

**Selección convencional y asistida con  
marcadores moleculares para mejorar la  
resistencia a la roya del frijol común en  
Honduras**

**Cristian Fernando Quispe Quitigüña**

**ZAMORANO**

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Noviembre, 2006

**ZAMORANO**  
**CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

**Selección convencional y asistida con  
marcadores moleculares para mejorar la  
resistencia a la roya del frijol común en  
Honduras**

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

Presentado por:

**Cristian Fernando Quispe Quitigüiña**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2006

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reserva el derecho de autor.

---

Cristian Fernando Quispe Quitigüiña

Zamorano, Honduras  
Noviembre, 2006

# **Selección convencional y asistida con marcadores moleculares para mejorar la resistencia a la roya del frijol común en Honduras**

Presentado por

**Cristian Fernando Quispe Quitigüiña**

Aprobado por:

---

Juan Carlos Rosas, Ph. D.  
Asesor Principal

---

Alfredo Rueda, Ph. D.  
Coordinador del Área Temática de  
Fitotecnia

---

María Mercedes Roca, Ph. D.  
Asesor Secundario

---

Abelino Pitty, Ph. D.  
Director Interino de la Carrera de  
Ciencia y Producción Agropecuaria

---

Alfredo Rueda, Ph. D.  
Asesor Secundario

---

George Pilz, Ph. D.  
Decano Académico

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

## **DEDICATORIA**

A esa Misteriosa Fuerza del Universo que mantiene el mundo vivo y que me dio la fortaleza de seguir luchando, siguiendo el mejor de los ejemplos que un hijo puede tener, el de sus adorados padres, que gracias a esa mágica unión familiar supieron conducir la existencia de sus tres más preciados tesoros.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al aliento diario de existencia, mis queridos padres, Héctor y Ligia.

Al poder femenino del amor Ligia Lorena, Rosita, Leonela, Lorena, Alma, Sarahi.

A la mano amiga que siempre estuvo presta al auxilio Alejandra, David, Fabián, José, Moshe, Daniel, Alexander.

Al paradigma de éxito Lic. Mayra Falck, Dr. Juan Carlos Rosas, Dr. Carlos Gauggel, Dr. Fredi Arias.

A las personas que siempre estuvieron prestas a escuchar y a aconsejar Ing. Gloria Arévalo, Ing. Daniel Kaegi, Ing. Antenor Romero, Dr. Fredi Arias.

A los miembros del PIF por su constante apoyo y palabras de aliento Luz Clarita, Tomasita, Ing. Jorge Venegas, Ing. Juan Xavier Elizalde, Lic. Roger Ramos, Mr. Jorge.

A todas las personas que de una u otra forma brindaron el apoyo necesario para que este proyecto se lleve a cabo.

## **AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES**

A la Escuela Agrícola Panamericana por la oportunidad que me brindó, así como al Gobierno del Ecuador que a través del Fondo de Solidaridad pudo financiar gran parte de estos cuatro años de estudio en Zamorano.

Al Programa Bean/Cowpea CRSP (Donación USAID N GDG-G-00-02-00012-00), por el financiamiento de este estudio.

## RESUMEN

Quispe, C. 2006. Selección convencional y asistida con marcadores moleculares para mejorar la resistencia a la roya del frijol común en Honduras. Proyecto especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 39 p.

La roya del frijol común, causada por *Uromyces appendiculatus*, es una de las enfermedades que causa mayores pérdidas en esta leguminosa de grano. Muchos han sido los esfuerzos por combatir a este hongo, que por la alta variabilidad genética de sus razas, resulta complejo el proceso de obtención de fuentes duraderas de resistencia. La selección convencional y la selección asistida con marcadores moleculares (SAM) son métodos efectivos para obtener líneas de frijol que contengan genes múltiples de resistencia, mediante su piramidización, que permitan una resistencia más amplia para afrontar la alta variabilidad que el patógeno presenta en el campo. El estudio se enfocó en la evaluación fenotípica y con marcadores moleculares de 78 líneas F5 desarrolladas mediante el mejoramiento de la resistencia a la roya de frijol común en Honduras. Para tal propósito, se hicieron inoculaciones usando aislamientos de roya colectados de lotes comerciales para la infección de los viveros móviles de las 78 líneas y tres testigos (Danlí 46, Don Silvio RR y Milenio), y se obtuvieron datos de severidad e incidencia de la enfermedad. Con base en la expresión de la severidad (tamaño de pústula), a nivel de campo, se seleccionaron 26 líneas que presentaron una resistencia igual o mayor al testigo resistente (Don Silvio RR) y un mejor valor comercial del grano. Se realizó el análisis molecular de las líneas utilizando cuatro marcadores SCAR asociados a genes específicos de resistencia a la roya: SK-14 (Ur-3), SA-14 (Ur-4), SOAD-12 (Ur-7) y Ur-11GTO2 (Ur-11). Se concluyó que la presencia del gen andino Ur-4 explica parte de la resistencia de las 26 líneas seleccionadas como resistentes; con los otros tres marcadores, se tienen dudas por la amplificación de posibles falsos positivos en varias muestras de ADN de dos testigos susceptibles (Danlí 46 y Aifi Wuríti), por lo que se recomienda continuar la optimización de protocolos para validar estos marcadores moleculares. Adicionalmente, se optimizó el protocolo para el marcador SCAR SI-19, ligado al gen Ur-5; y el protocolo para el SCAR SBC-6, asociado al gen Ur-6, de resistencia a la roya; y se obtuvo una amplificación y visualización de bandas significativa ( $X^2=0.006$ ; g.l.=1;  $P>0.9$ ) para las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.

**Palabras clave:** marcadores SCAR, *Phaseolus vulgaris*, *Uromyces appendiculatus*



## CONTENIDO

PORTADA.....	i
PORTADILLA.....	ii
AUTORÍA.....	iii
HOJA DE FIRMAS.....	iv
DEDICATORIA.....	.v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES.....	vii
RESUMEN.....	viii
CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
2.1. UBICACIÓN.....	3
2.2. EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA.....	3
Material vegetal y selección de familias resistentes.....	3
Siembra de viveros móviles (Steadman <i>et al.</i> 2002).....	3
Inoculación.....	4
Evaluaciones.....	4
2.3. EVALUACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES.....	6
Siembra.....	6
Marcadores moleculares.....	6
Extracción de ADN.....	7
Cuantificación y dilución de ADN.....	7
Amplificación con marcadores tipo SCAR.....	7
Electroforesis.....	7
2.4. OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LOS SCAR SI-19 (UR-5) Y SBC-6 (UR-6).....	8
Siembra para la extracción de ADN.....	8
Extracción de ADN.....	8
Cuantificación y dilución de ADN.....	8
Amplificación con marcadores tipo SCAR.....	8

Electroforesis.....	9
Evaluación del patrón de SCAR.....	9
2.5. VARIABLES.....	10
Evaluación fenotípica de la resistencia.....	10
Evaluación con marcadores moleculares.....	10
Optimización de protocolos para los SCARs SI-19 (Ur-5) y SBC-6 (Ur-6)....	10
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	10
Evaluación fenotípica de la resistencia.....	10
Optimización de protocolos para los SCARs SI-19 (Ur-5) y SBC-6 (Ur-6)....	10
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>11</b>
3.1. EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA.....	11
3.2. EVALUACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES.....	16
Gen Ur-3 (SK-14).....	16
Gen Ur-4 (SA-14).....	16
Gen Ur-7 (SOAD-12).....	17
Gen Ur-11 (UR11 GTO2).....	17
3.3. OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LOS SCARS SI-19 (UR-5) Y SBC-6 (UR-6).....	20
Protocolo para SCAR SI-19.....	21
Protocolo para SCAR SBC-6.....	22
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>23</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>24</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>25</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>27</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Variedades y marcadores SCAR ligados a genes de resistencia a la roya del frijol. ....	6
Cuadro 2. Perfil térmico para PCR usando SCARs asociados a genes de resistencia Ur para roya en frijol común .....	7
Cuadro 3. Variedades y marcadores SCAR ligados a genes de resistencia a la roya del frijol. ....	8
Cuadro 4. Perfil térmico para PCR usando SCARs asociados a genes de resistencia Ur para roya en frijol común .....	9
Cuadro 5. Evaluación de la severidad de roya (tamaño de pústula) en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí46) de frijol. El Ocotol, El Paraíso, Honduras, 2006.....	12
Cuadro 6. Evaluación de la severidad de roya (tamaño de pústula) en las líneas del Vivero de Genes. El Ocotol, El Paraíso, Honduras, 2006. ....	15
Cuadro 7. Resultado del análisis molecular de las líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí46) de frijol común. Zamorano, 2006.....	19
Cuadro 8. Cambios realizados en los protocolos modificados por Pulla Samaniego (2005) en los SCAR de roya SI-19 y SBC-6. Zamorano, 2006. ....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala para la evaluación de tamaño de pústula desarrollada en la Reunión Internacional de Trabajo Sobre Roya del Frijol, celebrada en la Universidad de Puerto Rico en 1983 (Stavely <i>et al.</i> 1983) . . . . .	4
Figura 2. A. Síntomas de roya en frijol. B. Severidad (tamaño de pústula) en envés de hoja de frijol, El Paraíso, Honduras, 2006. . . . .	4
Figura 3. Distribución de las líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí 46) según la diferencia mínima significativa (DMS) de la variable severidad (tamaño de pústula) (P=0,0019). . . . .	13
Figura 4. Distribución de las líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí 46) según la severidad de la roya usando la escala de tamaño de pústula. El Ocotal, El Paraíso, Honduras, 2006. . . . .	14
Figura 5. Amplificación del SCAR SK-14 (620 pb) asociado al gen Ur-3 en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 de frijol común (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006. . . . .	16
Figura 6. Amplificación del SCAR SA-14 (1079 y 800 pb) asociado al gen Ur-4 en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 de frijol común (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006. . . . .	16
Figura 7. Amplificación del SCAR SOAD-12 (620 pb) asociado al gen Ur-7 en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 de frijol común (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006. . . . .	17
Figura 8. Amplificación del SCAR UR11-GTO2 (450/490 pb) asociado al gen Ur-11 en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 de frijol común (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006. . . . .	17
Figura 9. Optimización del protocolo del SCAR SI-19 con adaptaciones al desarrollado por Park <i>et al.</i> 2003 (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006. . . . .	21
Figura 10. Optimización del protocolo del SCAR SBC-6 con adaptaciones al desarrollado por Mellotto y Kelly (1998) (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006. . . . .	22

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN para el análisis molecular de frijol (Método de la Universidad de Wisconsin, UW – Madison).....	28
Anexo 2. Variedades del Vivero de Genes. ....	29
Anexo 3. Escala para la evaluación de incidencia de roya en frijol común.....	30
Anexo 4. Guía de procedimientos para uso de marcadores moleculares SCAR. ....	30
Anexo 5. Guía para la elaboración de componentes adaptados para PCR.....	31
Anexo 6. Evaluación de la severidad de roya (tamaño de pústula) en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades (Don Silvio RR, Milenio y Danlí 46) testigos de frijol. El Ocotal, El Paraíso, Honduras, 2006. ....	33
Anexo 7. Adaptación de componentes para PCR usando marcadores SCAR. ....	35
Anexo 8. Resultado del análisis molecular de las líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí 46) de frijol común. Zamorano, 2006.....	36
Anexo 9. Proceso de mejoramiento para la Resistencia a Roya del Frijol Común en Honduras realizada por el PIF. ....	38
Anexo10. Posibles falsos positivos en el análisis molecular usando SCAR asociados a genes de resistencia a la roya en la variedad Danlí 46 (D46) (testigo susceptible). ....	39

## 1. INTRODUCCIÓN

América Latina es la región de mayor consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y aporta un 45% de la producción mundial de esta leguminosa de grano. Sin embargo, la producción es afectada por diferentes factores abióticos y bióticos. Entre los factores bióticos, las enfermedades pueden causar enormes pérdidas en rendimiento (10-100%) y a su vez tener profundas repercusiones sociales y económicas (Beebe y Pastor-Corrales 1991).

La gran variabilidad fenotípica y genética de frijoles andinos y mesoamericanos, determinada por la gran diversidad de variedades cultivadas y poblaciones silvestres, ha hecho que la interacción genética hospedero-patógeno tenga a su vez una amplia variabilidad. En el caso del patosistema del frijol común, sus patógenos poseen mecanismos de variabilidad genética muy eficientes, que aceleran el proceso de adaptación a las diferentes condiciones ecológicas (Araya 1996).

Tres patógenos han mostrado una íntima asociación con el frijol común: antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) y roya (*Uromyces appendiculatus*). Estos hongos presentan patogenicidad específica en los hospederos del correspondiente centro de origen. Las poblaciones mesoamericanas de los tres organismos son más virulentas que las respectivas andinas, y genéticamente más variables. El conocimiento de la variabilidad genética y especificidad en las poblaciones nativas es necesario para el desarrollo de programas de mejoramiento y selección de fuentes de resistencia durables y efectivas en cada país (Araya 2003).

La roya del frijol presenta una variabilidad patogénica muy amplia, con más de 300 razas reconocidas (Stavely y Pastor-Corrales 1989; Mmbaga et al. 1996). Así también, muchos genes de resistencia, de amplio espectro y de herencia dominante, están presentes en el germoplasma del frijol común. En 1996 se definieron 10 de esos genes, identificados desde Ur-1 hasta Ur-10 (Kelly *et al.* 1996); posteriormente, un nuevo gen (Ur-11) fue identificado en las líneas PI 181996 y PI 190078 (Stavely 1998). Entre estos genes, los más utilizados son Ur-3, Ur-4, Ur -5, Ur -6, y Ur-11, los cuales confieren resistencia a 44, 30, 70, 22 y 89 de las 90 razas identificadas en Estados Unidos, respectivamente (Stavely 1998). Honduras es el país con mayor número de patotipos virulentos de roya en América Central y el Caribe, razón por la cual ha demostrado ser uno de los mejores sitios para el desarrollo de variedades resistentes de frijol (Araya 1996).

Las nuevas investigaciones tienden a desarrollar líneas homocigotas que contengan un juego de genes de resistencia a las principales enfermedades del frijol común, mediante el uso de la selección convencional y la asistida con marcadores moleculares (SAM) (Oliveira *et al.* 2005). La SAM es la manera más útil, práctica y aproximada que provee una eficiencia a largo plazo para la detección de genes/alelos de una línea parental

donante; especialmente en las etapas iniciales e intermedias del proceso de mejoramiento genético (Oliveira *et al.* 2005).

Los marcadores moleculares SCAR (por sus siglas en inglés de regiones amplificadas de secuencia caracterizada), son primers (cebadores) específicos ligados a características de interés, ampliamente utilizados en mapeo genético y en la SAM que determinan la presencia o ausencia de genes de resistencia (Herrera Dávila 2004).

Los SCAR a ser utilizados en este estudio incluyen los desarrollados para la identificación de la presencia de los genes de resistencia (Ur-3, Ur-4, Ur -5, Ur -6, Ur-7, y Ur-11) a la roya del frijol. El objetivo general del trabajo estuvo enfocado en desarrollar líneas de frijol, de buen potencial agronómico y valor comercial, resistentes a la roya usando selección convencional y la SAM.

Los objetivos específicos de este estudio fueron: Realizar evaluaciones en campo utilizando inoculación artificial en poblaciones segregantes de frijol e identificar familias resistentes a la roya mediante selecciones en plantas, para posteriormente verificar la resistencia fenotípica con el uso de viveros móviles, complementadas con el uso de marcadores moleculares para determinar la estructura genética que confiere la resistencia.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. UBICACIÓN**

La siembra de las líneas F5 de las poblaciones de frijol RRH-332 y RRH-336 utilizadas para el análisis fenotípico y molecular, se realizó en el período comprendido entre abril a septiembre de 2006, en los invernaderos del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) y en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Estas facilidades están ubicadas en el Valle del Yeguaré, a 30 km de Tegucigalpa, Honduras; a una altura de 800 msnm, con una temperatura promedio de 24°C y precipitación promedio anual de 1100 mm.

La inoculación de los viveros móviles se realizó en lotes comerciales en la aldea de El Ocotal, Municipio de El Paraíso, Honduras; a una altura de 1262 msnm, con una temperatura promedio de 21.8 °C y precipitación promedio anual de 1562 mm.

### **2.2. EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA**

#### **Material vegetal y selección de familias resistentes**

Tres grupos de materiales genéticos de frijol fueron utilizados en el estudio: 1) 78 familias F5 de las cruces de Milenio por la fuente de resistencia BelMiDak RMM-12 (Ur-11, Ur-4), identificada como la población RRH-332; y Milenio por BelDakMi RMR-18 (Ur-3, Ur-4, Ur-6, Ur-11), identificada como la población RRH-336 (Anexo 9); 2) el Vivero de Genes de Roya, desarrollado por M. Pastor-Corrales (USDA, Beltsville) y J. Steadman (Universidad de Nebraska), que son un conjunto de 11 variedades asociadas a la presencia comprobada de genes Ur de resistencia a la roya (Anexo 2), y 3) las variedades Danlí 46 (susceptible), Don Silvio RR (resistente) y Milenio (progenitor élite) fueron utilizadas como testigos. Todo el material vegetal provino del PIF/Zamorano.

#### **Siembra de viveros móviles (Steadman *et al.* 2002)**

Se realizaron dos siembras, el 12 de junio y el 10 de agosto de 2006, en bandejas plásticas negras rectangulares de 60 cm × 30 cm con 36 agujeros de 6 cm × 6 cm. En cada agujero se colocaron tres semillas de las 78 accesiones, de las 11 líneas del Vivero de Genes y de los tres testigos (Danlí 46, Don Silvio RR y Milenio). Se raleó a los ocho días después de siembra (DDS) para mantener dos plantas por agujero. El sustrato fue una mezcla de suelo estéril y vermiculita en partes iguales.



## Inoculación

A los 12 DDS, los viveros móviles fueron trasladados e inoculados con aislamientos de esporas recolectados de lotes comerciales establecidos en la aldea de El Ocotal, Municipio de El Paraíso, Honduras. Se hizo una recolección de hojas con infección de roya y un lavado con agua destilada estéril para obtener una suspensión líquida con esporas del patógeno, se agregaron dos gotas (4ml) de Tween para dispersar las esporas y se aplicó la solución con un atomizador (1L) a los viveros móviles. Estos viveros se dejaron en lotes comerciales de frijol de la aldea El Ocotal hasta la evaluación de severidad e incidencia a los 24 DDS.

## Evaluaciones

La severidad (tamaño de pústula) e incidencia de la roya fueron evaluadas visualmente a los 12 días después de la inoculación (DDI). Se usó la escala desarrollada en la Reunión Internacional de Trabajo Sobre Roya del Frijol, celebrada en la Universidad de Puerto Rico en 1983 (severidad) de 1-6 para tamaño de pústula (Stavely *et al.* 1983) (Figura 1 y 2) y para incidencia la escala de 1-9 recomendada por el CIAT (Pastor-Corrales y Schoohoven 1987) para la estimación del área foliar afectada (Anexo 3).

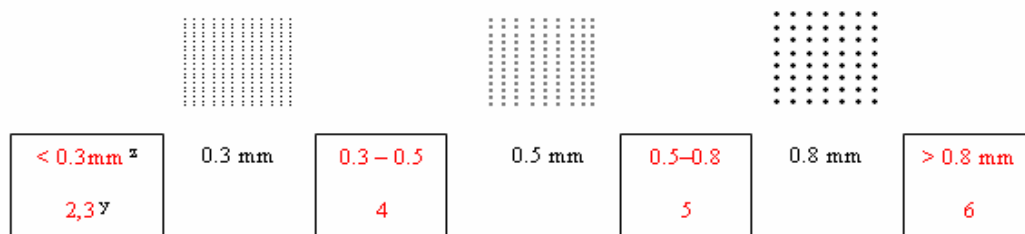


Figura 1. Escala para la evaluación de tamaño de pústula (Stavely *et. al* 1983).



Figura 2. A. Síntomas de roya en frijol. B. Severidad (tamaño de pústula) en envés de hoja de frijol, El Paraíso, Honduras, 2006.

Las familias resistentes (R) fueron seleccionadas utilizando la escala desarrollada en la Reunión Internacional de Trabajo Sobre Roya del Frijol, celebrada en la Universidad de Puerto Rico en 1983 (Stavely *et al.* 1983) de las líneas que no presentaron y/o tuvieron poco daño del patógeno (valores 1-2); las familias con resistencia intermedia (I) fueron las que presentaron valores entre 3 y 4; y finalmente las plantas que fueron evaluadas como 5 y 6 fueron consideradas susceptibles (S).

En las primeras etapas del mejoramiento en las poblaciones RRH-332 y RRH-336 (F2-F4) la selección fue basada en arquitectura de las plantas, días a madurez, valor comercial (rojos  $\leq$  5, negros y blancos) y por resistencia a otras enfermedades (mancha angular, mosaico común y mosaico dorado) (Anexo 9).

La evaluación del Vivero de Genes (Steadman *et al.* 2002) sirvió para verificar la interacción de estos materiales con las razas predominantes en la región y conocer las combinaciones de genes Ur que expresan la mayor resistencia.

## 2.3. EVALUACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES

### Siembra

La siembra de los materiales de frijol para la evaluación con marcadores SCAR, se realizó en maceteros de 15.24 cm de altura × 15.24 cm de diámetro utilizando ocho semillas por macetero, éstas se usaron para la extracción de ADN de las 78 familias F5, las 11 líneas del Vivero de Genes y los tres testigos (Danlí 46, Don Silvio RR y Milenio).

### Marcadores moleculares

En la evaluación de las líneas de frijol se emplearon cuatro marcadores moleculares SCAR (SK-14, SA-14, SOAD-12 y UR11-GTO2) para determinar la presencia/ausencia de monomorfismos asociados a la presencia/ausencia de genes específicos de resistencias a los patotipos de roya más comunes en Mesoamérica. Los protocolos de amplificación de estos cuatro marcadores SCAR fueron optimizados a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano por Pulla Samaniego (2005) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variedades y marcadores SCAR ligados a genes de resistencia a la roya del frijol.

Variedades	SCAR	Gen	Primers
<b>Andinas</b>			
Early Gallatin	SA-14 <sub>620</sub>	Ur-4	F- 5' CTATCTGCCATTATCAACTCAAAC R- 5' GTGCTGGGAAACATTACCTATT
<b>Mesoamericanas</b>			
Aurora	SK-14 <sub>1079 y 800</sub>	Ur-3	F- 5' CCCGCTACACACCAATACCTG R- 5' CCCGCTACACTTGATAAAATGTTAG
GN 1140	SOAD-12 <sub>523</sub>	Ur-7	F- 5' AAGAGGGCGTGAGATCGTCG R- 5' AAGAGGGCGTCTTGAAGGT
PI 181996	UR11-GTO2 <sub>490</sub>	Ur-11	F- 5' CGCACTTAGGAGCACAAA R- 5' TGGTGGTCCCATATTTTG

## Extracción de ADN

El ADN fue extraído de los cuatro primeros trifolios de las líneas y testigos a los 10 DDS siguiendo el protocolo establecido por la Universidad de Wisconsin-Madison (UW) (Anexo 1).

## Cuantificación y dilución de ADN

La cuantificación de ADN se realizó con un fluorómetro D y NA Hoefer Quant<sup>TM</sup> 200, calibrado con ADN estándar de timo de bovino a 100 ng/μl. Se agregaron 2 μl de muestra de ADN en el buffer de cuantificación (100 ml de TNE 1X y 10 μl de solución concentrada de tintura) (Anexo 4); y las muestras se colocaron en una cubeta de cuarzo puro para minimizar el margen de error al momento de la lectura. Las muestras de ADN fueron diluidas a 30 ng/ml con 100 μl de buffer TE 0.1X usando platos de 96 celdas con fondo redondo (polypropylene), para la amplificación con marcadores moleculares tipo SCAR (Anexo 5).

## Amplificación con marcadores tipo SCAR

Para la amplificación de ADN mediante PCR, se usó un termociclador (MJ Research, Inc. PTC 100<sup>TM</sup>) usando el perfil térmico establecido para cada marcador (Cuadro 2).

Cuadro 2. Perfil térmico para PCR usando SCARs asociados a genes de resistencia Ur para roya en frijol común

SCAR	Desnaturalización			Acoplamiento			Elongación			Elongación final		
	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo
SK-14	34	94	10 s	34	63	40 s	34	72	2 min	1	72	5 min
SA-14 <sup>§</sup>	35	94	1 min	35	55	1 min	35	72	1 min	1	72	5 min
SOAD-12 <sup>§</sup>	35	94	1 min	35	65	1 min	35	65	1 min	1	72	5 min
UR11-GTO2	38	94	10 s	38	60	40 s	38	72	2 min	1	72	5 min

<sup>§</sup>Ciclo adicional de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min.

## Electroforesis

Para la electroforesis se utilizó una escalera de ADN con una precisión de 100 pares de bases (pb), un control negativo (agua) y las muestras amplificadas mezcladas con Buffer Loading Dye 6X en geles de agarosa al 1.1%, en los tanques de electroforesis con buffer TBE 0.5X por 50 min a 110 voltios. Los geles fueron teñidos en una solución 1:10 bromuro de etidio y agua destilada (10 μl en 100 ml). Luego se visualizaron las bandas de ADN en el transiluminador Fotodyne Foto UV 26 para verificar presencia o ausencia de bandas, las que fueron fotografiadas con una cámara digital.

## 2.4. OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LOS SCAR SI-19 (UR-5) Y SBC-6 (UR-6)

### Siembra para la extracción de ADN

La siembra para la extracción de ADN de los materiales, se realizó en maceteros de 15.24 cm de altura × 15.24 cm de diámetro utilizando dos semillas por macetero y 40 maceteros por variedad. Las variedades utilizadas fueron: México 309 para el marcador SI-19 y Golden Gate Wax para el marcador SBC-6; estos fueron los materiales en los que se desarrolló cada marcador (Cuadro 3).

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en plantas individuales a los 10 DDS siguiendo el protocolo establecido por la Universidad de Wisconsin-Madison (UW) (Anexo 1) para determinar la mezcla maestra que optimizara la visualización del patrón de bandas asociado a la presencia de los genes de resistencia a la roya con los dos marcadores moleculares en estudio.

### Cuantificación y dilución de ADN

La cuantificación y dilución de ADN se realizó usando el mismo procedimiento de la sección anterior.

### Amplificación con marcadores tipo SCAR

Para la amplificación de ADN mediante PCR, se usó un termociclador (MJ Research, Inc. PTC 100<sup>TM</sup>) usando el perfil térmico establecido para cada marcador (Cuadro 4). Para optimizar la mezcla maestra del protocolo se hicieron pruebas en la concentración de Taq-polimerasa (de 0.9-0.1 U/ul) ajustando el volumen de la mezcla con agua hasta alcanzar una amplificación nítida de banda, esto debido a que el protocolo modificado por Pulla Samaniego (2005) no mostraba amplificación de banda.

Cuadro 3. Variedades y marcadores SCAR ligados a genes de resistencia a la roya del frijol.

Variedades	SCAR	Gen	Primers
Golden Gate Wax	SBC-6 <sub>308</sub>	Ur-6	F- 5' GAAGGCGAGAAGAAAAAGAAAAAT R- 5' GAAGGCGAGAGCACCTAGCTGAAG
México 309	SI-19 <sub>560</sub>	Ur-5	F- 5' AATGCGGGAGTCAATAGAAAAACC R- 5' AATGCGGGAGATATTTAAAAGGAAAG

Cuadro 4. Perfil térmico para PCR usando SCARs asociados a genes de resistencia Ur para roya en frijol común

SCAR	Desnaturalización			Acoplamiento			Elongación			Elongación final		
	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo	Ciclos	°C	Tiempo
SI-19 <sup>§</sup>	34	94	10 s	34	67	40 s	34	72	2 min	1	72	5 min
SBC 6 <sup>¶</sup>	30	94	30 s	30	59	1 min	30	72	2 min	1	72	7 min

<sup>§</sup>Ciclo adicional de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min.

<sup>¶</sup>Ciclo adicional de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min.

## Electroforesis

Se hizo el mismo procedimiento de la sección de evaluación molecular.

## Evaluación del patrón de SCAR

Se corrieron 40 muestras de cada variedad utilizada en el desarrollo de los marcadores (México 309 y Golden Gate Wax) para determinar la confiabilidad de la amplificación del patrón de bandas en las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.

## **2.5. VARIABLES**

### **Evaluación fenotípica de la resistencia**

La reacción a la roya del frijol se evaluó mediante la escala de severidad (tamaño de pústula 1-6) desarrollada en la Reunión Internacional de Trabajo Sobre Roya del Frijol, celebrada en la Universidad de Puerto Rico en 1983 (Stavely *et al.* 1983) y la escala de incidencia (1-9) recomendada por el CIAT (Pastor-Corrales y Schoohoven, 1987).

### **Evaluación con marcadores moleculares**

Consistió en la utilización de cuatro marcadores moleculares SCAR para determinar la presencia o ausencia de bandas amplificadas asociadas a genes de resistencia en las 78 familias F5 y los tres testigos.

### **Optimización de protocolos para los SCARs SI-19 (Ur-5) y SBC-6 (Ur-6)**

Amplificación y repetitividad de bandas en las 40 muestras de ADN extraídas de plantas individuales de las variedades citadas como referencia en el desarrollo de los marcadores (México 309 y Golden Gate Wax).

## **2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **Evaluación fenotípica de la resistencia**

Análisis de varianza y separación de medias (DMS) para las variables severidad e incidencia con el uso del programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS®) Los datos de las variables fueron normalizados (raíz cuadrada de las lecturas).

### **Optimización de protocolo para los SCARs SI-19 (Ur-5) y SBC-6 (Ur-6)**

Distribución de  $\chi^2$  (Chi-cuadrado) para los valores esperados y observados identificando la repetitividad en el patrón de bandas para cada SCAR.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA**

Con base en el análisis estadístico de la variable severidad ( $P=0.0019$ ) de las 78 familias F5, se observó la distribución según el grado de susceptibilidad o resistencia que presentaron las líneas F5 y los testigos. Don Silvio RR apareció en el grupo de familias resistentes con un bajo valor (2) para la variable severidad (Cuadro 5); se ubicó en el grupo de resistencia intermedia la línea parental Milenio; y en el grupo de susceptibilidad apareció Danlí 46 con el valor más alto en tamaño de pústula (4.5) (Anexo 6).

Se determinó que 52 de las 78 líneas evaluadas no presentan diferencias significativas ( $P=0,0019$ ) con el testigo susceptible (Danlí 46) para el tamaño de pústula; por otro lado, 24 líneas presentan una resistencia igual al testigo resistente y dos líneas (RRH 332-101 y RRH 332-82) superan la resistencia de Don Silvio RR (Figura 3).

Estos resultados permitieron seleccionar 26 líneas con resistencia a la roya del frijol común, que continúan siendo evaluadas por el programa de mejoramiento para continuar con el proceso de piramidización de genes de resistencia. Además, lo destacado de este grupo de familias resistentes es la presencia de líneas con semilla de un excelente valor comercial (VC) que abarca un amplio rango de colores: rojos (valores 3 y 4), negro brillante (NB), negro opaco (NO) y amarillo (Am), que indiscutiblemente facilitará el proceso de mejoramiento hacia líneas comerciales enfocadas a distintos mercados (Cuadro 5).

El análisis estadístico de la variable incidencia no mostró diferencia significativa entre las familias evaluadas ( $P=0.9354$ ).



Cuadro 5. Evaluación de la severidad de roya (tamaño de pústula) en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí46) de frijol. El Ocotal, El Paraíso, Honduras, 2006.

Líneas	Severidad <sup>‡</sup>	Dms	Reacción fenotípica		VC <sup>€</sup>
			Siembra 1	Siembra 2	
RRH 332-101	1.0 <sup>‡</sup>	e <sup>§</sup>	R	R	N,B
RRH 332-82	1.5	cd	R	R	NO,NB
RRH 332-58	2.0	bcd	R	R	3,4
RRH 336-49	2.0	bcd	R	R	3,4
RRH 332-55	2.0	bcd	R	R	NB
RRH 336-87	2.0	bcd	R	R	3
RRH 332-96	2.0	bcd	R	R	4
RRH 332-49	2.0	bcd	R	R	NO,NB
RRH 336-78	2.0	bcd	R	R	3,4
RRH 332-26	2.0	bcd	R	R	B
RRH 336-76	2.0	bcd	R	R	3
RRH 332-76	2.0	bcd	R	R	3,4
RRH 336-29	2.0	bcd	R	R	3
RRH 336-67	2.0	bcd	R	R	3
RRH 336-63	2.0	bcd	R	R	3
RRH 332-29	2.0	bcd	R	R	NO, B, Am
RRH 332-103	2.0	bcd	DP <sup>□</sup>	R	NB,NO
RRH 332-10	2.0	bcd	R	R	4
RRH 336-91	2.0	bcd	R	R	3
RRH 332-54	2.0	bcd	R	R	3,4
RRH 336-24	2.0	bcd	R	R	3,4
RRH 336-77	2.0	bcd	R	R	3
RRH 332-57	2.0	bcd	R	I	3,4
RRH 332-105	2.0	bcd	R	R	3
RRH 336-38	2.0	bcd	R	R	3
RRH 332-71	2.3	bcd	I	R	NO, B
Don Silvio RR	2.0	bcd	R	R	
Milenio	3.4	ab	I	I	
Danlí 46	4.5	a	S	S	

<sup>‡</sup> Media de tamaño de pústula: 1= no existe presencia de pústulas, 2 y 3= pústulas menores que 0.3 mm de diámetro, 4= pústulas entre 0.3 - 0.5 mm de diámetro, 5= pústulas entre 0.5 - 0.8 mm de diámetro, 6= pústulas mayores a 0.8 mm.

<sup>‡</sup> La normalización se realizó utilizando la herramienta raíz cuadrada de los datos de severidad para la separación mínima significativa (DMS) en el programa SAS.

<sup>§</sup> Datos seguidos con la misma letra no presentaron diferencia significativa. (P=0.0019)

<sup>□</sup> Datos perdidos

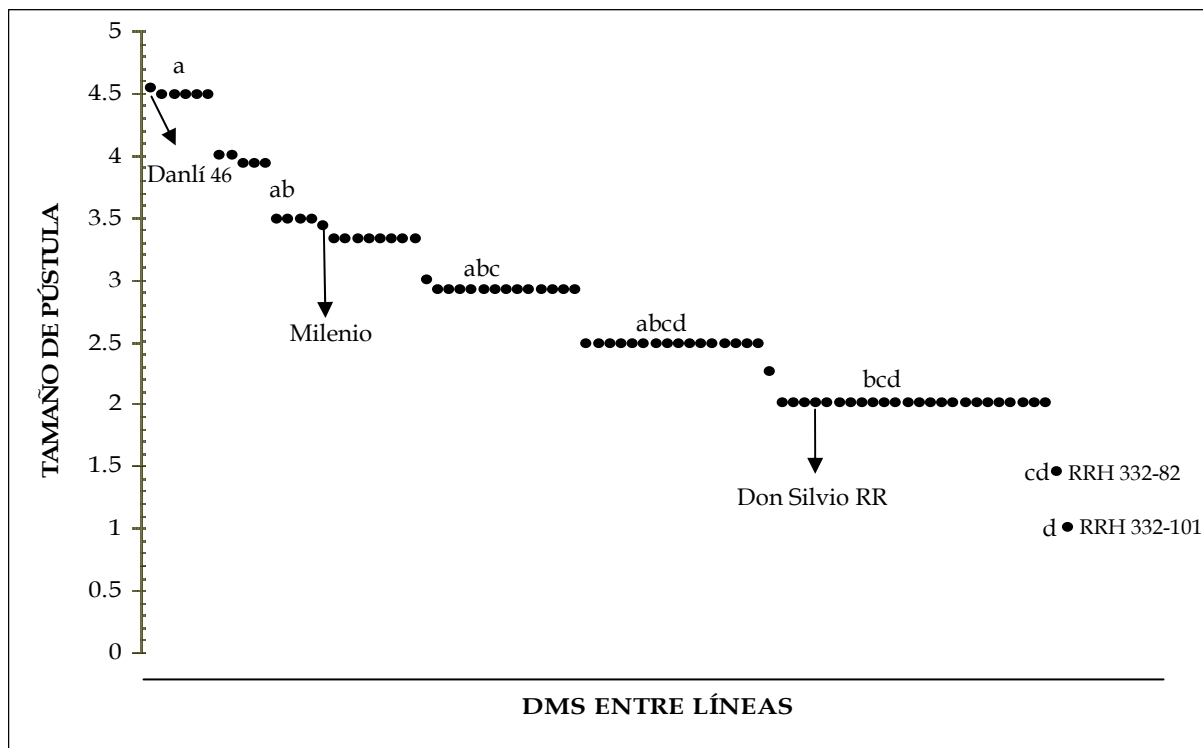


Figura 3. Distribución de las líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí 46) según la diferencia mínima significativa (DMS) de la variable severidad (tamaño de pústula) ( $P=0,0019$ ).

Se demostró que mediante el proceso de mejoramiento convencional se logró un avance significativo en el desarrollo de líneas de frijol con buena resistencia a la roya, ya que el 54% de las líneas evaluadas presentaron valores promedios de tamaño de pústulas iguales o menores a dos y la calificación como resistentes según la escala desarrollada en la Reunión Internacional de Trabajo Sobre Roya del Frijol, celebrada en la Universidad de Puerto Rico en 1983 (Figura 4).

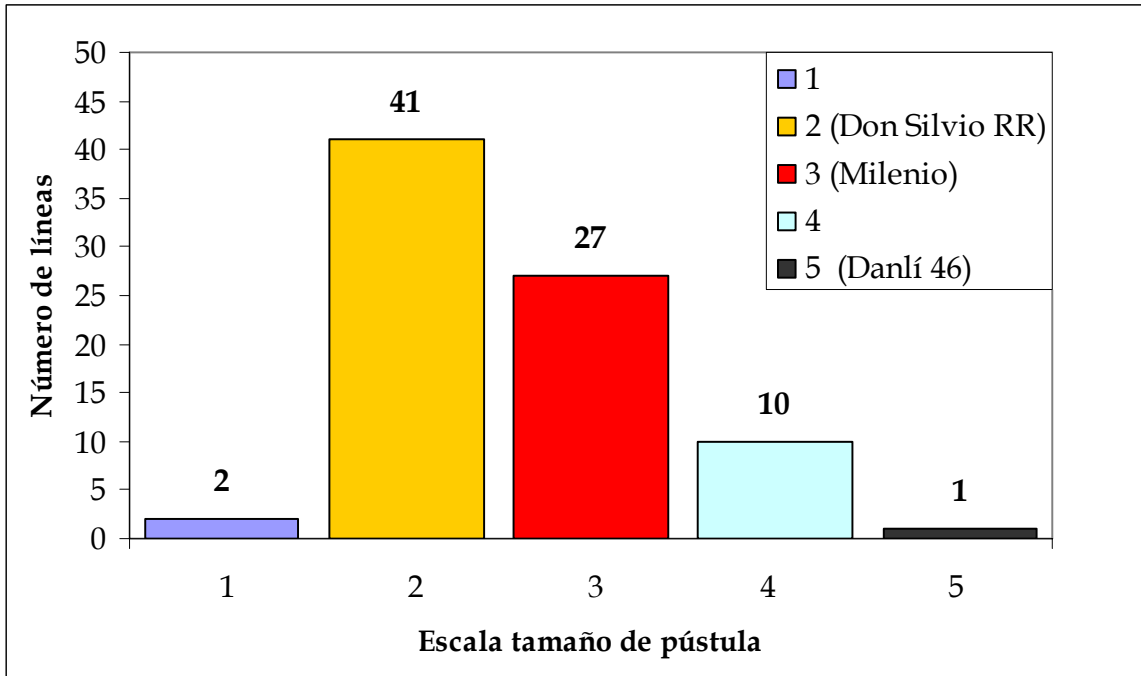


Figura 4. Distribución de las líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí 46) según la severidad de la roya usando la escala de tamaño de pústula. El Ocotal, El Paraíso, Honduras, 2006.

Aparentemente la alta variabilidad en la composición de los aislamientos de roya recolectados, explica la diferencia fenotípica observada entre las dos siembras realizadas de los tratamientos, para la variable severidad (Anexo 6).

La variabilidad en la virulencia del inóculo también se demuestra por los resultados obtenidos en severidad (tamaño de pústula) de las líneas que pertenecen al Vivero de Genes, en los que la combinación de genes Ur-3, Ur-6 y Ur-11 en la línea BelDakMi RMR 14 manifestó la mayor resistencia en campo y la variedad Aurora que únicamente presenta el gen Ur-3, muestra la mayor susceptibilidad del grupo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Evaluación de la severidad de roya (tamaño de pústula) en las líneas del Vivero de Genes. El Ocotal, El Paraíso, Honduras, 2006.

Variedad	Genes	Severidad <sup>‡</sup>	Dms	Reacción fenotípica	
				Siembra 1	Siembra 2
Aurora	Ur-3	3.3 <sup>‡</sup>	abc <sup>§</sup>	S	R
Early Gallatín	Ur-4	2.5	abcde	S	R
Mex 309	Ur-5	2.9	abcd	S	R
Olathe	Ur-6	2.0	bcde	R	R
GN 1140	Ur-7	2.9	abcd	S	R
PC50	Ur-9 y 12	1.5	de	R	R
Resisto	Ur-10	2.5	abcde	S	R
PI 181996	Ur-11	3.5	abc	S	S
Weihing	Ur-3 y 6	1.9	cde	R	S
BelDakMi RR2	Ur-4 y 6	2.0	bcde	R	R
BelDakMi RMR 14	Ur-3, 6 y 11	1.0	e	R	R

<sup>‡</sup> Media de tamaño de pústula: 1= no existe presencia de pústulas, 2 y 3 = pústulas menores que 0.3 mm de diámetro, 4 = pústulas entre 0.3 - 0.5 mm de diámetro, 5 = pústulas entre 0.5 - 0.8 mm de diámetro, 6 = pústulas mayores a 0.8 mm.

<sup>‡</sup> La normalización se realizó utilizando la herramienta raíz cuadrada de los datos de severidad para la separación mínima significativa (DMS) en el programa SAS.

<sup>§</sup> Datos seguidos con la misma letra no presentaron diferencia significativa. (P=0.0019)

### 3.2. EVALUACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES

#### Gen Ur-3 (SK-14)

De las 78 líneas evaluadas con el SCAR SK-14 (asociado al gen Ur-3), 77 líneas (99%) presentaron la banda de 620 pb de este marcador. Esto confirma que el gen es el más común entre estas líneas de origen mesoamericano<sup>¶</sup>. La variedad de referencia Aurora (Nemchinova y Stavely, 1998) utilizada como control positivo (C+) confirma la presencia de este SCAR (Figura 5).

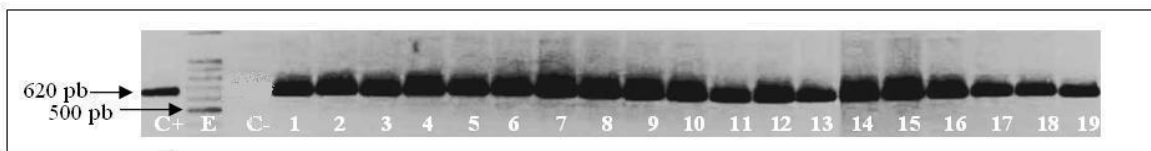


Figura 5. Amplificación del SCAR SK-14 (620 pb) asociado al gen Ur-3 en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 de frijol común (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006.

#### Gen Ur-4 (SA-14)

Sólo cinco de las 78 líneas evaluadas con el SCAR SA-14 (6%) amplificaron la banda de 1079 pb asociada con la presencia del gen homocigoto dominante Ur-4. Siete líneas (9%) amplificaron dos bandas, 1079 y 800 pb, indicando que son líneas heterocigotas para el gen Ur-4. Las 66 líneas (85%) que amplificaron bandas de 800 pb indican la presencia de los alelos recesivos del gen de origen andino Ur-4, por lo que son susceptibles a las razas que superan este gen de resistencia a la roya. La variedad de referencia Early Gallatin (Miklas *et al.* 2003) utilizada como control positivo (C+) confirma la presencia de este SCAR (Figura 6).

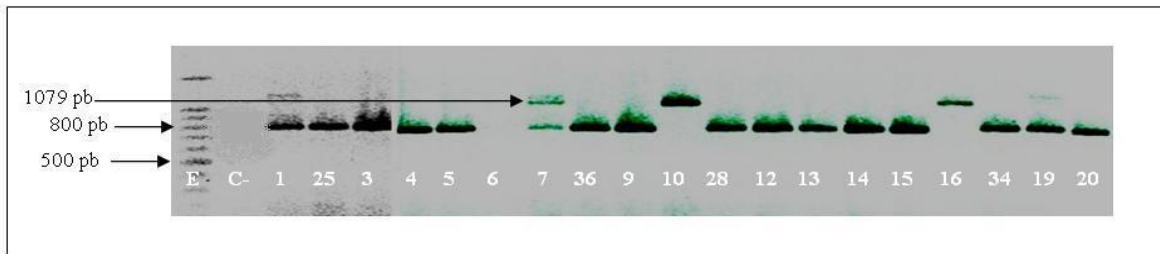


Figura 6. Amplificación del SCAR SA-14 (1079 y 800 pb) asociado al gen Ur-4 en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 de frijol común (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006.

<sup>¶</sup> Rosas J.C. 2006. Presencia de SCARs asociados a genes Ur. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Comunicación Personal.

### Gen Ur-7 (SOAD-12)

La presencia del marcador SCAR SOAD-12 que amplifica la banda de 620 pb, fue observada en 77 líneas (99%) sugiriendo la presencia del gen Ur-7. La variedad de referencia GN 1140 (Park *et al.* 2003) utilizada como control positivo (C+) confirma la presencia de este SCAR (Figura 7).

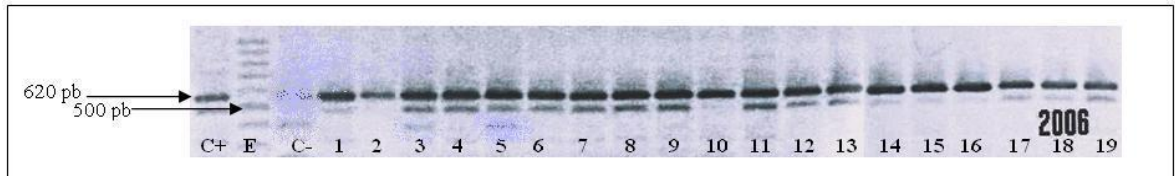


Figura 7. Amplificación del SCAR SOAD-12 (620 pb) asociado al gen Ur-7 en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 de frijol común (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006.

### Gen Ur-11 (UR11 GTO2)

Se determinó que 73 líneas (94%) amplificaron dos bandas a 450/490 pb usando el SCAR UR11-GTO2 asociado a la presencia del gen. La variedad de referencia PI 181996 (Boone *et al.* 1999) utilizada como control positivo (C+) confirma la presencia de este SCAR Ur-11 (Figura 8).

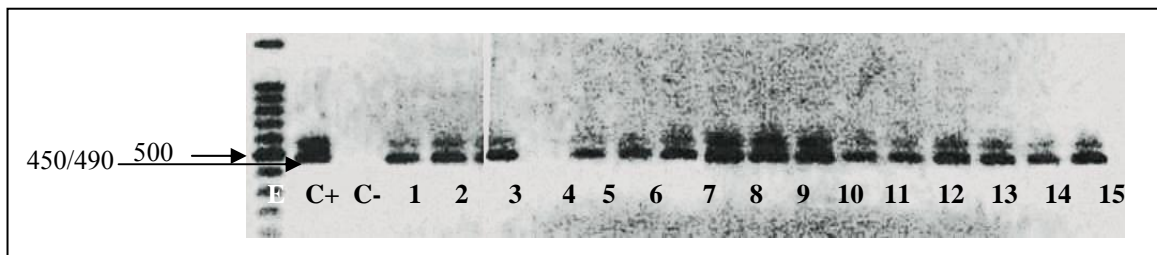


Figura 8. Amplificación del SCAR UR11-GTO2 (450/490 pb) asociado al gen Ur-11 en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 de frijol común (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006.

En la variedad Don Silvio RR, testigo resistente del estudio, se amplificaron los SCAR asociados a los genes Ur-3, Ur-7 y Ur-11. Milenio, variedad comercial usada como padre, también amplificó los marcadores asociados a estos tres genes.

La variedad Danlí 46, testigo susceptible, amplificó bandas asociadas a la presencia de Ur-3, Ur-7 y Ur-11; estos resultados provocaron dudas sobre la veracidad de los datos obtenidos en esta variedad (Anexo 8 y 10). Se realizaron tres pruebas utilizando ADN de Danlí 46 extraído de plantas individuales y de reservorios de semilla diferentes; sin embargo, las bandas mostraron repetitividad en la amplificación, lo que sugiere que los SCARs SK-14, SOAD-12 Y UR11-GTO2 no explican claramente las diferencias en resistencia presentadas en las familias evaluadas. También existe la posibilidad de que la reacción fenotípica observada en las líneas testigos, sea debida a la influencia de otros genes (Ur-5, Ur-6, Ur-10 y Ur-13) de resistencia a la roya que no fueron parte del estudio molecular de este grupo de materiales.

Por otro lado, el gen Ur-4 (SA-14) de origen andino explica en parte la resistencia mostrada en 7 de las 26 líneas (27%) seleccionadas como resistentes en el proceso fenotípico del estudio. Además se demuestra que la característica fue transferida a las progenies (RRH-332 y RRH-336) durante el proceso de selección convencional (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultado del análisis molecular de las líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí46) de frijol común. Zamorano, 2006.

Líneas	Ur - 3	Ur - 4	Ur - 7	Ur-11	Reacción fenotípica		VC <sup>€</sup>
	SK-14	SA-14	SOAD-12	UR11-GTO2	Siembra 1	Siembra 2	
RRH 332-101	+ <sup>¶</sup>	+	+	+	R	R	N,B
RRH 332-82	+	+	+	+	R	R	NO,NB
RRH 332-58	+	-	+	+	R	R	3,4
RRH 336-49	+	-	+	+	R	R	3,4
RRH 332-55	+	+	+	+	R	R	NB
RRH 336-87	+	-	+	+	R	R	3
RRH 332-96	+	-	+	+	R	R	4
RRH 332-49	+	+	+	+	R	R	NO,NB
RRH 336-78	+	-	+	+	R	R	3,4
RRH 332-26	+	+ <sup>§</sup>	+	+	R	R	B
RRH 336-76	+	-	+	+	R	R	3
RRH 332-76	+	-	+	+	R	R	3,4
RRH 336-29	+	-	+	-	R	R	3
RRH 336-67	+	-	+	+	R	R	3
RRH 336-63	+	-	+	+	R	R	3
RRH 332-29	+	+	+	+	R	R	NO, B, Am
RRH 332-103	+	+ <sup>-</sup>	+	-	-	R	NB,NO
RRH 332-10	+	-	+	+	R	R	4
RRH 336-91	+	-	+	+	R	R	3
RRH 332-54	+	-	+	+	R	R	3,4
RRH 336-24	+	-	+	+	R	R	3,4
RRH 336-77	+	-	+	+	R	R	3
RRH 332-57	+	-	+	+	R	I	3,4
RRH 332-105	+	-	+	+	R	R	3
RRH 336-38	+	-	+	+	R	R	3
RRH 332-71	+	-	+	+	I	R	NO, B
Don Silvio RR	+	-	+	+	R	R	
Milenio	+	-	+	+	I	I	
Danlí 46	+	-	+	+	S	S	

<sup>€</sup> Valor comercial de frijol: rojos (3,4), NB=negro brillante, NO=negro opaco, B=blanco, Am=amarillo.

<sup>§</sup> Gen Ur-4 manifiesta sus alelos heterocigotos con la amplificación de dos bandas a 1079 y 800 pb.

<sup>¶</sup> Presencia (+) o ausencia (-) del marcador SCAR asociado al gen de resistencia a la roya.



### 3.3. OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LOS SCARS SI-19 (UR-5) Y SBC-6 (UR-6)

Cuadro 8. Cambios realizados en los protocolos modificados por Pulla Samaniego (2005) en los SCAR de roya SI-19 y SBC-6. Zamorano, 2006.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (µl)</b>	
	<b>SI-19</b>	<b>SBC-6</b>
Agua	8.2	8.1
Buffer (10X) Promega con MgCl <sub>2</sub>	2.5	2.5
dNTP's (4mM)	1.2	1.2
Primers 1 (10mM)	0.5	0.5
Primers 2 (10mM)	0.5	0.5
Taq-Polimerasa (6 U/µl)	0.1	0.2
ADN (30 ng/ml)	2.0	2.0
<b>Volumen Final</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

### Protocolo para SCAR SI-19

Después de realizar los cambios en la concentración de Taq polimerasa (de 0.7 a 0.1 6U/ul) al protocolo desarrollado por Park *et al.* (2003) y modificado por Pulla Samaniego (2005), con el marcador SI-19 se logró amplificar la banda de 560 pb en la variedad México 309, corroborando la presencia del gen Ur-5 identificado por Park *et al.* (2003) (Figura 9).

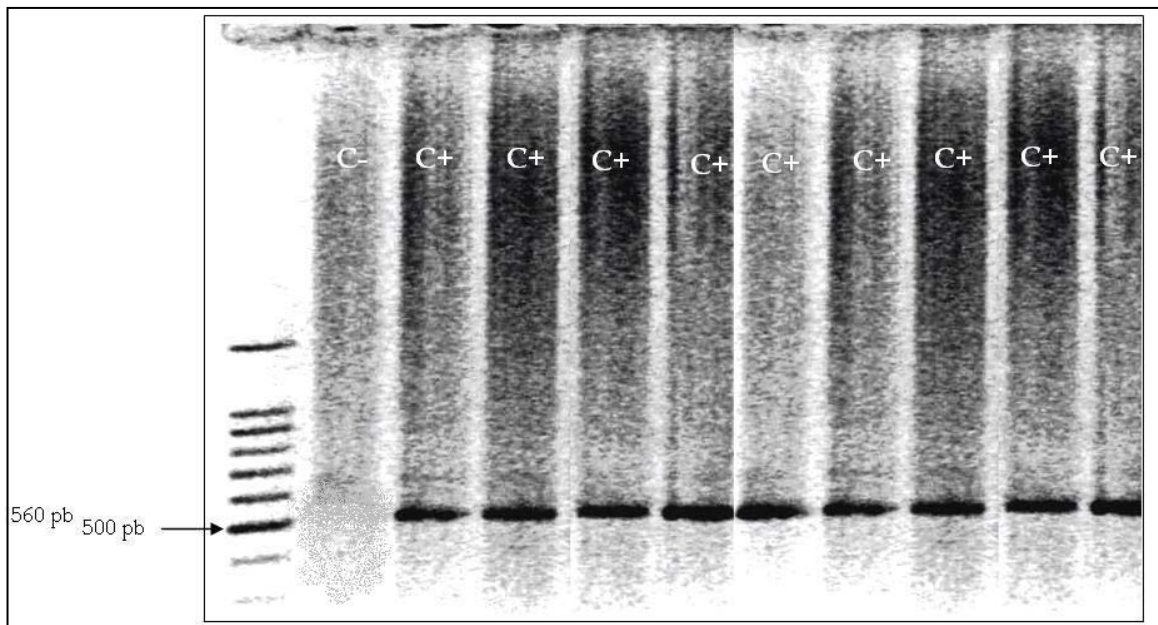


Figura 9. Optimización del protocolo del SCAR SI-19 con adaptaciones al desarrollado por Park *et al.* 2003 (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006.

### Protocolo para SCAR SBC-6

Después de realizar los cambios en la concentración de Taq polimerasa (de 0.7 a 0.2 6U/ul) al protocolo desarrollado por Melotto y Kelly (1998) y modificado por Pulla Samaniego (2005) (Cuadro 8), con el marcador SBC-6 se logró amplificar la banda de 308 pb en la variedad Golden Gate Wax, corroborando la presencia del gen Ur-6 identificado por Melotto y Kelly (1998) (Figura 10).

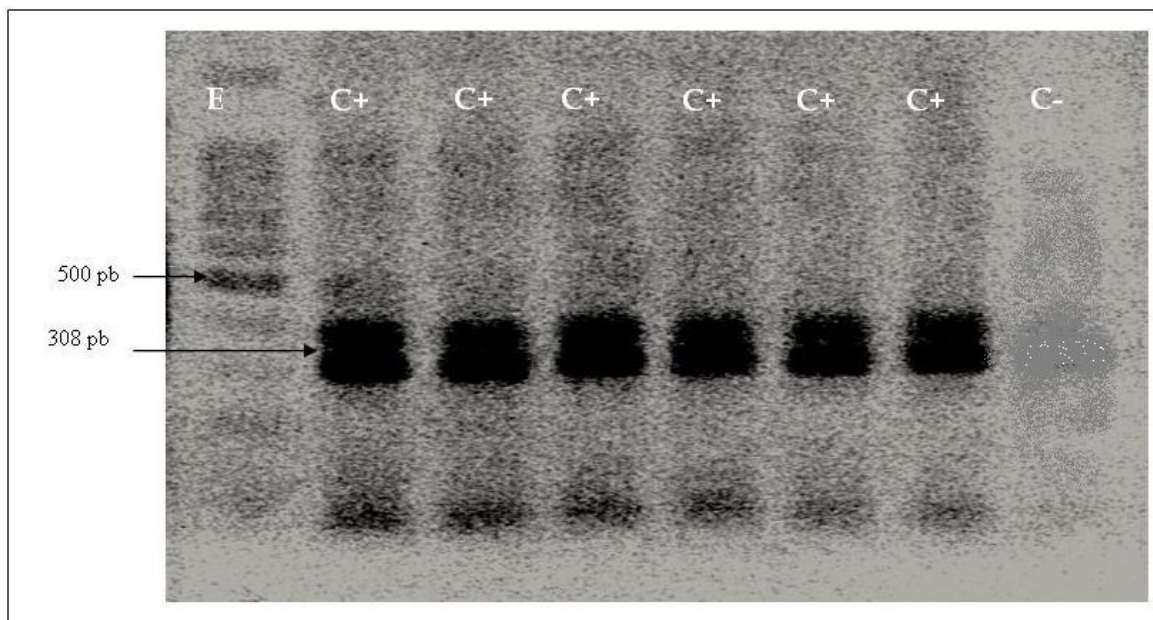


Figura 10. Optimización del protocolo del SCAR SBC-6 con adaptaciones al desarrollado por Mellotto y Kelly (1998) (gel de agarosa al 1.1%). Zamorano, 2006.

El análisis de Chi-cuadrado muestra la confiabilidad del protocolo (Anexo 7) desarrollado para la amplificación de bandas del marcador SI-19 ( $X^2=0.007$ ; g.l.=1;  $P>0.9$ ) y para el marcador SBC-6 ( $X^2=0.006$ ; g.l.=1;  $P>0.9$ ).

## 4. CONCLUSIONES

El proceso de mejoramiento convencional continúa siendo una herramienta fundamental para el desarrollo de germoplasma mejorado en países en desarrollo. Sin embargo, la selección asistida con marcadores moleculares, puede convertirse en una herramienta efectiva y eficiente para el mejoramiento de la resistencia a la roya del frijol.

Las 26 líneas seleccionadas con resistencia a la roya del frijol común son la base para desarrollo de líneas élite comerciales, así como para continuar con el proceso de piramidización de genes Ur en el programa de mejoramiento de Zamorano.

La optimización de dos marcadores SCAR SI-19 y SBC-6, para los genes Ur-5 y Ur-6 de resistencia a la roya, respectivamente, permitirá ampliar la utilización de un mayor número de marcadores en la selección asistida para la resistencia a la roya de frijol común.

La inconsistencia en los resultados de las pruebas moleculares en los testigos susceptibles (Danlí 46 y Aifi Wuríti), no permitió explicar la susceptibilidad observada en el campo con la presencia de genes de resistencia evaluada con los marcadores.

La ampliación de la resistencia a la roya del frijol, mediante la piramidización de genes Ur, es la manera más efectiva para controlar la alta variabilidad genética del patógeno.

## **5. RECOMENDACIONES**

Utilizar las líneas seleccionadas como resistentes en las actividades de piramidización de un mayor número de genes y la obtención de líneas de resistencia a la roya en las clases comerciales rojas y negros pequeños.

Continuar con la evaluación de la efectividad de los marcadores estudiados con un mayor número de líneas y testigos.

Evaluar diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  en los protocolos para obtener una amplificación más clara de los marcadores SCAR asociados a los genes de resistencia a la roya.

Evaluar las líneas seleccionadas con los marcadores SI-19 y SBC-6, implementados durante este estudio, para explicar de mejor manera las diferencias encontradas.

Trabajar con razas específicas para validar la utilidad de los marcadores moleculares.

## 6. LITERATURA CITADA

Araya, CM. 1996. Pathogenic and molecular variability and telia production of *U. appendiculatus* isolates from the Andean and Middle American centers of domestication of bean. Ph.D. dissertation. University of Nebraska, Lincoln. 159 p.

Araya, CM. 2003. Coevolución de Interacciones Hospedante – Patógeno en Frijol Común. Scientific Electronic Library Online. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/fb/v28n3/a01v28n3.pdf>. Consultado: 30 ene. 2006.

Beebe, SE; Pastor-Corrales, MA. 1991. Breeding for disease resistance. In: A. Van Schoonhoven y Voysest (Eds). Common bean Research for Crop Improvement. CIAT, Cali, Colombia, 1991, 561-618.

Boone, WE; Stavely, JR; Weeden, NF. 1999. Development of a sequence-tagged site (STS) marker for Ur-11, a gene conferring resistance to the bean rust fungus, *Uromyces appendiculatus*. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 42:33-34.

Herrera Dávila, B. 2004. Caracterización molecular del germoplasma cultivado y silvestre de frijol común de Honduras. Proyecto especial de Graduación del Programa de Ingeniero Agrónomo, EAP, Zamorano. 22 p.

Kelly, JD; Stavely, JR; Miklas, PN. 1996. Proposed symbols for rust resistance genes. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 39:25-31.

Kelly, JD; Gepts, P; Miklas, PN; Coyne, DP. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. Field Crops Research 82:135–154.

Melotto, M; Kelly, JD. 1998. SCAR markers linked to major disease resistance genes in common bean. Annu. Rept. Bean Improv. Crop. 41:64-65.

Miklas, PN; Delorme, R; Riley, RH. 2003. Identification of QTL conditioning resistance to white mold in a snap bean population. J. Am. Soc. Hort. Sci. 128:564-570.

Mmbaga, M; Steadman, J; Stavely, J. 1996. The use of host resistance in disease management of rust in common bean. Integrated pest management reviews 1:191-200.

Nemchinova, YP; Stavely, JR. 1998. Development of SCAR primers for the Ur-3 rust resistance gene in common bean. Phytopathology 88:S67.

Oliveira, EJ de; Alzate-Marin, AL; Borem, A; Azeredo Fagundes, S de; Barros, EG de; Moreira, MA. 2005 . Molecular marker-assisted selection for development of common bean lines resistant to angular leaf spot. *Plant Breeding* 124:572-575.

Park, SO; Crosby, KM; Coyne, DP; Steadman, JR. 2003. Survey of RAPD and SCAR Markers Linked to the Ur-6 Gene in Pinto Beans. *Annu. Rept. Bean Improv. Coop.* 46:189-190.

Pulla Samaniego, D. 2005. Optimización de marcadores moleculares SCAR para la selección asistida de la resistencia a la roya del frijol. Proyecto especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras, 20.

Stavely, JR, Freytag, GF; Steadman, JR; Schwartz, HF. 1983. The 1983 Bean/Rust Workshop. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 26, iv-vi.

Stavely, JR; Pastor-Corrales, MA. 1989. Rust. In: Schwartz, H.F., Pastor-Corrales, M.A. (Eds.), *Bean Production Problems in the Tropics*. CIAT, Cali, Colombia, pp. 159-194.

Stavely, JR. 1998. Recombination of two major dominant rust resistance genes that are tightly linked in repulsion. *Annu. Rept. Bean Improv. Coop.* 41:17-18.

Steadman, J; Godoy-Lutz, G; Rosas, JC; Beave, J. 2002. Uso de un vivero móvil para obtener patrones de virulencia de la roya del frijol común. *Agronomía Mesoamericana* 13(1): 37-39.

## **7. ANEXOS**



Anexo 1. Extracción de ADN para el análisis molecular de frijol (Método de la Universidad de Wisconsin, UW – Madison)

1. Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes).
2. Agregar 50  $\mu$ l del buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (pestle) de plexiglass de laboratorio. Agregar 450  $\mu$ l adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.
3. Lo más pronto posible (antes de 1 hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 min.
4. Centrifugar la muestra durante 10 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejido (pellet).
5. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
6. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.
7. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300  $\mu$ l de RNAasa A (concentración de 100  $\mu$ g/ml) + buffer TE<sup>b</sup> 0.1X (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.
8. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por 1 min (3 min si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
10. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
11. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletearlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
12. Vaciar el etanol/acetato de sodio<sup>c</sup> y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
13. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.

---

<sup>b</sup>Buffer TE (TRIS HCl 1 M, pH=7.5 ; EDTA 0.5 M, pH=8.0)

<sup>c</sup> Usar acetato de sodio 3H<sub>2</sub>O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

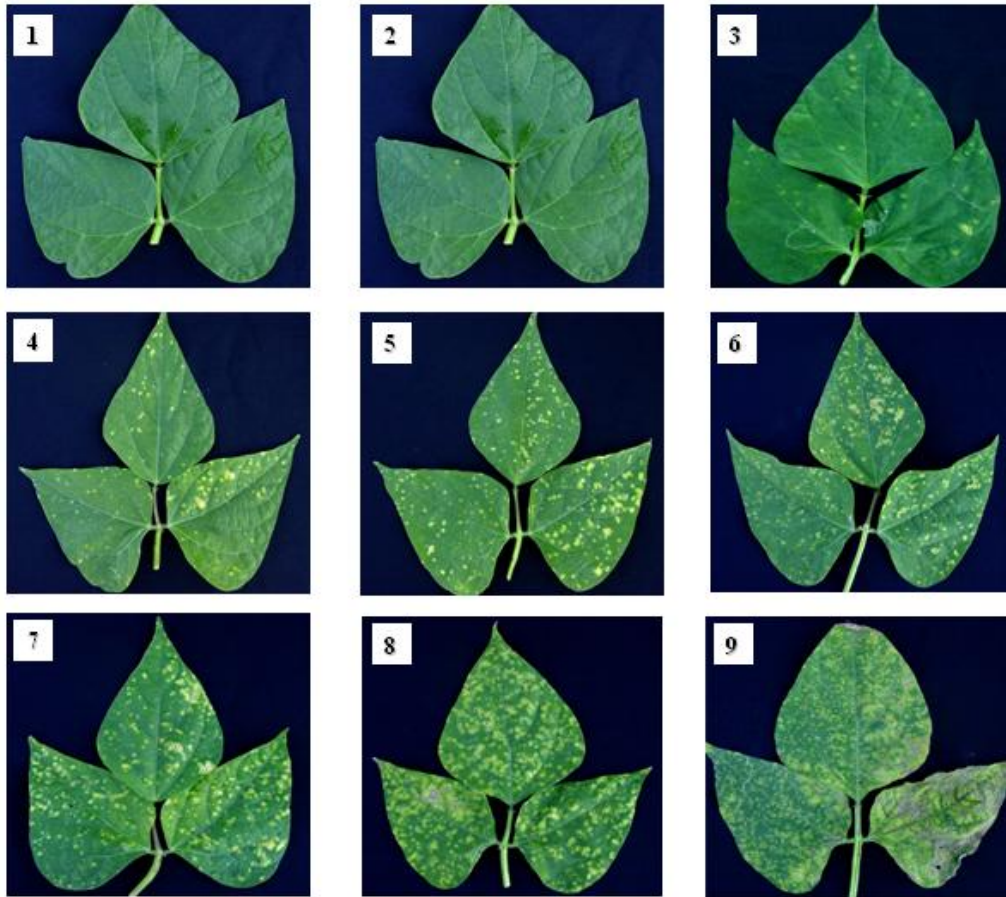
14. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).
15. Rehidratar los pellets agregando 100-200  $\mu$ l de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos en baño maría a 65 °C durante 15 minutos.
16. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN (ng/ml), con el fin de preparar las diluciones necesarias para efectuar las reacciones para su amplificación.

#### Anexo 2. Variedades del Vivero de Genes.

No	Variedad	Gen
1	Aurora	Ur-3
2	Early Gallatín	Ur-4
3	Mex 309	Ur-5
4	Olathe	Ur-6
5	GN 1140	Ur-7
6	PC50	Ur-9 y 12
7	Resisto	Ur-10
8	PI 181996	Ur-11
9	Weihing	Ur-3 y 6
10	BelDakMi RR2	Ur-4 y 6
11	BelDakMi RMR 14	Ur-3, 6 y 11

## Anexo 3. Escala para la evaluación de incidencia de roya en frijol común.

## Escala de severidad (Pastor-Corrales y Schoohoven, 1987)



## Anexo 4. Guía de procedimientos para uso de marcadores moleculares SCAR.

**Protocolo para la amplificación de ADN mediante PCR usando marcadores SCAR.**

1. Descongelar el ADN a temperatura ambiente del plato con las muestras diluidas de ADN guardados en el refrigerador.
2. Realizar los cálculos pertinentes para preparar la mezcla de reacción, según el anexo.
3. Preparar la mezcla de reacción sin incluir las muestras de ADN.
4. Colocar 13  $\mu$ l de la mezcla de reacción a cada celda del plato, luego agregar 2  $\mu$ l de muestra de ADN.
5. Tapar con papel plástico (Microseal<sup>TM</sup> "a") la caja de reacción (platos de 96 celdas).
6. Colocar el plato en el termociclador y amplificar con el perfil térmico para el SCAR.

7. Una vez finalizada la amplificación, guardar los platos con las muestras en el refrigerador hasta proceder a la electroforesis.

#### **Procedimiento para preparación de geles (1.1% agarosa)**

1. Pesar 1.1 g de agarosa y transferir a un erlenmeyer de 500 ml.
2. Agregar 110 ml de Buffer TBE 0.5X.
3. Calentar la solución en el horno microondas durante 40 segundos. Retirar y agitar vigorosamente.
4. Calentar nuevamente durante unos 20 segundos.
5. Colocar el erlenmeyer en un recipiente con agua para bajar la temperatura de la solución a 60 °C.
6. Colocar la solución en una bandeja para electroforesis, previamente sellada en los extremos y colocar el peine.

#### **Procedimiento para electroforesis usando marcadores SCAR**

1. Mezclar 15 µl de cada muestra amplificada con 3 µl de Buffer 6X y sembrar en los orificios de la gel.
2. Dejar correr la electroforesis por 50 min a 100 V.
3. Sumergir la gel en una solución de Bromuro de Etidio y agitar suavemente durante 30-45 min.
4. Transferir la gel al transiluminador de rayos UV, usando el equipo de protección adecuado.
5. Fotografiar la gel.

#### **Procedimiento para dilución de primers**

1. Centrifugar durante un minuto el primer liofilizado.
2. Multiplicar por el factor 10 el peso del primer (nmoles), para determinar el volumen de TBE 1X que se usará en la dilución.
3. De esta manera se obtiene una solución madre del primer a una concentración de 100 µl.

Para preparar aliquots de primers a una concentración de 10 µM:

- Colocar en un tubo eppendorf 10 µl de primer (100 µM).
- Agregar 90µl de buffer TBE 1X.
- Refrigerar.

Anexo 5. Guía para la elaboración de componentes adaptados para PCR

### **CUANTIFICACIÓN DE ADN**

#### **Buffer TNE 10X (1000 ml)**

- 12.11 g (100mM) Tris Base
- 3.72 g (10mM) EDTA Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O
- 116.89 g (2m) NaCl

Procedimiento:

- Pesar en un beaker los reactivos y disolver con 800 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.4 agregando gotas de HCl concentrado y agitando después de cada adición. Filtrar con papel 0.45 µm, al momento de transferir a un frasco volumétrico de 1000 ml.

- Completar el volumen con agua destilada y refrigerar.

### **AMPLIFICACIÓN DE ADN**

#### **Buffer 10X (100 ml)**

50 ml (500 mM) Tris Base 1M (pH 8.5)  
 20 ml (200 mM) KCL 1 M  
 2.5 ml (25 Mm) MgCl<sub>2</sub>

Procedimiento:

- Usar pipetas volumétricas para medir los ingredientes señalados.
- Trasferir a un frasco volumétrico de 100 ml y completar el volumen con agua destilada.
- Refrigerar.

#### **dNTP's 10X (1000 µl)**

25 µl (25mM) dCTP 100mM  
 25 µl (25mM) dGTP 100mM  
 25 µl (25mM) dTTP 100mM  
 25 µl (25mM) dATP 100mM

Procedimiento:

- Colocar los volúmenes indicados de dNTP's en un tubo eppendorf.
- Agregar 900 µl de agua destilada y mezclar.
- Refrigerar

### **SEPARACIÓN DE ADN**

#### **Buffer TBE 5X (1000ml)**

54g de Tris Base  
 27.5 g de Ácido bórico  
 20 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0

Procedimiento:

- Pesar en un beaker los ingredientes indicados.
- Disolver y transferir a un frasco volumétrico de 1000 ml.
- Medir con pipeta volumétrica 20 ml de EDTA y agregar a la solución anterior.
- Mezclar y completar el volumen de 1000 ml con agua destilada.

Para elaborar la gel de azarosa y llenar el tanque de electroforesis es necesario emplear de TBE Buffer a una concentración 0.5X, para esto:

Medir en una probeta 100 ml de Buffer TBE 5X.

- Transferir a un frasco volumétrico de 1000 ml y complementar el volumen con agua destilada.

#### **Buffer 6X (10 ml)**

25 mg de Bromofenol azul  
 2 g de Ficoll

Procedimiento:

- Pesar en un beaker los ingredientes.
- Disolver los compuestos agregando pequeñas cantidades de agua destilada.
- Trasferir la solución a un frasco volumétrico de 10 ml y complementar el volumen con agua destilad.

### Solución de Bromuro de Etidio (400 µl)

- Colocar 400 ml de agua destilada en un recipiente.
- Agregar 40µl de Bromuro de Etidio en una solución de 10 mg/ml.
- Después de correr la electroforesis sumergir la gel en la solución diluida de Bromuro de Etidio por 30-40 min y observar al transiluminador UV.

Anexo 6. Evaluación de la severidad de roya (tamaño de pústula) en líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos (Don Silvio RR, Milenio y Danlí 46) de frijol. El Ocotol, El Paraíso, Honduras, 2006.

Líneas	Severidad <sup>‡</sup>	Dms	Reacción fenotípica	
			Siembra 1	Siembra 2
RRH 332-4	2.5 <sup>‡</sup>	abcde <sup>s</sup>	R	I
RRH 332-6	2.5	abcde	R	I
RRH 332-8	4.0	ab	I	I
RRH 332-9	2.5	abcde	R	I
RRH 332-10	2.0	bcde	R	R
RRH 332-15	4.5	a	I	I
RRH 332-19	4.5	a	I	I
RRH 332-26	2.0	bcde	R	R
RRH 332-28	2.9	abcd	R	I
RRH 332-29	2.0	bcde	R	R
RRH 332-32	4.5	a	I	I
RRH 332-33	3.9	ab	I	I
RRH 332-35	2.5	abcde	I	R
RRH 332-43	2.9	abcd	I	R
RRH 332-49	2.0	bcde	R	R
RRH 332-50	2.5	abcde	I	R
RRH 332-54	2.0	bcde	R	R
RRH 332-55	2.0	bcde	R	R
RRH 332-56	2.9	abcd	R	I
RRH 332-57	2.0	bcde	R	I
RRH 332-58	2.0	bcde	R	R
RRH 332-66	4.0	ab	I	I
RRH 332-70	2.5	abcde	I	R
RRH 332-71	2.3	bcde	I	R
RRH 332-73	2.5	abcde	R	R
RRH 332-76	2.0	bcde	R	R
RRH 332-77	2.5	abcde	R	I
RRH 332-82	1.5	de	R	R
RRH 332-92	2.5	abcde	I	R
RRH 332-96	2.0	bcde	R	R
RRH 332-97	3.3	abc	S	R
RRH 332-98	3.3	abc	S	R
RRH 332-100	2.9	abcd	I	R
RRH 332-101	1.0	e	R	R
RRH 332-102	2.5	abcde	R	I
RRH 332-103	2.0	bcde	DP <sup>o</sup>	R
RRH 332-104	3.3	abc	S	I
RRH 332-105	2.0	bcde	R	R

Líneas	Severidad <sup>‡</sup>	Dms	Reacción fenotípica	
			Siembra 1	Siembra 2
RRH 332-108	2.5	abcde	R	R
RRH 332-109	3.3	abc	R	S
RRH 332-110	4.5	a	I	I
RRH 336-4	3.3	abc	I	R
RRH 336-5	2.5	abcde	R	R
RRH 336-8	3.3	abc	S	R
RRH 336-11	2.5	abcde	I	R
RRH 336-12	3.3	abc	S	R
RRH 336-15	2.9	abcd	I	R
RRH 336-16	3.5	abc	I	I
RRH 336-18	2.9	abcd	I	R
RRH 336-21	2.5	abcde	I	R
RRH 336-22	2.5	abcde	I	R
RRH 336-24	2.0	bcde	R	R
RRH 336-28	2.9	abcd	I	R
RRH 336-29	2.0	bcde	R	R
RRH 336-35	3.3	abc	S	R
RRH 336-37	2.9	abcd	I	R
RRH 336-38	2.0	bcde	R	R
RRH 336-39	3.5	abc	I	I
RRH 336-40	3.0	abcd	I	I
RRH 336-43	4.5	a	S	I
RRH 336-48	3.9	ab	S	I
RRH 336-49	2.0	bcde	R	R
RRH 336-50	2.9	abcd	R	I
RRH 336-56	2.9	abcd	R	I
RRH 336-57	3.9	ab	I	S
RRH 336-61	3.5	abc	I	I
RRH 336-63	2.0	bcde	R	R
RRH 336-67	2.0	bcde	R	R
RRH 336-70	2.9	abcd	R	I
RRH 336-76	2.0	bcde	R	R
RRH 336-77	2.0	bcde	R	R
RRH 336-78	2.0	bcde	R	R
RRH 336-85	2.9	abcd	I	R
RRH 336-86	2.5	abcde	I	R
RRH 336-87	2.0	bcde	R	R
RRH 336-89	3.5	abc	I	I
RRH 336-90	2.9	abcd	R	I
RRH 336-91	2.0	bcde	R	R
Danlí 46	4.5	a	S	S
Don Silvio RR	2.0	bcde	R	R
Milenio	3.4	abc	I	I

<sup>‡</sup> Media de tamaño de pústula: 1= no existe presencia de pústulas, 2 y 3 = pústulas menores que 0.3 mm de diámetro, 4 = pústulas entre 0.3 - 0.5 mm de diámetro, 5 = pústulas entre 0.5 - 0.8 mm de diámetro, 6 = pústulas mayores a 0.8 mm.

<sup>¥</sup> La normalización se realizó utilizando la herramienta raíz cuadrada de los datos de severidad para la separación mínima significativa (DMS) en el programa SAS.

<sup>§</sup> Datos seguidos con la misma letra no presentaron diferencia significativa. (P=0.0019)

<sup>□</sup> Datos perdidos

## Anexo 7. Adaptación de componentes para PCR usando marcadores SCAR.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (µl)</b>	
	<b>SI-19</b>	<b>SBC-6</b>
Agua	8.2	8.1
Buffer (10X) Promega con MgCl <sub>2</sub>	2.5	2.5
dNTP's (4mM)	1.2	1.2
Primers 1 (10mM)	0.5	0.5
Primers 2 (10mM)	0.5	0.5
Taq-Polimerasa (6 U/µl)	0.1	0.2
ADN (30 ng/ml)	2.0	2.0
<b>Volumen Final</b>	<b>15</b>	<b>15</b>



Anexo 8. Resultado del análisis molecular de las líneas F5 de las poblaciones RRH-332 y RRH-336 y variedades testigos de frijol común. Zamorano, 2006.

Líneas	Severidad <sup>‡</sup>	Ur - 3	Ur - 4	Ur - 7	Ur-11	Reacción fenotípica	
		SK-14	SA-14	SOAD-12	GTO2-UR11	Siembra 1	Siembra 2
RRH 332-4	2.5	+ <sup>¶</sup>	-	+	+	R	I
RRH 332-6	2.5	+	+ <sup>-§</sup>	+	+	R	I
RRH 332-8	4.0	+	-	+	+	I	I
RRH 332-9	2.5	+	+ <sup>-</sup>	+	+	R	I
RRH 332-10	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 332-15	4.5	+	-	+	+	I	I
RRH 332-19	4.5	+	-	+	+	I	I
RRH 332-26	2.0	+	+ <sup>-</sup>	+	+	R	R
RRH 332-28	2.9	+	-	+	+	R	I
RRH 332-29	2.0	+	+	+	+	R	R
RRH 332-32	4.5	+	-	+	+	I	I
RRH 332-33	3.9	+	-	+	+	I	I
RRH 332-35	2.5	+	-	+	+	I	R
RRH 332-43	2.9	+	+ <sup>-</sup>	+	+	I	R
RRH 332-49	2.0	+	+	+	+	R	R
RRH 332-50	2.5	+	-	+	+	I	R
RRH 332-54	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 332-55	2.0	+	+	+	+	R	R
RRH 332-56	2.9	+	-	+	+	R	I
RRH 332-57	2.0	+	-	+	+	R	I
RRH 332-58	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 332-66	4.0	+	-	+	+	I	I
RRH 332-70	2.5	+	-	-	-	I	R
RRH 332-71	2.3	+	-	+	+	I	R
RRH 332-73	2.5	+	+ <sup>-</sup>	+	+	R	R
RRH 332-76	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 332-77	2.5	+	-	+	+	R	I
RRH 332-82	1.5	+	+	+	+	R	R
RRH 332-92	2.5	+	-	+	+	I	R
RRH 332-96	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 332-97	3.3	+	-	+	+	S	R
RRH 332-98	3.3	+	-	+	+	S	R
RRH 332-100	2.9	+	-	+	+	I	R
RRH 332-101	1.0	+	+	+	+	R	R
RRH 332-102	2.5	+	-	+	+	R	I
RRH 332-103	2.0	+	+ <sup>-</sup>	+	-	-	R
RRH 332-104	3.3	+	-	+	-	S	I
RRH 332-105	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 332-108	2.5	+	+ <sup>-</sup>	+	+	R	R
RRH 332-109	3.3	+	-	+	+	R	S

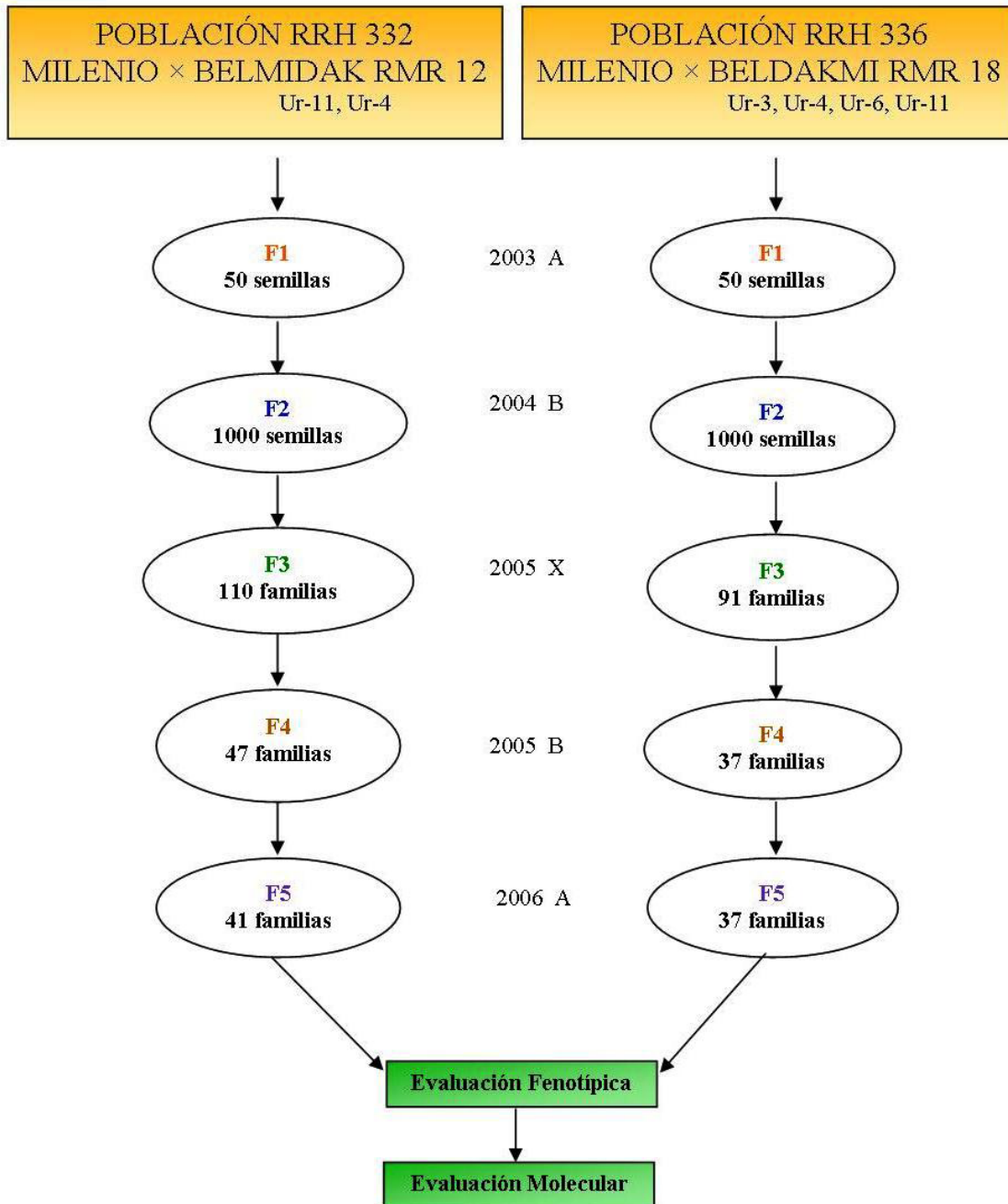
Líneas	Severidad <sup>‡</sup>	Ur - 3	Ur - 4	Ur - 7	Ur-11	Reacción fenotípica	
		SK-14	SA-14	SOAD-12	GTO2-UR11	Siembra 1	Siembra 2
RRH 332-110	4.5	+	-	+	+	I	I
RRH 336-4	3.3	+	-	+	+	I	R
RRH 336-5	2.5	+	-	+	+	R	R
RRH 336-8	3.3	+	-	+	+	S	R
RRH 336-11	2.5	+	-	+	+	I	R
RRH 336-12	3.3	+	-	+	+	S	R
RRH 336-15	2.9	+	-	+	+	I	R
RRH 336-16	3.5	+	-	+	+	I	I
RRH 336-18	2.9	+	-	+	+	I	R
RRH 336-21	2.5	+	-	+	+	I	R
RRH 336-22	2.5	+	-	+	+	I	R
RRH 336-24	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-28	2.9	+	-	+	+	I	R
RRH 336-29	2.0	+	-	+	-	R	R
RRH 336-35	3.3	+	-	+	+	S	R
RRH 336-37	2.9	+	-	+	+	I	R
RRH 336-38	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-39	3.5	+	-	+	+	I	I
RRH 336-40	3.0	+	-	+	+	I	I
RRH 336-43	4.5	+	-	+	+	S	I
RRH 336-48	3.9	+	-	+	+	S	I
RRH 336-49	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-50	2.9	+	-	+	+	R	I
RRH 336-56	2.9	+	-	+	+	R	I
RRH 336-57	3.9	+	-	+	+	I	S
RRH 336-61	3.5	+	-	+	+	I	I
RRH 336-63	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-67	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-70	2.9	+	-	+	+	R	I
RRH 336-76	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-77	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-78	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-85	2.9	+	-	+	+	I	R
RRH 336-86	2.5	+	-	+	-	I	R
RRH 336-87	2.0	+	-	+	+	R	R
RRH 336-89	3.5	+	-	+	+	I	I
RRH 336-90	2.9	+	-	+	+	R	I
RRH 336-91	2.0	+	-	+	+	R	R
Danlí 46	4.5	+	-	+	+	S	S
Don Silvio RR	2.0	+	-	+	+	R	R
Milenio	3.4	+	-	+	+	I	I

<sup>‡</sup> Gen Ur-4 manifiesta sus alelos heterocigotos con la amplificación de dos bandas a 1079 y 800 pb.

<sup>†</sup> Presencia (+) o ausencia (-) del marcador SCAR asociado al gen de resistencia a la roya.

Anexo 9. Proceso de mejoramiento para la Resistencia a Roya del Frijol Común en Honduras realizada por el PIF.

## RRH RESISTENCIA A ROYA EN HONDURAS



Anexo10. Posibles falsos positivos en el análisis molecular usando SCAR asociados a genes de resistencia a la roya en la variedad Danlí 46 (D46) (testigo susceptible).

