

Caracterización de la diversidad genética del germoplasma hondureño de frijol común

Raúl David Rubio Medina

Honduras
Diciembre, 2002

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Caracterización de la diversidad genética del germoplasma hondureño de frijol común

Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Ciencia y Producción Agropecuaria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por

Raúl David Rubio Medina

Honduras
Diciembre, 2002

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

Raúl David Rubio Medina

Honduras
Diciembre, 2002

Caracterización de la diversidad genética del germoplasma hondureño de frijol común

Presentado por

Raúl David Rubio Medina

Aprobada:

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor Principal

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.
Coordinador, Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Pablo Emilio Paz, Ph. D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Luwbia Aranda, Ing. Agr.
Asesor

Mario Contreras, Ph. D.
Director General

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Coordinador de Área Temática

DEDICATORIA

A Dios, todopoderoso que siempre me acompaña y me guía por el buen camino.

A mi Padre Raúl, por la formación que me dio para seguir adelante.

A mi madre Delia, por confiar en mí.

A mi segunda madre Alexandra, por todo su amor, preocupación, confianza, apoyo incondicional y siempre darme fuerzas para seguir adelante.

A mis hermanos, Sandra, Jonathan, María Belén, Carlyne, Raúl Alexander, Jacob, por su cariño, estar siempre a mi lado y darme el apoyo para lograr mis metas.

A toda la familia Rubio.

A toda la Familia Romero.

A todas las personas que siempre han estado a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar siempre conmigo y ser mi guía en todo momento.

A mi familia por su apoyo, cariño, por su preocupación, esfuerzo y confianza en mí en todo momento.

Al Dr. Juan Carlos Rosas, por su apoyo tiempo y confianza en la realización de este estudio.

A la Ing. Aracely Castro, por su apoyo incondicional.

Al Dr. Pablo Emilio Paz, por su apoyo, tiempo y colaboración en la realización de este estudio.

A la Ing. Luwbia Aranda, por su ayuda, tiempo y colaboración en la realización de este estudio.

A todo el personal del Programa de Investigación en Frijol, por la colaboración en la realización de este estudio.

A mi gran amiga Ligia Luna, por los buenos momentos, por el apoyo incondicional, gracias por la amistad, que la valoro como una de las mejores de mi vida.

A Byron y Deysi, por su amistad y apoyo.

Al Licenciado Roger Ramos, Tomasa y Luz, por su amistad y colaboración incondicional en este trabajo.

A Jorge Venegas, Danilo Moreta, Edwin Vinueza, Jacquelin Moreno, Gerson Morales, por su apoyo y colaboración en este trabajo.

A mis amigos: Guillermo Arce, Edison Andrade, Jimmy Zumba, Eli Sánchez, Alex Espinoza, Antonio Andino, Linnier Torres, Juan Pablo Sánchez, Andrés Egas, Manuel Cerda, Marcos Tomalá, Rafael Trejo, Andrés Suazo, Carlos Suazo, Montgomery Sánchez, Fausto Plaza, Diana Morán, Valeria Flores, Antonella Córdova, Vanesa Piedra, Andrea Ontaneda, Ma. Isabel Córdova, por su especial amistad.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A Zamorano, que a través del Fondo Dotal Suizo financió mis primeros tres años de estudio.

A la Fundación Nippón por el financiamiento para terminar mis estudios.

Al Programa de Investigación en Frijol (PIF) por el financiamiento y colaboración para la realización del estudio.

Al Proyecto Bean Cowpea CRISP por el financiamiento y colaboración para la realización del estudio.

RESUMEN

Rubio Medina, Raúl. 2002. Caracterización de la diversidad genética del germoplasma hondureño de frijol común. Proyecto Especial de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras.

Los centros de domesticación de Mesoamérica y la región sur de los Andes se relacionan con la existencia de dos reservorios genéticos del frijol cultivado. El objetivo del estudio fue estimar la diversidad genética de un grupo de accesiones del germoplasma hondureño, utilizando criterios morfológicos, agronómicos y moleculares, para su empleo en el mejoramiento del frijol común. El estudio se realizó en Zamorano, Honduras, se utilizaron 39 accesiones, nueve variedades comerciales y dos testigos resistentes. En el verano se caracterizaron agronómicamente utilizando un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con tres repeticiones. En todas las variables se observaron diferencias significativas ($P=0.01$) en el germoplasma, sugiriendo que existe una gran variabilidad en el germoplasma hondureño; se identificó un grupo de accesiones con alto potencial de rendimiento (19%). En la época de verano y primera se evaluaron las reacciones a enfermedades, utilizando un diseño BCA con dos repeticiones. Se determinó la incidencia y severidad utilizando la escala del CIAT. Se observó diferencia significativa ($P=0.01$) entre los genotipos y el testigo G06727 (resistente a la mancha angular), excepto para bacteriosis, debido a que todos los genotipos resultaron susceptibles. Todos los genotipos fueron susceptibles a bacteriosis, pudrición carbonosa, antracnosis y mancha angular. Se evaluó la respuesta a la inoculación con *Rhizobium* en invernadero empleando un diseño BCA con cuatro repeticiones. Los genotipos Danlí 46 y F-147 presentaron mayor nodulación y se observaron diferencias entre algunos de los tratamientos y el testigo absoluto (sin inoculación ni fertilización nitrogenada), y el testigo nitrógeno (sin inoculación y con fertilización nitrogenada). En el peso seco de nódulos no se observó diferencia significativa. Para el peso seco de follaje se registraron diferencias entre algunos de los tratamientos y los testigos. Los testigos absolutos y con aplicación con nitrógeno presentaron mayor vigor vegetativo. En la evaluación molecular se utilizaron 19 cebadores RAPD, y se observaron polimorfismos (presencia/ausencia de bandas); se estimó la similaridad genética aplicando el Coeficiente de DICE. Los marcadores RAPDs generaron 42 bandas con 26% de polimorfismo. Los resultados indican una alta variabilidad genética, encontrándose 28 modelos distintos de agrupaciones; se identificó que existen accesiones genéticamente similares. Los genotipos F-190, F-371 y Concha Rosada presentaron un alto grado de similitud genética y agronómica, y poseen un buen potencial de rendimiento. Se debe continuar evaluando los mejores materiales y considerarlos como progenitores en programas de fitomejoramiento.

Palabras clave: Accesiones, dendrograma, marcadores moleculares, *Phaseolus vulgaris*, rendimiento.

NOTA DE PRENSA

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL COMÚN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado uno de los cultivos alimenticios más importantes en la dieta de la mayoría de la población rural y urbana en Centro y Sur América. En Honduras, las variedades criollas de frijol utilizadas por los pequeños productores, están relativamente bien adaptadas a sus sistemas de producción caracterizados por suelos de baja fertilidad, estrés de sequía, cultivo en asocio o en secuencia con maíz, empleo de bajos niveles de insumos (fertilizantes y pesticidas) y una pobre mecanización del cultivo. El área de siembra y las tecnologías de manejo varían de una región a otra, obteniéndose un rendimiento promedio de 761 kg/ha en un área sembrada de 111,646 ha.

Contrario a lo que muchos consideran, en la actualidad, existen variedades y germoplasma mejorados que poseen una base genética adecuada que confiere mayor adaptación y potencial de rendimiento, resistencia a las enfermedades y factores de estrés abióticos predominantes. Sin embargo, muchas limitantes de la producción aún deben superarse a través del mejoramiento genético; el valor genético del germoplasma criollo y silvestre del frijol común resultan ser de gran importancia en esta tarea.

El mejoramiento tradicional tiene limitaciones como la rapidez y precisión con que muchas de las características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas y utilizadas en sus programas de mejoramiento. Pero, algunas técnicas que han seguido la vía del análisis del ADN, han contribuido a la identificación de marcadores moleculares, que algunos investigadores utilizan en sus programas de mejoramiento.

Con el objetivo de estimar la diversidad genética de un grupo de accesiones del germoplasma hondureño, el Programa de Investigación de Frijol en Zamorano realizó ensayos utilizando criterios morfológicos, agronómicos y moleculares durante febrero y agosto del 2002, para identificar genotipos que se puedan emplear en el mejoramiento genético del frijol común.

En la época de verano, se evaluaron 48 genotipos de frijol, determinándose que existe una gran variabilidad en el germoplasma hondureño y se identificó un grupo con alto potencial de rendimiento. En la época de verano y primera, los genotipos mostraron ser susceptibles a las enfermedades bacteriosis, pudrición carbonosa, antracnosis y mancha angular.

Los genotipos de frijol respondieron de manera favorable a la inoculación con *Rhizobium* a nivel de invernadero. Esto indica que se puede reducir el uso de fertilizantes sintéticos e incrementar los rendimientos.

En el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano, se pudo identificar que existen accesiones genéticamente similares como otras con alta variabilidad, mediante el uso de marcadores tipo RAPDs.

La variabilidad del frijol es muy amplia, y se identificaron genotipos que presentaron un alto grado de similitud genética y agronómica, y que poseen un buen potencial de rendimiento. Estos genotipos son una base importante para el mejoramiento y desarrollo de nuevas variedades comerciales que ayuden a los productores a incrementar su productividad.

Licda. Sobeyda Álvarez

CONTENIDO

	Portada.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Nota de Prensa.....	viii
	Contenido.....	x
	Índice de Cuadros.....	xiii
	Índice de Figuras.....	xiv
	Índice de Anexos.....	xv
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	OBJETIVOS.....	2
1.1.1	General.....	2
1.1.2	Específicos.....	2
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	PRODUCCIÓN DE FRIJOL.....	3
2.2	BANCOS DE GERMOPLASMA.....	4
2.3	ENFERMEDADES DEL FRIJOL.....	5
2.3.1	Bacteriosis común del frijol.....	6
2.3.2	Pudrición carbonosa.....	6
2.3.3	Antracnosis.....	7
2.3.4	Mancha angular.....	7
2.3.4	Evaluación del germoplasma.....	8
2.4	MARCADORES MOLECULARES PARA EL FITOMEJORAMIENTO.....	9
2.4.1	Marcadores moleculares tipo RAPD.....	9
2.4.1.1	Aplicación de los marcadores tipo RAPD.....	10
2.4.1.1.1	Mapeo genético e identificación de caracteres de interés.....	10
2.4.1.1.2	Evaluación de germoplasma.....	10
2.5	FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.....	10
2.5.1	Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas.....	11

3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1	ESTUDIO I: CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL.....	12
3.1.1	Localización del estudio.....	12
3.1.2	Preparación de terreno y siembra.....	13
3.1.3	Fertilización.....	13
3.1.4	Cosecha.....	13
3.1.5	Variables medidas.....	13
3.1.5.1	Días a emergencia.....	13
3.1.5.2	Días a floración (etapa R6).....	13
3.1.5.3	Días a madurez fisiológica (etapa R9).....	13
3.1.5.4	Altura de planta.....	13
3.1.5.5	Hábito de crecimiento.....	14
3.1.5.6	Color de la semilla.....	14
3.1.5.7	Rendimiento.....	14
3.1.5.8	Componentes de Rendimiento.....	15
3.1.5.8.1	Número de vainas por planta (NVP).....	15
3.1.5.8.2	Número de semillas por vaina (NSV).....	15
3.1.5.8.3	Peso seco e cien semillas (PSCS).....	15
3.1.2	Diseño experimental y análisis estadístico.....	15
3.2	ESTUDIO II: EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL A ENFERMEDADES.....	15
3.2.1	Localización del estudio.....	15
3.2.2	Reacción a bacteriosis común.....	17
3.2.3	Reacción a pudrición carbonosa (Macrophomina).....	18
3.2.4	Reacción a antracnosis.....	18
3.2.5	Reacción a la mancha angular.....	18
3.2.6	Diseño experimental y análisis estadístico.....	19
3.3	ESTUDIO III: RESPUESTA EL GERMOPLASMAHONDUREÑO DE FRIJOL A LA INOCULACIÓN CON <i>RHIZOBIUM</i> EN INVERNADERO.....	19
3.3.1	Localización del estudio.....	19
3.3.2	Cultivo de Rhizobium.....	19
3.3.3	Medio de cultivo.....	19
3.3.4	Preparación del inoculante.....	19
3.3.5	Medio de crecimiento.....	20
3.3.6	Siembra.....	20
3.3.7	Inoculación y fertilización.....	20
3.3.8	Variables medidas.....	20
3.3.8.1	Coloración del follaje.....	20
3.3.8.2	Número de nódulos (NN).....	21
3.3.8.3	Peso seco de follaje (PSF).....	21
3.3.9	Diseño estadístico y análisis experimental.....	21
3.4	ESTUDIO IV: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DELGERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL.....	22
3.4.1	Localización del estudio.....	22

3.4.2	Características del germoplasma.....	22
3.4.2.1	Plantas.....	22
3.4.2.2	Siembra.....	22
3.4.2.3	Muestreo.....	22
3.4.2.4	Análisis de ADN.....	22
3.4.2.5	Variables y su medición.....	23
3.4.2.5.1	Laboratorio.....	23
3.4.2.5.2	Análisis de los datos de RAPDs.....	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1	CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL.....	25
4.2	EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL A ENFERMEDADES.....	38
4.3	RESPUESTA DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL A LA INOCULACIÓN CON RHIZOBIUM EN INVERNADERO.....	41
4.4	EVALUACIÓN MOLECULAR DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL.....	44
5.	CONCLUSIONES.....	48
6.	RECOMENDACIONES.....	49
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8.	ANEXOS.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		
1.	Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungos.....	8
2.	Datos climatológicos mensuales durante el periodo experimental (Zona III, Año 2002).....	12
3.	Escala de evaluación para describir el hábito de crecimiento.....	14
4.	Escala de evaluación para determinar diferencias en el color de la semilla del tipo rojo pequeño (raza Mesoamérica).....	14
5.	Nombre local y procedencia de las accesiones del germoplasma hondureño de frijol común utilizadas en el estudio (ordenadas por altitud de las localidades donde fueron colectadas).....	16
6.	Descripción de las variedades comerciales y testigos resistentes.....	17
7.	Escala de evaluación del color de hojas por deficiencias de nitrógeno.....	21
8.	Mezcla maestra para amplificar marcadores moleculares tipo RAPD.....	23
9.	Lista de cebadores (Operon Technologies Inc.) utilizados en el estudio con RAPDs.....	24
10.	Características morfológicas, fenológicas y color del grano del germoplasma hondureño de frijol común.....	26
11.	Rendimiento de grano y componentes de rendimiento del germoplasma hondureño de frijol común.....	27
12.	Distribución de frecuencia de los caracteres agronómicos de los genotipos del germoplasma hondureño de frijol común.....	29
13.	Variabilidad de color de grano de los genotipos del germoplasma hondureño de frijol común.....	30
14.	Variabilidad de hábito de crecimiento de los genotipos del germoplasma hondureño de frijol común.....	31
15.	Resultados de la evaluación de la severidad (S) e incidencia (I) de enfermedades en el germoplasma hondureño de frijol común.....	39
16.	Color de hojas, promedio del número (NN) y peso seco de nódulos (PSN) por planta, peso seco de follaje (PSF) del germoplasma hondureño de frijol común inoculado con <i>Rhizobium</i>	42
17.	Variabilidad de color de hoja de los genotipos del germoplasma hondureño de frijol común, inoculados con <i>Rhizobium</i>	43
18.	Resultados de análisis de correlación para las variables PSF y PSN.	43
19.	Polimorfismos detectados con los cebadores RAPDs de la evaluación molecular del gemoplasma hondureño de frijol.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		
1.	Distribución de frecuencias color de grano en el germoplasma hondureño de frijol común.....	30
2.	Distribución de frecuencias altura de planta en el germoplasma hondureño de frijol común.....	31
3.	Distribución de frecuencias de días a floración del germoplasma hondureño de frijol común.....	32
4.	Distribución de frecuencias de días a madurez fisiológica del germoplasma hondureño de frijol común.....	32
5.	Distribución de frecuencias del número de vainas por planta del germoplasma hondureño de frijol común.....	33
6.	Distribución de frecuencias de número de semillas por vaina del germoplasma hondureño de frijol común.....	33
7.	Distribución de frecuencias del peso seco de cien semillas (g) del germoplasma hondureño de frijol común.....	34
8.	Distribución de frecuencias de rendimiento del germoplasma hondureño de frijol común.....	34
9.	Relación del potencial de rendimiento del germoplasma hondureño de frijol común con su procedencia (altura).....	35
10.	Origen geográfico de las accesiones del germoplasma hondureño de frijol común.....	35
11.	Dendrograma morfológico y fenológico de las accesiones estudiadas.....	37
12.	Patrones de bandas RAPDs generados por el cebador OpQ14.....	44
13.	Dendrograma molecular de las accesiones estudiadas.....	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Temperaturas máximas y mínimas durante las evaluaciones de resistencia a bacteriosis y pudrición carbonosa.....	55
2.	Temperaturas máximas y mínimas durante las evaluaciones de resistencia a mancha angular y antracnosis.....	56
3.	Caldo-Levadura-Manitol.....	57
4.	Prueba para determinar la cantidad de <i>Rhizobium</i> existente en los inoculantes.....	58
5.	Resultado del análisis químico del medio (suelo:arena:perlita:vermiculita).....	59
6.	Solución libre de nitrógeno de Broughton y Dillworth.....	60
7.	Extracción de ADN para el análisis RAPDs (método de la UW-Madison).....	61
8.	Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del Fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA TM 200).....	63
9.	Diluciones de ADN (a 4 ng/ml) según el método de la UW-Madison.....	64
10.	Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores RAPD.....	65
11.	Protocolo para la amplificación de ADN usando marcadores tipo RAPD (Método de la UW-Madison).....	66
12.	Electroforesis para la amplificación de ADN.....	67
13.	Guía para preparar reactivos y enzimas.....	68

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de pequeños agricultores en la mayoría de las regiones de América Latina. El grano de frijol es un componente esencial en la dieta de la mayoría de la población rural y urbana, de los países productores más pobres o en vías de desarrollo. Datos recientes sugieren la existencia de dos centros principales de domesticación, localizados en Mesoamérica y la región sur de los Andes, los cuales se encuentran relacionados con la existencia de dos reservorios de genes de germoplasma cultivado de frijol común. El aislamiento geográfico pudo haber sido una de las causas para la divergencia genética del frijol común de las dos regiones (Rosas, 1998).

Las variedades criollas de frijol utilizadas por los pequeños productores en Honduras, están relativamente bien adaptadas a sus sistemas de producción caracterizados por suelos de baja fertilidad, cultivo en asocio o en secuencia con maíz, empleo de bajos niveles de insumos (fertilizantes y pesticidas), pobre mecanización del cultivo y sujetos a estrés de sequía. Aunque en el germoplasma de la raza Mesoamérica recolectado en Honduras existen algunos genes de resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*), antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), estos están presentes en un número limitado de accesiones. En consecuencia, la productividad de la mayoría de las variedades criollas de frijol utilizadas por los agricultores está limitada por su susceptibilidad a las enfermedades mencionadas y otras que afectan el cultivo (Rosas, 2001). El aumento de la resistencia a enfermedades, el incremento en la habilidad del frijol para fijar nitrógeno atmosférico (N₂) y la tolerancia a sequía son alternativas atractivas para incrementar la productividad de este cultivo en los programas de mejoramiento tradicionales (Rosas y Bliss, 1986b).

Los fitomejoradores se han encontrado con limitaciones en la rapidez y precisión con que muchas de las características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas, y utilizadas en sus programas de mejoramiento (Kelly *et al.*, 1994). Los rápidos avances en la biología molecular proveen las herramientas necesarias para el mejoramiento genético de las plantas. Algunas de estas técnicas han seguido la vía del análisis del ADN, para la identificación y ubicación de genes con características importantes. Estos análisis han contribuido a la identificación de marcadores moleculares, que algunos investigadores hacen uso en sus programas de mejoramiento (Kelly *et al.*, 1994).

Contrario a lo que muchos consideran, en la actualidad, las variedades y germoplasma mejorados de frijol poseen una base genética adecuada que confiere mayor adaptación y potencial de rendimiento, y resistencia a las enfermedades y factores de estrés abióticos predominantes (Rosas, 2001). Sin embargo, muchas limitantes de la producción aún

requiere de ser superados a través del mejoramiento genético, y el valor genético del germoplasma criollo y silvestre del frijol común resultan ser de gran importancia en esta tarea.

Con este estudio se pretende estimar la diversidad genética de las accesiones de germoplasma utilizadas y determinar características fenotípicas de interés, con la finalidad de que sirvan como herramientas y posibles progenitores donantes de genes en el mejoramiento genético del frijol común.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 General

Caracterizar la diversidad genética del germoplasma hondureño utilizando criterios morfológicos, agronómicos y moleculares para su empleo en el mejoramiento genético del frijol común.

1.1.2 Específicos

1. Determinar las diferencias morfológicas y el comportamiento agronómico de un grupo de accesiones representativas del germoplasma hondureño, bajo condiciones normales de producción.
2. Evaluar la respuesta de un grupo de accesiones representativas del germoplasma hondureño a la inoculación con *Rhizobium*.
3. Evaluar un grupo de accesiones del germoplasma hondureño por su reacción a enfermedades.
4. Determinar la diversidad genética de las accesiones incluidas en el estudio utilizando marcadores moleculares tipo RAPD.
5. Establecer relaciones entre la diversidad morfológica, agronómica y molecular.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos de granos básicos más importantes de América Latina; es uno de los componentes principales en la dieta alimenticia, y una de las fuentes más baratas y accesibles de proteína para la mayoría de la población de Honduras y de otros países centroamericanos (Rosas *et al.*, 1991).

En Honduras, el frijol ocupa el segundo lugar dentro de los granos básicos, después del maíz, tanto por la superficie sembrada como por la cantidad que consume la población. El frijol se cultiva en el ámbito nacional donde varía el área de siembra, los rendimientos y las tecnologías de manejo de una región a otra (DICTA, 1998). Según el CIAT (2001b), el rendimiento promedio en la región de Centro América en el año 2000 fue de 554 kg/ha; Honduras tuvo rendimiento promedio de 761 kg/ha en un área sembrada de 111,646 ha.

2.1 PRODUCCIÓN DE FRIJOL

El CIAT (1985) indica que el frijol común es una de las leguminosas comestibles más importantes, debido a su amplia distribución y por ser un complemento nutricional indispensable en la dieta alimenticia en Centro y Sur América. Este cultivo es considerado como uno de las más antiguos, siendo la región de Mesoamérica aceptada como el más probable centro de origen. Hallazgos en el centro de origen y en Sur América indican que fue conocido por lo menos unos 5,000 años antes de la era cristiana.

La planta de frijol es anual, herbácea, intensamente cultivada desde el trópico hasta las zonas templadas; aunque es una especie termófila, es decir, que no soporta heladas. Se cultiva esencialmente para obtener las semillas, las cuales tienen un alto contenido proteico (22% con base en materia seca). Las semillas pueden ser consumidas tanto inmaduras como secas; también puede consumirse la vaina entera inmadura y las hojas (CIAT, 1985).

El cultivo de frijol en Honduras se siembra en diferentes tipos de suelo, localizados en diversas áreas como valles y laderas, que frecuentemente limitan el desarrollo de la planta obteniendo bajos rendimientos debido a deficiencias nutricionales. El DICTA (1998) menciona que para una siembra adecuada de frijol, se requiere que las condiciones climáticas que permiten un buen desarrollo del cultivo, también coincidan con el período de baja o ninguna precipitación durante la cosecha; para evitar daños en el grano. En Honduras, el cultivo tiene tres épocas de siembra: siembras de primavera o primera, de postrera o segunda que representan entre el 70-80% del área sembrada, y de apante que aproximadamente significa el 10% del área sembrada anualmente en el país.

El cultivo de frijol durante la maduración, empieza a cambiar la coloración de las vainas, continúa el amarillamiento y la caída de las hojas y todas las partes de la planta se secan; las vainas al secarse pierden su pigmentación. El contenido de agua de las semillas baja hasta alcanzar un 15%, y según la variedad puede cambiar durante el almacenamiento. Así termina el ciclo biológico, y el cultivo se encuentra listo para la cosecha (CIAT, 1985).

El frijol es un cultivo notoriamente susceptible a factores adversos que pueden disminuir considerablemente su productividad; estos factores varían de una región a otra afectando el desarrollo y rendimiento del cultivo. El CIAT (1985) señala que en muchas zonas frijoleras del mundo, las enfermedades son los factores más importantes responsables de los bajos rendimientos del cultivo. Se han reportado varias decenas de agentes que causan las enfermedades del frijol; sin embargo, no todos tienen la misma distribución geográfica, prevalencia o importancia económica.

2.2 BANCOS DE GERMOPLASMA

A través de los años, el hombre y la naturaleza han producido miles de variedades y genotipos adaptados a diferentes localidades y prácticas culturales. En los últimos años, varios factores han contribuido a invertir esta tendencia; de aquí la importancia de conservar esta variabilidad genética, la cual constituye la base del fitomejorador para la creación de variedades adaptadas a las circunstancias actuales (Esquinas, 1983).

La conservación y el uso de la diversidad fitogenética son fundamentales para satisfacer las necesidades del desarrollo futuro del mundo. Se estima que la población terrestre se duplicará o triplicará antes de estabilizarse a finales del siglo XXI. Todo ello creará fuertes presiones en el ambiente y requerirá un enorme incremento en la producción de bienes alimentarios y no alimentarios (IPGRI, 2001).

El enriquecimiento genético se ha desacelerado considerablemente. Producto de la evolución, la base genética del frijol se erode rápidamente; por tal razón diversas organizaciones han puesto énfasis en trabajos de investigación, recolección y conservación del germoplasma.

La estrategia para conservar el germoplasma consiste en usar la diversidad genética útil en programas dinámicos de mejoramiento, conservar lo que no parece útil en la actualidad para asegurar su disponibilidad en el futuro y capacitar científicos de los programas nacionales para que conserven y aprovechen mejor la diversidad genética en sus programas (Wellhausen, 1988).

El CIAT tiene un banco de germoplasma vegetal denominado Unidad de Recursos Genéticos (URG), cuya sede está en Cali, Colombia. Hay tres sitios más en el país que prestan servicios de multiplicación de semillas para renovar sistemáticamente esta colección. La URG se dedica a proteger la diversidad genética de frijol, yuca y forrajes tropicales, así como de sus parientes silvestres, combinando métodos de conservación, tanto *in situ* (o sea, en un hábitat exterior natural) como *ex situ* (en el ambiente controlado

de un banco de germoplasma). Este trabajo es fundamental para la agricultura mundial, la seguridad alimentaria y las gestiones de investigación y desarrollo que apoyan esos sectores (CIAT, 2001a).

La colección de *Phaseolus* del CIAT contiene más de 40,000 accesiones, de las cuales 26,500 son de *Phaseolus vulgaris*. Alrededor de 1,300 accesiones corresponden a especies silvestres de *P. vulgaris*; el resto son parientes distantes. Una parte de esta colección sirve de base para el trabajo que se hace en actividades de mejoramiento de frijol en el CIAT y en otras organizaciones; éste es representativo de los ambientes diversos en que ha evolucionado y en los que se cultiva el frijol, y consta de unas 1,400 accesiones de frijol común domesticado y de 100 accesiones de frijol silvestre, cuyo tipo de material son las semillas (CIAT, 2001a).

El IPGRI trabaja con bancos de germoplasma y fitomejoradores para promover el uso de los recursos fitogenéticos conservados *ex situ*. También lleva a cabo investigaciones para comprender y mejorar el papel desempeñado por la diversidad en los sistemas de producción. Una atención especial se dirige a las alternativas para la ampliación de la base genética de cultivos alimenticios importantes (IPGRI, 2001).

En la Escuela Agrícola Panamericana, se encuentran almacenadas en el Banco de Germoplasma de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria (CCPA), un total de 454 accesiones de frijol criollo, 78 de otras especies de leguminosas incluyendo otros *Phaseolus* y 319 de maíz criollo. Estas colecciones son representativas de la variabilidad existente de materiales criollos y silvestres de frijol y maíz en los diferentes departamentos de Honduras, los mismos que se designaron considerando como prioridad los lugares de mayor riesgo de erosión genética. Además, se han realizado evaluaciones del germoplasma colectado por el Programa de Investigaciones del Frijol (Rosas *et al.*, 1994).

Actualmente los avances en la biotecnología, con la formación de genotecas y la documentación de las colecciones de germoplasma, permiten que los fitomejoradores puedan obtener información inmediata de gran utilidad en el estudio de la síntesis de genes.

Por los beneficios que se obtienen de los programas de mejoramiento de plantas, los bancos genéticos son una inversión que debe ser mantenida por los gobiernos, universidades y el sector privado y, cuanto más pronto se utilice, más pronto será rentable la inversión inicial (Esquinas, 1983; Plucknett *et al.*, 1992).

2.3 ENFERMEDADES DEL FRIJOL

En el cultivo de frijol, como en cualquier otro cultivo, uno de los principales factores limitantes en su producción, es el daño ocasionado por enfermedades causadas por microorganismos como hongos, bacterias y virus, y por nemátodos. En muchos casos,

cuando las condiciones de temperatura, humedad relativa y precipitación favorecen el desarrollo del patógeno, pueden causar pérdida total del cultivo.

2.3.1 Bacteriosis común del frijol

La bacteriosis común de frijol es una enfermedad de climas cálidos y es favorecida por temperatura y humedad alta (CIAT, 1985). Inicialmente los síntomas foliares aparecen como puntos acuosos en el envés de la hoja, que aumentan de tamaño y adquieren una forma irregular, y se unen para formar una lesión más grande. Estas áreas se notan flácidas y rodeadas de un borde angosto de color amarillo limón, el cual al necrosarse se vuelve de color café llegando muchas veces a cubrir un área grande de la hoja (CIAT, 1985).

El CIAT (1985) indica que en las vainas, los síntomas se manifiestan como manchas húmedas muy pequeñas que gradualmente adquieren primero un color café, y después, se tornan oscuras con bordes rojizos y levemente deprimidos. Estas lesiones se unen cubriendo extensas áreas en la vaina y mostrando el exudado bacterial.

Los aislamientos de *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*, patógeno causante de la bacteriosis común, difieren en virulencia, pero no hay evidencia de que difieran en patogenecidad. Para evaluar la resistencia del frijol al patógeno se han utilizado muchos métodos artificiales de inoculación. No se reporta una reacción de inmunidad en *Phaseolus vulgaris* al patógeno de la bacteriosis común, pero si muchas líneas con resistencia intermedia, anteriormente referidas como tolerantes (CIAT, 1985). Nuevas líneas con alta resistencia han sido desarrolladas en los últimos años por el CIAT, la Universidad de Puerto Rico y la EAP/Zamorano.

2.3.2 Pudrición carbonosa

La pudrición carbonosa causada por *Macrophomina phaseolina* (Maubli.) Sabih, nunca ha sido reportada causando daños de consideración. Esta enfermedad aparece cuando la temperatura varía entre los 28 y 32°C, son óptimas para el crecimiento y formación de esclerocios de *Macrophomina phaseolina*, y en luz continua (Campos, 1987).

Campos (1987) señala que los principales síntomas son pudrición de la raíz, secamiento total de la planta, defoliación prematura y poca o falta de turgencia de las vainas. La enfermedad avanza de la base del tallo hacia arriba y se trasmite por medio de la semilla.

En el cultivo de frijol no se practica ningún control para esta enfermedad porque no amerita; así mismo, se ha encontrado que *M. phaseolina* tiene otros organismos antagonicos en el suelo, como *Aspergillus flavus*, *A. rugulosus*, *A. terreus*, *Thielavia terricola*, *Trichoderma lignorum* y *Bacillus cereus*, los cuales inhiben el crecimiento del hongo (Campos, 1987).

2.3.3 Antracnosis

Campos (1987) manifiesta que esta enfermedad es causada por el patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. Para que el agente causal se desarrolle y disemine, se requiere de alta humedad relativa (95%) y de bajas temperaturas (16 a 24°C). Varios medios ayudan a diseminar este hongo; entre ellos se mencionan la salpicadura de agua de lluvia, los insectos, el viento, los instrumentos de trabajo, el hombre, la semilla infectada y el roce de las hojas entre sí.

La antracnosis ataca todas las partes aéreas de la planta, siendo las vainas las más dañadas y donde los síntomas son más notorios. Las lesiones producidas en las vainas varían de tamaño, de pequeños puntitos necróticos a lesiones profundas de color negro y de forma circular de más de un centímetro de diámetro, delimitadas por un borde de color rojizo; cuando las lesiones se juntan, cubren gran parte de la vaina y la secan por completo (Campos, 1987).

Cuando se inocula en el campo, para las evaluaciones de resistencia, las plantas se asperjan mediante bombas nebulizadoras tratando de que queden humedecidas en su totalidad. Las inoculaciones se hacen cuando las plantas tienen 2-3 hojas trifoliadas y se repiten cada 10 días hasta la aparición de síntomas severos. Las inoculaciones deben hacerse en condiciones de alta humedad y baja temperatura, por lo que se recomienda hacerlas después de las cuatro de la tarde. También se sugiere agregar un dispersante y/o adherente a la suspensión de inóculo (CIAT, 1985).

2.3.4 Mancha angular

Esta enfermedad es causada por el patógeno *Phaeoisariopsis griseola* Sacc., requiere de temperaturas de 16 a 24°C y humedad de 80 a 95% para su desarrollo y esporulación. El viento es uno de los principales agentes que disemina las esporas de este hongo, ya que al madurar se desprenden fácilmente del conidióforo y son arrastrados a otras siembras de frijol. La lluvia, los insectos y las semillas también contribuyen a la diseminación de las esporas. El patógeno puede permanecer en los residuos de las plantas enfermas hasta por 16 meses, así como en el suelo (Campos, 1987).

Campos (1987) indica que los síntomas son visibles en todas las partes aéreas de la planta (follaje, vainas y tallos). En el envés de la hoja, aparecen manchitas grises sin forma definida; posteriormente, las manchas adquieren forma angular y de color rojizo a negro, delimitadas por nervaduras. A medida que envejecen, aparece clorosis sobre las hojas; las manchas se juntan y causan defoliación de la planta desde el inicio de la floración hasta el final del ciclo vegetativo.

En las vainas las manchas son superficiales, casi circulares, de color rojizo a oscuro, y pueden cubrir el ancho de la vaina. En los tallos y peciolo, las manchas son longitudinales y a veces cubren toda el área afectada del tallo. Estas manchas pueden medir varios centímetros de longitud (Campos, 1987).

El CIAT (1985) indica que para las evaluaciones de resistencia, las inoculaciones en el campo se hace asperjando la suspensión de esporas con una bomba micronizer sobre las plantas cuando tengan 2-3 hojas trifoliadas, y repitiendo las inoculaciones cada 10 días hasta la aparición de síntomas.

2.3.5 Evaluación del germoplasma

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) emplea un sistema estándar para evaluar algunas enfermedades en condiciones de campo; este sistema utiliza parámetros de severidad e incidencia para la evaluación de las enfermedades. La severidad de la enfermedad, se define como la cantidad de tejido de la planta afectado por los organismos causantes de la enfermedad y se expresa como porcentaje de la cantidad total de ese tejido. La incidencia de la enfermedad, se define como el número de unidades afectadas; se considera generalmente plantas enteras, aunque también se consideran como unidades las partes de la planta como hojas, tallos, vainas o raíces, expresando luego estas unidades como porcentaje de la población total de unidades escogidas (CIAT, 1987).

El CIAT (1987) menciona que los datos de evaluación de germoplasma de frijol se basan en una escala fija de 1 a 9, en la cual los valores 1, 2 y 3 se consideran “resistentes”; 4, 5 y 6 “intermedios”; y 7, 8 y 9 “susceptibles” (Cuadro 1). La calificación 0 está reservada para cualquier situación en que no se pueda evaluar y no representa una ausencia de síntomas.

Cuadro 1. Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungosos.

Calificación	Severidad	Categoría	Descripción	Incidencia (%)
1	Ausente	Resistente	Síntomas no visibles o muy leves	0
2	Dudoso			1-10
3	Débiles			11-25
4	Moderados	Intermedio	Síntomas visibles y conspicuos que sólo ocasionan un daño económico limitado	26-40
5	Intermedios			41-60
6	Generales			61-75
7	Intensos	Susceptible	Síntomas severos a muy severos que causan pérdidas considerables en rendimiento o la muerte de la planta	76-90
8	Severos			91-99
9	Muerte			100

Fuente: CIAT (1987).

2.4 MARCADORES MOLECULARES PARA EL FITOMEJORAMIENTO

Beebe (1997) menciona que un marcador indica la presencia de otro carácter y sirve para reconocerlo directa o indirectamente. Éstos se basan en diferencias en la longitud y secuencia de sus fragmentos, lo que indica que si un gen de una planta influye en el marcador, también influye en el carácter de interés ligado al marcador.

Pedraza (1997) señala que los marcadores moleculares han evolucionado rápidamente y que existen varios tipos que utilizan como herramientas el Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

La técnica de PCR ha permitido el desarrollo de marcadores como los RAPDs (siglas en inglés de ADN Polimórfico Amplificado al Azar), de los que inicialmente se derivaron los SCARs; los AFLPs (de Polimorfismo de los Fragmentos Amplificados), que se combinan aspectos de RAPDs y RFLPs; y últimamente de los microsatélites (SSR-Secuencias Sencillas Repetidas) (Aranda, 2000).

2.4.1 Marcadores moleculares tipo RAPD

Kelly *et al.* (1994) señalan que basado en la técnica de PCR, se ha desarrollado el marcador molecular conocido como RAPD. Esta técnica permite la amplificación aleatoria de fragmentos de ADN con base en decanucleótidos de secuencia arbitraria, lo que genera un polimorfismo. El número de fragmentos amplificados depende de la concentración y secuencia de bases en el ADN molde, de la longitud del cebador, y de la temperatura de acoplamiento (Castro *et al.*, 2001). La técnica utilizada para obtener marcadores tipo RAPD es más rápida, menos sofisticada, y más apropiada para la filosofía de un programa de mejoramiento genético aplicado (Kelly *et al.*, 1994).

Otero *et al.* (1997) mencionan que la técnica PCR se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido a lo largo del genoma. Los RAPDs se conocen como marcadores dominantes/recesivos, ya que el carácter que se obtiene es la presencia/ausencia de una secuencia amplificable de ADN; por lo tanto, los términos dominante y recesivo se refieren a la amplificación o no durante la reacción en cadena de la polimerasa.

Las ventajas de estos marcadores son: 1) existe un juego universal de cebadores; 2) no requiere de sondas, radioactividad, ni el conocimiento de la secuencia del cebador; 3) el proceso puede ser automatizado; 4) requiere de pequeñas cantidades del ADN original (5-25 ng) y 5) es una técnica de bajo costo. Sin embargo su mayor desventaja consiste en la baja repetibilidad de los resultados obtenidos (Castro *et al.*, 2001).

2.4.1.1 Aplicación de los marcadores tipo RAPD

2.4.1.1.1 Mapeo genético e identificación de caracteres de interés

La elaboración de mapas genéticos permite manipular características de interés agrícola con cierto grado de confiabilidad. Utilizando tanto líneas isogénicas como diferentes generaciones (F_1 , F_2) de plantas cultivadas, se ha logrado identificar rápidamente marcadores ligados a genes de resistencia a diferentes enfermedades causados por virus, bacterias, hongos, insectos y nemátodos (Otero *et al.*, 1997).

2.4.1.1.2 Evaluación de germoplasma

Thormann y Osborn (s.f.) mencionan que identificar marcadores tipo RAPDs permite fácilmente determinar relaciones genéticas. Esta identificación es posible porque los RAPDs se portan como marcadores genéticos dominantes, no conoce los fragmentos amplificados del genoma, a menos que cada fragmento sea mapeado por un análisis separado de segregación; esta característica permite determinar relaciones genéticas entre algunos grupos de germoplasma.

2.5 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), es un fenómeno que permite la disponibilidad del nitrógeno (N) en los organismos vivos a partir del nitrógeno molecular (N_2) del aire, que es únicamente realizada por los procariotes. La FBN funciona en bacterias adaptadas en ambientes ecológicos y estilos de vida muy diversos. Sin embargo, todas poseen el sistema enzimático responsable de la reducción del nitrógeno: la nitrogenasa (Baca *et al.*, 2000).

La FBN es el mecanismo principal de aporte de N en los ecosistemas naturales y es muy importante en la agricultura del trópico, porque los suelos tropicales presentan bajo intercambio de iones, mínima retención de agua de la fracción mineral y la fertilidad del suelo está estrechamente relacionada con el contenido de materia orgánica del suelo. El N_2 es el elemento que se pierde más fácilmente cuando la mineralización de la materia orgánica del suelo es estimulada por el arado del suelo, es frecuente que este elemento controle la materia orgánica del suelo y, por lo tanto, su fertilidad. La aplicación continua de fertilizantes no puede ser una opción sostenida para el tercer mundo, ya que los precios de los energéticos son muy elevados, son contaminantes de los mantos acuíferos y se pierden fácilmente por lixiviación (Baca *et al.*, 2000).

2.5.1 Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas

Los microorganismos fijadores de N incluyen dos tipos: los fijadores de vida libre, que fijan N para su propio uso y los fijadores de N simbióticos, que fijan N cuando se asocian con plantas y proveen a la planta de este elemento, intercambiándolo por carbono y por un hábitat de protección, como son los nódulos radiculares de las leguminosas. Entre los fijadores simbióticos de N está la bacteria gram negativa del género *Rhizobium*, en géneros relacionados, establece simbiosis con plantas leguminosas. Las leguminosas proveen el 25-35% del consumo proteico mundial (CIFN, 2001).

Las bacterias del género *Rhizobium* inducen en las leguminosas la formación de nódulos en los cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Baca *et al.* (2000) mencionan que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es el resultado de una interacción muy específica entre la bacteria y la planta. La organogénesis del nódulo es un proceso inducido por un "intercambio de señales" entre los dos participantes de la interacción, el microsimbionte (bacteria) y el macrosimbionte (planta), para los cuales es esencial la unión del microorganismo a los pelos radiculares de la planta. Sustancias con efecto mitógeno (factores de nodulación) son sintetizadas por productos de los llamados genes de nodulación del microsimbionte (genes nod), en respuesta a la excreción por la planta de sustancias de tipo flavonoide. Actualmente, se estima que la FBN es de 200 millones de toneladas por año, es decir, dos veces la producción de fertilizantes nitrogenados por síntesis industrial.

El frijol es considerado un pobre fijador de nitrógeno de la atmósfera, y, gracias a la interacción con diferentes cepas de *Rhizobium* puede influir de manera significativa en la cantidad de nitrógeno fijado; sin embargo, Rosas y Bliss (1986a) mencionan que el uso de cepas superiores de *Rhizobium* no será efectivo si no es acompañado con el uso de plantas hospederas superiores y, viceversa.

Hubbell (1986) manifiesta que la nodulación y la fijación de nitrógeno depende del éxito de la etapa de infección. Ésto permite tener disponible la fuente de nitrógeno que aumenta los rendimientos bajo condiciones limitantes de nitrógeno del suelo, que es el objetivo final de la inoculación de las leguminosas con *Rhizobium*.

La inoculación con *Rhizobium* consiste en la introducción a la rizósfera de grandes poblaciones de cepas altamente efectivas, en su capacidad de fijación de nitrógeno y compatibles con el cultivo/variedad de leguminosa de interés; colocándola cerca de la semilla para que la mayoría de los nódulos formados por la planta contengan el *Rhizobium* introducido (Rosas *et al.*, 2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, situada en el Valle del Yeguary, departamento de Francisco Morazán, a 800 msnm, a 14° de latitud Norte y 87° de longitud Oeste, con una temperatura y precipitación promedio anual de 23 °C y 1200 mm, respectivamente. El trabajo consistió de cuatro estudios: caracterización agronómica, evaluación de la reacción a enfermedades, respuesta a la inoculación con *Rhizobium* en invernadero y la evaluación molecular del germoplasma del frijol hondureño.

3.1 ESTUDIO I: CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL

3.1.1 Localización del estudio

Las evaluaciones se realizaron durante la época de verano (febrero-abril) del 2002, se evaluó un total de 48 accesiones. Las accesiones evaluadas fueron recolectados durante el periodo de 1990-94, en giras de exploración en 13 departamentos de Honduras (Cuadro 6 y 7). El estudio se realizó en Zona III, Lote 41, de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras. Las condiciones climáticas (temperatura y precipitación pluvial) referidas al período en que se realizó el experimento se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Datos climatológicos mensuales durante el periodo experimental (Zona III, Año 2002).^z

Mes	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)
Febrero	23	24.0
Marzo	24	5.8
Abril	25	20.0

^z El experimento se condujo entre el 5 de febrero y el 30 de abril del 2002.

3.1.2 Preparación de terreno y siembra

Para la siembra, el terreno se preparó con dos pases de rastra y un pase de arado, posteriormente se surcó a una distancia de 0.60 m. La distancia de siembra entre plantas fue de 0.1 m, para obtener una densidad final de 166,666 plantas por hectárea.

Se utilizó 39 accesiones del germoplasma hondureño, tres variedades mejoradas y seis variedades criollas bajo las mismas condiciones de campo.

3.1.3 Fertilización

La fertilización fue de 118 kg/ha de 18-46-0 al momento de la siembra. Posteriormente, se aplicó 100 kg/ha de urea(46-0-0) a los 22 días después de la siembra (DDS), para suplir los requerimientos de nitrógeno; y se aprovechó esta aplicación para aporcar las plantas. Durante el ensayo, se procuró dar un manejo adecuado contra plagas, enfermedades y malezas, con el fin de evitar alteraciones en los resultados.

3.1.4 Cosecha

La cosecha se realizó en la etapa de madurez fisiológica (R9), la fecha de cosecha fue diferente para los diversos genotipos. Se cosecharon todas las plantas, excepto las que se encontraban en los extremos, para evitar el efecto de borde.

3.1.5 Variables medidas

3.1.5.1 Días a emergencia: Se determinó cuando el 50% de las plantas emergieron en la parcela.

3.1.5.2 Días a floración (etapa R6): Se midió cuando el 50% de las plantas presentaron la primera flor abierta, correspondiente al primer botón floral.

3.1.5.3 Días a madurez fisiológica (etapa R9): Se evaluó al final de la fase reproductiva, cuando el 50% de las plantas presentaron decoloración y secado de las vainas.

3.1.5.4 Altura de planta: Se midió la altura de cinco plantas al azar de cada parcela, al final de la floración. Según el CIAT (1993) en las plantas con hábito de crecimiento indeterminado, se mide desde el punto de inserción de las raíces hasta el último meristema apical del tallo. En las plantas con hábito de crecimiento determinado, se mide desde la inserción de las raíces hasta el ápice del último racimo floral.

3.1.5.5 Hábito de crecimiento: Se identificó al inicio de la etapa R9 (madurez fisiológica) y se utilizó la escala de evaluación descrita por el CIAT (1993) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Escala de evaluación para describir el hábito de crecimiento.

Tipo	Característica
1	Arbustivo determinado
2A	Arbustivo indeterminado, con guía corta
2B	Arbustivo indeterminado, con guía más o menos larga
3A	Postrado indeterminado, con guía no trepadora
3B	Postrado indeterminado, con guía trepadora
4A	Trepador indeterminado, con carga a lo largo de la planta
4B	Trepador indeterminado, con carga en los nudos superiores

Fuente: CIAT (1993).

3.1.5.6 Color de la semilla: Se determinó en semillas cosechadas. Y se utilizó el sistema de evaluación del Programa de Investigaciones del Frijol (Cuadro 4).

Cuadro 4. Escala de evaluación para determinar diferencias en el color de la semilla del tipo rojo pequeño (raza Mesoamérica)

Tipo	Característica*
R1	Rojo claro brillante (variedad Paraisito o Chingo)
R2	Color de la semilla de la variedad Concha Rosada
R3	Color de la semilla de la variedad Madura Parejo
R4	Color de la semilla de la variedad Amadeus-77
R5	Color de la semilla de la variedad Tío Canela-75
R6	Color de la semilla de la variedad Danlí 46
R7	Color de la semilla de la variedad Dorado
R8	Color de la semilla de la variedad Retinto Rojo (F-80)
R9	Rojo oscuro opaco (variedad Retinto vaina blanca F-104)

* Se consideran nueve rangos dentro del color rojo de la semilla, desde el color rojo claro brillante hasta el rojo oscuro opaco. Para otros colores, se consideran los colores: blanco, crema, amarillo, café, rosado, morado, negro y su aspecto opaco o brillante.

3.1.5.7 Rendimiento: Se midió al final del ciclo del cultivo y se cosechó todas las plantas de cada surco, excepto las plantas de cada extremo para eliminar el efecto de borde y el rendimiento fue ajustado a 14% de humedad.

3.1.5.8 Componentes de Rendimiento:

3.1.5.8.1 Número de vainas por planta (NVP): Se determinó el NVP en 15 plantas al azar después de haber cosechado las parcelas para estimar los rendimientos.

3.1.5.8.2 Número de semillas por vaina (NSV): El conteo de semillas se realizó en 20 vainas tomadas al azar de las plantas usadas para determinar el NVP.

3.1.5.8.3 Peso seco de cien semillas (PSCS): Se determinó después de pesar las muestras de granos de las plantas cosechadas para estimar el NSV.

Estos datos fueron utilizados para estimar el rendimiento, según se indica a continuación:

Rendimiento = $g/parcela * (166,666 / \text{No. plantas por parcela}) * (100 - \%H) / (100 - 14)$

3.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un arreglo en Bloques Completos al Azar (BCA) con tres repeticiones. Cada genotipo se sembró en parcelas de un surco de 3 m de largo y 0.6 m de ancho. Para el análisis e interpretación de los datos se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS[®] V8); se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y separaciones de medias para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos en cada variable evaluada.

3.2 ESTUDIO II: EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL A ENFERMEDADES

3.2.1 Localización del estudio

La evaluación del germoplasma se realizó durante la época de verano (febrero-abril) y primera (junio-agosto) del 2002, se evaluó 50 genotipos (Cuadro 5 y 6), incluyendo accesiones del germoplasma hondureño, variedades comerciales y testigos resistentes a enfermedades. El estudio durante la época de verano se realizó en Zona III, Lote 41, de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, la temperatura mínima promedio fue de 16 °C y la temperatura máxima promedio de 32 °C (Anexo 1). Se evaluó la reacción a bacteriosis común y pudrición carbonosa y el estudio durante la época de primera se realizó en las camas de infección (bancales) ubicadas en el área de invernaderos del PIF/CCPA la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La temperatura mínima promedio fue 18 °C y la temperatura máxima promedio fue 30 °C (Anexo 2). En estas

camas, se evaluó la resistencia a antracnosis y mancha angular. La evaluación de las enfermedades se efectuó basándose en la escala descrita por el CIAT para la evaluación de germoplasma de frijol (Cuadro 1).

Cuadro 5. Nombre local y procedencia de las accesiones del germoplasma hondureño de frijol común utilizadas en el estudio (ordenadas por altitud de las localidades donde fueron colectadas).

Accesión	Nombre local	Localidad	Departamento	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
F-245	Gringo	El Chaguitón	Ocotepeque	14°30'15"	88°48'55"	1830
F-201	Talete	Santa Teresa	Lempira	14°26'50"	88°39'25"	1750
F-09	Concha Blanca	Higuero Quemado	Yoro	15°04'40"	87°22'15"	1700
F-47	Frijol de montaña	Jalapa	Yoro	15°01'55"	87°16'45"	1400
F-102	Sangre de toro	Las Rosas	Santa Bárbara	15°03'30"	88°25'00"	1200
F-169	50ño	Plan Grande	Copán	14°01'00"	88°52'00"	1200
F-264	Arbolito	Plan del Rosario	Ocotepeque	14°18'20"	89°01'10"	1200
F-57	Vaina rosada	Maraderos	Yoro	15°12'20"	87°22'00"	1150
F-340	Chile	Las Selvas	El Paraíso	13°49'02"	86°24'14"	1100
F-130	Talete	Camasca	Intibucá	14°00'00"	88°22'40"	968
F-371	Moro	Gualiqueme	Choluteca	13°30'00"	87°11'30"	910
F-190	Talete de guía	Arenales	Lempira	14°49'50"	88°36'30"	900
F-253	Negro	Santa Anita	Ocotepeque	14°28'35"	89°12'35"	887
F-126	Negro Ligero	San Juan de Dios	Inibucá	14°18'15"	88°23'10"	850
F-505	Liberal	San Francisco	Fco. Morazán	14°48'40"	86°56'00"	835
F-211	Alilí	Azacualpa Candelaria	Lempira	14°06'00"	88°34'05"	800
F-107	Frijol ñato	Quezalapa	Comayagua	14°54'30"	87°19'30"	780
F-72	Desarrural	Sabana Larga	Fco. Morazán	13°41'50"	87°08'40"	750
F-518	Frijol mantequilla	El Pedernal	Fco. Morazán	14°42'00"	87°06'45"	700
F-34	Gualiqueme	Ayapa	Yoro	15°06'15"	87°10'30"	650
F-91	40ño	El Baldoquín	Choluteca	13°18'05"	86°59'20"	650
F-30	Chilito	Uluapa	Olancho	14°55'20"	86°21'30"	575
F-321	Vaina blanca	Teoxintales	Santa Bárbara	15°28'00"	88°31'00"	565
F-332	Seda	Amparo	El Paraíso	13°53'50"	85°53'50"	550
F-147	Chile	Los Llanitos	Copán	15°02'10"	88°45'55"	490
F-85	Chelito	Las Delicias	Valle	13°42'35"	87°33'20"	450
F-22	Cuarenteño	Zopilotepe	Olancho	14°33'15"	86°17'20"	400
F-97	Arbolito	Guanacaste	Choluteca	13°15'40"	86°59'20"	400
F-104	Retinto v. blanca	Azacualpa	Santa Bárbara	14°42'35"	88°05'20"	400
F-428	Rojo	Esquipulas del Norte	Olancho	15°19'00"	86°33'55"	400
F-117	Danlí	Las Delicias	Comayagua	14°54'45"	87°22'40"	350
F-155	Arbolito rojo	Los Tangos	Copán	15°08'40"	88°40'30"	350
F-405	Arbolito v. blanca	Yaurca	Atlántida	15°39'43"	86°40'25"	320
F-218	Arbolito rojo	Mapulaca	Lempira	14°02'00"	88°37'00"	275
F-419	Chile	Las Quebradas	Atlántida	15°39'35"	87°25'50"	250
F-77	Frijol arbolito	Alubarén	Fco. Morazán	13°47'35"	87°28'10"	200
F-79	Frijol rojo	Coray	Valle	13°39'40"	87°32'00"	150
F-80	Retinto rojo	Coray	Valle	13°39'40"	87°32'00"	150
F-421	Vaina roja	Santa María	Atlántida	15°38'39"	87°38'39"	100

Fuente: Rosas *et al.* (1994).

3.2.2 Reacción a bacteriosis común

Esta evaluación se realizó en el ensayo sembrado para la caracterización agronómica del germoplasma de frijol hondureño, mencionado en la Sección 3.1. La evaluación por bacteriosis se hizo utilizando dos inoculaciones de *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* (aislamiento EAP 9606). La inoculación se efectuó con una bomba de 15 L, tratando de que las hojas asperjadas queden humedecidas en su totalidad; se agregó un adherente (1 gota de Tween 20 por litro), un abrasivo (2 g de carborundum por litro) al inóculo diluido. La enfermedad se evaluó al inicio de la etapa R8 (llenado de vainas).

Cuadro 6. Descripción de las variedades comerciales y testigos resistentes

Accesión	Descripción
<u>Variedades mejoradas</u>	
Amadeus-77	Variedad mejorada desarrollada por el PIF de la EAP/Zamorano, mediante la cruce de Tío Canela-75 x DICTA 105. Es resistente al virus del mosaico dorado amarillo del frijol y tolerante a altas temperaturas.
Tío Canela-75	Variedad mejorada desarrollada por el PIF de la EAP/Zamorano, a partir de la cruce DOR 483 x F ₁ (DOR 391 x Pompadour J). Es resistente al virus del mosaico dorado amarillo y otras enfermedades y tiene buena adaptación a zonas bajas e intermedias.
Dorado	Variedad mejorada liberada por el DICTA/SAG y PROFRIJOL en Honduras. Es una variedad resistente al virus del mosaico dorado y otras enfermedades.
<u>Variedades criollas</u>	
Desarrural	Variedad criolla sembrada en las regiones que incluyen a los departamentos de El Paraíso y Olancho.
Danlí 46	Variedad acriollada cultivada en varias regiones de Honduras.
Concha Rosada	Variedad criolla originaria de Yoro.
Madura Parejo	Variedad criolla de Santa Bárbara.
Chingo	Variedad criolla del departamento de El Paraíso; otras variedades del mismo nombre son cultivadas en Yoro y Olancho.
Paraisito	Variedad criolla del departamento de El Paraíso.
<u>Testigos resistentes</u>	
G06727	Variedad identificada por el CIAT (1992) como Guarzo-Popayán. Originaria de Colombia. Resistente a la mancha angular. Tiene hábito de crecimiento tipo 1.
VAX 6	Variedad resistente a bacteriosis, proveniente del CIAT.

3.2.3 Reacción a pudrición carbonosa (*Macrophomina*)

La evaluación se realizó en el ensayo establecido para la caracterización agronómica del germoplasma de frijol hondureño, descrito en la Sección 3.1. La pudrición carbonosa apareció por incidencia natural, debido a las condiciones de humedad y temperatura favorables para el desarrollo de la enfermedad, y se evaluó al inicio de la etapa R5 (Prefloración).

3.2.4 Reacción a antracnosis

La evaluación por antracnosis se realizó en las camas de infección de Zamorano, en la etapa R6 (floración). Se hicieron aspersiones de esporas de un aislamiento de tejidos de plantas infestadas de *Colletotrichum lindemuthianum* (aislamiento monospórico Co-Z) del PIF/CCPA. La concentración inicial del inóculo se determinó mediante un hemacitómetro de la suspensión utilizada, diluyendo el inóculo hasta obtener la concentración de 1.2×10^6 esporas/ml recomendada por el CIAT (1985).

La inoculación se realizó a los 10 DDS, cuando las hojas primarias estaban totalmente expandidas (etapa de desarrollo V2), y se repitieron cada 10 días hasta la aparición severa de síntomas. Se hicieron tres inoculaciones en total.

Las inoculaciones se hicieron después de las 5:00 pm, para evitar muerte de las esporas por el calor y, porque la penetración es más eficiente durante la noche o en las horas de la mañana, cuando la humedad relativa es alta y las temperaturas son moderadas (CIAT, 1980). Se utilizó una bomba de 15 L, tratando de que las hojas asperjadas queden humedecidas en su totalidad; se agregó un adherente (1 gota de Tween 20 por litro) al inóculo diluido.

3.2.5 Reacción a la mancha angular

La evaluación del germoplasma por su reacción a la mancha angular se realizó en las camas de infección (bancas), en la etapa R6. Se hicieron aspersiones de inóculo de *Phaeoisariopsis griseola* Sacc. usando tejido infectado recolectado el mismo día, o el día anterior, en campos comerciales de frijol infectados con mancha angular de la aldea El Ocotal, Yuscarán. El inóculo se preparó licuando las hojas infectadas en agua destilada estéril; se utilizó un colador para eliminar todos los pedazos de hojas de la solución.

Las inoculaciones se realizaron a partir de los 12 DDS, cuando las hojas primarias estaban totalmente expandidas. Éstas se hicieron después de las 5:00 pm, para evitar muerte de las esporas por el calor y, porque la penetración es más eficiente durante la noche o en las horas de la mañana, cuando la humedad relativa es alta y las temperaturas son moderadas (CIAT, 1980). Estas aplicaciones se verificaron observando el envés de las hojas y tratando de que durante la aspersión las hojas queden totalmente humedecidas. Se utilizó una bomba de 15 L y se agregó adherente (1 gota de Tween 20 por litro) al inóculo diluido.

3.2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de BCA con dos repeticiones. Cada genotipo se sembró en parcelas de 1 surco de 1.2 m de largo y 0.5 m de ancho. Para el análisis e interpretación de los datos se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS[®] V8); se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y separaciones de medias para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos para cada variable.

3.3 ESTUDIO III: RESPUESTA DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL A LA INOCULACIÓN CON *RHIZOBIUM* EN INVERNADERO

3.3.1 Localización del estudio

El estudio se realizó en el Invernadero # 3 del PIF, en la EAP; con el fin de determinar la respuesta de los genotipos evaluados a la inoculación con *Rhizobium*, para determinar su utilidad en el mejoramiento genético del frijol.

3.3.2 Cultivo de *Rhizobium*

Se utilizó la cepa CR477 de *Rhizobium etli*, recolectada por Oscar Acuña, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Esta cepa tiene la característica de alta capacidad de nodulación (Gómez *et al.*, 1998), y presenta altos rendimientos de materia seca y peso de nódulos.

3.3.3 Medio de cultivo

Para la preparación del inoculante líquido se utilizó caldo levadura-manitol (Anexo 3), recomendada para el crecimiento del cultivo de *Rhizobium* (Rosas *et al.*, 2002).

3.3.4 Preparación del inoculante

El subcultivo se preparó inoculando un erlenmeyer de 1000 ml que contenía 500 ml de caldo levadura-manitol, introduciendo la bacteria *Rhizobium* mediante una asa estéril. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente sobre un agitador de cultivos (100 rpm) durante cinco días. La calidad del inoculante fue de 12.30×10^8 células/ml determinado por la prueba de gota (Anexo 4) (Rosas *et al.*, 2002).

3.3.5 Medio de crecimiento

Se utilizó un medio de crecimiento preparado con una mezcla de suelo, perlita, vermiculita y arena (1:1:1:1), el cual contenía aprox. 0.06% de N (Anexo 5), con la finalidad de facilitar la identificación visual de síntomas de deficiencias de N. El suelo para el medio de crecimiento se obtuvo de la Terraza 2, y esterilizado.

3.3.6 Siembra

En el invernadero se sembraron las 50 accesiones del estudio (Cuadro 6 y 7), y soya (*Glycine max* L.) y *Brachiaria decumbens* como testigos. De cada material se sembró cuatro maceteros con 6 semillas cada uno; se usaron maceteros estándares de 6 pulgadas con 1.1 kg de medio de crecimiento. En la etapa de desarrollo V2 (hojas primarias desplegadas), aprox. 7 DDS, se realizó un raleo para dejar dos plantas por macetero cortando con tijeras el resto de plantas. En el caso de la *B. decumbens* se dejaron 6 plantas por maceta. Además de los tratamientos de inoculación, se adicionaron maceteros sembrados con las variedades Desarrural y Tío Canela-75 sin inoculación, sin fertilizante N; y sin inoculación, con fertilizante N (usando KNO_3).

3.3.7 Inoculación y fertilización

A los 8 DDS, cada planta se inoculó con 1 ml de cultivo de la cepa de *Rhizobium* CR477; el inóculo contenía 12.30×10^8 células/ml. Las plantas fueron regadas con agua cada dos días, alternándose con un riego por la tarde de la solución nutritiva libre de nitrógeno de Broughton y Dillworth (NifTAL) (Anexo 6) cada dos días. Las plantas bajo el tratamiento con nitrógeno se regaron con una adición de 70 ppm de N en la forma de KNO_3 a la solución.

3.3.8 Variables medidas

3.3.8.1 Coloración del follaje: Esta variable fue medida a los 35 DDS, aprox. en la etapa de desarrollo V4 (primera hoja trifoliada completamente abierta). El color de las hojas se determinó usando la escala de evaluación utilizada en estudios realizados por Rosas *et al.* (1998) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Escala de evaluación del color de hojas por deficiencias de nitrógeno.

Calificación	Color
1	Verde oscuro
2	Verde claro
3	Verde amarillento
4	Amarillo claro
5	Amarillo brillante

Fuente: Rosas *et al.* (1998).

3.3.8.2 Número de nódulos (NN): Esta variable fue medida a los 35 DDS. Las dos plantas por maceta fueron removidas cuidadosamente. Se lavaron las raíces evitando el desprendimiento de raíces secundarias, ya que éstas tienen tantos nódulos como la corona de la raíz. Los nódulos se separaron con las manos o con pinzas dependiendo de la facilidad de manejo y se los colocó en platos *Petri*.

3.3.8.3 Peso seco de nódulos (PSN): Se determinó pesando los nódulos recolectados de cada genotipo después de secarlos en el horno a una temperatura de 80 °C durante 48 horas.

3.3.8.4 Peso seco de follaje (PSF): Esta variable se determinó pesando la parte aérea de la planta. Las muestras de follaje fueron secadas en el horno a una temperatura de 80 °C durante 48 horas.

3.3.9 Diseño estadístico y análisis experimental

Se utilizó un arreglo en BCA con cuatro repeticiones. Cada genotipo se sembró en macetas. Para el análisis e interpretación de los datos se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS® V8); se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y separaciones de medias para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos de cada variable.

3.4 ESTUDIO IV: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL

3.4.1 Localización del estudio

Este estudio se realizó en los invernaderos del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) y en el Laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria (CCPA) de Zamorano, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras.

3.4.2 Características del germoplasma

3.4.2.1 Plantas

Para la evaluación molecular, se usó accesiones, variedades mejoradas y criollas de frijol del Banco de Germoplasma de la Escuela Agrícola Panamericana. Las accesiones del germoplasma hondureño fueron recolectadas en diferentes lugares del país, en el periodo de 1990 a 1994 (Rosas *et al*, 1994) y representa parte de la diversidad existente en Honduras.

3.4.2.2 Siembra

En los invernaderos del PIF, se sembró un grupo de 39 accesiones y nueve variedades comerciales (Amadeus-77, Tío Caneala-75, Dorado, Desarrural, Danlí 46, Concha Rosada, Madura Parejo, Chingo y Paraisito). Se sembró un macetero estándar de 6 pulgadas con 5 posturas por genotipo, con el fin de extraer ADN y ser analizado en el laboratorio.

3.4.2.3 Muestreo

Para la obtención de ADN provenientes de los diversos genotipos, se realizó un muestreo de tejido a los 12 DDS. El tejido se obtuvo de las hojas más jóvenes (brotes terminales en crecimiento activo), de las plantas de cada accesión.

3.4.2.4 Análisis de ADN

Se utilizaron tubos eppendorf y barras (*pestle*) de pexiglass estériles, junto con el buffer PEX (etil xantogenato de potasio) para permitir una mejor destrucción de las paredes celulares (Anexo 7), micropipetas (0.5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL), puntas desechables y una microcentrífuga. El protocolo utilizado en la extracción es el adaptado de la Universidad de Wisconsin-Madison usado para RAPDs, para obtener ADN

purificado. La cuantificación de ADN se realizó en un fluorómetro (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant TM200), que expresa la concentración en ng/μL, usando buffer de cuantificación, además de ADN bovino estándar (100 ng/μL) para la calibración (Anexo 8). La dilución el ADN se realizó a una concentración de 4 ng/mL, según el método sugerido por la Universidad de Wisconsin-Madison (Anexo 9).

La amplificación de ADN se realizó en un termociclador (PCR-100TM, Programable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling); para la amplificación de ADN se utilizó una mezcla maestra para marcadores RAPD (Cuadro 8). La separación en un tanque de electroforesis (EC Maxicell EC 360 M, 22 orificios), utilizando una fuente de aplicación y regulación de voltaje (Hoefer Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP) (Anexo 10, 11 y 12). También se empleó una escalera de ADN de 100 bp para determinar la longitud de los fragmentos observados. Para la observación de bandas, se utilizó un transiluminador de rayos ultravioleta (Fotodyne, Foto/UV[®]26), y una cámara Polaroid[®] para fotografiar geles y registrar los resultados (Aranda, 2000).

Cuadro 8. Mezcla maestra para amplificar marcadores moleculares tipo RAPD.

Componente	Volumen para una reacción (μL)
Agua	4.36
Buffer (5X)	4.40
DNTP's (10 mM c/u) + MgCl ₂	0.80
Cebador (10 μM)	0.80
Taq-polimerasa (5U/μL)	0.50
ADN (4 ng/ml)	10.00
Volumen final	20.00

3.4.2.5 Variables y su medición

3.4.2.5.1 Laboratorio

Se registraron los polimorfismos (presencia/ausencia de bandas) generados con 19 cebadores empleados en el estudio. Estos se identificaron mediante la observación y determinación de su peso molecular en una gel de agarosa (electroforesis), visualizadas en un transiluminador y registradas en fotografías instantáneas. Los 19 cebadores usados en la generación de polimorfismos se indican en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Lista de cebadores (Operon Technologies Inc.) utilizados en el estudio con RAPDs.

Cebador	Secuencia	Cebador	Secuencia
OpH-13	GACGCCACAC	OpO-13	GTCAGAGTCC
OpH-04	GGAAGTCGCC	OpG-03	GAGCCCTCCA
OpH-08	GAAACACCCC	OpX-01	CTGGGCACGA
OpW-13	CACAGCGACA	OpO-19	GGTGCACGTT
OpG-15	ACTGGGACTC	OpP-09	GTGGTCCGCA
OpY-06	AAGGCTCACC	OpQ-14	GGACGCTTCA
OpC-04	CCGCATCTAC	OpB-10	CTGCTGGGAC
OpO-16	TCGGCGGTTC	OpL-04	GACTGCACAC
OpW-06	AGGCCCGATG	OpU-19	GTCAGTGCGG
OpT-07	GGCAGGCTGT		

3.4.2.5.2 Análisis de los datos de RAPDs

Las bandas más intensas se contabilizarán como presencia (1) y ausencia (0) para construir una matriz para cada uno de los cebadores. La similitud genética entre las accesiones se calculó con el programa NTSYS[®] aplicando el Coeficiente de DICE (Sneath y Sokal, 1973). Los agrupamientos se realizaron siguiendo el método UPGMA (Rohlf, 2000).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL

En los 48 genotipos evaluados, mediante la caracterización agronómica se encontró una gran variación en la mayoría de los variables estudiadas, notándose materiales con buenas y malas características. En los resultados de las características morfológicas y fenológicas se observó diferencias significativas entre los genotipos (Cuadro 10). El 52% de los genotipos germinaron a los 5 días y el resto a los 6 DDS. El 88% (42 genotipos) tuvieron alturas entre 25-33 cm, incluyendo a las accesiones F-245, F-201, F-47, F-264, F-130, F-371, F-518, F-428, F-117, F-405, y F-79 que tuvieron alturas cercanas al promedio (29 cm). En las accesiones F-332 y F-22 se encontraron las plantas con alturas más bajas (22-24 cm); mientras que, los materiales Chingo, F-09, F-57 y F-505 tuvieron alturas mayores a los 34 cm.

Los materiales en promedio florecieron a los 34 DDS, de los cuales el 31% (15) de los materiales florecieron entre los 31 y 36 DDS, y el 66% (32) florecieron antes de los 30 DDS, entre los que se destacan las accesiones F-102, F-169, F-253, F-126, F-72, F-30, F-22, F-97 y F-77. Las variedades mejoradas Amadeus-77, Tío Canela-75 y Dorado florecieron por encima de los 38 DDS.

Un total de 42 genotipos son precoces (=65 DMF), aspecto relevante en la producción de frijol (Cuadro 12). Los genotipos más precoces (61 DMF) fueron F-47, F-57, F-518, F-85, F-22, F-218, F-419, F-77; estas accesiones fueron recolectadas en localidades de 1,400, 1,150, 700, 450, 400, 275, 250 y 200 msnm respectivamente, sugiriendo que no hubo relación de la precocidad con la procedencia (altitud). Las accesiones F-117, F-80, las variedades criollas Danlí 46 y Chingo, y las variedades mejoradas Amadeus-77 y Tío Canela-75 fueron más tardías (>65 DMF).

Los rendimientos de grano y componentes de rendimiento presentaron diferencias significativas entre los materiales evaluados (Cuadro 11). La mayoría de los genotipos (38), produjeron entre 7 y 10 vainas por planta; y solamente la variedad criolla Concha Rosada produjo 11 vainas por planta. Las accesiones F-130, F-371, F-190, F-211, F-155, F-218, y F-80 fueron las que produjeron mas de 8 vainas por planta. En promedio, los materiales tuvieron 5 semillas por vaina, y sólo Chingo, F-34, F-201, F-332 y F-340 tuvieron 6 semillas por vaina. Un total de 35 materiales, son del tipo de grano pequeño (<25 g/100 semillas), y los demás son del tipo de grano mediano (25-40 g/100 semillas), destacándose las accesiones F-245, F-72 y F-117 que tuvieron entre 29-31 g/100 semillas.

Cuadro 10. Características morfológicas, fenológicas y color del grano del germoplasma hondureño de frijol común. Ensayo de verano. Zamorano, 2002.

Accesión	Color de Grano ^x	Hábito de Crecimiento ^y	Días a emergencia	Altura de planta ^z	Días a Floración ^z	Días madurez fisiológica ^z
Amadeus-77	R4	2A	6	25.8 fghi	39 cd	67 ab
Desarrural	R4	2A	5	30.5 bcdefgh	32 nop	62 c
Tío Canela-75	R5	2A	6	30.2 bcdefgh	38 cde	67 ab
Dorado	R7	2A	6	29.9 bcdefghi	40 ab	63 bc
Danlí 46	R6	2A	5	30.9 bcdefgh	41 a	69 a
Concha Rosada	R2	2A	6	32.5 bcdefg	37 def	64 bc
Madura Parejo	R3	2A	6	28.3 cdefghi	32 nop	65 bc
Chingo	R1	2A	5	34.2 bc	36 ghi	69 a
Paraisito	R1	2A	6	30.3 bcdefgh	33 mno	62 c
F-245	Morado-Rojizo	1	6	30.0 bcdefghi	32 nop	62 c
F-201	R2	2A	5	30.5 bcdefgh	35 ijkl	64 bc
F-09	R2	2B	5	42.1 a	34 lmn	62 c
F-47	R3	2A	5	30.8 bcdefgh	36 ghi	61 c
F-102	R5	2A	6	27.6 cdefghi	30 qrstu	63 c
F-169	Negro-opaco	2A	5	31.4 bcdefgh	29 uv	63 bc
F-264	Negro-opaco	2A	5	30.4 bcdefgh	32 nop	62 c
F-57	R3	2B	5	33.8 bcd	34 klm	61 c
F-340	R2	2A	5	31.5 bcdefgh	34 klm	65 bc
F-130	R3	2A	5	29.8 bcdefghi	37 efg	62 c
F-371	Crema-moteado	2A	6	29.2 bcdefghi	37 efg	64 bc
F-190	R4	2A	5	31.1 bcdefgh	31 pqr	65 bc
F-253	Negro-opaco	2A	5	32.9 bcdef	30 qrstu	62 c
F-126	Negro-opaco	2A	5	27.9 cdefghi	29 v	63 bc
F-505	R4	2A	5	35.7 ab	34 lmn	64 bc
F-211	R4	2A	6	26.9 defghi	35 hij	64 bc
F-107	R2	2A	6	27.7 cdefghi	35 hij	65 bc
F-72	R2	2A	6	28.2 cdefghi	30 qrstu	62 c
F-518	Blanco	2B	5	30.1 bcdefgh	37 efg	61 c
F-34	R3	2A	5	33.4 bcde	34 klm	64 bc
F-91	R3	2A	5	25.7 ghi	34 klm	62 c
F-30	R5	2A	5	26.9 defghi	29 uv	62 c
F-321	R4	2A	5	25.9 fghi	34 klm	62 c
F-332	R2	2A	6	22.9 i	31 pqr	62 c
F-147	R4	2A	6	26.9 defghi	31 pqr	62 c
F-85	R3	2A	6	26.9 defghi	31 pqr	61 c
F-22	R3	2A	6	25.5 ghi	30 qrstu	61 c
F-97	R2	2A	5	28.5 cdefghi	30 qrstu	62 c
F-104	R9	2A	6	28.8 bcdefghi	31 pqr	62 c
F-428	R4	2A	5	30.2 bcdefgh	34 klm	62 c
F-117	R7	2A	6	28.7 bcdefghi	40 ab	69 a
F-155	R6	2A	5	31.3 bcdefgh	39 bc	64 bc
F-405	R6	2A	6	28.5 cdefghi	38 cde	62 c
F-218	R4	2A	6	26.9 defghi	31 pqr	61 c
F-419	R3	2A	5	24.5 hi	32 nop	61 c
F-77	R5	2A	6	26.0 fghi	30 qrstu	61 c
F-79	R2	2A	6	28.5 cdefghi	31 pqr	64 bc
F-80	R8	2A	6	32.2 bcdefg	39 bc	69 a
F-421	R3	2A	5	26.3 efghi	31 pqr	62 c
Promedio	-	-	-	29	34	63
Rango	-	-	-	42.1-22.9	41-29	69-61
ANDEVA	-	-	-	**	**	**
DMS (0.05)	-	-	-	7.13	1.65	3.91
C.V. (%)	-	-	-	14.91	3.00	3.29

** Altamente significativo al nivel de P = 0.01

^x Ver Cuadro 4

^y Ver Cuadro 3

^z Medias con la misma letra son estadísticamente iguales

Cuadro 11. Rendimiento de grano y componentes de rendimiento del germoplasma hondureño de frijol común. Ensayo de verano. Zamorano, 2002.

Accesión	NVP ^z	NSV ^z	PSCS (g) ^z	RDTO (kg/ha) ^y
Amadeus-77	6.0 hij	4 efg	26.2 defghij	828 fghi
Desarrural	7.0 efghij	6 abc	27.6 cde	1360 bcde
TC-75	7.0 efghij	4 efg	23.9 ijklmnopqr	1252 bcdefg
Dorado	7.3 defghi	5 cdef	22.9 nopqrstuv	844 efghi
Danlí 46	8.0 bcdefghi	5 cdef	22.6 nopqrstuv	984 cdeffghi
Concha Rosada	10.6 a	6 abc	22.8 nopqrstuv	1952 a
Madura Parejo	6.0 hij	4 efg	20.7 vw	792 ghi
Chingo	9.0 abcdef	6 abc	24.7 ghijklmnop	1222 bcdefgh
Paraisito	7.3 defghi	5 cdef	24.7 ghijklmnop	1131 cdefghi
F-245	8.3 abcdefgh	4 efg	30.4 ab	1323 bcdefg
F-201	8.0 bcdefghi	6 abc	24.2 hijklmnopq	1307 bcdefg
F-09	7.3 defghi	4 efg	26.6 defgh	1111 cdefghi
F-47	8.0 bcdefghi	5 cdef	22.6 opqrstuv	1181 bcdefgh
F-102	4.6 j	5 cdef	26.3 defghi	857 defghi
F-169	7.6 cdefghi	5 cdef	23.9 ijklmnopqr	1044 cdefghi
F-264	7.6 cdefghi	5 cdef	22.9 nopqrstuv	1031 cdefghi
F-57	7.6 cdefghi	5 cdef	21.9 rstuvw	1047 cdefghi
F-340	6.3 ghij	6 abc	25.6 defghijklm	1006 cdefghi
F-130	10.3 ab	5 cdef	24.1 hijklmnopq	1392 bc
F-371	9.6 abcd	4 efg	27.9 bcd	1672 ab
F-190	10.0 abc	5 cdef	23.5 klmnopqrstu	1688 ab
F-253	6.3 ghij	4 efg	25.8 defghijkl	854 defghi
F-126	6.0 hij	3 g	23.2 mnopqrstuv	715 hi
F-505	6.3 ghij	5 cdef	23.6 klmnopqrst	1090 cdefghi
F-211	9.0 abcdef	5 cdef	23.6 klmnopqrst	1368 bcd
F-107	8.6 abcdefg	5 cdef	21.4 stuvw	1101 cdefghi
F-72	7.0 efghij	4 efg	31.2 a	1226 bcdefgh
F-518	7.6 cdefghi	4 efg	27.1 cdefg	1010 cdefghi
F-34	8.6 abcdefg	6 abc	23.6 klmnopqrst	1356 bcde
F-91	8.3 abcdefgh	5 cdef	22.9 nopqrstuv	1115 cdefghi
F-30	6.3 ghij	4 efg	22.6 nopqrstuv	849 efghi
F-321	8.0 bcdefghi	5 cdef	21.6 rstuvw	1064 cdefghi
F-332	6.6 fghij	7 a	27.3 cdef	1059 cdefghi
F-147	8.0 bcdefghi	4 efg	21.0 uvw	891 cdefghi
F-85	8.3 abcdefgh	5 cdef	23.4 lmnopqrstu	1089 cdefghi
F-22	7.3 defghi	5 cdef	21.0 uvw	1087 cdefghi
F-97	6.6 fghij	4 efg	23.7 jklmnopqrs	895 cdefghi
F-104	5.6 ij	4 efg	25.9 defghijk	854 defghi
F-428	7.3 defghi	5 cdef	24.2 hijklmnopq	1019 cdefghi
F-117	8.3 abcdefgh	4 efg	29.4 abc	971 cdefghi
F-155	9.6 abcd	5 cdef	22.3 pqrstuv	1137 cdefghi
F-405	6.3 ghij	5 cdef	19.6 w	649 i
F-218	9.3 abcde	5 cdef	24.1 hijklmnopq	1278 bcdefg
F-419	6.6 fghij	5 cdef	21.4 stuvw	1108 cdefghi
F-77	6.3 ghij	4 efg	24.8 fghijklmno	883 cdefghi
F-79	8.0 bcdefghi	5 cdef	21.4 stuvw	1039 cdefghi
F-80	9.3 abcde	5 cdef	25.1 efghijklmn	1137 cdefghi
F-421	7.6 cdefghi	5 cdef	21.2 tuvw	1040 cdefghi
Promedio	7.6	5	24.1	1102
Rango	10.6-4.6	7-3	31.2-19.6	1952-649
ANDEVA	**	**	**	**
DMS (0.05)	2.52	1.24	2.51	518.31
C.V. (%)	20.3	15.9	6.4	29.0

** Altamente signifactivo al nivel de P = 0.01

^z Medias con la misma letra son estadísticamente iguales

^y Ajustado al 14% de humedad

Se encontró 44 genotipos con rendimientos entre 801 y 1700 kg/ha demostrando que muchos tienen un buen potencial de rendimiento; la variedad Madura Parejo y las accesiones F-126, F-405 obtuvieron rendimientos debajo de los 800 kg/ha; y solamente Concha Rosada tuvo el rendimiento más alto (1952 kg/ha)

La variabilidad en la caracterización agronómica de los genotipos estudiados, puede deberse a que entre los materiales encontramos variedades mejoradas, criollas y accesiones que provienen de localidades muy diferentes en cuanto a altura, condiciones climáticas, edáficas y sistemas de producción. La accesión F-190 que se encuentra dentro del 6% superior en rendimiento (> 1600 kg/ha), pero el Peso Seco de Cien Semillas (PCSS) es 23.5 g, el Número de Vainas por Planta (NVP) es 10, es precoz 65 Días a Madurez Fisiológica (DMF) y tiene un hábito de crecimiento arbustivo indeterminado con guía corta (Cuadro 10); esta accesión podría ser mejorada para características como Número de Semilla por Vaina (NSV).

La accesión F-72 presentó el mayor PSCS (31.2 g), hábito de crecimiento arbustivo indeterminado con guía corta, un rendimiento promedio de 1226 kg/ha, pero no presenta muy buenas características de NSV (4) y NVP (7).

Existen accesiones como la F-371 que presenta el tercer rendimiento más alto (1672 kg/ha) que podría ser mejorada para características como NSV; ésta posee un color de su grano crema-moteado (Cuadro 10) y puede ser útil para regiones donde este grano es importante.

Se observaron dos accesiones (F-47 y F-218), que tuvieron un rendimiento aceptable (1181 y 1278 kg/ha); estos son genotipos precoces, con hábito de crecimiento arbustivo indeterminado con guía corta. Estos materiales podrían ser utilizados en programas de mejoramiento para introducir la característica de precocidad sin afectar el rendimiento.

Cuadro 12. Distribución de frecuencia de los caracteres agronómicos de los genotipos del germoplasma hondureño de frijol común. Ensayo de verano. Zamorano, 2002.

Días a Emergencia		Días a Floración		Días a madurez Fisiológica		Altura de Planta (cm)	
Intervalo Clase	Número Genotipo	Intervalo Clase	Número Genotipo	Intervalo Clase	Número genotipo	Intervalo Clase	Número genotipo
5	25	29-30	6	61-62	26	22-24	2
6	23	31-32	16	63-64	12	25-27	11
		33-34	8	65-66	4	28-30	19
		35-36	6	67-68	2	31-33	12
		37-38	6	69-70	4	34-36	3
		39-40	3			37-39	0
		41-42	3			40-42	1

Número de vainas por planta		Número de semillas por vaina		Peso seco de 100 semillas (g)		Rendimiento (kg/ha)	
Intervalo Clase	Número Genotipo	Intervalo clase	Número Genotipo	Intervalo Clase	Número genotipo	Intervalo Clase	Número genotipo
5-6	9	4	15	20-22	11	600-700	1
7-8	29	5	28	23-35	24	701-800	2
9-10	9	6	5	26-28	10	801-900	9
11-12	1			29-31	3	901-1000	2
						1001-1100	13
						1101-1200	8
						1201-1300	4
						1301-1400	6
						1601-1700	2
						1901-2000	1

Total de genotipos = 48

El 85% de los genotipos son de color rojo, incluyendo diferentes variaciones. Solo dos accesiones (F-155 y F-405) tienen el color de grano similar a la variedad criolla Danlí 46 (Cuadro 13). El 10% de los genotipos tiene el color de grano similar a la variedad mejorada Tío Canela-75 (rojo brillante), y 19% tiene el color de grano similar a la variedad criolla Desarrural (Figura 1).

La mayoría de los genotipos son de color rojo, es debido a que la mayor parte de la población en Honduras consume frijoles rojos. Sin embargo, se encontraron 4 accesiones (F-126, F-169, F-253 y F-264) de color negro-opaco, provenientes de la zona occidental (Copán y Ocotepeque), lo que refleja el consumo similar a la mayor parte de la población de Guatemala que consumen frijol de este color.

Cuadro 13. Variabilidad de color de grano de los genotipos del germoplasma hondureño de frijol común. Ensayo de verano. Zamorano, 2002.

Color de grano	Número de genotipos
Rojo claro brillante (variedad Paraisito o Chingo)	2
Color de la semilla de la variedad Concha Rosada	9
Color de la semilla de la variedad Madura Parejo	10
Color de la semilla de la variedad Amadeus-77	9
Color de la semilla de la variedad Tío Canela-75	4
Color de la semilla de la variedad Danlí 46	3
Color de la semilla de la variedad Dorado	2
Color de la semilla de la variedad Retinto Rojo (F-80)	1
Rojo oscuro opaco (variedad Retinto vaina blanca F-104)	1
Negro-opaco	4
Morado-rojizo	1
Crema-moteado	1
Blanco	1
Total genotipos	48

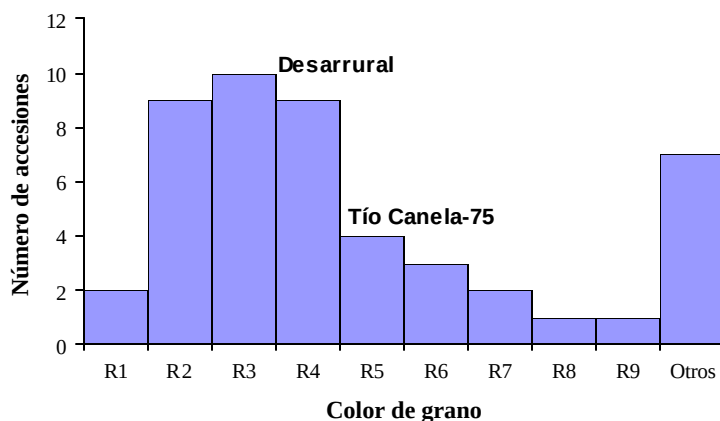


Figura 1. Distribución de frecuencias color de grano en el germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

La mayoría de los genotipos son de hábito de crecimiento tipo 2A, arbustivo indeterminado, con guía corta (Cuadro 14); el resto de las accesiones mostraron hábitos de crecimiento diferentes, que podría estar asociado con los sistemas de producción que utilizan los agricultores (monocultivo o asocio) (Alvarenga, 1995). El 92% de los

genotipos tuvieron hábito de crecimiento arbustivo indeterminado, con guía corta, al igual que las variedades Tío Canela-75 y Desarrural (Cuadro 14).

Cuadro 14. Variabilidad de hábito de crecimiento de los genotipos del germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

Tipo	Característica	Número de genotipos
1	Arbustivo determinado	1
2A	Arbustivo indeterminado, con guía corta	44
2B	Arbustivo indeterminado, con guía más o menos larga	3
3A	Postrado indeterminado, con guía no trepadora	0
3B	Postrado indeterminado, con guía trepadora	0
4A	Trepador indeterminado, con carga a lo largo de la planta	0
4B	Trepador indeterminado, con carga en los nudos superiores	0

El 40% genotipos se encuentran en el rango de 28-30 cm de altura, incluyendo las variedades Tío Canela-75 y Desarrural (Figura 2). Por otro lado, el 33% de los genotipos florecen entre los 31 y 32 DDS, en la cual encontramos a la variedad Desarrural; el 13% del germoplasma y la variedad mejorada Tío Canela-75 florecen entre los 37 y 38 DDS (Figura 3). De igual manera, se observa que el 54% de los genotipos son más precoces (<63 DMF), y el 4% son variedades de madurez intermedia que maduran posteriormente (>65 DMF) (Figura 4).

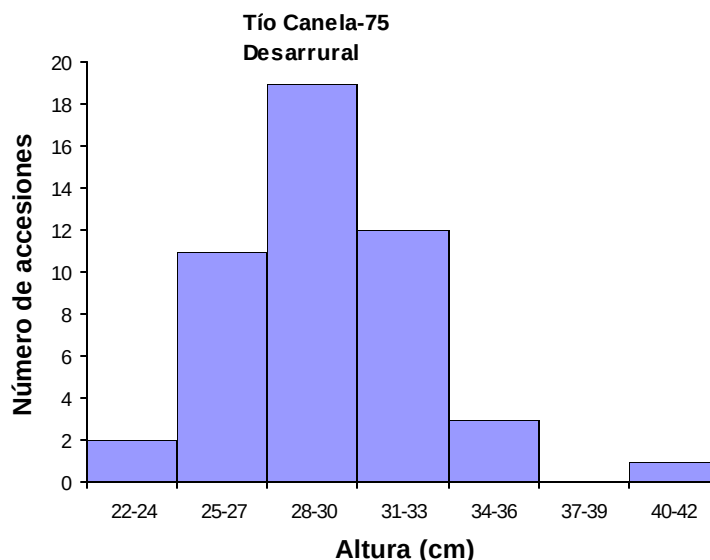


Figura 2. Distribución de frecuencias altura de planta en el germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

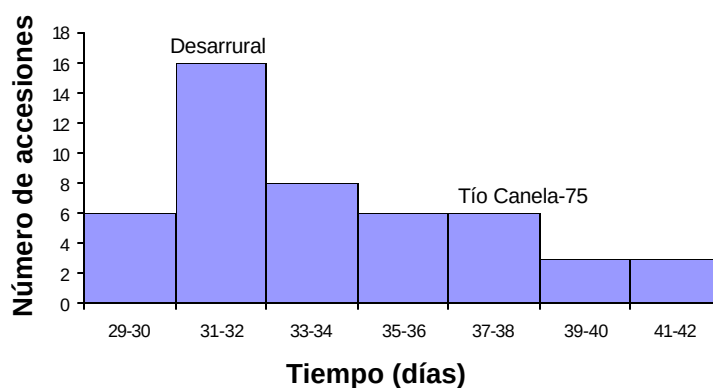


Figura 3. Distribución de frecuencias de días a floración del germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

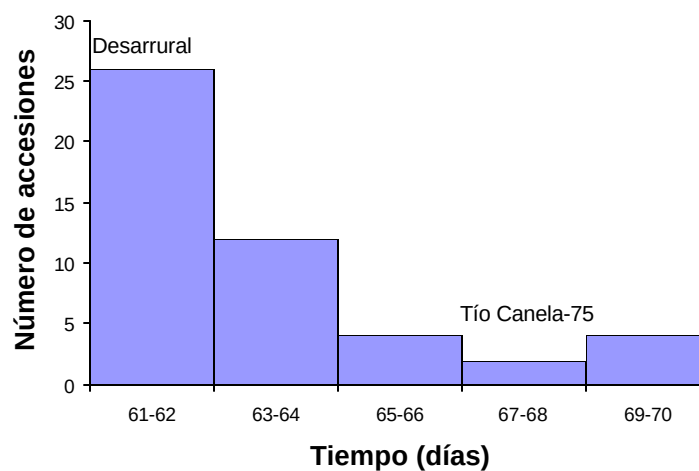


Figura 4. Distribución de frecuencias de días a madurez fisiológica del germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

Los componentes de rendimiento nos indican que el 60% de los genotipos tuvieron entre 7 y 8 vainas por planta; en este grupo se encuentran las variedades Desarrural y Tío Canela-75 (Figura 5). Según el NSV de los 48 genotipos, el 31% tuvo cuatro y el 58% cinco semillas por vaina (Figura 6). Sin embargo, el 50% de los genotipos tuvieron granos de tamaño pequeño (23-25 g/ 100 semillas); un 21% tuvo un peso entre los 26 y 28 g PSCS, que es considerado de tamaño mediano (Figura 7).

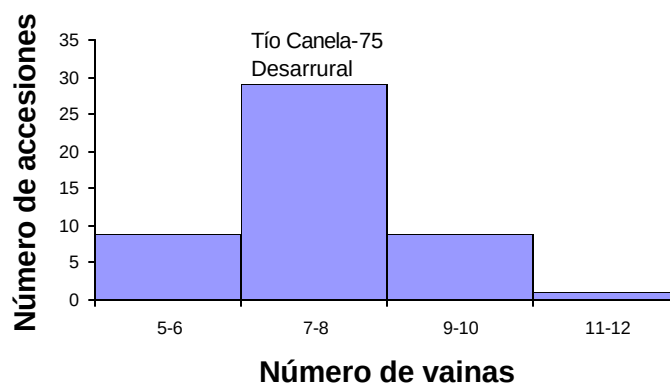


Figura 5. Distribución de frecuencias del número de vainas por planta del germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

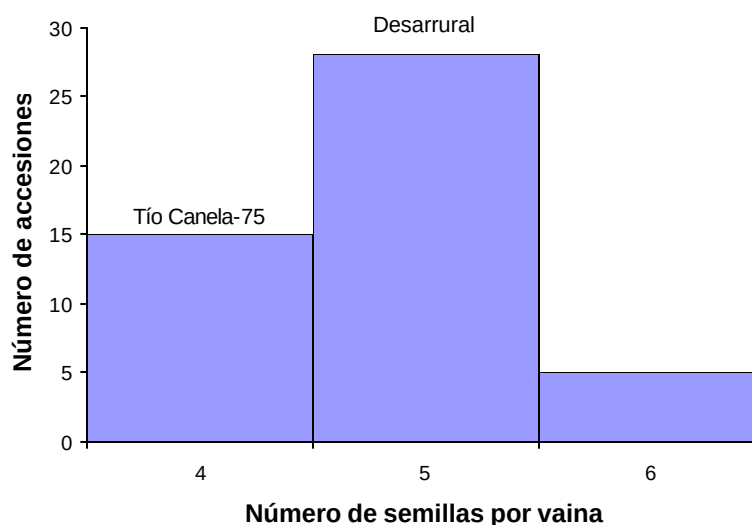


Figura 6. Distribución de frecuencias de número de semillas por vaina del germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

En los rendimientos promedios de los 48 genotipos evaluados, un 8% tuvieron rendimientos entre 1201 y 1300 kg/ha, y un 13% entre 1301 y 1400 kg/ha. En estos grupos se encuentran las variedades Tío Canela-75 y Desarrural, respectivamente (Figura 8). Estos resultados sugieren que no hubo relación del potencial de rendimiento con la procedencia (altitud) (Figura 9).

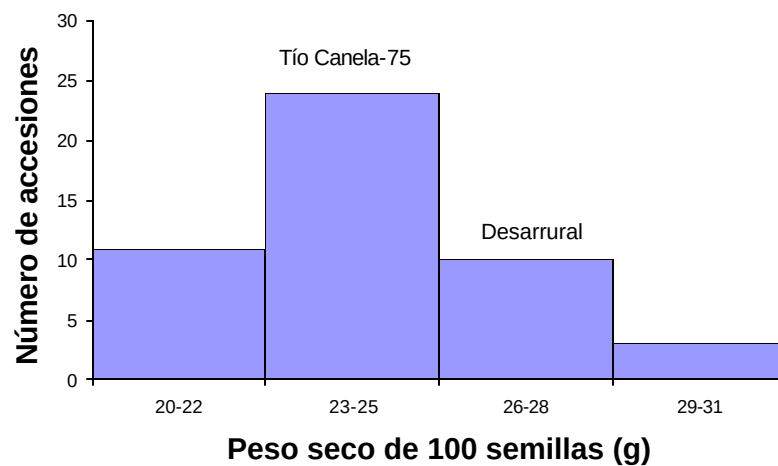


Figura 7. Distribución de frecuencias del peso seco de cien semillas (g) del germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

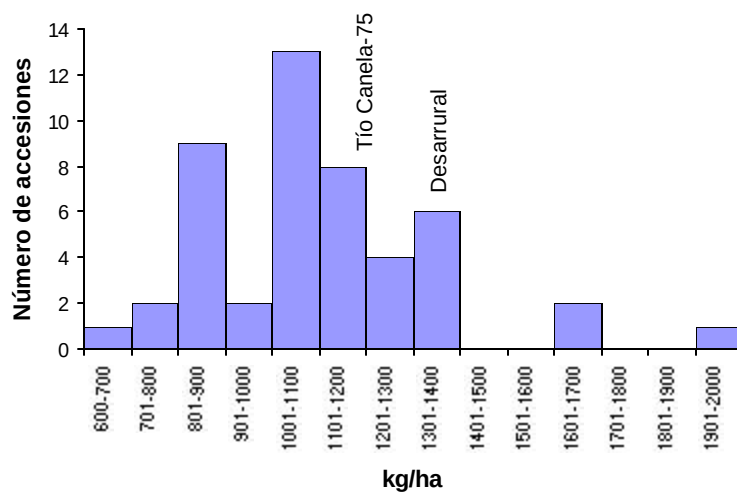


Figura 8. Distribución de frecuencias de rendimiento del germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

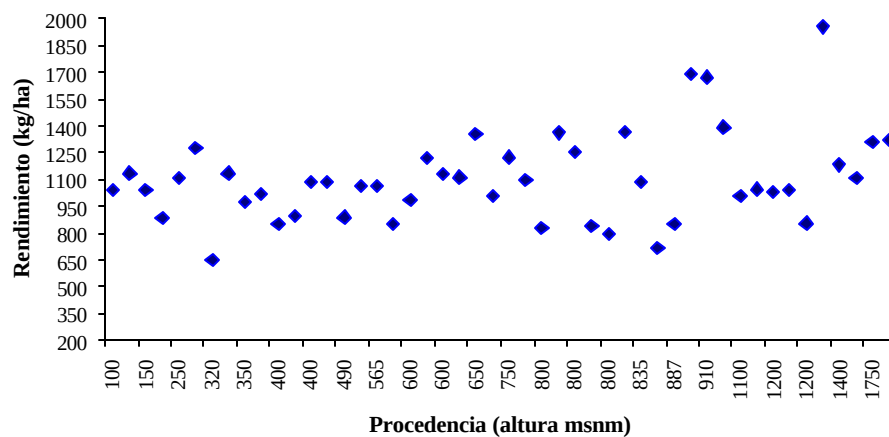


Figura 9. Relación del potencial de rendimiento del germoplasma hondureño de frijol común con su procedencia (altura). Zamorano, 2002.

Las accesiones provienen de varias regiones de los Departamentos de Honduras; por lo cual este germoplasma presenta una gran variabilidad (Figura 10).

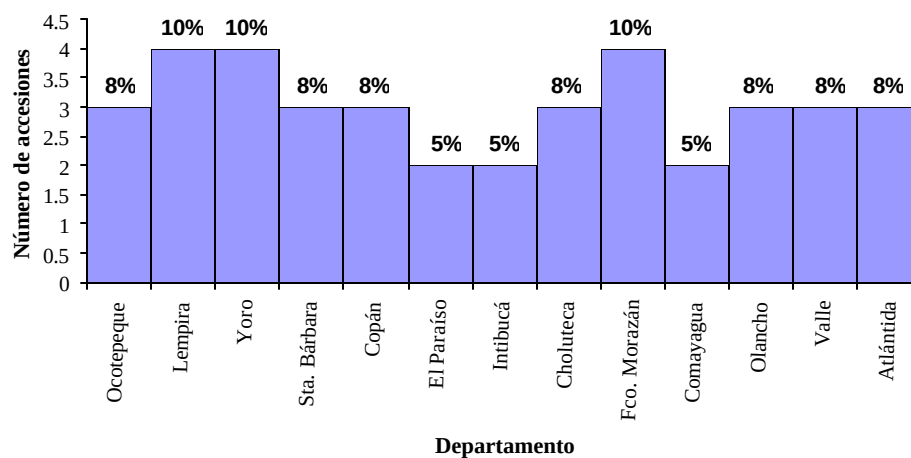


Figura 10. Origen geográfico de las accesiones del germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

La variabilidad del germoplasma hondureño de frijol, permite al fitomejorador seleccionar características deseables para obtener variedades mejoradas y con potencial de rendimiento. Existe un pequeño grupo de genotipos que se diferencian marcadamente, éste incluye a la variedad Concha Rosada y las accesiones F-371 y F-190, las cuales obtuvieron los mayores rendimientos (Figura 11). Según las características morfológicas y fenológicas con coeficientes de similitud, el germoplasma hondureño de frijol, se separa en dos grupos; en el primero, se encuentran los genotipos Amadeus-77, F-126, Dorado, Madura Parejo, F-102, F-340, F-332 y F-405, las cuales son sembradas en varias localidades de las región oriental y occidental. En el segundo grupo, se encuentran el resto de los genotipos, lo cual indica que existe una mayor similitud dentro de cada grupo que entre ellos. Estos resultados, se deben considerar en la planificación del manejo de los recursos genéticos como accesiones duplicadas, y, la decisión de la preservación de estas accesiones, se supeditará a la disponibilidad de espacio y recursos.

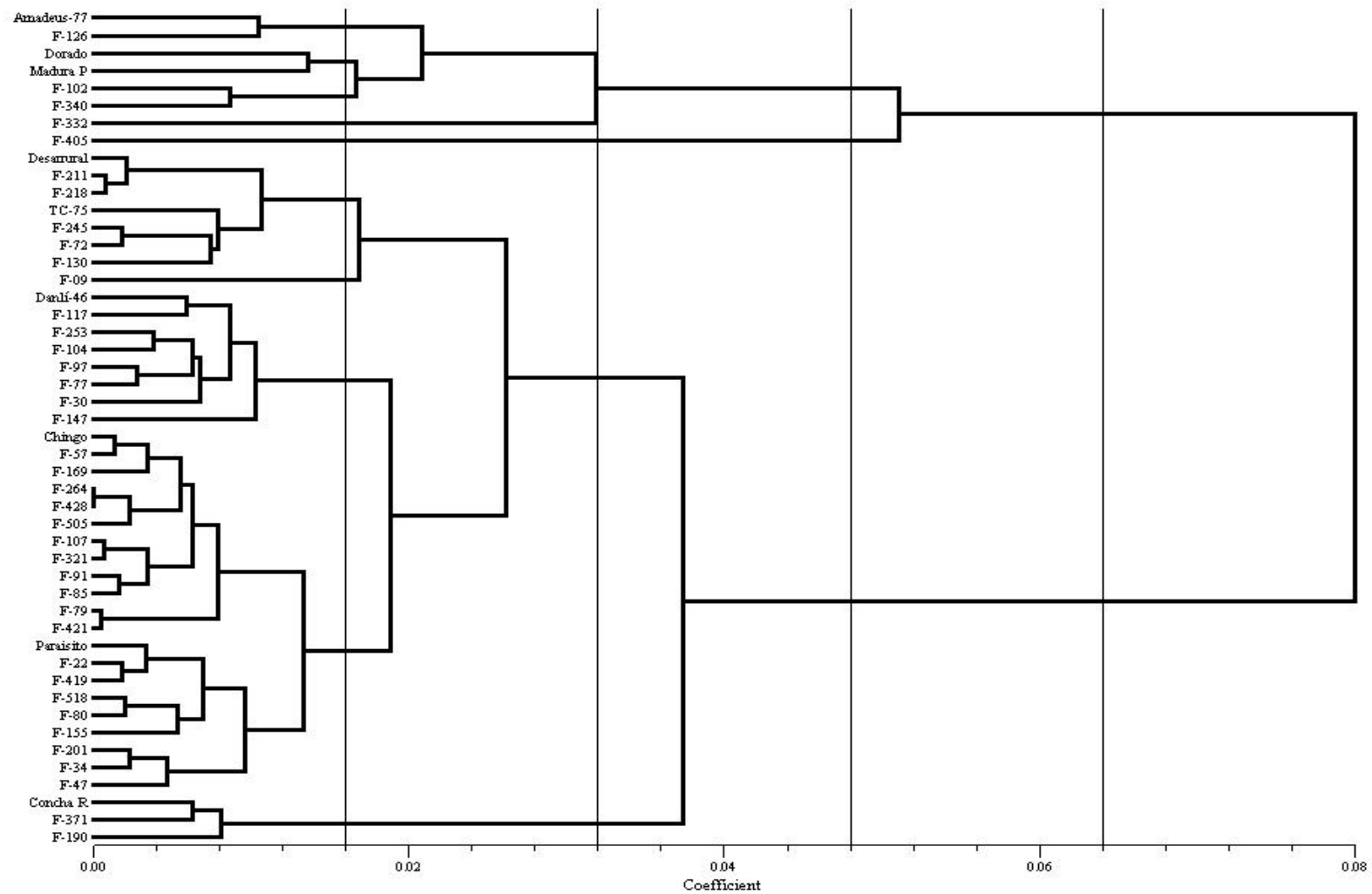


Figura 11. Dendrograma morfológico y fenológico de las accesiones estudiadas. Zamorano, 2002.

4.2 EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL A ENFERMEDADES

En la época de verano del 2002 se evaluó 48 genotipos por su reacción a bacteriosis y pudrición carbonosa, observándose su comportamiento en cuanto a severidad e incidencia principalmente.

Los 48 materiales evaluados por su reacción a bacteriosis no tuvieron diferencia significativa entre ellos (Cuadro 15). En general, se observó que no existieron genotipos resistentes a bacteriosis. Sin embargo, existe la accesión F-85 (450 msnm) que presentó una severidad de 3, y un porcentaje de incidencia bajo (8%) y puede ser útil en programas de fitomejoramiento. La bacteria se desarrolló bajo condiciones de temperatura promedio de 24°C; lo cual no concuerda con las temperaturas óptimas para el desarrollo de la bacteria de 28 a 32°C y humedad relativa alta (Saettler, 1989). Las temperaturas inferiores a las óptimas para el crecimiento del patógeno cuando se realizó la evaluación, pudieron afectar el desarrollo y la infección del mismo. Sin embargo, la severidad fue bastante alta. Es necesario realizar nuevas evaluaciones para reconfirmar los resultados, ya que factores ambientales pudieron ocasionar escapes de infección.

En la evaluación para la pudrición carbonosa, todos los genotipos fueron susceptibles. Esto indica que hubo una buena presión de la enfermedad. Sin embargo, los niveles de incidencia fueron bajos, con niveles menores a 2%, lo cual demuestra que esta enfermedad no causó pérdidas considerables en el cultivo y por ello no se realiza ningún control: Campos (1987) menciona que la pudrición carbonosa, nunca ha causado daños de consideración y no amerita ningún tipo de control; por otro lado *M. phaseolina* tiene otros organismos antagonistas en el suelo, como *Aspergillus flavus*, *A. rugulosus*, *A. terreus*, *Thielavia terricola*, *Trichoderma lignorum* y *Bacillus cereus* los cuales inhiben el crecimiento del hongo.

En la época de primavera del 2002 se evaluaron los 48 genotipos por su reacción a la mancha angular y antracnosis, observándose su comportamiento en cuanto a severidad e incidencia principalmente (Cuadro 16).

En la evaluación de la mancha angular, la mayoría de los genotipos fueron susceptibles. Para comprobar el ataque del hongo, se utilizó el testigo resistente G06727 que mostró un grado de severidad de 1. La accesión F-245 mostró un grado de severidad de 6 y una incidencia del 35% en la escala de calificación, y se considera en la categoría intermedio.

Para que el hongo desarrolle, esporule y cause infección requiere de temperaturas de 16 a 24°C, y humedad de 80 a 95% (Campos, 1987), condiciones que se dieron en Zamorano durante el periodo de evaluación (temperatura promedio de 24°C).

Cuadro 15. Resultados de la evaluación de la severidad (S) e incidencia (I) de enfermedades en el germoplasma hondureño de frijol común. Zamorano, 2002.

Accesión	Bacteriosis		Pudrición carbonosa		Mancha Angular ^z		Antracnosis ^z	
	S (1-9)	I (%)	S (1-9)	I (%)	S (1-9)	I (%)	S (1-9)	I (%)
GO6727	-	-	-	-	1	0 a	1	0 a
Amadeus-77	7	17	9	3	9	83 de	8	55 b
Desarrural	5	37	9	1	9	75 cde	9	58 b
TC-75	4	28	9	1	9	93 e	9	55 b
DORADO	5	35	9	4	9	85 de	8	58 b
Danlí 46	4	18	9	2	8	70 cde	8	60 b
Concha Rosada	6	43	9	0	9	70 cde	8	50 b
Madura Parejo	4	12	9	0	9	75 cde	8	45 b
Chingo	5	15	9	0	9	85 de	9	75 b
Paraisito	3	12	9	0	9	85 de	9	85 b
F09	5	17	9	1	9	70 cde	9	60 b
F22	6	43	9	0	8	70 cde	9	70 b
F30	5	20	9	0	9	70 cde	9	88 b
F34	6	52	9	0	8	45 bcd	9	90 b
F47	7	50	9	0	9	70 cde	9	75 b
F57	7	63	9	0	9	80 cde	9	80 b
F72	5	35	9	0	9	85 de	9	85 b
F77	7	20	9	0	9	85 de	9	90 b
F79	6	23	9	1	9	90 de	9	85 b
F80	6	30	9	0	9	80 cde	9	90 b
F85	3	8	9	0	9	70 cde	9	80 b
F91	5	22	9	1	9	83 de	9	93 b
F97	6	35	9	0	9	85 de	9	90 b
F102	7	40	9	0	9	80 cde	9	83 b
F104	5	20	9	0	8	75 cde	9	75 b
F107	5	27	9	0	9	85 de	9	90 b
F117	4	8	9	0	9	83 de	9	85 b
F126	6	27	9	1	8	50 bcde	9	70 b
F130	5	17	9	0	9	80 cde	9	75 b
F147	6	43	9	0	7	65 cde	9	60 b
F155	4	25	9	1	8	55 bcde	9	70 b
F169	6	30	9	0	9	85 de	9	88 b
F190	4	15	9	0	9	70 cde	9	70 b
F201	5	10	9	0	9	65 cde	9	90 b
F211	4	20	9	0	9	85 de	9	90 b
F218	4	30	9	0	9	83 de	9	85 b
F245	5	18	9	0	6	35 bc	9	35 b
F253	6	40	9	0	9	88 de	9	80 b
F264	5	20	9	0	9	65 cde	9	88 b
F321	4	12	9	1	9	93 e	9	93 b
F332	4	22	9	0	9	80 cde	9	90 b
F340	6	37	9	1	9	60 cde	9	80 b
F371	6	35	9	0	9	85 de	9	95 b
F405	7	57	9	0	9	85 de	9	80 b
F419	5	40	9	1	9	75 cde	9	85 b
F421	6	37	9	1	9	85 de	9	93 b
F428	6	27	9	0	9	70 cde	9	85 b
F505	5	37	9	0	9	65 cde	9	60 b
F518	8	63	9	1	8	55 bcde	9	45 b
Promedio	5	27	9	0	9	71	9	73
ANDEVA	ns	ns	ns	**	**	**	**	**
DMS (0.05),	-	-	-	0.21	-	-	-	-
SNK (0.05)	-	-	-	-	1.96	2.04	0.96	2.04
C.V. (%)	47.5	34.1	0	4.1	9.3	23.2	5.5	41.5

** Altamente significativo al nivel de P = 0.01 , ns No significativo

^z Medias con la misma letra son estadísticamente iguales

La ocurrencia del fuerte ataque de mancha angular en Zamorano, permitió confirmar niveles bajos de resistencia a esta enfermedad en el germoplasma local, variedades criollas y mejoradas; se sugiere incorporar resistencia a esta enfermedad en las variedades en programas de fitomejoramiento. En este caso se sugiere el uso de fuentes de resistencia del acervo genético andino, tal es el caso del material G06727. En Zamorano, se han realizado estudios de evaluaciones fenotípicas por reacción a la mancha angular en las camas de infección, de plantas de generaciones F2, F3 y F4 de la población ALS 9951, por Díaz (primer semestre de 2001); y se continuaron las evaluaciones de las generaciones F5 y F6, por Parreño (segundo semestre de 2002).

No se realizaron estudios acerca de las razas que se presentaron en las accesiones evaluadas y es necesario reconfirmar estos resultados para posibles usos en fitomejoramiento.

Todos los genotipos evaluados fueron susceptibles a la antracnosis. Sin embargo, el genotipo del acervo andino G06727 fue resistente con un grado de severidad de 1 en la escala de calificación. Es importante mencionar que las temperaturas promedio de 24°C durante la mayor parte del ciclo biológico del cultivo favorecieron el desarrollo de la antracnosis, lo cual coincide con Campos (1987), que manifiesta que esta enfermedad para que el agente causal se desarrolle y disemine, se requiere de alta humedad relativa (95%) y de bajas temperaturas (de 16 a 24°C). No se utilizaron diferenciales para identificar la raza.

Es necesario realizar otras evaluaciones para reconfirmar estos resultados y poder obtener posibles fuentes de resistencia para el uso en fitomejoramiento.

4.3 RESPUESTA DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL A LA INOCULACIÓN CON *RHIZOBIUM* EN INVERNADERO

El germoplasma hondureño de frijol presentó una gran variación en el color de hojas en la respuesta a la inoculación con *Rhizobium*. En la evaluación de los genotipos (Cuadro 16) se encontró material con color de hojas verde oscuro, que representaban la ausencia de síntomas por deficiencia de nitrógeno, debido a una buena capacidad de fijación de Nitrógeno atmosférico (N_2). las accesiones que tenían colores en sus hojas amarillo claro o amarillo brillante eran indicaciones de deficiencia de nitrógeno, y por lo tanto de pobre capacidad para fijar N_2 .

Solo un genotipo fue catalogado con el color verde oscuro, 3 (6.3%) fueron valoradas verde claro, 22 (45.8%) verde amarillento, 21 (43.8%) amarillo claro, y 2 (4.1%) tuvieron color de hojas amarillo brillante (Cuadro 17). De todas las accesiones que tenían coloraciones amarillas, la mayoría presentó nódulos por arriba de la media (> 258), excepto los genotipos Tío Canela-75, F-126, F-190 y F-518.

En el Cuadro 17 se muestran los promedios de número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN) y peso seco de follaje (PSF) del germoplasma hondureño de frijol común y los tratamientos testigos. Se obtuvieron diferencias significativas entre materiales. La variable PSN fue la única que no presentó diferencia significativa. Sin embargo, el 52% de los genotipos obtuvieron PSN mayores al promedio (185 mg/pl). Las diferencias observadas en nodulación (NN y PSF) pueden ser debidas a la gran variabilidad que presenta el germoplasma.

La variedad Amadeus 77, Danlí 46 y la accesión F-147 se encuentran dentro del 6% más productoras de nódulos (NN), aproximadamente 1.5 veces por arriba del promedio. Sin embargo, el tratamiento testigo (Desarrural con fertilización nitrogenada) presentó una cantidad de nódulos 1.4 veces por arriba de la media. La presencia de nódulos puede deberse a la presencia de rhizobios nativos y a que en la especie de frijol no existen materiales que no nodulen, aunque no se descartan otras posibles fuentes de contaminación (salpique por riego, salpique por pipetas, etc.).

La capacidad de formar nódulos, no necesariamente indica la eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno; para cada combinación leguminosa-rhizobio, el nivel óptimo de nodulación es diferente. Por lo que es común observar leguminosas promiscuas que presentan una nodulación “semiefectiva” en donde se observa buena nodulación, pero fijan una reducida cantidad de N, que no les permite alcanzar su potencial de rendimiento (Mora, 1995).

El PSF sirvió para determinar la influencia del tratamiento sobre la producción de materia verde. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los genotipos y tratamiento testigos. Desarrural con fertilización nitrogenada y sin inoculación con *Rhizobium* y Tío Canela-75 con fertilización nitrogenada, fueron los que obtuvieron los valores más altos de PSF, 1.5 veces más que el promedio general e iguales estadísticamente entre ellos.

Cuadro 16. Color de hojas, promedio del número (NN) y peso seco de nódulos (PSN) por planta, peso seco de follaje (PSF) del germoplasma hondureño de frijol común inoculado con *Rhizobium*. Ensayo en invernadero. Zamorano, 2002.

Accesión	Color de hojas	NN ^z	PSN (mg/pl)	PSF (g/pl) ^z
Amadeus-77	Verde claro	362 abc	250	1.7 c
Desarrural	Verde amarillento	294 bcdefghi	200	2.0 bc
TC-75	Verde amarillento	177 hijkl	150	1.8 bc
DORADO	Verde amarillento	315 abcdefg	150	1.6 c
Danlí 46	Amarillo claro	428 a	250	1.8 bc
Concha Rosada	Amarillo brillante	268 bcdefghijk	150	1.7 c
Madura Parejo	Amarillo claro	213 efghijkl	150	1.7 c
Chingo	Amarillo claro	245 bcdefghijkl	150	1.6 c
Paraisito	Verde amarillento	314 abcdefg	200	1.6 c
F09	Verde amarillento	265 bcdefghijkl	250	1.4 c
F22	Verde amarillento	250 bcdefghijkl	200	1.7 c
F30	Verde amarillento	266 bcdefghijkl	150	1.6 c
F34	Amarillo claro	263 bcdefghijkl	200	1.6 c
F47	Amarillo claro	331 abcde	200	1.7 c
F57	Verde claro	189 fghijkl	150	1.5 c
F72	Amarillo claro	296 abcdefghi	200	1.8 bc
F77	Amarillo claro	284 bcdefghi	250	2.0 bc
F79	Verde amarillento	265 bcdefghijkl	150	1.6 c
F80	Verde amarillento	346 abcd	200	1.7 c
F85	Verde amarillento	274 bcdefghijk	250	1.8 bc
F91	Amarillo claro	239 cdefghijkl	100	1.3 c
F97	Verde amarillento	241 bcdefghijkl	150	1.8 bc
F102	Amarillo claro	243 bcdefghijkl	150	1.4 c
F104	Amarillo claro	311 abcdefg	200	1.8 bc
F107	Verde amarillento	210 efghijkl	150	1.6 c
F117	Verde amarillento	296 abcdefghi	250	1.6 c
F126	Verde amarillento	169 ijkl	150	1.7 c
F130	Amarillo claro	201 efghijkl	150	1.5 c
F147	Amarillo claro	373 ab	200	1.7 c
F155	Verde amarillento	303 abcdefgh	200	1.7 c
F169	Verde amarillento	185 ghijkl	150	1.4 c
F190	Amarillo claro	134 lm	100	1.4 c
F201	Verde amarillento	225 defghijkl	250	1.4 c
F211	Verde amarillento	354 abcd	200	1.7 c
F218	Amarillo claro	261 bcdefghijl	200	1.8 bc
F245	Amarillo claro	303 abcdefgh	200	1.5 c
F253	Verde claro	141 klm	100	1.4 c
F264	Amarillo brillante	271 bcdefghijk	150	1.6 c
F321	Amarillo claro	266 bcdefghijkl	200	1.6 c
F332	Amarillo claro	320 abcdef	250	1.8 bc
F340	Amarillo claro	267 bcdefghij	150	1.8 bc
F371	Verde amarillento	223 defghijkl	150	1.4 c
F405	Amarillo claro	207 efghijkl	150	1.5 c
F419	Verde amarillento	203 efghijkl	150	1.8 bc
F421	Verde amarillento	281 bcdefghi	150	1.5 c
F428	Amarillo claro	319 abcdef	200	1.6 c
F505	Amarillo claro	278 bcdefghij	200	1.6 c
F518	Verde amarillento	145 jklm	150	1.6 c
Desarrural (CN)	Verde amarillento	367 abc	250	2.5 ab
Desarrural (SR)	Verde amarillento	252 bcdefghijkl	200	2.5 ab
TC-75 (CN)	Verde oscuro	223 defghijkl	200	2.8 a
TC-75 (SR)	Verde amarillento	188 fghijkl	150	1.9 bc
Soya	Amarillo claro	25 m	100	1.6 c
Brachiaria	Amarillo claro	-	-	0.7 d
Promedio	-	258	185	1.7
Rango	-	428-25	250-100	2.8-0.7
ANDEVA	-	**	ns	**
SNK (0.05)	-	266.4	3.95	3.95
C.V. (%)	-	36.9	38.7	17.5

** Altamente significativo P = 0.01 , ns No significativo. ^z Medias con la misma letra son estadísticamente iguales

Todos los genotipos, no presentaron diferencias significativas de PSF entre ellos, ni entre Tío Canela-75 inoculado y no inoculado con *Rhizobium*; lo cual se puede ameritar a la presencia de rhizobios nativos viables capaces de infectar las raíces, a pesar de que fue el medio fue esterilizado, con el objetivo de disminuir al mínimo la población de cepas nativas; por lo que, se puede decir que el suelo no estuvo totalmente estéril. La presencia de nódulos en la soya, la cual no es nodulada por la cepa CR477 de frijol, sugiere la presencia de rhizobios nativos en el medio debido a una esterilización incompleta del medio.

Sin embargo, existen accesiones como la F-72, F-77, F-85, F-97, F-104, F-218, F-332, F-340 y F-419 que obtuvieron en promedio de PSF 1.1 veces más arriba del promedio general. El resto de los materiales evaluados obtuvieron los menores valores, tratamientos en los que, se observó un reducido desarrollo foliar.

Los resultados anteriores indican que existen 9 accesiones capaces de obtener un crecimiento y desarrollo foliar similar a los testigos que se les aplicó nitrógeno. Pero la disponibilidad de N proveniente de FBN se inicia aproximadamente 20 días después de la siembra, debido a lo cual se hace necesario adicionar una pequeña cantidad de N mineral (30 kg N/ha), para estimular el crecimiento inicial de las plántulas, favorecer el establecimiento de las cepas en el cultivo y la formación de nódulos (Silvester, 1983).

Cuadro 17. Variabilidad de color de hoja de los genotipos del germoplasma hondureño de frijol común, inoculados con *Rhizobium*. Ensayo en invernadero. Zamorano, 2002

Color	Número de genotipos
Verde oscuro	1
Verde claro	3
Verde amarillento	25
Amarillo claro	23
Amarillo brillante	2
Total de genotipos	54

En el análisis de correlación, se observaron relaciones entre el PSF y el PSN por planta, demostrando así que a un mayor peso seco de nódulos el peso seco del follaje es mayor (Cuadro 18).

Cuadro 18. Resultados de análisis de correlación para las variables PSF y PSN. Ensayo en invernadero. Zamorano, 2002.

PSF	PSN
	0.17*

* Significativo a P= 0.01

4.4 EVALUACIÓN MOLECULAR DEL GERMOPLASMA HONDUREÑO DE FRIJOL

Los 19 cebadores empleados en este estudio generaron un total de 42 bandas RAPDs (Cuadro 19). Se obtuvo un total de 11 bandas polimórficas que varían desde una banda en los cebadores OpW-06, OpT-07, OpP-09, OpL-04 y OpU-19 hasta dos bandas en los cebadores OpH-04, OpG-15 y OpC-04, para un promedio de 2.2 bandas por cebador. El porcentaje general de polimorfismo alcanzó el 26%. La figura 12 muestra las bandas amplificadas con el cebador OpQ-14.

Cuadro 19. Polimorfismos detectados con los cebadores RAPDs de la evaluación molecular del germoplasma hondureño de frijol. Zamorano, 2002.

Cebador	Número de bandas monomórficas	Número de bandas polimórficas	Cebador	Número de bandas monomórficas	Número de bandas polimórficas
OpH-13	2	0	OpO-13	1	0
OpH-04	2	2	OpG-03	1	0
OpH-08	2	0	OpW-09	2	0
OpW-13	3	0	OpO-19	3	0
OpG-15	0	2	OpP-09	2	1
OpY-06	2	0	OpQ-14	2	0
OpC-04	1	2	OpB-10	1	0
OpO-16	2	0	OpL-04	1	1
OpW-06	2	1	OpU-19	1	1
OpT-07	1	1			

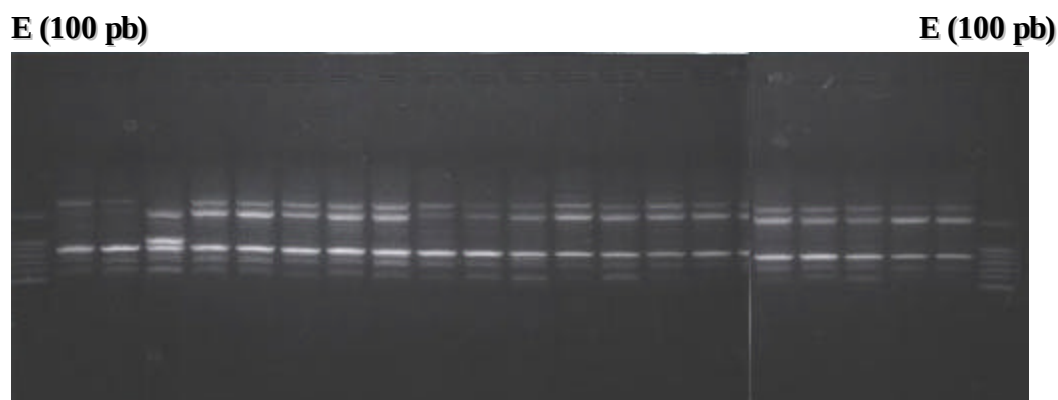


Figura 12. Patrones de bandas RAPDs generados por el cebador OpQ-14. Zamorano, 2002.

Con las bandas generadas por el análisis RAPD, se realizó un dendrograma utilizando el coeficiente de DICE (Figura 13).

Las variedades Amadeus-77 y Tío Canela-75 se unen a las accesiones F-169, F-155, F-253 con un coeficiente de similaridad de 0.98. Las accesiones F-169, F-155 y F-253 provienen de localidades de la región Occidental de Honduras (Copán y Ocotepeque), de altitud de 850 a 1890 msnm. Es importante recalcar que la similitud entre las variedades Amadeus-77 y Tío Canela-75 se debe a que la primera fue desarrollada mediante la cruce de Tío Canela-75 x DICTA 105, es decir es descendiente de esta variedad.

El 85% de los genotipos pertenecen a otro grupo y entre ellos existe un coeficiente de similaridad de 0.98. En este grupo se encontró un coeficiente de similitud de 1.0 entre las accesiones F-79, F-85, F-340 y las variedades criollas Desarrural y Paraisito; estos genotipos son sembrados en varias regiones de los departamentos de El Paraíso y Valle.

Las variedades Danlí-46, Madura Parejo y Chingo, se agruparon a las accesiones F-405, F-47, F-126 y F-264 con un coeficiente de similitud de 0.988. A éstas se agrupa la accesión F-102 pero a un nivel de similitud más bajo.

Las accesiones F-91, F-130, F-218, F-371, F-419 y F-421, son parte de un mismo grupo con un coeficiente de similaridad de 1.0; éstas se conectan con la accesión F-72 con un coeficiente más bajo (0.988). Estas accesiones pertenecen al grupo con los rendimientos mayores a 1200 kg/ha y son sembradas en localidades con alturas menores a 950 msnm. La accesión F-72 no presenta muy buenas características de NSV y NVP y la F-371 obtuvo el tercer rendimiento más alto (1672 kg/ha).

La variedad criolla Concha Rosada se agrupa con la accesión F-57 con un coeficiente de similitud de 0.988; son originarias de Yoro y son considerados genotipos precoces (<65 DMF).

Las accesiones F-80 y F-245 se encuentran separadas de los grupos anteriores; F-245 tiene un hábito de crecimiento tipo 1, tuvo un rendimiento mayor a 1300 kg/ha y es sembrada en localidades con altitudes cercanas a los 1800 msnm; en este estudio se adaptó favorablemente a las condiciones de Zamorano (800 msnm). La variedad mejorada Dorado, fue la única marcadamente separada de los grupos descritos anteriormente; en su desarrollo se usaron progenitores de otros países.

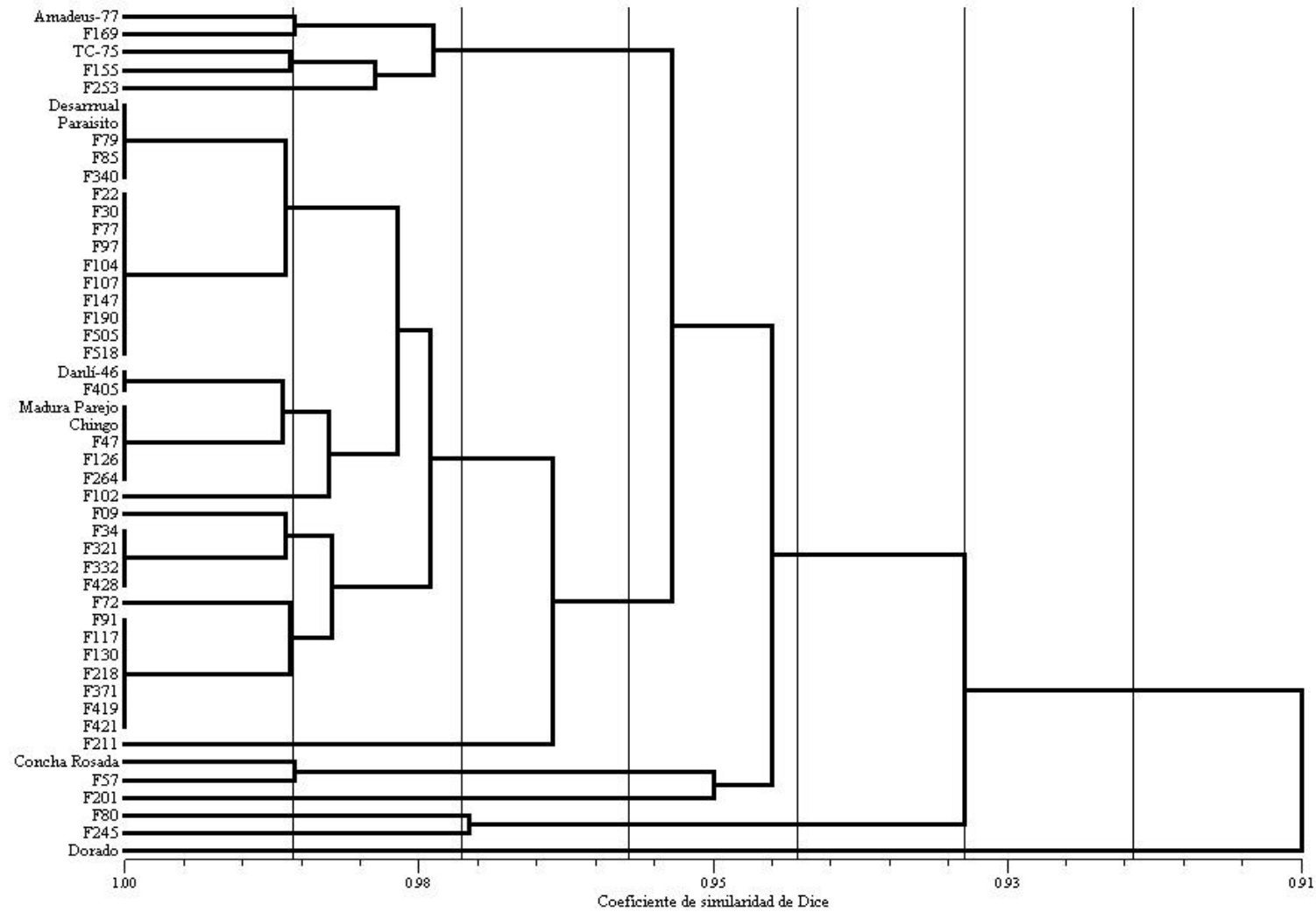


Figura 13. Dendrograma molecular de las accesiones estudiadas. Zamorano, 2002.

La desproporción entre las cuarenta y dos bandas RAPDs permite generalizar la detección de la variabilidad del germoplasma hondureño de frijol. La magnitud de la variabilidad se correlaciona con la probabilidad de detección de la misma; sin embargo, los ensayos habituales que se plantean con técnicas moleculares exploran una parte mínima del genoma y por tanto la probabilidad de encontrar diversidad se reduce (Ulanovsky et al., 2001).

Los marcadores RAPDs permitieron caracterizar las accesiones del germoplasma hondureño, que cuenta con numerosas entradas. Ulanovsky et al. (2001) manifiesta que los marcadores RAPDs son más fáciles de implementar y demandan menos recursos, se consideran adecuados para caracterizar accesiones integrantes de una colección con numerosas entradas, con la finalidad de identificar el material y organizar el manejo y el mantenimiento interno de un Banco de Germoplasma.

Los 48 genotipos se pueden agrupar en 21 modelos distintos, con un coeficiente de similitud de 1.0. Las accesiones que manifiestan modelos idénticos en la caracterización molecular, se pueden considerar como accesiones duplicadas. Sin embargo, en la planificación del manejo de los recursos genéticos, no se descarta la existencia de diferencias genéticas detectables en el futuro, y la preservación de las accesiones se supeditará al número detectado de genotipos diferentes y la disponibilidad de espacio y recursos.

5. CONCLUSIONES

- Existe una gran variabilidad en el germoplasma evaluado, en el rendimiento y sus componentes; habiéndose identificado un grupo (19%) con alto potencial.
- La mayoría de las accesiones presentaron buenas características de precocidad.
- La mayoría de las accesiones son de grano de color rojo, variando en su tonalidad.
- La inoculación con la cepa CR477 de *Rhizobium* presentó mayor nodulación y vigor vegetativo.
- Todas las accesiones fueron susceptibles a bacteriosis, pudrición carbonosa, mancha angular y antracnosis.
- Los marcadores moleculares empleados en este trabajo demostraron que existe una gran variabilidad genética, y las accesiones presentaron 28 modelos distintos de agrupaciones. Estos resultados nos permiten identificar accesiones genéticamente similares como otras altamente diversas.
- Los genotipos F-190 (Taleta de guía de Lempira), F-371 (Moro de Choluteca) y Concha Rosada, demostraron genética (molecular) y agronómicamente un alto grado de similitud, y poseen un buen potencial de rendimiento.

6. RECOMENDIACIONES

- Evaluar los mejores materiales y en diversas localidades, y considerarlos como progenitores en programas de fitomejoramiento.
- Realizar la caracterización y evaluación en zonas altitudinales diferentes.
- Evaluar este germoplasma por otros factores (p.e. calor y sequía).
- Evaluar otras cepas de *Rhizobium* en este germoplasma.
- Continuar con la caracterización genética utilizando otros marcadores moleculares RAPDs para incrementar la precisión sobre las relaciones genéticas entre las accesiones.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANDA, L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 78 p.

BACA, B.; SOTO, L.; PARDO, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno (en línea). México. Consultado el 5 de octubre de 2002. Disponible en <http://www.elementos.buap.mx/num38/htm/nitrogen.html>

BEEBE, S. 1997. Marcadores Moleculares para brutos (y para frijoleros). s.l., s.n.t., 11 p. (manuscrito).

CAMPOS, J. 1987. Enfermedades del frijol. México D.F., México, Trillas. 132 p.

CASTRO, A.; ROSAS, J.C.; ARANDA, L. 2001. Manual del Módulo de Biotecnología. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 19 p (manuscrito).

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1980. Diversidad genética de las especies cultivadas del género Phaseolus. Ed. por Ospina, H.F. Cali, Colombia, CIAT. 54 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1985. Frijol: Investigación y Producción. Ed. por López, M., Fernández, F. y van Schoorhoven, A. Cali, Colombia, CIAT. 419 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Trad. por EDITEC. Ed. por F. Mata, A. van Schoonhoven y M.A. Pastor-Corrales (comps.) Cali, Colombia. CIAT. 56 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1992. Catálogo de Germoplasma de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.). Ed. por R. Hidalgo, Cali, Colombia. CIAT. 450 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1993. Descriptores varietales: arroz, frijol, maíz, sorgo. Ed. por G. Muñoz, G. Giraldo y J. Fernández de Soto, Cali, Colombia. CIAT 174 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 2001a. Base de datos sobre recursos genéticos (en línea). Colombia. Consultado 23 de septiembre de 2002. Disponible en http://www.ciat.cgiar.org/pgr/pgr_es/inicio.htm

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 2001b. Bean World Statistic (en línea). Colombia. Consultado el 1 de octubre de 2002. Disponible en <http://www.ciat.cgiar.org/beans/worldstat2.htm#>

CIFN (Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno). 2001. La Fijación de Nitrógeno: de la Ciencia Genómica a la Agricultura. México (en línea). Consultado el 5 de octubre de 2002. Disponible en http://www.cifn.unam.mx/iii_research/research_es.htm

DÍAZ, G. 2001. Caracterización genética de la resistencia del frijol común a la mancha angular. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 45 p.

DICTA (Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria), 1998. Programa Nacional de Generación de Tecnología Agropecuaria. El Cultivo de Frijol: Guía para el manejo del cultivo del frijol, Tegucigalpa, Honduras. 39 p.

ESQUINAS, J. 1983. Los recursos fitogenéticos, Una inversión segura para el futuro. 4 ed. Madrid, España. p 7-34.

GOMEZ, L.; HERNANDEZ, G.; SANCHEZ, T.; TOSCANO, V.; SANCHEZ, M. 1998. Interacción genotipo de frijol común-cepa de *Rhizobium*. Agronomía Mesoamericana 9(1): 93-97.

HUBBELL, D. 1986. El proceso de infección de las leguminosas por *Rhizobium*. Ceiba 27:5-15.

IPGRI. 2001. Por qué tienen importancia los recursos fitogenéticos (en línea). Consultado 23 de septiembre de 2002. Disponible en <http://www.ipgri.cgiar.org/system/language.asp?lang=ES>

KELLY, J.; AFANADOR, L.; HARLEY, S.; MILKAS, P. 1994. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento de frijol. Agronomía Mesoamericana (Costa Rica) 5:1-7.

MORA, F. 1995. Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica. Agronomía Mesoamericana 6: 68-74.

OTERO, A.; DE LA CRUZ, M.; OYAMA, K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. D.F., México. 60:85-117.

PARREÑO, M. 2001. Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 43 p.

PEDRAZA, F. 1997. Marcadores moleculares, nuevas herramientas para el fitomejorador. s.l. s.n.t. 1 p. (manuscrito).

PLUCKNETT, D.L.; WILLIAMS, J.T.; SMITH, N.G.; ANISHETTY, N.M. 1992. Los Bancos Genéticos y la Alimentación Humana. Trad. por CIAT. San José, Costa Rica. 260 p.

ROHLF, F. J. Ntsys-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Publications. Setauket, New York. 38 p.

ROSAS, J.; BLISS, F. 1986a. Mejoramiento de la capacidad de fijación de nitrógeno en frijol común. Ceiba 27:95-104.

ROSAS, J.; BLISS, F. 1986b. Utilización del potencial de fijación de nitrógeno del frijol común en Centro América. Ceiba 27:105-115.

ROSAS, J.C.; ERAZO, J.D.; MONCADA, J.R. 1991. Tolerancia a la sequía de germoplasma de frijol común y frijol tepari. Ceiba 32(2):91-106.

ROSAS, J.C.; YOUNG, R.; VARELA, O. 1994. Recolección de germoplasma criollo y silvestre de maíz y *Phaseolus* en Honduras. Informe final (1990-1994). Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. s.p.

ROSAS, J.C.; CASTRO, J.A.; ROBLETO, E.A., HANDELSMAN, J. 1998. A method for screening *Phaseolus vulgaris* L. germplasm for preferential nodulation with a selected *Rhizobium etli* strain. Plant and Soil 203: 71-78.

ROSAS, J.C. 1998. El Cultivo del Frijol Común en América Tropical. Zamorano, Honduras. Zamorano Academic Press 52 p.

ROSAS, J.C. 2001. Experiencias en la aplicación de metodologías participativas para el mejoramiento genético del frijol común en Centro América. Agronomía Mesoamericana 12(2):000-000.

ROSAS, J.C.; REYES, B.; CASTRO, A. 2002. Manual del Laboratorio de Biofertilización. EAP, Zamorano, 17 p.

SAETTLER, A. W. 1989. Common bacterial blight. Schwrtz, H.F. and M.A. Pastor-Corrales (eds.). Bean production problems in the tropics. 2a. ed. CIAT. Cali, Colombia. 261-283 p.

SAS (SAS Institute Inc, US). 1994. SAS[®] User's Guide Statistics. Version 6.12 Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.

SILVESTER, R. 1983. Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas: aspectos agronómicos relacionados con su nodulación con *Rhizobium*. Suelos Ecuatoriales 13(2):28-35.

SNEATH, P. H. y SOKAL, R. R. 1973. Numerical taxonomy. Freeman. San Francisco. 573 p.

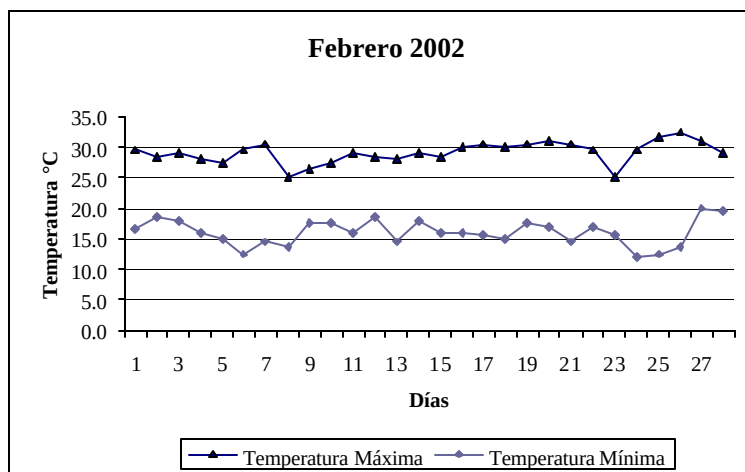
THORMANN, C.; OSBORN, T. s.f. Use of RAPD and RFLP markers for germplasm evaluation. s.l., s.n.t., p. 9-11.

ULANOVSKY, S.; GOGORCENA, Y.; MARTÍNEZ DE TODA, F.; ORITZ, J.M. 2001. Utilización de marcadores moleculares para la detección de sinonimias y homonimias en variedades de vid de cultivo minoritario en la Rioja. *Geórgica* 8: 25-41.

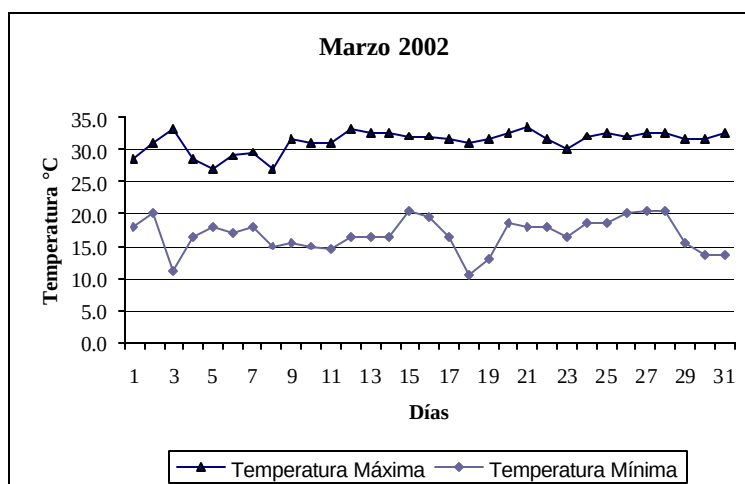
WELLHAUSEN, E. 1988. The indigenous maize germoplasm complexes of México. *In* Recent advances in the conservation and utilization of genetic resources: Proceedings of the global maize germplasm workshop. México D.F., CIMMYT. P. 17-28.

8. ANEXOS

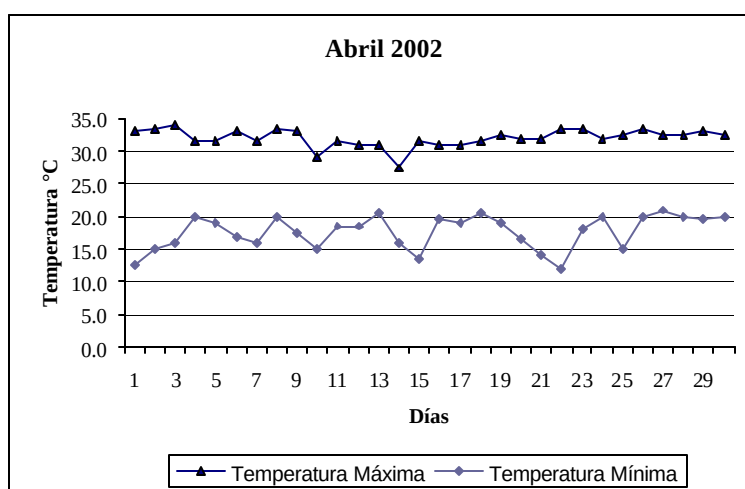
Anexo 1. Temperaturas máximas y mínimas durante las evaluaciones de resistencia a bacteriosis y pudrición carbonosa. Ensayo de verano. Zamorano, 2002.



Fecha de siembra: 4 febrero, 2002.
 Temperatura promedio Máxima 29 °C
 Temperatura promedio Mínima 16 °C

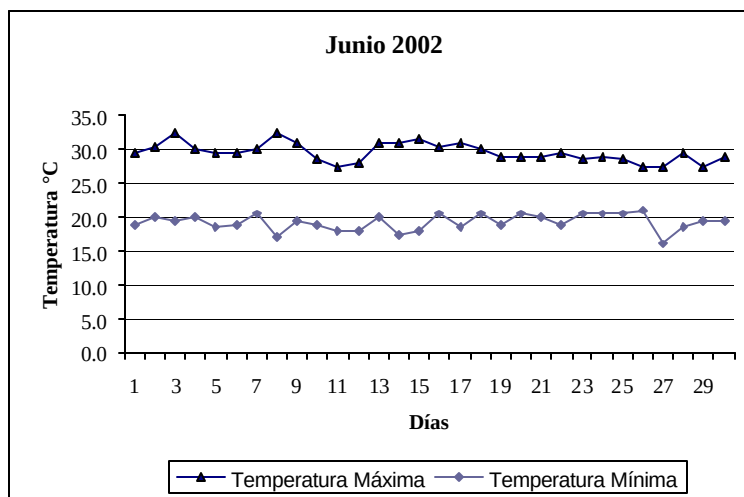


Temperatura promedio Máxima 31 °C
 Temperatura promedio Mínima 17 °C

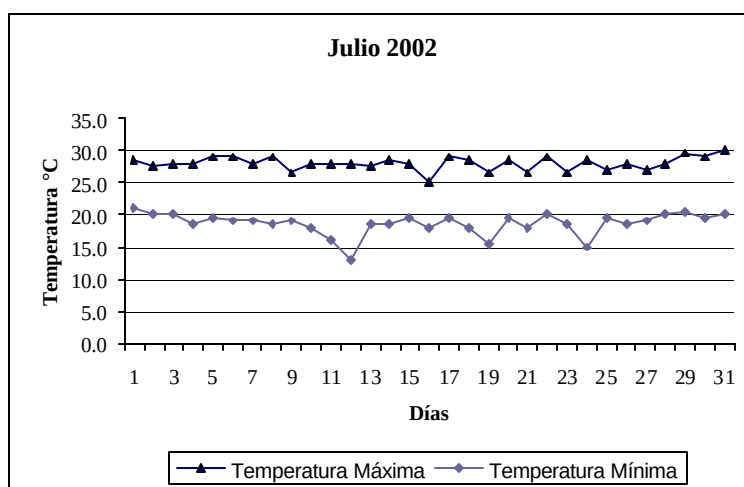


Temperatura promedio Máxima 31 °C
 Temperatura promedio Mínima 17 °C

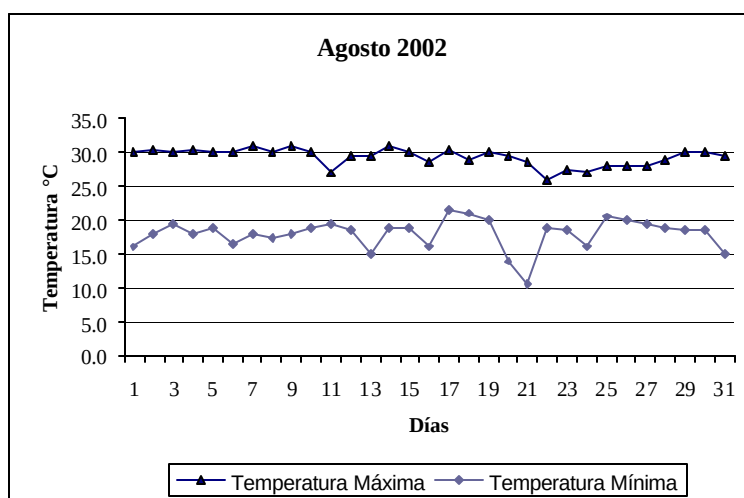
Anexo 2. Temperaturas máximas y mínimas durante las evaluaciones de resistencia a mancha angular y antracnosis. Ensayo de primera. Zamorano, 2002.



Temperatura promedio Máxima 30 °C
Temperatura promedio Mínima 19 °C



Temperatura promedio Máxima 28 °C
Temperatura promedio Mínima 19 °C



Temperatura promedio Máxima 29 °C
Temperatura promedio Mínima 18 °C

Anexo 3. Caldo-Levadura-Manitol

Composición para 1,000 ml de medio:

Fosfato de Potasio Monobásico (K_2HPO_4)	0.5 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0.5 g

Preparación:

En un frasco Erlenmeyer de 1,000 ml, mezclar todos los ingredientes con el agua destilada y agitar hasta su completa dilución (líquido de color amarillo). Medir el pH y normalizarlo a 6.8-7.3 si es necesario. Luego esterilizar.

Esterilización del medio:

La pureza del medio de cultivo es muy importante para el crecimiento de la bacteria libre de competencia con otros microorganismos. Para ello se debe:

- Colocar el medio en un autoclave a 121 °C de temperatura y 15 PSI (libras/pulgada²) de presión durante 20 minutos.
- El frasco donde se esterilice el medio debe ser autoclavado y debe ser llenado hasta la mitad para evitar que se derrame el líquido. Se aconseja que éste sea cubierto por un tapón de algodón y gasa que permita el intercambio de gases.
- Si la presión, temperatura y tiempo de la esterilización son variados, pueden resultar en problemas de crecimiento ya que al elevarlos se incurre en la desnaturalización de los componentes del medio y al reducirlos se incurre en la eliminación incompleta de los microorganismos no deseables.

Una vez esterilizado, el medio debe ser enfriado y distribuido en los platos petri para su uso, recordando siempre de manejarlo bajo condiciones estériles para conservar su pureza.

Una vez que el caldo levadura manitol ha sido preparado y esterilizado, debe incubarse a 30 °C por 24 horas para comprobar su absoluta esterilidad. Si no presenta desarrollo de patógenos, se almacena bajo refrigeración hasta su posterior uso (este paso no es necesario).

Anexo 4. Prueba de gota para determinar la cantidad de *Rhizobium* existente en los inoculantes.

Se usan platos *Petri* con Agar-Levadura-Manitol y Rojo congo, que han estado refrigerados al menos por 3 días y antes de la prueba por lo menos dos horas en el incubador para secarlos. Antes de la prueba, con un lápiz graso se divide cada plato en 8 partes iguales en el fondo; cada sector debe ser rotulado con la dilución a usarse, considerando que se obtendrán cuatro repeticiones por dilución por lo tanto en un plato habrá 2 diluciones. El procedimiento, efectuado bajo estrictas medidas de esterilidad, es el siguiente:

1. Diluir 1 ml de inoculante en 9 ml de agua destilada estéril para obtener la dilución de 1/10; y continuar las diluciones hasta lograr la dilución 8/10.
2. Una vez obtenidas las ocho diluciones, se procede a su siembra en los platos *Petri* correspondientes. Para ello se utilizan pipetas Pasteur cortas y estériles con igual diámetro en la punta fina. Se extrae ¼ de la pipeta con una dilución, y se coloca una gota en cada réplica correspondiente en el plato. Este procedimiento se repite con todas las diluciones y platos.
3. Dejar reposar el plato hasta que el medio absorba el líquido y una vez absorbido, invertirlos e incubarlos por 24 h a 30 °C.
4. Proceder al conteo de colonias de bacterias cuando se observe crecimiento. Este se efectúa en la dilución donde hay de 10-30 colonias por gota, obteniendo la media de colonias crecidas en las 4 repeticiones y registrando el resultado.

Considerando que una pipeta Pasteur tiene capacidad para 1 ml de agua y que su punta más fina permite la salida de 0.3 ml de agua por gota, de acuerdo a la siguiente fórmula se puede obtener la cantidad de *Rhizobium* en el inoculante empleado.

$$\text{Cantidad de células/ml} = \frac{\text{Tamaño pipeta (ml)}}{\text{Tamaño de gota (ml)}} \times \text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}$$

**Anexo 5. Resultado del análisis químico del medio (suelo:arena:perlita:vermiculita).
Laboratorio de suelos. Zamorano, 2002.**

Lab.	Muestra	pH (H₂O)	N_{total} %	P ppm	K ppm	Ca ppm	Mg ppm
#630	Medio (suelo, arena, perlita, vermiculita)	MLA 6.68	B 0.06	A 166	A 266	A 1567	M 202

Interpretación

A = Alto

M = Medio

B = Bajo

pH: MLA= Muy levemente Ácido

Anexo 6. Solución libre de nitrógeno de Broughton y Dillworth (NifTal).

- Solución stock 1: a 1.0 L de agua destilada agregar 294.1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloruro de calcio dihidratado).
- Solución stock 2: a 1.0 L de agua destilada agregar 136.1 g de KH_2PO_4 (fosfato de potasio dibásico).
- Solución stock 3: a 1.0 L de agua destilada, agregar 6.7 g de citrato de hierro, 123.3 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 87 g de sulfato de potasio (K_2SO_4) y 0.34 g de sulfato de manganeso hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Mezclar bien todos estos ingredientes.
- Solución stock 4: a 1.0 L de agua agregar 0.25 g de ácido bórico (H_3BO_3), 0.29 g de sulfato e zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) y 0.048 g de molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). Mezclar bien todos esos ingredientes.

Para preparar 10 litros de solución nutritiva, tomar 5 ml de cada solución stock y agregar 9.980 ml de agua destilada estéril. Ajustar el pH a un rango de 6.6-6.8, usando NaOH 1N.

Las cuatro soluciones stock, deben ser almacenadas en recipientes oscuros de 1 litro de capacidad para su uso continuo. Si se desea obtener tratamientos con nitrógeno, se añade KNO_3 al 0.05 % a la solución, obteniendo una concentración de 70 ppm de N.

Anexo 7. Extracción de ADN para el análisis RAPDs (método de la UW-Madison)

1. Cosecha 0.5-0.75 g de tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas primarias) a los 10 a 12 días después de siembra.
2. Agregar 50 μ L de *buffer* de extracción (PEX) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Macerar el tejido en un tubo usando una barra (*pestle*) de *plexiglass* de laboratorio.
3. Agregar 450 μ L adicionales de *buffer* PEX y agitar el tubo en el vortex.
4. 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 minutos.
5. Centrifugar la muestra durante 10 min a > 14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar (*pellet*) los residuos de tejido.
6. 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 30min a temperatura ambiente.
7. 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.
8. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300 μ L de RNAasa A (concentración de 100 μ L/ml) + *buffer* 0.1X TE^a (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.
9. 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.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
11. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla de 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.
12. 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.
13. Vaciar el Etanol/Acetato de Sodio^b y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
14. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.
15. Separar los pellets usando el vortex.

16. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).
17. Rehidratar los pellets agregando 100-200 μL de TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos a 65 °C en baño maría durante 3 min.
18. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN ($\text{ng}/\mu\text{L}$), con el fin de preparar las diluciones (4 $\text{ng}/\mu\text{L}$) necesarias para efectuar las reacciones para su amplificación.

^a Buffer TE (TRIS 1 mM, pH=7.5; EDTA 0.1 mM, pH=8.0)

^b Usar acetato de sodio $3\text{H}_2\text{O}$ (pH=5.2, usando ácido acético glacial)

Anexo 8. Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del Fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNATM200)

1. Colocar 2 ml de buffer de cuantificación en un cubo (cuvette) limpio y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 μ L de muestra de AND al buffer cuantificador.
3. Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.
4. Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/ml.
5. Vaciar el cubo, enjuagar con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

* Fluorómetro: (Hoefer) TKO-100, λ_{ex} + 365 nm, λ_{em} + 460 nm

* Buffer de cuantificación:

10 μ L solución para tinción concentrada + 100 ml buffer TNE 1X (pH=7.4)

Anexo 9. Diluciones de ADN (a 4 ng/ml) según el método de la UW MadisonDilución de ADN a 4 ng/ml

1. Agregar 100 μ L de *buffer* TE 0.1 X + Tartrazine en tubos eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar el volumen inicial de la muestra de ADN extraído de tejido, estimado mediante la fórmula $V_i = 400/C_i - 4$.
3. Diluir las muestras en platos de 96 celdas con fondo redondeado (Microplate™ 96, Polypropylene, MJ Research, INC.). Cubrir las celdas del plato con tapa selladora, y almacenarlo en el congelador (o refrigerador si se va a usar en los siguientes días). Guardar el resto de ADN en el congelador.

Anexo 10. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores RAPD

1. Descongelar el ADN a temperatura ambiente del plato con las muestras diluidas de ADN (4 ng/ μ L) guardados en el refrigerador.
2. Preparar la mezcla maestra de acuerdo a los volúmenes de agua, *buffer* 5X, cebador (*primer*), dNTPs y *Taq* polimerasa especificados en el cuadro anexo.
3. Colocar μ L de la mezcla maestra por cada celda en platos con fondo V. Agregar 10 μ L de ADN de cada muestra.
4. Colocar los platos en el termociclador y sellarlo con papel plástico para platos de 96 celdas (Microseal™ “A” Film) antes de cerrar la tapa.
5. Realizar la amplificación usando el perfil térmico para RAPD (UW-Madison).
6. Una vez finalizadas las reacciones PCR, guardar los platos con las muestras en el refrigerador hasta proceder a la electroforesis.

Mezcla de reacción para amplificar marcadores moleculares tipo RAPD.

Componentes	1 reacción (μL)
Agua	4.36
Buffer (5X)	4.40
DNTPs (10 mM c/u) + Mg Cl ₂	0.80
Cebador (10 μ M)	0.80
<i>Taq</i> -polimerasa (5U/ μ L)	0.50
ADN (4 ng/ml)	10.00
Volumen final	20.00

Anexo 11. Protocolo para la amplificación de ADN usando marcadores tipo RAPD (Método de la UW-Madison)

Perfil térmico para la PCR usando marcadores tipo RAPD

No	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización (denaturation)	91	60 seg	2
	Acoplamiento (annealing)	42	15 seg	2
	Elongación (polimerization)	72	70 seg	2
2	Desnaturalización	91	15 seg	38
	Acoplamiento	42	15 seg	38
	Elongación	72	70 seg	38
3	Elongación final	72	4 min	1

Perfil de programación del termociclador para la PCR de marcadores tipo RAPD

No	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)/ciclo
1	1	91	00:01:00
2	2	42	00:00:15
3	3	72	00:01:10
4	4		1 vez el Paso 1
5	5	91	00:00:15
6	6	42	00:00:15
7	7	72	00:01:10
8	8		37 veces al Paso 5
9	9	72	00:04:00
10	10	4	00:00:00
11	11	final	

Anexo 12. Electroforesis para la amplificación de ADN

Preparación de geles (gelatina) al 1% de agarosa

1. Agregar 170 ml de buffer TBE 0.5X + 1.7 g de agarosa en un erlenmeyer, para bandejas de 22 orificios.
2. Colocar el erlenmeyer (con uno más pequeño invertido en su boca) en un horno microondas por 3 min. Retirar el erlenmeyer, agitarlo levemente y colocarlo de nuevo en el horno microondas dos veces por 1 min. (USAR GUATES RESISTENTES AL CALOR).
3. Retirar el erlenmeyer del microondas y colocarlo en una bandeja con agua para enfriar la mezcla de agarosa/TBE buffer. Verificar la temperatura introduciendo un termómetro en el erlenmeyer.
4. Cuando la temperatura baje a 60 °C, agregar 9 ó 20 µL de bromuro de etidio (180 ml para 22 orificios ó 400 ml para 44 orificios), y vaciar la solución de agarosa y buffer TBE en una bandeja de electroforesis para correr muestras. Colocar los peines de inmediato y dejar solidificar por 20-30 min.

* Agarosa de pureza normal gelatiniza a 36-42 °C.

* Buffer TBE (Trisborate), ver guía de preparación de reactivos y enzimas (Anexo 13).

* Para detalles del porcentaje de agarosa, revisar manuales: éste varía de acuerdo a las características de las muestras (ADN, proteínas, etc.), el tamaño del gel, del equipo de electroforesis y otros factores.

Electroforesis

1. Colocar 15 ó 20 µL de cada muestra de ADN amplificado en cada orificio del gel.
2. Dejar correr la electroforesis por 60 minutos a 140 V.
3. Transferir las gelatinas al transiluminador, usando guantes de látex desechables.
4. Revisar el nivel de tinción de las bandas en el transiluminador de luz UV.
5. Fotografiar las gelatinas.

* El bromuro de etidio es altamente cancerígeno.

* Proteger los ojos y piel de los rayos UV, usando el equipo apropiado al visualizar y fotografiar los geles en el transiluminador.

* Para detalles del voltaje y tiempo de electroforesis, revisar manuales. Estos varían de acuerdo al tamaño del gel, el equipo de electroforesis, la estabilidad del voltaje y otros factores.

Anexo 13. Guía para preparar reactivos y enzimas*

Extracción de ADN (UW-Madison)

EDTA 0.5 M (pH 8.0), (100 ml)

- Pesar 18.612 g de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ácido Etilendiaminotetracético Disódico) en un beaker de 150 ml, agregar con una probeta 80 ml de agua destilada, disolver completamente.
- Regular el pH a 8.0 usando el potenciómetro, agregando gotas de NaOH 10 N y mezclando perfectamente después de cada adición.
- Transferir la solución en un frasco volumétrico de 100 ml y completar el volumen con agua destilada. Agitar y transferir nuevamente al beaker, y verificar el pH deseado.
- Transferir la solución a un frasco color ámbar (opaco) y guardar en el refrigerador.

BUFFER PEX (250 ml)

50 ml de TRIS HCl 1 M (pH 7.5)

10 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0)

20.44 g de NaCl (Cloruro de Sodio)

25 g de PEX (Etil xantogenato de Potasio)

... ml de agua (18 Megohm)

250 ml de volumen final

Preparación

- Pesar los reactivos sólidos en beakers de vidrio de 100 ml, disolverlos con la cantidad necesaria de agua pura (18 Megohm).
- Transferirlos a un frasco volumétrico de 250 ml.
- Agregar los reactivos líquidos a la mezcla anterior, usando pipetas volumétricas.
- Completar el volumen final con agua (18 Megohm).
- Mezclar bien, transferir a un frasco de vidrio ámbar y guardarlo en el refrigerador.

(6:1) ETANOL: ACETATO DE AMONIO, 7.5 M (490 ml)

- Medir 420 ml de etanol en una probeta graduada de 500 ml.
- Medir 70 ml de acetato de amonio 7.5 M, en una probeta graduada de 100 ml.
- Mezclar en un frasco ámbar y guardarlos en el refrigerador.

*Nota: Al momento de medir volúmenes de soluciones que han estado refrigeradas, éstas deben estar a temperatura ambiente.

(10:1) ETANOL: ACETATO DE SODIO TRIHIDRATADO, 3 M (pH 5.2, usando ácido acético glacial) (495 ml)

- Medir 450 ml de etanol en una probeta graduada de 500 ml.
- Medir 45 ml de 3 M acetato de sodio trihidratado, pH 5.2.
- Mezclarlos en un frasco ámbar y guardarlos en el refrigerador.

BUFFER TE 0.1X (1L)

TRIS HCl 1 mM (pH 7.5)

EDTA 0.1 mM (pH 8.0)

Preparación

- Mezclar en un frasco volumétrico de 1 L, 1 ml (1000 µL) de TRIS 1 M (pH 7.5) + 0.2 ml (200 µL) de EDTA 0.5 M (pH 8.0)
- Completar el volumen con agua destilada, agitar y guardar en frasco ámbar en refrigeración.

RNAasa A + BUFFER TE 0.1X (100 µg de RNAasa A/ml de buffer) (500 ml)

- Disolver 0.5 g de RNAasa A en 500 ml de buffer TE 0.1X en un frasco volumétrico (1000 µg de RNAasa A/ml de buffer)
- En un frasco volumétrico, diluir 50 ml de solución (concentrada e 1000 µg/ml) con buffer TE 0.1X hasta la marca de 500 ml.
- Guardar en un frasco ámbar en refrigeración.

Extracción de ADN (CIAT)

HIDRÓXIDO DE SODIO (NaOH), 0.25 M (100 ml)

- Medir con una pipeta volumétrica 2.5 ml de NaOH (10 M).
- Transferir a un frasco volumétrico de 100 ml, completar el volumen con agua destilada, y agitar para mezclar bien.
- Transferir la solución a un frasco color ámbar y guardar en el refrigerador.

ÁCIDO CLORHÍDRICO (HCl), 0.25 M (100 ml)

- Medir con una pipeta volumétrica 25 ml de HCl (1M).
- Transferir a un frasco volumétrico de 100 ml, completar el volumen con agua destilada, y agitar para mezclar bien.
- Transferir la solución a un frasco color ámbar y guardar en el refrigerador.

TRIS ÁCIDO CLORHÍDRICO (Tris HCl), 0.5 M (100 ml)

- Medir con una probeta 50 ml de Tris HCl (1 M).
- Transferir a un frasco volumétrico de 100 ml, completar el volumen con agua destilada, y agitar para mezclar bien.
- Transferir la solución a un frasco color ámbar y guardar en el refrigerador.

Cuantificación de ADN (UW-Madison)**BUFFER TNE 10X, Ph 7.4 (1000 ml)**

- Pesar 1.2 g de TRIS Base, 3.7 g de EDTA- Na_2 y 58.4 g de NaCl.
- Disolver en 800 ml de agua destilada en un beaker de 1 litro.
- Regular el pH a 7.4 usando el potenciómetro, adicionando HCl concentrado y mezclarlo bien después de cada adición.
- Transferir la solución a un frasco volumétrico y completar el volumen con agua destilada hasta la marca de 1 litro.
- Transferir nuevamente el beaker y corroborar el pH; agregar HCl si fuera necesario.
- Guardar la solución en un frasco ámbar en refrigeración.

BUFFER TNE 1X, pH 7.4 (500 ml)

- Medir 50 ml de buffer TNE 10X con una pipeta volumétrica.
- Transferirlo a un frasco volumétrico y completar el volumen con agua destilada hasta la marca de 500 ml.

SOLUCIÓN CONC. DYE (100 ml)

- Disolver 100 mg de dye (Hoechst 33258, Pharmacia) en 100 ml de agua destilada, usando un frasco volumétrico.
- Guardar en un frasco ámbar en refrigeración.

BUFFER (Para cuantificar DNA) (100 ml)

- Mezclar 10 μL de la solución conc. Dye y 100 ml de buffer TNE 1X, usando un frasco ámbar.
- Guardar en refrigeración.

Dilución de ADN (UW-Madison)**(BUFFER TE 0.1X + TARTRAZINE) (500 ml)**

- A 500 ml de buffer TE 0.1X, agregar con la punta de una varilla de vidrio una pequeña cantidad de tartrazina para obtener un color amarillo tenue.
- Mezclar bien y guardar en un frasco ámbar en el refrigerador.

Reacción para PCR (mezcla maestra), (UW-Madison)**BUFFER 5X (100 ml)**

- Medir con pipetas volumétricas, 25 ml de TRIS, 1 M (pH 8.5); 10 ml de KCl, 1 M; y 500 µL de MgCl₂, 1 M.
- Pesar en beaker de 100 ml, 0.25 g de BSA; 7.5 g de Ficoll 400; y 0.05 g de Xylene Cyanole.

Procedimiento

- Disolver los sólidos agregándoles las soluciones líquidas y cantidades muy pequeñas de agua destilada.
- Usando un embudo, transferir a un frasco volumétrico de 100 ml de la solución, lavando los beakers sobre este con agua destilada y teniendo cuidado de no sobrepasar el volumen.
- Completar con agua destilada hasta la marca de 100 ml.
- Guardar en frasco color ámbar en refrigeración.

(dNTPSs + Mg Cl₂, 10 Mm) (1000 µL)

- Mezclar en un tubo e microcentrífuga 875 µL de agua destilada (18 megohm); 25 µL de MgCl₂, 1 M; y 100 µL de dNTPs, 100 mM (4x25 µL de c/u).
- Guardar en refrigeración.

Electroforesis (UW-Madison)**TBE BUFFER (5 litros)**

Pesar 24 g de TRIS Base y 13.75 g de Ácido Bórico.

Medir 10 ml de EDTA, 0.5 M (ph 8.0), con pipeta volumétrica.

Preparación de TBE buffer (5 litros)

- Pesar los sólidos en beakers de 150 ml, disolverlos y transferirlos a un frasco volumétrico de 1 litro.
- Agregar los 10 ml de EDTA, completar el volumen a 1 litro mezclando bien y transferir a un recipiente más grande (5 L).
- Agregar 4 litros de agua destilada, medidos con frascos volumétricos grandes.
- Mezclar bien y guardar en refrigeración.