

**Caracterización de líneas de frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a la mancha
angular (*Pseudocercospora griseola*).**

**Luis Alberto Monserrate Oyola
Henry Víctor Espinoza Delgado**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Caracterización de líneas de frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a la mancha
angular (*Pseudocercospora griseola*).**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Luis Alberto Monserrate Oyola
Henry Víctor Espinoza Delgado**

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2015

Caracterización de líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a la mancha angular (*Pseudocercospora griseola*).

Presentado por:

Luis Alberto Monserrate Oyola
Henry Víctor Espinoza Delgado

Aprobado por:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

John Jairo Hincapié DMV, Ph.D.
Director del Departamento de
Ciencia y Producción
Agropecuaria

Daniel Valle, Ing. Agr.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Caracterización de líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a la mancha angular (*Pseudocercospora griseola*).

Luis Alberto Monserrate Oyola
Henry Víctor Espinoza Delgado

Resumen. La mancha angular causada por el hongo *Pseudocercospora griseola* es una de las enfermedades más comunes en la producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), la cual en condiciones favorables causa pérdidas hasta de un 70% de la producción. Para seleccionar líneas de frijol común resistentes a la mancha angular es necesario la caracterización fenotípica con razas del hongo y el uso de marcadores moleculares SCAR (regiones amplificadas de secuencia caracterizada), ligados a caracteres de interés. El objetivo del estudio fue caracterizar la resistencia de líneas de frijol común a la mancha angular usando razas de *P. griseola* y marcadores moleculares. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con 12 tratamientos y cinco repeticiones cada una. Las líneas se sembraron en casa de malla con micro aspersión, usando maceteros de 20 cm de diámetro. Las plantas fueron inoculadas con inóculo (2×10^4 conidias/ml) de las razas 31-31, 63-31, 63-43 de *P. griseola*, a los 15, 22 y 29 días después de siembra (DDS). Se evaluó la reacción de las líneas de frijol desde la aparición de los síntomas típicos hasta la etapa de floración (30, 37 y 42 DDS) utilizando la escala de severidad de 1-9 (1-3= resistente; 4-6= intermedia; 7-9= susceptible) del CIAT (1987). Se identificó como resistentes a las líneas ALS 0532-6, ALS 0531-41, ALS 0532-38 y NIC 604-29 a las tres razas de *P. griseola*. Se determinó que estas líneas poseen los marcadores SCAR SNO2 y EACA/M CTT 330 de los genes *Phg-2* y *G10474*. La accesión andina G06727 con presencia del marcador SH13 del gen *Phg-1* presentó una reacción intermedia.

Palabras claves: Marcadores SCAR, razas patogénicas, reacción fenotípica, severidad de daños.

Abstract: The angular leaf spot caused by the fungus *Pseudocercospora griseola* is one of the most common diseases in the production of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), which under favorable conditions can cause production losses up to 70%. To select common bean lines resistant to angular leaf spot it is necessary phenotypic characterization of races of the fungus and the use of SCAR (sequence characterized amplified regions) molecular markers, linked to traits of interest. The main objective of the study was to characterize the resistance of common bean lines to angular leaf spot using races of *P. griseola* and molecular markers. The study was conducted using a randomized complete block design with 12 treatments and five repetitions. The lines were grown in an screen house with micro spray, using pots of 20 cm in diameter. The plants were inoculated with inoculum (2×10^4 conidia / ml) of the races 31-31, 63-31, 63-43 of *P. griseola*, at 15, 22 and 29 days after planting (DAP). The reaction of bean lines were

evaluated once typical symptoms were observed until the flowering stage (30, 37 and 42 DDS) using the 1 to 9 severity scale (1-3 = resistant; 4-6 = intermediate; 7-9 = susceptible) of CIAT (1987). The lines 0532-6 ALS, ALS 0531-41, 0532-38 and NIC 604-29 were resistant to the three races of *P. griseola*. It was determined that these lines have the SNO2 and EACA / M CTT 330 SCAR markers of the *Phg2* and G10474 genes. The andean accession G06727 with the presence of the SH13 marker of the *Phg-1* gene showed an intermediate reaction to all races.

Keywords: Pathogenic races, phenotypic reaction, disease severity, SCAR markers.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros y figuras.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	13
4. CONCLUSIONES.....	20
5. RECOMENDACIONES.....	24
6. LITERATURA CITADA.....	25

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Líneas de frijol común usadas para la evaluación fenotípica y molecular de la resistencia a <i>Pseudocercospora griseola</i> causante de la mancha angular.....	5
2. Procedencia de las razas utilizadas para la inoculación de líneas de frijol y la caracterización de su resistencia a <i>Pseudocercospora griseola</i> en Honduras.....	6
3. Determinación de las razas de <i>Pseudocercospora griseola</i> utilizadas en la inoculación para evaluar la resistencia a la mancha angular de líneas avanzadas de frijol común. Zamorano, Honduras, 2015.	6
4. Marcadores moleculares SCAR empleados en la identificación de la presencia de genes de resistencia a <i>Pseudocercospora griseola</i>	8
5. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo del SCAR SH13 para identificar la presencia del gen <i>Phg-1</i>	11
6. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo del SCAR SH13 para identificar la presencia del gen <i>Phg-1</i>	11
7. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo del SCAR SNO2 para identificar la presencia del gen <i>Phg-2</i>	11
8. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el marcador molecular SCAR SNO2 del gen <i>Phg-2</i>	12
9. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo del SCAR EACA/M-CTT 330 para identificar la presencia del gen de la accesión <i>G10474</i>	12
10. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330 del gen de la accesión <i>G10474</i>	12
11. Evaluación fenotípica de la resistencia de 10 líneas de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>) inoculadas con la raza 31-31 de <i>Pseudocercospora griseola</i> . Zamorano, Honduras 2015.....	15
12. Evaluación fenotípica de la resistencia de 10 líneas de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>) inoculadas con la raza 63-31 de <i>Pseudocercospora griseola</i> . Zamorano, Honduras, 2015.....	16
13. Evaluación fenotípica de la resistencia de 10 líneas de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>) inoculadas con la raza 63-43 de <i>Pseudocercospora griseola</i> . Zamorano, Honduras, 2015.....	17
14. Respuesta de 10 líneas y testigos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>) a la inoculación con tres razas de <i>Pseudocercospora griseola</i>	18
15. Identificación de genes de resistencia a <i>Pseudocercospora griseola</i> en líneas y testigos de frijol mediante marcadores moleculares SCAR.	22

1. Representación de la escala de severidad de daño (CIAT 1987) para la evaluación de la severidad de daños causados por <i>Pseudocercospora griseola</i> en plantas de frijol (1-3= resistente; 4-6= intermedia; 7-9= susceptible)..	7
2. Bandas generadas por el primer SH13 en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen <i>Phg-1</i> . E: Escalera molecular de 100 pb, + (control positivo, AND 277), - (control negativo, mezcla maestra sin ADN).....	19
3. Bandas generadas por el primer SNO2 en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen <i>Phg-2</i> . E: Escalera molecular de 100 pb, + (control positivo, AND 277), - (control negativo, mezcla maestra sin ADN).....	20
4. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen <i>G10474</i> . E: Escalera molecular de 100 pb, + (control positivo, AND 277), - (control negativo, mezcla maestra sin ADN)..	20

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de grano alimenticio más importante para consumo humano (Voyssest 2000). En Centroamérica, el frijol es un componente básico en la dieta por ser una de las fuentes más barata de proteína; adicionalmente es un cultivo importante en la generación de ingresos económicos para los pequeños productores (Martínez *et al.* 2004).

La mancha angular es una de las enfermedades más comunes en la producción de frijol. Es causada por el hongo *Pseudocercospora griseola*, causando severas pérdidas de rendimiento en países tropicales y subtropicales y está presente en más de 60 países alrededor del mundo (Guzmán *et al.* 1993). En condiciones favorables las pérdidas causadas por la mancha angular pueden llegar hasta un 70% de la producción (Sartorato y Rava 1992); en Centroamérica, las variedades susceptibles pueden sufrir daños de hasta un 80 % de la producción (Rosas 2003).

Cuando son infectadas por el patógeno, los síntomas en las plantas de variedades susceptibles normalmente se presentan en la cuarta semana después de la siembra (Araya y Hernández 2006). La mancha angular ataca al follaje, las vainas y las semillas del frijol. Los síntomas de la infección son comunes en las hojas y se presentan generalmente como lesiones angulares delimitadas por las nervaduras. Inicialmente aparecen en el envés de las hojas como pequeños puntos grises y, dependiendo de la variedad, pueden presentar un halo clorótico de márgenes indefinidos. En los folíolos de las hojas más desarrolladas, los lados de las lesiones son definidas por las nervaduras formando ángulos, del cual se deriva el nombre de la enfermedad (Castellanos *et al.* 2013). Ataques severos de esta enfermedad causan amarillamiento y caída de las hojas afectadas, lo que reduce el rendimiento cuando ocurre temprano en el ciclo del cultivo (Araya y Hernández 2006).

Las condiciones favorables podrían causar que las conidias germinen en tres horas, las esporas infectan el tejido de la hoja al penetrar a través de los estomas y destruyen la epidermis desintegrando las células del parénquima en empalizada (Liebenberg y Pretorius 1997). El desarrollo de la enfermedad se disemina más eficientemente con temperaturas moderadas, humedad continúa sobre el follaje y tallos, alternada con periodos de baja humedad y viento (Schwartz *et al.* 1982).

Las temperaturas entre 16 y 28 °C son propicias para el desarrollo de la mancha angular (León 2009), especialmente cuando las temperaturas son bajas y hay presencia de rocío en el ambiente (Paula y Zambolim 1998). El patógeno puede ser diseminado mediante las salpicaduras producidas por el agua de lluvia o de riego y mediante el viento, al arrastrar esporas provenientes de lesiones en esporulación de restos contaminados de cosechas anteriores (Moreno 1977). Se ha reportado que la transmisión del patógeno por semilla es muy baja (Schwartz *et al.* 1982).

La mancha angular posee extensa variabilidad genética, por lo que algunos genotipos evaluados hasta ahora son resistentes a unas razas y susceptibles a otras. En América Central se reportaron presencia de razas fisiológicas donde los aislamientos más virulentos fueron colectados en México y Honduras (Jara 1998). Existen dos acervos genéticos de frijol común, el andino que corresponde a la región andina y el mesoamericano que incluye México y Centroamérica (Gepts *et al.* 1991). Así mismo, también existen dos grupos de aislamientos de *P. griseola*, uno andino y otro mesoamericano que corresponden a los dos acervos genéticos de frijol común (Chacón *et al.* 1996).

En 1995 se aprobó el uso de un vivero de 12 genotipos diferenciales y su valor binario para la caracterización de razas de *P. griseola* desarrollado por el CIAT. Estos diferenciales se encuentran divididos en dos grupos: seis andinos (Don Timoteo, G11796, Bolón Bayo, Montcalm, Amendoin y G05686) y seis mesoamericanos (PAN 72, G2858, Flor de Mayo, México 54, BAT 332 y Cornell 49242) (Pastor-Corrales y Jara 1995).

El patógeno puede ser controlado con fungicidas pero debido al alto costo y dado que una parte importante de la producción de frijol es producida por agricultores de subsistencia, se les dificulta el acceso a estos fungicidas (García *et al.* 2006). El uso de variedades resistentes es considerado la principal práctica de manejo de *P. griseola* (Teixeira *et al.* 2003). En la mayoría de las regiones frijoleras, *P. griseola* es un problema serio debido a la falta de variedades de frijol resistentes a la enfermedad.

La mayoría de las fuentes resistentes registradas en otras regiones generalmente corresponden a variedades con resistencia a los aislamientos locales del patógeno en donde fueron identificadas (Pastor-Corrales y Schwartz 1994). Un claro ejemplo de esto fue la línea avanzada de CIAT, BAT 332 que se registró como resistente en países como Brasil (Mora *et al.* 1985), El Congo y Colombia (CIAT 1985); sin embargo, se comportó como susceptible en Argentina (Sartorato 1989). Las variedades resistentes en un determinado año no necesariamente son resistentes en los años siguientes por cuanto *P. griseola* es un hongo altamente variable (Busugoro *et al.* 1999)

Para seleccionar líneas de frijol común resistentes a la mancha angular, es necesario el uso de marcadores moleculares SCAR (regiones amplificadas de secuencia caracterizada), los cuales son *primers* (cebadores) específicos ligados a características de interés, ampliamente utilizados en el mapeo genético y en la selección asistida por marcadores moleculares (SAM) que determinan la presencia o ausencia de genes de resistencia (Herrera 2004). Los SCAR utilizan *primers* específicos de 20 a 30 pares de bases, diseñados a partir de secuencias establecidas mediante marcadores RAPD ligados a una característica de interés (Castro *et al.* 2003).

El presente estudio tiene como objetivos:

Caracterizar la resistencia de líneas avanzadas de frijol común a la mancha angular mediante su reacción a razas de *Pseudocercospora griseola*.

Identificar la presencia de marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia a razas específicas de *P. griseola* en las líneas avanzadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación del estudio.

Las evaluaciones de la resistencia de las líneas avanzadas de frijol desarrolladas por el Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de Zamorano a razas de *Pseudocercospora griseola*, se realizaron en casas de malla implementadas con un sistema de riego por micro aspersión en las facilidades PIF. Los análisis moleculares se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Zamorano se encuentra localizado a una altura de 800 msnm, con temperatura promedio de 24° C y precipitación promedio anual de 1100 mm.

2.2 Evaluación fenotípica con razas de *Pseudocercospora griseola* de Honduras.

2.2.1 Siembra.

Se hicieron tres siembras de las líneas y testigos en maceteros ubicados en casa de malla de 5 × 3 m para evaluar fenotípicamente la resistencia de estas líneas previamente identificadas como resistentes bajo inóculo natural a nivel de campo (Cuadro 1). Las líneas mejoradas por resistencia a la mancha angular provienen del programa de mejoramiento a través de la piramidización de genes resistentes a *P. griseola*. En la primera etapa del desarrollo se desarrollaron líneas resistentes conteniendo dos genes de resistencia, *Phg-1* y *Phg-2*, aportados por el padre andino G06727 (Guarzo Popayán) de Colombia, y el padre mesoamericano Tío Canela 75, respectivamente. Las líneas ALS 9951-42 y ALS 9951-62 seleccionada de la cruza de Tío Canela 75/G06727, fueron utilizadas como fuentes de los genes *Phg-1* y *Phg-2* en cruza con la línea MR13697-2-5, fuente del gen de resistencia identificado en la accesión *G10474* procedente de Guatemala, las que dieron como resultado las líneas incluidas en este estudio.

La unidad experimental consistió en un macetero con dos plantas por línea de frijol. Se utilizaron maceteros de 20 cm conteniendo un sustrato de suelo: compost (2:1). La siembra se realizó con semilla pre-germinada de las líneas de frijol. La casa de malla utilizada en el estudio tiene instalado un sistema de ventilación y micro aspersores que se encendieron cada 30 minutos por 30 segundos, para proveer condiciones favorables al desarrollo de la enfermedad, incluyendo alta humedad relativa (80-95%), temperatura

media (24-28°C) y una lámina de agua continua sobre la superficie de las hojas para facilitar la entrada del hongo por los estomas y la producción de lesiones típicas de la enfermedad.

Cuadro 1. Líneas de frijol común usadas para la evaluación fenotípica y molecular de la resistencia a *Pseudocercospora griseola* causante de la mancha angular.

Línea	Pedigrí
ALS 0546-78	Aifi Wuriti//F1(ALS9951-62/MR13697-2-5)
ALS 0532-6	Cardenal//F1(ALS9951-62/ MR13697-2-5)
ALS 0546-97	Aifi Wuriti //F1(ALS9951-62/MR13697-2-5)
ALS 0531-41	Amadeus77//F1 (ALS9951-42/MR13697-2-5)
ALS 0532-38	Cardenal//F1(ALS9951-62/ MR13697-2-5)
ALS 0531-97	Amadeus77//F1 (ALS9951-42/ MR13697-2-5)
ALS 0546-60	Aifi Wuriti //F1(ALS9951-62/MR13697-2-5)
ALS 0532-4	Cardenal//F1(ALS9951-62/ MR13697-2-5)
ALS 0626-35	Cardenal//F1(ALS 9951-62/MR 13697-2-5)
NIC 604-29	INTA Precoz// F1 SRS 2-31
G06727 (testigo resistente)	Guarzo-Popayán
Tio Canela 75 (testigo susceptible)	DOR483//F1(DOR391/PompadourJ)

2.2.2 Inoculación de las líneas de frijol con razas de *P. griseola*.

Las líneas avanzadas y los testigos fueron inoculados con inóculo de tres razas de *P. griseola* causante de la mancha angular. Estas razas provienen de aislamientos de muestras recolectados en la Vega 4, Zamorano, Departamento Francisco Morazán; Sulaco, Departamento de Yoro y El Barro, Departamento de El Paraíso, Honduras (Cuadro 2). La identificación de las razas se hizo utilizando la técnica del Vivero de Diferenciales de la Mancha Angular, asignándose valores binarios a los diferenciales que muestran susceptibilidad a un aislamiento determinado. La sumatorio de los valores binarios de todos los genotipos andinos y mesoamericanos determina la raza de *P. griseola* (Pastor-Corrales y Jara 1995).

Los resultados de las pruebas realizadas con los genotipos diferenciales de frijol que dieron lugar a las razas utilizadas como inóculo en el presente estudio se indican en el Cuadro 3.

Cuadro 2. Procedencia de las razas utilizadas para la inoculación de líneas de frijol y la caracterización de su resistencia a *Pseudocercospora griseola* en Honduras.

Raza	Aislamientos	Lugar de Recolección	Año
31-31	<i>Pg-V</i>	Vega 4, Zamorano, Francisco Morazán	2015
63-31	<i>Pg-Su</i>	Sulaco, Yoro, Honduras	2015
63-43	<i>Pg-EB</i>	El Barro, El Paraíso, Honduras	2015

Cuadro 3. Determinación de las razas de *Pseudocercospora griseola* utilizadas en la inoculación para evaluar la resistencia a la mancha angular de líneas avanzadas de frijol común. Zamorano, Honduras, 2015.

Razas	Asmto ^a	Andinos						Mesoamericanos					
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
		(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(32)	(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(32)
31-31	<i>Pg-Z</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
63-31	<i>Pg-Su</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
63-43	<i>Pg-EB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

^a: Aislamiento.

Diferenciales: Andinos (A: Don Timoteo, B: G11796, C: Bolón Bayo, D: Montcalm, E: Amendoin y F: G05686) y Mesoamericanos (G: PAN 72, H: G2858, I: Flor de Mayo, J: México 54, K: BAT 332 y L: Cornell 49242).

Reacción: Resistente (+); susceptible (-)

Para asegurar una buena infección durante la evaluación de la resistencia de las líneas de frijol, se realizaron tres inoculaciones, a los 15, 22 y 29 días después de la siembra (DDS), con cada una de las razas de *P. griseola*. El inóculo se obtuvo de aislamientos puros de las tres razas de *P. griseola*, los que se multiplicaron en medio V8 durante 12 días para producir un inóculo con una concentración de 2×10^4 conidias/ml. Por cada litro de inóculo se colocó una gota de Tween 20 para dispersar las esporas y facilitar su adhesión al follaje. La inoculación se hizo sobre el haz y el envés de las hojas con un atomizador Bilviss[®] adaptado a un compresor de 10 psi. Después de cada inoculación, las plantas pasaron un periodo de incubación de 48 horas, bajo riego por micro aspersión para promover la infección de las plantas.

2.2.3 Evaluación de la severidad de daño en las líneas y testigos.

Se evaluó la reacción de las 10 líneas y dos testigos de frijol usando inóculo puro de cada una de las tres razas de *P. griseola*, utilizando la escala de severidad de 1-9 (1-3= resistente; 4-6= intermedia; 7-9= susceptible) establecida por el CIAT (1987), y cuya severidad de daños en trifolios de frijol común se observan en la Fig. 1. La severidad de la

enfermedad en líneas de frijol fue evaluada en tres ocasiones, cada siete días desde la aparición de los síntomas típicos hasta la etapa de floración (30, 37 y 42 DDS).

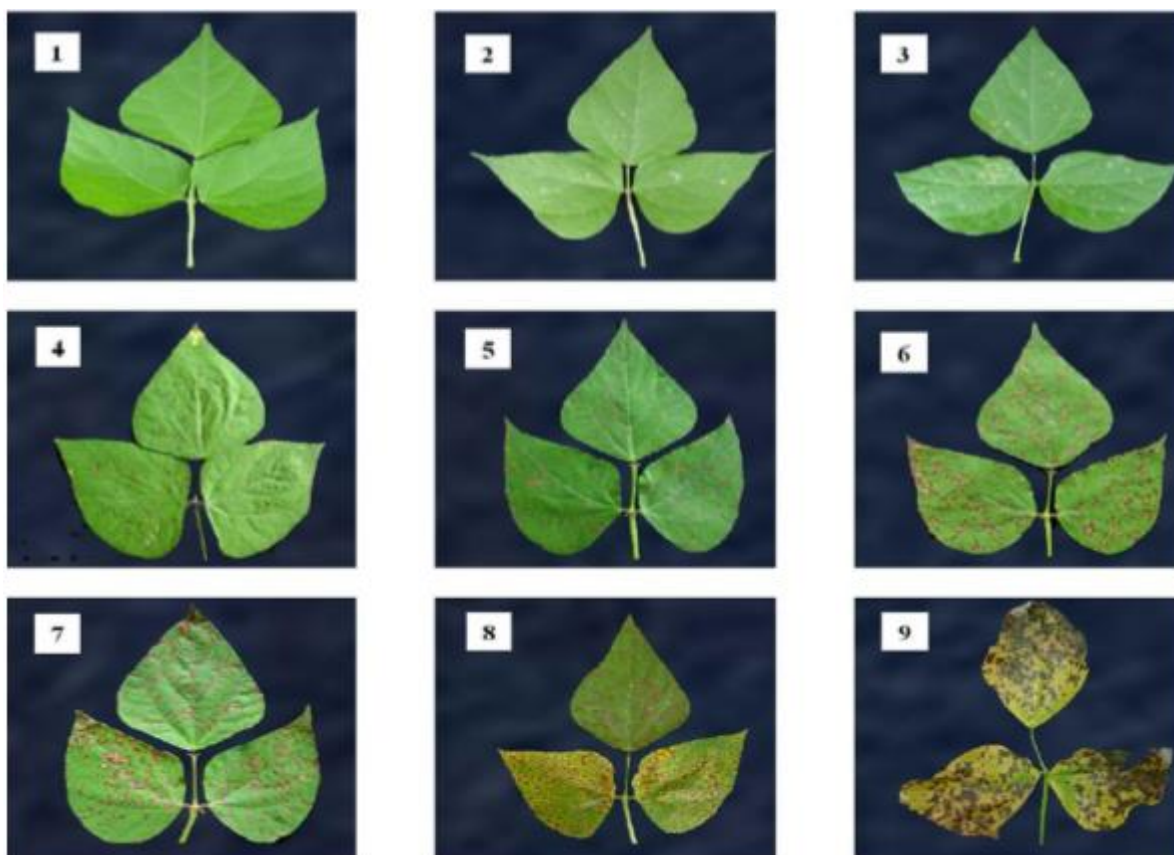


Figura 1. Representación de la escala de severidad de daño (CIAT 1987) para la evaluación de la severidad de daños causados por *Pseudocercospora griseola* en plantas de frijol (1-3= resistente; 4-6= intermedia; 7-9= susceptible).

2.3 Evaluación genotípica con marcadores moleculares SCAR.

Se utilizaron tres marcadores moleculares SCAR (SH13, SNO2 y EACA/M-CTT 330) para la identificación de la presencia de los genes de resistencia a la mancha angular *Phg-1*, *Phg-2* y *G10474*, respectivamente (Cuadro 4).

2.3.1 Utilización de marcadores moleculares tipo SCAR.

Para la identificación de la presencia o ausencia de los genes resistentes a *P. griseola* en las 10 líneas de frijol y dos testigos (resistente y susceptible), se utilizaron los protocolos de extracción, cuantificación, amplificación y separación de ADN de la Universidad de

Wisconsin-Madison, adaptados al Laboratorio de Biotecnología aplicada del PIF, Zamorano.

Cuadro 4. Marcadores moleculares SCAR empleados en la identificación de la presencia de genes de resistencia a *Pseudocercospora griseola*.

SCAR	Tamaño (pb) ^β	Secuenciación de avance	Secuenciación de Reversa	Gen
SH13	520	GAC GCC ACA CCC ATT ATG TT	GCC ACA GAC ATG GAG CTT TA	<i>Phg-1</i>
SNO2	890	ACC AGG GGC ATT ATG AAC AG	ACC AGG GGC AAC ATA CTA TG	<i>Phg-2</i>
EACA/M- CTT 330	305	CTT GTT CTG AGT CAT TTA CCT TGC	GAA TTC ACA GTC CAA ACT CTA ATC	<i>G10474</i>

^β Pares de bases.

Fuentes: Genes *Phg-1* (Queiroz *et al.* 2004); *Phg-2* (Nietsche *et al.* 2000; Miklas 2002); y *G10474* (Mahuku *et al.* 2004).

2.3.2 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de la Universidad de Wisconsin-Madison. El ADN se extrajo de los primeros brotes de plantas de dos semanas de edad. Las muestras se recolectaron de plantas individuales en micro tubos *ependorf* de 1.5 mL, se agregó 50 µL de buffer PEX (etil xantogenato de potasio) para macerar el tejido en el micro tubo usando una barra *pestle* de plexiglass de laboratorio, se le adicionó 450 µL de buffer PEX.

Las muestras se colocaron en baño María a 65° C por 60 minutos; para concentrar los residuos de tejido las muestras se centrifugaron a 14000 RPM por 10 minutos. Luego se precipitaron los ácidos nucleicos, llenando los micro tubos con una mezcla 6:1; etanol: acetato de amonio 7.5 M. por 30 minutos a temperatura ambiente; se peletizaron los ácidos nucleicos centrifugando las muestras a 3000 RPM durante 10 minutos. A los micro tubos con tejido se les adicionó 300 µL de RNAasa (100 µg/mL) + buffer TE 0.1X y se colocaron en baño María a 37°C por 1 hora para eliminar el ARN de las muestras. Seguidamente se precipitó el ADN llenando los micro-tubos con una mezcla de 10:1 etanol: acetato de sodio (3M), se mezcló invirtiendo los micro tubos para permitir que se precipite el ADN a temperatura ambiente por 30 minutos. Para peletizar el ADN las muestras se centrifugaron a 3000 RPM por 5 minutos. El tejido de ADN, previamente lavado con etanol al 70% y secado a temperatura ambiente por 3 horas, se rehidrató con 100 µL de buffer TE 0.1X y se almacenó a -20°C.

2.3.3 Cuantificación de ADN.

Mediante el protocolo sugerido en el manual del módulo de Diagnóstico Molecular (Guachambala y Rosas 2008) determinaron la concentración de ADN de cada una de las muestras. Se utilizó un fluorómetro Hoefer TKO-100, $\lambda_{ex} + 365\text{nm}$, $\lambda_{em} + 460 \text{ nm}$, calibrado con ADN estándar bovino concentrado a 100 ng/mL.

Para calibrar el fluorómetro se mezcló 2 mL de buffer de cuantificación TNE (100 mL de TNE 1X, pH=7.4 y 10 μL de solución para tinción concentrada Dye) con 2 μL de ADN estándar bovino, en una cubeta de cuarzo puro para minimizar el margen de error al momento de la lectura. Posterior a la calibración el procedimiento se repitió utilizando 2 μL de ADN puro de cada muestra. La concentración mínima de ADN que se necesitó para el protocolo SCAR es de 30 ng/mL.

2.3.4 Dilución de ADN.

Al obtener el dato de concentración de ADN, las muestras que presentaron concentraciones de ADN superior a 30 ng/mL se diluyeron con buffer TE 0.1X, para que todo el ADN tenga la misma capacidad de amplificarse.

La dilución se hizo mediante la siguiente ecuación [1].

$$Vi = \frac{(Cf \times Vf)}{Ci} - Vb \quad [1]$$

Vi: Volumen inicial (μL), Cf: Concentración final (ng/mL), Vb: Volumen del buffer de dilución TE 0.1X (100 μL), Ci: Concentración inicial (ng/mL), Vf: Volumen final (100 μL).

2.3.5 Amplificación de ADN.

El ADN se amplificó en un termociclador Techne Unit TC-512 (Thermal cycler), utilizando tres *primers* o cebadores (SH13, SNO2 y EACA/M-CTT 330), con diferentes protocolos (Cuadros 4, 6, 8) y perfiles térmicos (Cuadros 5, 7 y 9).

2.3.6 Visualización de ADN.

Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa a 1.1% en solución tampón TE 0.5X (TrisHCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA) en tanques de electroforesis. A los geles de agarosa se les adicionó SYBR® Safe DNA gel stain, a una concentración de 1% con la finalidad de teñir las bandas de ADN. Se utilizó una escalera molecular de 100 pares de bases para verificar la presencia o ausencia de bandas. Las bandas fueron separadas en un Transphor/ Electrophoresis de 2.5 amperios a 120 Voltios durante 1 h 30 min. Las

bandas de ADN se visualizaron en el trans-iluminador Benchtop, UVP, modelo M- 26 VX (95-0413-01), con una longitud de onda de 302 nm. A los geles de agarosa se les tomó una fotografía con una cámara convencional bajo luz ultravioleta para registrar resultados.

2.3.7 Protocolos de marcadores moleculares SCAR.

Para desarrollar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se preparó una mezcla maestra para cada protocolo (SH13, SHNO2 y EACA/M-CTT 330) con agua bi-destilada, buffer (5X) para mantener el pH estable (6.5 a 7.0), dNTP's (desoxinucleótidos tri-fosfatos), *Mg Cl₂* (Cloruro de magnesio), *primers* de avance y de reversa (10 mM), Taq (*Thermus aquaticus*) polimerasa (5 U/ μ L) y ADN (30 ng/mL).

Para identificar la presencia del gen *Phg-1* se utilizó el protocolo del marcador SCAR SH13 (Cuadros 5 y 6). El control positivo para éste gen de resistencia a la mancha angular es la línea AND 277 de origen andina, el tamaño de la banda es 520 pares de bases (pb) y se utilizó una escalera de 100 pb (Queiroz *et al.* 2004).

El protocolo del marcador SCAR SNO2 (Cuadros 7 y 8), permite identificar el gen *Phg-2*. El control positivo con resistencia a mancha angular es la línea Cornell 49-242 de origen mesoamericana, el tamaño de la banda es 890 pb para lo que se usó una escalera de 100 pb (Nietsche *et al.* 2000).

Para la identificación del gen específico G10474 se utilizó el protocolo del marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330 (Cuadros 9 y 10). El control positivo resistente a mancha angular es la accesión G10474 de origen mesoamericano, este gen presenta co-dominancia a 305 pb en líneas resistentes y 280 pb en líneas susceptibles, y se utiliza una escalera molecular de 100 pb (Mahuku *et al.* 2004).

Cuadro 5. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo del SCAR SH13 para identificar la presencia del gen *Phg-1*.

Reactivos	$\mu\text{L}/\text{muestra de ADN}$	$\mu\text{L}/ 12 \text{ muestras de ADN}$
DD H_2O	7.1	85.2
Buffer 5X	3.0	36.0
dNTP's sin $MgCl_2$	1.2	14.4
Primer (F) SH13 (F)	0.5	6.0
Primer(R) SH13 (R)	0.5	6.0
<i>Taq</i> Polimerasa	0.7	8.4
ADN (30 ng/mL)	2.0	
Total	15.0	156.0

Fuente: Queiroz *et al.* (2004).

Cuadro 6. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo del SCAR SH13 para identificar la presencia del gen *Phg-1*.

Fases de la PCR	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (S)	Ciclos
Desnaturalización	94	30	1
Desnaturalización inicial	94	30	35
Acoplamiento de <i>primers</i>	59	60	35
Extensión	72	90	35
Extensión final	72	90	1

Fuente: Queiroz *et al.* (2004).

Cuadro 7. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo del SCAR SNO2 para identificar la presencia del gen *Phg-2*.

Reactivos	$\mu\text{L}/\text{muestras de ADN}$	$\mu\text{L}/ 12 \text{ muestras de ADN}$
DD H_2O	6.5	78.0
Buffer 5X	2.0	24.0
dNTP's con $MgCl_2$	1.0	12.0
Primer (F) SH13 (F)	1.4	16.8
Primer(R) SH13 (R)	1.4	16.8
<i>Taq</i> Polimerasa	0.2	2.4
ADN (30 ng/mL)	2.5	
Total	15.0	150.0

Fuente: Nietsche *et al.* (2000).

Cuadro 8. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el marcador molecular SCAR SNO2 del gen *Phg-2*.

Fases de la PCR	Temperatura (°C)	Tiempo (S)	Ciclos
Desnaturalización	94	30	1
Desnaturalización inicial	94	30	30
Acoplamiento de <i>primers</i>	65	60	30
Extensión	72	90	30
Extensión final	72	90	1

Fuente: Nietsche *et al.* (2000).

Cuadro 9. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo del SCAR EACA/M-CTT 330 para identificar la presencia del gen de la accesión *G10474*.

Reactivos	µL/muestras de ADN	µL/ 12 muestras de ADN
DD H_2O	5.6	67.2
Buffer 5X	2.5	30.0
dNTP's	2.0	24.0
$MgCl_2$	0.5	6.0
Primer (F) EACA/M-CTT 330 (F)	0.6	7.2
Primer(R) EACA/M-CTT 330 (R)	0.6	7.2
<i>Taq</i> Polimerasa	0.7	8.4
ADN (30 ng/mL)	2.5	
Total	15.0	150.0

Fuente: Mahuku *et al.* (2004).

Cuadro 10. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330 del gen de la accesión *G10474*.

Fases de la PCR	Temperatura (°C)	Tiempo(S)	Ciclos
Desnaturalización	94	300	1
Desnaturalización inicial	94	30	35
Acoplamiento de <i>primers</i>	65	45	35
Extensión	72	30	35
Extensión final	72	600	1

Fuente: Mahuku *et al.* (2004).

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Resistencia de las líneas avanzadas a razas específicas de *P. griseola* de Honduras.

Para la evaluación de la reacción de las líneas y testigos a la inoculación con cada una de las tres razas de *P. griseola* (31-31, 63-31 y 63-43), se utilizaron los valores de la escala 1 a 9 del CIAT (1987). En esta escala los valores 1 a 3 indican resistencia, 4 a 6 reacción intermedia y 7 a 9 susceptibilidad.

Resistencia a la raza 31-31

Para determinar la reacción de las líneas y testigos a la inoculación con la raza 31-31, procedente de un aislamiento de la Vega 4, Zamorano, se realizaron dos evaluaciones, a los 30 y 37 DDS. En la primera evaluación, los máximos valores, incluyendo en el testigo susceptible Tío Canela 75, fueron intermedios (Cuadro 11). Según lo que se recomienda para estas evaluaciones, se debe tener una expresión de síntomas de por lo menos 7.0 en el testigo susceptible para considerar que las reacciones al inóculo de las líneas restantes sean aceptables. Cuando esto sucede se deben hacer evaluaciones adicionales, aprox. una semana después de haberse realizado la lectura anterior.

En la segunda evaluación con la raza 31-31, el testigo susceptible presentó un valor de la escala >7.0 , por lo cual se determinó que la respuesta en el resto de las líneas a la inoculación con esta raza eran definitivas. Según estos resultados, las líneas ALS 0532-6, ALS 0531-41, ALS 0532-38, ALS 0626-35 y NIC 604-29 presentaron resistencia a esta raza 31-31 de *P. griseola*; el resto de las líneas y el testigo resistente G06727 tuvieron una reacción intermedia.

Resistencia a la raza 63-31

En la evaluación de la resistencia de las 10 líneas avanzadas y testigos a la raza 63-31, se realizaron tres lecturas, a los 30, 37 y 42 DDS. En las tres evaluaciones de las reacciones al inóculo de la raza 63-31, no se alcanzaron valores de una reacción de susceptibilidad (≥ 7.0) tanto en el testigo susceptible ni en ninguna línea avanzada, por lo que estos resultados obtenidos con esta raza deben considerarse tentativos y sujetos a verificación repitiendo una evaluación adicional bajo condiciones similares (Cuadro 12). Bajo estas

consideraciones, las líneas ALS 0526-78, ALS 0532-6, ALS 0531-41, ALS 0532-38, ALS 0531-97 y NIC 604-29, presentaron reacciones de resistencia a esta raza de *P. griseola*. El testigo andino G06727 no presentó resistencia a esta raza 63-31, cuyo primer valor binario 63 indica que ataca a todos los diferenciales andinos, por lo que resulta ser muy virulenta cuando afecta genotipos de frijol procedentes de este reservorio genético andino.

Resistencia a la raza 63-43

Para la evaluación de las reacciones de las líneas avanzadas y testigos a la inoculación con la raza 63-43 se realizaron tres evaluaciones a los 30, 37 y 42 DDS. El testigo susceptible Tío Canela 75 no alcanzó el grado de susceptibilidad esperado (≥ 7.0) aún después de la tercera lectura a los 42 DDS (Cuadro 13). Como en la evaluación de la raza anterior 63-31, se debe considerar el realizar lecturas posteriores hasta que el testigo susceptible alcance a presentar el valor esperado (≥ 7.0) para considerar hacer la última lectura de una evaluación de la respuesta a la inoculación con razas de *P. griseola* en plantas de genotipos de frijol. Debido a lo anterior, la mayoría de líneas de frijol presentaron reacciones de resistencia a la tercera y última evaluación realizada con la raza 63-43.

Las condiciones en la casa de malla incluyendo el sistema de riego por micro-aspersión son relativamente controlables. Sin embargo, las condiciones no permiten controlar adecuadamente las fluctuaciones en temperatura que pudieran en algunos días sobrepasar el rango adecuado de 16-28°C deseables para la infección y desarrollo del patógeno. Por lo que será necesario tener en cuenta las evaluaciones en diferentes épocas del año para confirmar definitivamente la resistencia de las líneas generadas a través del mejoramiento genético por el programa PIF. Por otro lado, hay que tener en cuenta que las plantas varían con respecto a la edad en su susceptibilidad a las enfermedades dependiendo del patógeno (Sarasola y Rocca 1975). Adicionalmente, se hace necesario el uso de marcadores moleculares para verificar la presencia de genes de resistencia en los materiales mejorados; por lo que parte de este estudio incluyó estas evaluaciones con marcadores moleculares.

Cuadro 11. Evaluación fenotípica de la resistencia de 10 líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con la raza 31-31 de *Pseudocercospora griseola*. Zamorano, Honduras 2015.

Número	Líneas	Evaluación 1 (30 DDS^α)	Evaluación 2 (37 DDS)
1	ALS 0546-78	3.6	4.2
2	ALS 0532-6	2.2	3.2
3	ALS 0546-97	2.6	4.8
4	ALS 0531-41	1.8	2.6
5	ALS 0532-38	2.0	3.2
6	ALS 0531-97	4.0	4.0
7	ALS 0546-60	3.6	4.6
8	ALS 0532-4	3.0	5.4
9	ALS 0626-35	3.4	3.2
10	NIC 604-29	3.0	3.2
11	G06727 (Resistente)	2.0	4.2
12	Tío Canela 75 (Susceptible.)	3.4	7.4
	Valor P	0.6340	≤ 0.0001
	DMS 0.05 ^β	2.4	1.5
	CV (%) ^γ	64.4	27.9
	Rango de severidad	1.8 - 4.0	2.6 - 7.4

Resistente (1-3), intermedio (4-6), susceptible:(7-9).

^α: Días después de siembra, ^β: Diferencia mínima significativa, ^γ: Coeficiente de variación.

Cuadro 12. Evaluación fenotípica de la resistencia de 10 líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con la raza 63-31 de *Pseudocercospora griseola*. Zamorano, Honduras, 2015.

Número	Líneas	Evaluación 1 (30 DDS ^a)	Evaluación 2 (37 DDS)	Evaluación 3 (42 DDS)
1	ALS 0546-78	2.8	2.8	3.2
2	ALS 0532-6	1.8	2.0	2.2
3	ALS 0546-97	2.6	3.8	3.8
4	ALS 0531-41	1.8	2.0	2.5
5	ALS 0532-38	1.8	1.8	2.8
6	ALS 0531-97	1.6	1.8	3.2
7	ALS 0546-60	2.0	2.6	3.8
8	ALS 0532-4	2.0	2.8	4.4
9	ALS 0626-35	5.8	5.0	4.8
10	NIC 604-29	1.4	1.8	2.6
11	G06727 (R)	2.6	4.2	5.0
12	Tío Canela 75 (S)	4.0	4.0	6.0
	Valor P	≤ 0.0001	≤ 0.0001	0.0004
	DMS 0.05 ^β	1.1	1.2	0.5
	CV (%) ^γ	33.5	33.5	29.1
	Rango de Severidad	1.4 - 5.8	1.8 - 5.0	2.2 - 6.0

Resistente (1-3), intermedio (4-6), susceptible:(7-9).

^a: Días después de siembra, ^β: Diferencia mínima significativa, ^γ: Coeficiente de variación.

Cuadro 13. Evaluación fenotípica de la resistencia de 10 líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con la raza 63-43 de *Pseudocercospora griseola*. Zamorano, Honduras, 2015.

Número	Líneas	Evaluación 1 (30 DDS ^a)	Evaluación 2 (37 DDS)	Evaluación 3 (42 DDS)
1	ALS 0546-78	2.6	3.2	2.9
2	ALS 0532-6	1.8	2.0	2.2
3	ALS 0546-97	2.2	2.6	2.8
4	ALS 0531-41	1.8	2.0	2.2
5	ALS 0532-38	1.6	2.0	2.2
6	ALS 0531-97	2.0	2.0	2.2
7	ALS 0546-60	2.0	2.4	2.6
8	ALS 0532-4	1.8	2.6	2.8
9	ALS 0626-35	2.6	3.2	3.5
10	NIC 604-29	1.8	2.0	2.2
11	G06727 (R)	3.6	3.6	3.6
12	Tío Canela 75 (S)	3.4	3.4	4.0
	Valor P	0.0005	0.0008	0.0029
	DMS 0.05 ^β	0.9	0.3	0.4
	CV(%) ^γ	32.7	27.3	28.4
	Rango de Severidad	1.6 - 3.6	2.0 - 3.6	2.2 - 4.0

Resistente (1-3), intermedio (4-6), susceptible (7-9).

^a: Días después de siembra, ^β: Diferencia mínima significativa, ^γ: Coeficiente de variación.

Resistencia de líneas de frijol a tres razas de *P. griseola*

Según los resultados de las reacciones de líneas y testigos de frijol a la inoculación con tres razas de *P. griseola*, bajo las condiciones del estudio llevado a cabo en casa de malla en la facilidades del PIF en Zamorano, Honduras, se presentan líneas resistentes a una, dos y tres razas (Cuadro 14). Las líneas resistentes a las tres razas, ALS 0532-6, ALS 0531-41. ALS 0532-38 y NIC 604-29, se presentan con buen potencial para su validación para ser liberadas como variedades o ser utilizadas como progenitores con fines de mejoramiento. Estas líneas promisorias también poseen otras características agronómicas y comerciales deseables. Las líneas resistentes a dos de las razas, ALS 0546-78 y ALS 0531-97, pueden ser utilizadas en mejoramiento teniendo en cuenta de incluir un progenitor que complemente su resistencia a otras razas de *P. griseola*.

Cuadro 14. Respuesta de 10 líneas y testigos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) a la inoculación con tres razas de *Pseudocercospora griseola*.

Líneas	Nombre	Raza de <i>P. griseola</i>		
		31-31	63-31	63-43
1	ALS 0546-78	I	R	R
2	ALS 0532-6	R	R	R
3	ALS 0546-97	I	I	R
4	ALS 0531-41	R	R	R
5	ALS 0532-38	R	R	R
6	ALS 0531-97	I	R	R
7	ALS 0546-60	I	I	R
8	ALS 0532-4	I	I	R
9	ALS 0626-35	R	I	I
10	NIC 604-29	R	R	R
11	G06727 (Resistente)	I	I	I
12	Tío Canela 75 (Susceptible)	S	I	I

Escala 1-9 (CIAT 1987): Resistente= R (1-3), intermedio= I (4-6), susceptible= S (7-9).

3.2 Evaluación genotípica con marcadores moleculares SCAR

Las evaluaciones fenotípicas las 10 líneas y los testigos con base en la respuesta a la inoculación con tres razas de *P. griseola* bajo condiciones de casa de malla, fueron complementadas con evaluaciones genotípicas utilizando tres marcadores moleculares SCAR específicos para identificar la presencia de marcadores de tres genes de resistencia a *P. griseola*, agente causal de la mancha angular del frijol común, implementados en el Laboratorio de Biotecnología del PIF. Los marcadores SCAR utilizados fueron el SH13, SNO2 y EACA/M-CTT 330 que determinan la presencia de los genes *Phg1*, *Phg-2* y *G10474*, respectivamente. Los resultados de los análisis con marcadores SCAR se discuten a continuación.

3.2.1 Marcador molecular SCAR SH13 del gen *Phg-1*.

Los análisis con el marcador molecular SH13 que indica la presencia del gen *Phg-1* determinó la presencia de este marcador (banda polimórfica de 520 pb) solamente en el testigo resistente de origen andino G06727 (Fig. 2). Según Ragagnin *et al.* (2004), la presencia del gen *Phg-1* de origen andino expresa la resistencia a la raza 63-23 de mancha angular. La que la resistencia en las líneas avanzadas a las razas evaluadas se debe a los otros genes evaluados u otros no evaluados en este estudio.

3.2.2 Marcador molecular SCAR SNO2 del gen *Phg-2*

Los análisis con el marcador SCAR SNO2 determinaron que todas las líneas avanzadas evaluadas junto con los dos testigos presentaron la banda a 890 pb correspondiente al marcador del gen *Phg-2* de resistencia a la mancha angular (Fig. 3). Según lo reportado por Nietzsche *et al.* (2000), el gen *Phg-2* confiere resistencia a la raza 31-17 de *P. griseola*.

3.2.3 Marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330 del gen *G10474*

El marcador del gen *G10474* de resistencia a *P. griseola* es co-dominante y expresa la presencia del gen de resistencia a 305 pb y la ausencia a 280 pb. El análisis de las líneas y testigos con este marcador del gen de resistencia a *P. griseola* determinó que este marcador se presentó en todas las líneas avanzadas y en el testigo susceptible Tío Canela 75, excepto en el testigo resistente andino G06727 (Fig. 4). La accesión G10474 es de origen mesoamericano (procedencia Guatemala); y el gen *G10474* confiere la resistencia a la raza 63-63 de *P. griseola* (Mahuku *et al.* 2004).

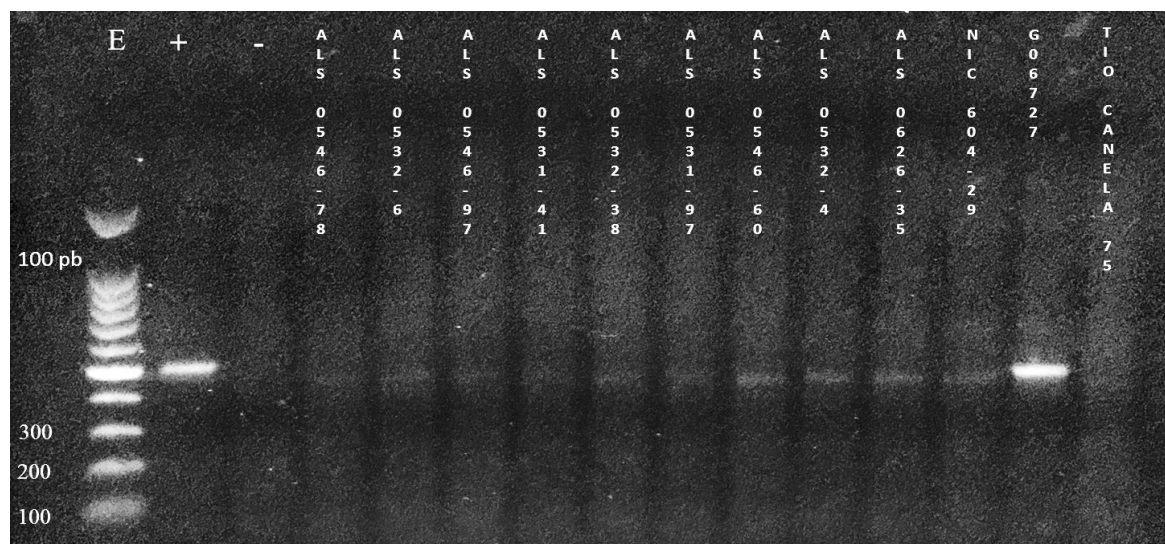


Figura 2. Bandas generadas por el primer SH13 en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen *Phg-1*. **E:** Escalera molecular de 100 pb, + (control positivo, AND 277), - (control negativo, mezcla maestra sin ADN).

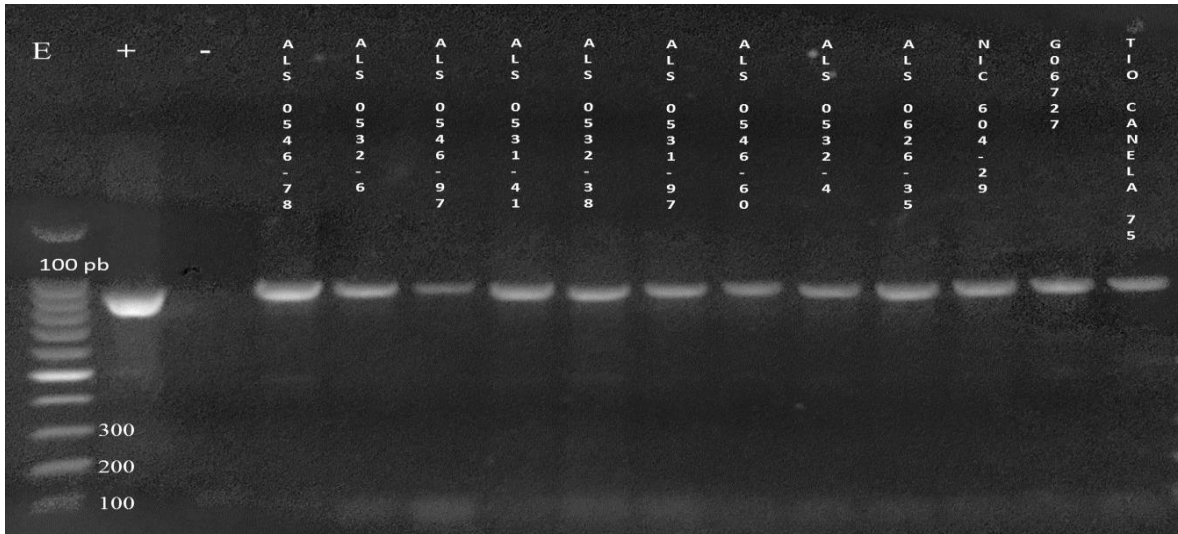


Figura 3. Bandas generadas por el primer SNO2 en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen *Phg-2*. **E:** Escalera molecular de 100 pb, + (control positivo, AND 277), - (control negativo, mezcla maestra sin ADN).

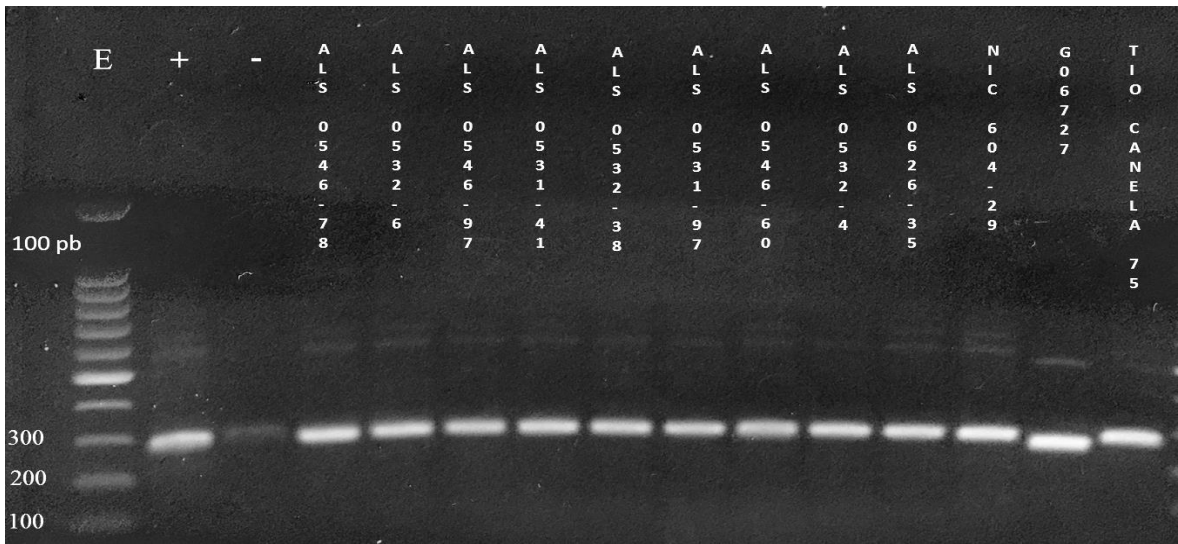


Figura 4. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen *G10474*. **E:** Escalera molecular de 100 pb, + (control positivo, AND 277), - (control negativo, mezcla maestra sin ADN).

Teniendo en cuenta los análisis moleculares con los tres marcadores, se determinó que todas las líneas avanzadas y el testigo susceptible Tío Canela 75 presentan los marcadores de los genes *Phg-2* y *G10474*, y el testigo resistente andino G06727 los marcadores de los genes *Phg-1* y *Phg-2* (Cuadro 15), sin embargo, no todas las líneas presentaron resistencia fenotípica en las evaluaciones con las tres razas de *P. griseola*.

Como se discutió anteriormente, las líneas ALS 0532-6, ALS 0531-41, ALS 0532-38 y NIC 604-29 presentaron resistencia a las tres razas de *P. griseola* (Cuadro 14), y estas líneas solamente poseen los marcadores de los genes *Phg-2* y *G10474* (Cuadro 15). Los genes mencionados confieren resistencia a razas 63-23 y 31-17, respectivamente (Ragagnin *et al.* 2004; Nietsche *et al.* 2000); y estas razas atacan severamente a los diferenciales tanto andinos como mesoamericanos. En el caso del testigo Tío Canela 75, de reacción susceptible a la raza 31-31 e intermedia a las razas 63-31 y 63-43, puede deberse a falta de una evaluación de síntomas en una etapa posterior a las realizadas, o la presencia de algún otro gen de resistencia no identificado.

Las reacciones intermedias del testigo andino G06727, previamente identificado como resistente en varios ensayos en Honduras con las razas 31-63, 62-33 y 63-63 (Rodríguez 2013), sugiere la necesidad de revisar resultados anteriores y con un mayor número de razas. Por otro lado como se ha mencionado anteriormente, las líneas con combinaciones de los genes *Phg-2* y *G10474*, son las que fueron resistentes a las tres razas en este estudio. Este testigo resistente andino G06727 sólo presentó reacción intermedia, debido a que no posee el gen *G10474* según el análisis con los marcadores moleculares, lo cual sugiere la importancia de utilizar este gen para desarrollar líneas resistentes a *P. griseola* causante de la mancha angular del frijol.

Para estudios posteriores se deberá ampliar los testigos susceptibles y resistentes a por lo menos dos de cada categoría, como la línea AMFF 1-12-1-17-1 que presenta los tres marcadores de genes de resistencia a la mancha angular evaluados (Rodríguez 2013). Se debe asegurar la máxima expresión en los testigos susceptibles y resistentes para hacer un mejor uso de la escala 1 a 9 del CIAT (1987) que permita una evaluación confiable y efectiva de razas de *P. griseola* y líneas resistentes a estas razas de *P. griseola*.

Cuadro 15. Identificación de genes de resistencia a *Pseudocercospora griseola* en líneas y testigos de frijol mediante marcadores moleculares SCAR.

Líneas	Nombre	Genes de resistencia a <i>P. griseola</i>		
		<i>Phg-1</i>	<i>Phg-2</i>	<i>G10474</i>
1	ALS 0546-78	-	+	+
2	ALS 0532-6	-	+	+
3	ALS 0546-97	-	+	+
4	ALS 0531-41	-	+	+
5	ALS 0532-38	-	+	+
6	ALS 0531-97	-	+	+
7	ALS 0546-60	-	+	+
8	ALS 0532-4	-	+	+
9	ALS 0626-35	-	+	+
10	NIC 604-29	-	+	+
11	G06727 (Resistente)	+	+	-
12	Tío Canela 75 (Susceptible)	-	+	+

+: Presencia, -: Ausencia

4. CONCLUSIONES

Como resultado de las evaluaciones fenotípicas con la inoculación con las razas 31-31, 63-31 y 63-43 de *Pseudocercospora. griseola* en casa de malla, se identificaron cuatro líneas avanzadas de frijol (ALS 0532-6, ALS 0531-41, ALS 0532-38 y NIC 604-29) resistentes.

Estas líneas resistentes a las tres razas de *P. griseola* presentaron los marcadores moleculares SCAR SNO2 y EACA/M-CTT 330 de los genes *Phg-2* y *G10474*, que resultó ser la combinación de genes más efectiva a las tres razas de *P. griseola*.

El gen andino *Phg-1* identificado con el marcador molecular SH13 resultó no ser suficientemente efectivo a las razas evaluadas, ya que el testigo resistente G06727 de origen andino, sólo presentó niveles intermedios de resistencia.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar evaluando la resistencia de las líneas seleccionadas y otras en proceso de generación por el PIF, incluyendo razas adicionales de *P. griseola*.

Para las evaluaciones fenotípicas incluir testigos susceptibles o resistentes con reacciones extremas e incluir evaluaciones adicionales hasta alcanzar la máxima expresión de susceptibilidad en los testigos incluidos para esos fines, con el fin de mejorar el uso de la escala 1-9.

Utilizar otros marcadores moleculares SCAR para la identificación de nuevos genes de resistencia a mancha angular, como el marcador del gen *Phg-3* identificado en la línea mesoamericana Ouro Negro.

Continuar las actividades de validación de las líneas resistentes a nivel de finca en Honduras y otros países interesados en la liberación de variedades resistentes a la mancha angular que también presentan características agronómicas y comerciales deseables.

Realizar nuevas recombinaciones mediante cruzamientos genéticos que incluyan los tres genes estudiados y genes adicionales como el *Phg-3*, con el fin de ampliar la base genética de la resistencia a *P. griseola* patógeno causal de la mancha angular del frijol común.

6. LITERATURA CITADA

Araya, C. y J.C. Hernández. 2006. Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. San José, Costa Rica. 44p.

Busogoro J.P., M. H. Jijakli, P. Lepoivre. 1999. Virulence variation and RAPD polymorphism in African isolates of *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr. the causal agent of angular leaf spot of common bean. *European Journal of Plant Pathology* 105(6):559-569.

Castellanos, G., C. Jara y G. Mosquera. 2013. Guía Práctica 6: Manejo del hongo en el laboratorio. Centro Internacional de la Agricultura Tropical (CIAT). p 232.

Castro, A., J.C. Rosas y L.L. Aranda. 2003. Manual del módulo de biodiversidad y fitomejoramiento. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 23 p.

Chacón, M.I., C. Jara, G. Castellanos, C.E. Posso, R. Buruchara, J.B. Cuasquer, M.A. Pastor Corrales. 1996. Diversidad genética y relación entre aislamientos de África y América Latina del hongo de la mancha angular del frijol común: Implicaciones para el mejoramiento genético. In: S.P. Singh y O. Voysest (eds.). *Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI*. CIAT, Cali, Colombia. pp. 135-142.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Trad. EDITEC. A.V. Schoonhoven, M.A. Pastor-Corrales (comp.). Cali, Colombia. 56 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1985. Bean Program. Annual Report. Cali, Colombia. 29 p.

García, R.A.V., M.S. Carneiro, y A. Sartorato. 2006. Angular leaf spot. Reports of Bean Improvement Cooperative and National Dry Bean Council Research Conference. Goias, Brazil 211-212.

Guachambala, M. y J.C. Rosas. 2008. Manual del Módulo de Diagnóstico Molecular. Laboratorio de Biotecnología del PIF. Zamorano, Honduras. Zamorano Academic Press. 50 p.

Guzmán, P., D. Mandala, P. Gepts, R. Nodari, B. Johnson, S. Temple, W.A.B. Msuku, A.B.C. Mkandawire y R.L. Gilbertson. 1993. Genetic diversity among isolates of the angular leaf spot fungus (*Phaeoisariopsis griseola*) revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPDs) analysis. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. 36:158-159.

Herrera Dávila, B. 2004. Caracterización molecular del germoplasma cultivado y silvestre de frijol común de Honduras. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 22 p.

Jara, C. 1998. Diversidad patogénica de *Phaeoisariopsis griseola* centroamericana, causante de la mancha angular del frijol común. Resúmenes XLIV Reunión Anual PCCMCA. Managua, Nicaragua. p 102.

León Saavedra, I. 2009. La antracnosis y la mancha angular del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Temas de Ciencia y Tecnología 13(39):45-54.

Liebenberg, M. M. y Z.A. Pretorius. 1997. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). African Plant Protection 3: 81-106.

Mahuku, G., C. Montoya, M.A. Henríquez, C. Jara, H. Terán y S. Beebe. 2004. Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. Crop Science 44(5):1817-1824.

Martinez, L., R. Bernsten y M. Zamora. 2004. Estrategias de mercado para el frijol centroamericano. Agronomía Mesoamericana 15(2):121-130.

Miklas, P.N. 2002. Marker assisted selection for disease resistance in common bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. 45:1-3.

Mora, B., M.A. Pastor-Corrales, L. Zambolin, C. Viera y G. Chaves. 1985. Determinación de pérdidas en rendimiento en Frijol Común por mancha angular. Phytopathology 75 (10):144-150.

Moreno, R.A. 1977. Efecto de diferentes sistemas de cultivo sobre la severidad de la mancha angular del frijol (*Phaseolus vulgaris*), causada por *Isariopsis griseola* Sacc. Agron. Costa Rica 1:39-42

Nietsche, S., A. Borém, G.A. Carvalho, R.C. Rocha, T.J. Paula, E.G. de Barros y M.A. Moreira. 2000. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. Journal of Phytopathology 148:117-121.

Pastor-Corrales, M.A., y H.F. Schwartz. 1994. Problemas de producción de frijol en los trópicos. Segunda Edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia 19(1): 1524.

Pastor-Corrales, M.A y C.E. Jara. 1995. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol común en América Latina. Fitopatología Colombiana 19:15-24.

Paula, T.J. y L. Zambolim. 1998. Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas, Editora UFV, Viçosa, Brasil. p 375–433.

Queiroz, V.T., C.S. Sousa, M.R. Costa, D.A. Sanglad, K.M.A. Arruda, T.L.P.O. Souza, V.A. Ragagnin, D. Sanglard, T.L. de Souza, M. Costa, M. Moreira y E. Barros. 2004. A new inoculation procedure to evaluate angular leaf spot disease in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) for breeding purposes. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 48:90-91.

Ragagnin, V.A., F.G. Barros y M.A. Moreira. 2004. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 47:237-238.

Rodríguez, I.Y. 2013. Caracterización de razas y selección fenotípica y molecular de líneas de frijol común resistentes a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) Sacc. Ferraris. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 35 p.

Rosas, J.C. 2003. El cultivo de frijol común en América Tropical. EAP, Zamorano. 2 ed. Imprenta Litocom. Tegucigalpa, Honduras. 57 p.

Sarasola, A.A. y M.A. Rocca. 1975. Fitopatología. Curso Moderno. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur. p 117.

Sartorato, A. 1989. Resistencia vertical e horizontal do feijoeiro comun (*Phaseolus vulgaris* L.) a (*Isariopsis griseola*) Sacc. PhD. Dissert Universidade de Sao Paulo, Piracicaba, Sao Paulo, Brasil. 131 p.

Sartorato, A. y C.A. Rava. 1992. Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Fitopatología Brasileira 17:247-251.

Schwartz, H.F., F. Correa y M.A. Pastor-Corrales. 1982. La mancha angular del frijol y su control. Centro Internacional de la Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 28 p.

Teixiera, E., A. Borém, S. de Azevedo, S. Nietsche, E. Goncalvez y M. Alves. 2003. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. *Euphytica* 134:297-303.

Voyses, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris L.*). Legado de variedades de América Latina 1930-1999. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 195 p.