. Para el marcador ITS 1-4 (466 pb), los aislamientos del primer grupo presentaron los mayores porcentajes de identidad con las especies *B. exigua* (100%) y *B. noackiana* (99%). Aunque al comparar las dos secuencias del GenBank son iguales, la accesión relacionada a *B. noackiana* es más corta, lo que explica por qué tiene un valor de identidad un poco más bajo. Por otro lado, con los aislamientos del grupo 2 se obtuvo un porcentaje de identidad de 100% con ocho especies distintas (*Boeremia exigua*, *B. exigua* var. *exigua*, *B. exigua* var. *heteromorpha*, *B. exigua* var. *pseudolilacis*, *B. telephii*, *B. foveata*, *Ascochyta abelmoschi*, *Phoma multirostrata*, *Coniothyrium fuscidulum*). Con este

marcador, la diferencia a nivel de secuencia entre los aislamientos de ambos grupos es dada solo por dos nucleótidos (posición 356 y 437; Apéndice B).

Con el marcador ITS 5-4 (529 pb) el grupo 1 presentó el mayor porcentaje de identidad con dos secuencias de *B. exigua* var. *exigua* (99%), mientras que el segundo grupo presentó una secuencia igual respecto a las especies *B. exigua* var. *pseudolilacis*, *B. exigua* var. *heteromorpha* y *A. abelmoschi*. La diferencia entre estos dos grupos de aislamientos fue por solo dos nucleótidos (posición 77 y 158; Apéndice C). En conjunto estos resultados permiten establecer que el marcador ITS no es eficiente para la discriminación de la especie que causa la mancha anillada en frijol, su utilidad se limita a la determinación a nivel de género.

Así mismo, algunos de los autores mencionados anteriormente (Maikel M. Aveskamp, Verkley, et al., 2009; Chen et al., 2015; Schoch et al., 2012), muestran en sus resultados que los demás marcadores asociados a regiones del ADNr (marcador SSU – 18S y LSU – 28S) son de utilidad limitada, ya que en sus estudios obtuvieron algunas secuencias similares e inclusive completamente idénticas para dos o más especies, aun así, afirman que estos marcadores pueden establecer una distinción a niveles taxonómicos superiores (p.ej. género o familia).

La falta de discriminación de estos marcadores también se comprobó en el presente estudio, puesto que para el LSU (1127 pb), los aislamientos del grupo 1 tienen el valor más alto de identidad con la especie *B. diversispora* (100%) y *B. noackiana* (99%), la diferencia en identidad se dio por un nucleótido (posición 408; Apéndice D). Para los aislamientos del segundo grupo se obtuvo el mayor porcentaje de identidad con secuencias completamente iguales a las especies *B. exigua*, *B. exigua* var. *linicola*, *Calophoma clematidina* y *Dothriorella ulmi*. Por último, con el marcador SSU (994 pb), todos los aislamientos tenían el máximo valor de identidad con secuencias reportadas para varias especies: *Charala* sp., *B. exigua* var. *exigua* y *P. macrostoma*

var. *incolorata* entre otras. Esto indica que las regiones amplificadas por estos marcadores son altamente conservadas a nivel de género y no son marcadores eficientes para la determinación del agente causal de la mancha anillada.

5. Marcadores Relacionados a Regiones Codificantes de Proteínas

A pesar de que los marcadores asociados a la región del ADNr son los más usados en estudios de filogenia en hongos, aquellos basados en regiones codificantes de proteínas han servido como marcadores complementarios y también han sido útiles para la creación de filogenias en distintos grupos, demostrando un poder de resolución superior a los marcadores de la región del ADNr (Aroca, Raposo, y Lunello, 2008; M.M. Aveskamp et al., 2010; Berner et al., 2015; Chen et al., 2015; Gupta y Singh, 2017; Marin-Felix et al., 2017; Mostert, Groenewald, Summerbell, Gams, y Crous, 2006). En el presente estudio, los marcadores que amplifican regiones codificantes de proteínas (β -tubulina (342 pb), actina (244 pb), calmodulina (491 pb), la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (643 pb) y el factor de elongación de traducción 1 α (298 pb)), fueron eficientes en la discriminación a nivel de especie, de esta manera los aislamientos del grupo 1 siempre fueron asociados con la especie *B. noackiana*.

Con el marcador TUB asociado a la región de β -tubulina, en el alineamiento de los aislamientos del grupo 1 (*B. noackiana*) con respecto a los aislamientos del grupo 2 (*B. exigua*) se obtuvo una diferencia en seis nucleótidos (apéndice E), que fue suficiente para discriminar estas dos especies. Esto concuerda con lo reportado por Chen *et al.* (2015) y Berner *et al.* (2015), quienes al realizar análisis filogenéticos en especies de la familia Didymellaceae, con varios marcadores, entre estos el TUB, lograron la identificación taxonómica a nivel de especie y por tanto una buena resolución de las filogenias.

El marcador EF-1 α -C al igual que el ya mencionado EF-1 α -O, no amplificó para el aislamiento 485 y a pesar de que, si se obtuvo una secuencia con buena calidad para el aislamiento 571, el porcentaje de identidad con respecto a las secuencias registradas en el GenBank fue bajo (92%) y correspondió a la variedad *B. exigua* var. *pseudolilacis*, por lo que no se puede establecer con seguridad este aislamiento pertenezca a esta especie. Algunos aislamientos del grupo 1 (001 y 353) presentaron variaciones de tres nucleótidos (Apéndice F), aun así, las secuencias en la base de datos relacionan estos aislamientos con *B. noackiana*.

Al comparar las secuencias de los dos grupos con el marcador rpb2 se presentaron 18 variaciones (Apéndice G), estas diferencias permitieron la identificación como *B. noackiana* para los aislamientos del grupo 1 y como *B. trachelospermi* para los del grupo 2. Este resultado es inesperado ya que con los otros marcadores la identificación de los aislamientos del grupo 2 como *B. exigua* fue consistente. Adicionalmente, *B. trachelospermi* fue recientemente descrita como patógeno de *Trachelospermum jasminoides* (Marin-Felix et al., 2017), una planta de la familia Apocynaceae, nativa de algunas regiones de Asia y de la cual no hay registro en Colombia. Esto puede indicar que la región rpb2 puede estar conservada entre *B. exigua* y *B. trachelospermi* por lo que este marcador no permite una clara diferenciación entre estas dos especies, sin embargo, es necesario contar con más secuencias para poder realizar una conclusión al respecto. A pesar de lo anterior, en el presente estudio se evidencia el poder de resolución del rpb2 (al diferenciar claramente los aislamientos del grupo 1 respecto al grupo 2), lo que concuerda con (Chen et al., 2015), quienes utilizando solamente este marcador lograron discriminar los 17 géneros utilizados en ese estudio. Estos resultados indican el poder de resolución para especies de la familia Didymellaceae del marcador rpb2.

El marcador CAL fue uno de los más eficientes, al hacer el análisis de las secuencias se presentaron 20 nucleótidos de diferencia (Apéndice H), que caracterizaron el grupo 1 como *B. noackiana* y el grupo 2 como *B. exigua*. La eficiencia de este marcador con diferentes especies de la familia Dydimellacea, solamente se ha registrado en el artículo de Berner *et al.* (2015), el cual, con el uso de este marcador junto con ACT, TUB, rpb2 e ITS logro la diferenciación de 21 especies.

Por último, con el marcador que amplifica para una región parcial del gen de actina (ACT) se obtuvo una diferenciación precisa, ya que los aislamientos del grupo 1 presentaron un alto valor de identidad con la especie *B. noackiana*, y en el caso de los aislamientos del grupo 2 el valor más alto de identidad fue con diferentes variedades de la especie *B. exigua* (var. *pseudolilacis*, *glivescens*, *rhapontica*, *heteromorpha*).

Llama la atención que al realizar el análisis del alineamiento junto con secuencias del GenBank, la diferencia de las secuencias del grupo 2 con *B. diversispora* se dio por tres nucleótidos en la posición 123, 131, 141 y por un INDEL de cinco nucleótidos en la posición 167 – 171 (Apéndice I). A pesar de que este marcador cuenta con una secuencia nucleotídica corta (204 pb), estas dos características podrían ser suficientes para discriminar entre *B. exigua*, *B. diversispora* y *B. noackiana*, sin embargo, se requiere hacer una evaluación con más aislamientos, para verificar si este resultado es consistente. Por esta razón, este marcador es un buen candidato para la identificación taxonómica del agente causal de la mancha anillada en el frijol.

En la literatura referente a el manejo y el control de la enfermedad de la mancha anillada en Colombia y en algunas regiones de Suramérica, la enfermedad ha sido asociada a las especies *B. diversispora* y *B. exigua* var. *exigua* (Buruchara et al., 2010; Castellanos et al., 2016; Pastor

Corrales y Schwartz, 1994; Peralta et al., 2016; Sartorato y Rava, 1994). Sin embargo, en el presente estudio, de ocho aislamientos tomados al azar, seis correspondieron a *B. noackiana*, por lo que es notable la presencia de esta especie como el agente causal de esta enfermedad, en algunas regiones productoras de frijol en el país y refleja la variabilidad que puede presentar este patógeno.

Por este motivo la información generada en el presente proyecto es de gran utilidad y servirá para realizar la identificación taxonómica del agente causal de la mancha anillada, a partir de marcadores moleculares, la cual se complementará con evaluaciones a nivel morfológico y patogénico, que se están llevando a cabo con un número representativo de aislamientos de la colección. Esto permitirá tener un diagnóstico de la enfermedad y su agente causal en diferentes zonas del país. Adicionalmente, estos resultados pueden ser útiles para futuros estudios filogenéticos tanto para investigadores a nivel nacional como de otras regiones donde esta enfermedad es limitante.

6. Conclusiones

- A partir de muestras de hoja y vaina con síntomas característicos de la mancha anillada, tomadas en zonas productoras de frijol, por medio de cultivos monomiceliales se obtuvieron 99 aislamientos de Tolima y 107 de Huila, con lo que se logró ampliar la colección de este hongo a 619 aislamientos.
- De los quince marcadores moleculares propuestos, se logró la estandarización de las condiciones de amplificación de diez, correspondientes a cuatro marcadores asociados a las regiones de ADNr (ITS1-4, ITS5-4, SSU y LSU), cinco correspondientes a regiones

codificantes para proteínas (ACT, CAL, TUB, rpb2 y EF-1 α -C) y el marcador molecular tipo SCAR específico para *B. noackiana* (H-CCT).

- Entre los marcadores estandarizados, los cinco que amplifican regiones codificantes de proteínas (ACT, CAL, TUB, rpb2 y EF-1 α -C) presentaron una mejor resolución y de manera general permitieron identificar seis aislamientos como *B. noackiana* y dos como *B. exigua*.

- De todos los marcadores evaluados, los que se recomiendan para usar en futuros estudios de identificación del agente causal de la mancha anillada, basado en su poder de resolución son el CAL, ACT y TUB.

Referencias Bibliográficas

- Abd Murad, N. B., Mohamed Nor, N. M. I., Shohaimi, S., & Mohd Zainudin, N. A. I. (2017). Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fruit rot disease in banana across Peninsular Malaysia. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(6), 1533–1546. <https://doi.org/10.1111/jam.13582>
- Abeln, E. C. A., Stax, A. M., De Gruyter, J., & Van Der Aa, H. A. (2002). Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. *Mycological Research*, *106*(4), 419–427. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005804>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed). Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *181*, 1–20.
- Arias Restrepo, J. H., Rengifo Martínez, T., & Jaramillo Carmona, M. (2007). *Manual técnico: buenas prácticas agrícolas (BPA) : en la producción de frijol voluble*. Medellín: Corpoica Mana FAO.
- Aroca, A., Raposo, R., & Lunello, P. (2008). A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the β -tubulin gene as the target sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(6), 1131–1140. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1647-3>
- Aveskamp, Maikel M., Verkley, G. J. M., de Gruyter, J., Murace, M. A., Perelló, A., Woudenberg, J. H. C., ... Crous, P. W. (2009). DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia*, *101*(3), 363–382. <https://doi.org/10.3852/08-199>
- Aveskamp, Maikel M., Woudenberg, J. H. C., De Gruyter, J., Turco, E., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2009). Development of taxon-specific sequence characterized amplified region (SCAR) markers based on actin sequences and DNA amplification fingerprinting

- (DAF): a case study in the *Phoma exigua* species complex. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00540.x>
- Aveskamp, M.M., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., & Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1–60. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- Bala, K., Robideau, G. P., Désaulniers, N., de Cock, A. W. A. M., & Lévesque, C. A. (2010). Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 22–31. <https://doi.org/10.3767/003158510X524754>
- Berner, D., Cavin, C., Woudenberg, J. H. C., Tunali, B., Büyük, O., & Kansu, B. (2015). Assessment of *Boeremia exigua* var. *rhapontica*, as a biological control agent of Russian knapweed (*Rhaponticum repens*). *Biological Control*, 81, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.009>
- Blair, M. W., Garzón, G., Nayibe, L., Jara, C., Castellanos, G., Mosquera, G., ... others. (2011). Resistance to and diversity of *Ascochyta* blight in common beans. *Annual report*.
- Boerema, G., Crüger, G., Gerlagh, M., & Nirenberg, H. (1981). *Phoma exigua* var. *diversispora* and related fungi on *Phaseolus* beans/*Phoma exigua* var. *diversispora* und verwandte Pilze an *Phaseolus*-Bohnen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 597–607.
- Boerema, G. H. (Ed.). (2004). *Phoma identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture*. Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA, USA: CABI Pub.
- Boerema, G. H., Pieters, R., & Hamers, M. E. C. (1993). Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Supplement Series 2c, d (additions and corrections): Fungi on field crops: pulse (legumes), forage crops (herbage legumes), vegetables and cruciferous crops. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(1), 1–29. <https://doi.org/10.1007/BF01999933>
- Buruchara, R., Mukaruziga, C., & Ampofo, K. O. (2010). Bean disease and pest identification and management. Recuperado de <http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/xmlui/handle/123456789/1163>

- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, *91*(3), 553. <https://doi.org/10.2307/3761358>
- Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2016). *Bean pathogens: practical guide for lab and greenhouse work*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Chehri, K. (2017). Molecular identification of entomopathogenic *Fusarium* species associated with *Tribolium* species in stored grains. *Journal of Invertebrate Pathology*, *144*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.003>
- Chen, Q., Jiang, J. R., Zhang, G. Z., Cai, L., & Crous, P. W. (2015). Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology*, *82*, 137–217. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- de Gruyter, J., van Gent-Pelzer, M. P. E., Woudenberg, J. H. C., van Rijswick, P. C. J., Meekes, E. T. M., Crous, P. W., & Bonants, P. J. M. (2012). The development of a validated real-time (TaqMan) PCR for detection of *Stagonosporopsis andigena* and *S. crystalliniformis* in infected leaves of potato and tomato. *European Journal of Plant Pathology*, *134*(2), 301–313. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9990-8>
- Dentinger, B. T. M., Didukh, M. Y., & Moncalvo, J.-M. (2011). Comparing COI and ITS as DNA Barcode Markers for Mushrooms and Allies (Agaricomycotina). *PLoS ONE*, *6*(9), e25081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025081>
- FAOSTAT. (2018). Crops - Statistical Databases. Recuperado el 22 de agosto de 2018, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fenalce. (2018). Indicadores cerealistas. Recuperado de <http://www.fenalce.org/archivos/Indicadorcerealista2017.pdf>
- Ferreira, J. J., Campa, A., & Pérez-Vega, E. (2016). Variation in the response to ascochyta blight in common bean germplasm. *European Journal of Plant Pathology*, *146*(4), 977–985. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0974-y>
- Ferreira Rodríguez, C. O. (2013). *Evaluación de la colección nuclear de judía frente a un aislamiento local de Phoma exigua var. Diversispora*.
- Gilmore, S. R., GräFenhan, T., Louis-Seize, G., & Seifert, K. A. (2009). Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 90–98. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02636.x>

- Graham, P. H., & Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1), 131–146. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00112-3)
- Gruyter, de J., Noordeloos, M. E., & Boerema, G. H. (1998). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)? I. 3. Section *Phoma*: Taxa with conidia longer than 7 μm . *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 16(4), 471–490.
- Gupta, V. K., & Singh, B. P. (Eds.). (2017). *Molecular markers in mycology: diagnostics and marker developments*. Cham: Springer.
- Jara, C., & Giraldo, D. (2016). *Manejo agronómico de fríjol. Cartilla 1*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Recuperado de <http://hdl.handle.net/10568/76299>
- Kennedy, S., & Oswald, N. (2011). *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*. Caister Academic Press. Recuperado de <https://books.google.com.co/books?id=oXoUkTSbnFgC>
- Kiss, L. (2012). Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), E1811–E1811.
- Leong, S., Latiffah, Z., & Baharuddin, S. (2010). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense isolates from Malaysia. *African Journal of Microbiology Research*, 4(11), 1026–1037.
- Li, P. P., Cao, Z. Y., Wang, K., Zhai, H., Jia, H., Liu, N., ... Dong, J. G. (2014). First Report of *Fusarium equiseti* Causing a Sheath Rot of Corn in China. *Plant Disease*, 98(7), 998–998. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1088-PDN>
- Lim, T. K. (2012). *Phaseolus vulgaris*. En T. K. Lim, *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants* (pp. 815–848). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0_92
- Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1799–1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>

- Marin-Felix, Y., Groenewald, J. Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S., Barnes, I., ... Crous, P. W. (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology*, 86(Supplement C), 99–216. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>
- Martin, F. N. (2000). Phylogenetic Relationships among Some Pythium Species Inferred from Sequence Analysis of the Mitochondrially Encoded Cytochrome Oxidase II Gene. *Mycologia*, 92(4), 711. <https://doi.org/10.2307/3761428>
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24(16), 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
- Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Gams, W., & Crous, P. W. (2006). Taxonomy and Pathology of Togninia (Diaporthales) and its Phaeoacremonium Anamorphs. *Studies in Mycology*, 54, 1–113. <https://doi.org/10.3114/sim.54.1.1>
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- Pastor Corrales, M. A., & Schwartz, H. F. (1994). *Problemas de producción del Frijol en los Trópicos*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Peralta, E., Murillo, A., Mazón, N., Rodríguez, D., & Vega, L. (2016). *Manual para el reconocimiento y control de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de fréjol (Phaseolus vulgaris L.) en Ecuador*. Quito, Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- Pérez de la Vega, M., Santalla, M., & Marsolais, F. (Eds.). (2017). *The Common Bean Genome*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63526-2>
- Petrak, F. (1921). Mykologische Notizen. *Annales Mycologici*, II, 19(1–2): 17–128.
- Pfenning, L. H., Costa, S. da S., Melo, M. P. de, Costa, H., Ventura, J. A., Auer, C. G., & Santos, Á. F. dos. (2014). First report and characterization of Fusarium circinatum, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39(3), 210–216. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000300004>

- Rangaswami, G., & Bagyaraj, D. J. (2005). *Agricultural microbiology* (2. ed., 6. printing). New Delhi: Prentice Hall of India.
- Ravi, I., Baunthiyal, M., & Saxena, J. (Eds.). (2014). *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1554-7>
- Rehner, S. A., & Samuels, G. J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98(6), 625–634. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80409-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80409-7)
- Rivera, L. J. R. (2007). *Diversidad genética de Colletotrichum lindemuthianum que afecta fríjol en las zonas productoras de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Santander*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Escuela de Posgrados.
- Robideau, G. P., De COCK, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., ... André Lévesque, C. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer: DNA BARCODING OF OOMYCETES WITH COI AND ITS. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Sartorato, A., & Rava, C. A. (1994). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. *EMBRAPA-CNPAP. Documentos*.
- Schmit, V., & Baudoin, J. P. (1992). Screening for resistance to *Ascochyta* blight in populations of *Phaseolus coccineus* L. and *P. polyanthus* Greenman. *Field Crops Research*, 30(1–2), 155–165. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(92\)90064-G](https://doi.org/10.1016/0378-4290(92)90064-G)
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schwartz, H. F. (1981). Dry Bean Yield Losses Caused by *Ascochyta*, Angular, and White Leaf Spots in Colombia. *Plant Disease*, 65(6), 494. <https://doi.org/10.1094/PD-65-494>
- Seifert, K. A., Samson, R. A., Houbraken, J., Lévesque, C. A., Moncalvo, J.-M., Louis-Seize, G., ... others. (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), 3901–3906.

- Stielow, J. B., Lévesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., ... Robert, V. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 242–263. <https://doi.org/10.3767/003158515X689135>
- Tigano-Milani, M. S., Honeycutt, R. J., Lacey, L. A., Assis, R., McClelland, M., & Sobral, B. W. (1995). Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(3), 274–282.
- Van der Aa, H., Boerema, G., Gruyter, J. de, & others. (2000). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) VI-1: section *Phyllostictoides*: characteristics and nomenclature of its type species *Phoma exigua*. *Persoonia*, 17(3), 435–456.
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238–4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. En *PCR Protocols* (pp. 315–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., de Gruyter, J., Spiers, A. G., & Crous, P. W. (2009). Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 22(1), 56–62. <https://doi.org/10.3767/003158509X427808>

Apéndices

Apéndice A. Protocolo modificado de limpieza de productos de PCR con kit PROMEGA.

1. Tener un producto de PCR de mínimo de 40 μ L.
2. Del kit PROMEGA, colocar las columnas dentro de los tubos y marcar los dos con el código respectivo.
3. En el tubo donde están almacenados los 40 μ L de PCR, adicionar 40 μ L de «*Membrane Binding Solution*».
4. Tomar estos 80 μ L y colocarlos en el centro de la columna.
5. Centrifugar a 16000 rpm / 1 min.
6. Sacar la columna, descartar el centrifugado y devolver la columna al tubo.
7. Adicionar en el centro de la columna 700 μ L de «*Membrane Wash Solution*».
8. Centrifugar a 16000 rpm / 1 min.
9. Sacar la columna y descartar el centrifugado.
10. Centrifugar la columna y el tubo sin adición de ninguna solución (para secar la columna) a 10000 rpm / 1 min.
11. Sacar la columna y colocarla dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 mL nuevo (marcar el tubo).
12. Adicionar en el centro de la columna 30 μ L «*Nuclease Free Water*» (Pueden ser 20 μ L si el amplificado es poco).
13. Centrifugar a 10.000 rpm / 1 min.
14. Descartar la columna y guardar el tubo con el amplificado PCR limpio a -20°C.
15. Para el envío a secuenciación, enviar 10 μ L de PCR limpio. Los otros 20 μ L, se guardan a -20 °C, por si se debe repetir la secuenciación el producto ya esté listo para envío.

Apéndice J. Tabla resumen de los resultados obtenidos en BLAST.

Aislamiento	MARCADORES										COLOR	ESPECIE
	ITS 1-4	ITS 5-4	SSU	LSU	ACT	Cal	TEF	TUB	RPB2	SCAR B. noa		
001	100-100	100-99	100-100		100-100	100-100	95-100	97-100	92-100	100-99		<i>B. noackiana</i>
310	100-100	100-99	100-100	100-100	100-100	100-100	93-100	97-100	92-100	100-99		<i>B. diversispora</i>
353	100-100	100-99	100-100	100-100	100-100	100-100	95-100	97-100	92-100	100-99		<i>B. exigua</i>
451	100-100	100-99	100-100	100-99	100-100	100-99	93-100	97-100	92-100	100-99		<i>B. trachelospermi</i>
485	100-100	100-99	100-100	100-100	100-100	100-99		100-99	100-99			No se pudo analizar
540	100-100	100-99	100-100	100-100	100-99	100-100	93-100	97-100	92-100	100-99		
571	100-100	100-98	100-100	100-100	100-99	100-99	100-92	100-99	100-99			
617		100-99	100-100	100-100	100-99	100-100	93-100	97-100	92-100	100-99		

Nota: Los números en cada casilla corresponde al porcentaje de cobertura y de identidad. Los colores representan la especie identificada y cada color es explicado en la tabla a la derecha.