

**Caracterización fenotípica y molecular de
la resistencia a la antracnosis
(*Colletotrichum lindemuthianum*) en frijol
común**

Elmer Geovani Aroche Arreaza

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Noviembre, 2006

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCION AGROPECUARIA

**Caracterización fenotípica y molecular de
de la resistencia a la antracnosis
(*Colletotrichum lindemuthianum*) en frijol
común**

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

presentado por

Elmer Geovani Aroche Arreaza

**Zamorano, Honduras
Noviembre, 2006**

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

Elmer Geovani Aroche Arreaza

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2006

Caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) en frijol común

presentado por

Elmer Geovani Aroche Arreaza

Aprobada:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

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

María Mercedes Roca, Ph.D.
Asesor

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

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Juan Elizalde, Ing.
Asesor

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

DEDICATORIA

A mis padres Teresa de Jesús Arriaza, Mario Aroche Reyes y a toda mi familia por alcanzar este triunfo conmigo.

A mi sobrino Elder Josué para que le sirva de inspiración y que algún día pueda alcanzar mucho más que esto.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y toda mi familia por creer en mí y apoyarme incondicionalmente en todo momento.

A mis asesores por sus consejos en momentos difíciles y ser un noble ejemplo para encaminarme en la investigación.

A Luz Marina por su gran amistad y apoyo.

A Estela Garrido, por compartir sus conocimientos conmigo.

Al Ing. Jorge Venegas por orientarme al inicio del estudio.

Al Dr. Alonso Suazo, por compartir amablemente sus conocimientos.

Al Dr. Phil Arneson, por compartir a manos llenas sus conocimientos

A Tomasa, Enrique, Calixto, Jorge y a todo el equipo del Programa de Investigaciones en Frijol, por brindarme su valiosa amistad y apoyo.

Al equipo de diseño gráfico de Zamorano por capacitarme en la edición de las imágenes.

A mis amigos y a todos los que me han apoyado.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A The Nippon Foundation Ryoichi Sasakawa/Norman Borlaug Scholarship, por financiar mis estudios en Zamorano.

Al Programa Bean/Cowpea CRSP por el financiamiento parcial de este estudio.

RESUMEN

Aroche, E. 2006. Caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) en frijol común. Proyecto especial del programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras, 20 p.

La antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) es una de las enfermedades más importantes en el frijol común, que puede causar pérdidas en rendimiento mayores al 40%. La selección asistida con marcadores moleculares puede ser una forma eficiente para la selección de genes de resistencia a esta enfermedad. El objetivo de este estudio fue optimizar el protocolo de amplificación de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a la antracnosis en frijol común e identificar la presencia de los marcadores en variedades comerciales y genotipos diferenciales que sirvan de base para el desarrollo de variedades resistentes a las razas del patógeno de la región meta. El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Zamorano y en la aldea El Ocotol, Yuscarán, El Paraíso, Honduras. Se adaptaron encontrar los protocolos de marcadores SCAR SCAreoli, SAS13 y SAB3 que permiten detectar los genes Co-2, Co-4² y Co-5 de resistencia a la antracnosis en frijol común, respectivamente, mediante ajustes en la concentración de la Taq polimerasa. Adicionalmente, para la amplificación del marcador SAS13 se hicieron cambios en el perfil térmico. La confiabilidad de los marcadores para detectar los genes de resistencia se comprobó con una prueba de Chi cuadrado, donde presentaron un nivel de confianza $P > 0.90$. Se detectó la presencia o ausencia de los genes Co-2, Co-4² y Co-5, en 14 variedades comerciales y 12 genotipos diferenciales de frijol común, mediante el uso de estos tres marcadores; y se determinó la reacción de dichos materiales a la inoculación con los aislamientos de antracnosis Co-J, Co-R y Co-S. La variedad Desarrural, la línea MPCR 202-26-1 y el diferencial AB 136, presentaron susceptibilidad a la antracnosis ($P > 0.95$); sin embargo, de acuerdo al análisis con marcadores, los genes Co-2 y Co-4² están presentes en las líneas MPCR 202-26-1 y AB 136, así como en algunos otros materiales que presentaron resistencia. Probablemente, los aislamientos del patógeno en la zona de estudio son virulentos a los genotipos que poseen dichos genes. Estos resultados sugieren que para el mejoramiento genético se debe de combinar un número adecuado de genes de resistencia, según la variabilidad patogénica presente en la región de Centro América.

Palabras clave: Gen, Genotipo diferencial, SCAR

CONTENIDO

Portadilla	i
Autoría	ii
Página de firmas	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Agradecimientos a patrocinadores	vi
Resumen	vii
Índice de figuras	xi
Índice de anexos	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	2
2.1 ESTUDIO CON MARCADORES MOLECULARES	2
2.1.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	2
2.1.2 ETAPA I: ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS DE TRES MARCADORES SCAR	2
2.1.3 ETAPA II: VERIFICACIÓN DE UTILIDAD DEL PATRÓN SCAR	4
2.1.4 ETAPA III: APLICACIÓN DE LOS PROTOCOLOS AJUSTADOS PARA LOS MARCADORES	5
2.2 EVALUACIÓN DE LA ANTRACNOSIS EN EL CAMPO	5
2.2.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO	5
2.2.2 METODOLOGÍA PARA LA INOCULACIÓN DE <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i>	5
2.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	7
3. RESULTADOS Y DISCUSION	8
3.1 ESTUDIO CON MARCADORES MOLECULARES	8
3.1.1 ETAPA I: ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS PARA SCAR	8
3.1.1.3. Marcador SCAR SCAreoli.	11
3.1.2 ETAPA II: VERIFICACIÓN DE UTILIDAD DE LOS MARCADORES SCAR	11
3.1.2.1 Análisis Estadístico	11
3.1.3. ETAPA III: APLICACIÓN DE LOS MARCADORES OPTIMIZADOS..	12
3.1.3.2. Evaluación con el marcador SAS13.	13
3.2 EVALUACIÓN DE LA ANTRACNOSIS EN EL CAMPO	14
3.2.1 Evaluación en el campo	14

4.	CONCLUSIONES.....	17
5.	RECOMENDACIONES.....	18
6.	LITERATURA CITADA	19
7.	ANEXOS.....	21

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Marcadores SCAR, genes de resistencia a la antracnosis del frijol y genotipos de frijol en los que fueron identificados. 2
2. Mezcla maestra de PCR del Laboratorio de Biotecnología de Zamorano. 4
3. Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungos (CIAT, 1987). 6
4. Análisis de Chi cuadrado obtenido con los marcadores SCAR y genotipos de frijol. 12
5. Variaciones en la presencia/ausencia de marcadores moleculares (SAB3, SAS13 y SCAreoli), reacción a la inoculación con tres aislamientos (Co-J, Co-R y Co-P) de antracnosis de Honduras, y clasificación de la resistencia de 14 variedades comerciales y 12 genotipos diferenciales de frijol. El Ocotal, Yuscarán , El Paraíso, Honduras. 15
6. Distribución de variedades comerciales (14) y genotipos diferenciales (12) de acuerdo a la categoría de reacción a los aislamientos Co-J, Co-R y Co-P de *Colletotrichum lindemuthiamun*, y a la ausencia o presencia de los marcadores SCAreoli, SAS13 y SAB3, respectivamente. 16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

- Figura 1. Variaciones en la amplificación del SCAR SAB3 (400 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa). 8
- Figura 2. Variaciones en la amplificación del SCAR SAS13 (950 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa). 9
- Figura 3. Variaciones en la expresión del SCAR SAS13 (950 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa y dNTP's en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa). 10
- Figura 4. Variaciones en la expresión del SCAR SAS13 (950 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa y cebador en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa). 10
- Figura 5. Variaciones en la expresión del SCAR SCAreoli (1000 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa). 11
- Figura 6. Identificación de la presencia/ausencia del marcador SAB3 (gen Co-5) en 14 variedades comerciales (1-14) y 12 genotipos diferenciales (15-26) (gel de agarosa al 1%). 13
- Figura 7. Identificación de la presencia/ausencia del marcador SAS13 (gen Co-4²) en 14 variedades comerciales (1-14) y 12 genotipos diferenciales (15-26) (gel de agarosa al 1%). 13
- Figura 8. Identificación de la presencia/ausencia del marcador SCAreoli (gen Co-2) en 14 variedades comerciales (1-14) y 12 genotipos diferenciales (15-26) (gel de agarosa al 1%). 14

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos

1	Escala de evaluación de severidad de antracnosis en germoplasma de frijol común.....	21
---	--	----

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común juega un papel importantísimo en la alimentación de la población de América Latina. Por otro lado, la producción de este grano es una actividad a la que se dedican principalmente los pequeños y medianos productores que se encuentran distribuidos desde los 52° latitud norte a los 32° latitud sur (CIAT 1997).

Uno de los factores que causan bajos rendimientos en la producción de frijol son las enfermedades fungosas; siendo la antracnosis la causa de pérdidas en rendimiento mayores al 40% (Araya 2003).

La antracnosis, cuyo agente causal es el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, es una enfermedad cosmopolita con un amplio rango de hospederos. Afecta al frijol a alturas intermedias a altas (sobre los 1000 msnm). Algunas variedades presentan resistencia genética contra la antracnosis, debido a la presencia de diferentes genes. La resistencia para las razas del patógeno depende de su región de origen (andino y mesoamericano). De acuerdo a la teoría de coevolución, en un programa de mejoramiento genético se deben de considerar por lo menos un gen de resistencia del otro reservorio, además de los reservorios a los que pertenece la región meta (Rosas 2003).

Tradicionalmente, el mejoramiento convencional se ha realizado con base en las características fenotípicas; sin embargo, debido a las variaciones ambientales en ese tipo de selección se puede dar lugar a sesgos. Los marcadores moleculares representan una gran ayuda para identificar la resistencia directamente en el ADN (Cornide 2002).

Los objetivos de la presente investigación fueron optimizar el protocolo para la amplificación de marcadores moleculares SCAR (siglas en inglés de Regiones Amplificadas de Secuencias Caracterizadas) que identifican genes de resistencia a la antracnosis en frijol común; identificar germoplasma de frijol con genes de resistencia utilizando los protocolos de los marcadores moleculares optimizados; caracterizar germoplasma de frijol resistente a la antracnosis empleando aislamientos de Honduras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ESTUDIO CON MARCADORES MOLECULARES

2.1.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

Plantas de los genotipos de frijol se produjeron en los invernaderos del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) y el análisis molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ambas facilidades ubicadas en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, a una altura de 800 msnm, con temperatura promedio de 24°C y precipitación promedio anual de 1100 mm. Los estudios de invernadero y laboratorio se llevaron a cabo durante el periodo de mayo a octubre de 2006.

2.1.2 ETAPA I: ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS DE TRES MARCADORES SCAR

2.1.2.1 Material experimental: Se usaron los mismos genotipos de frijol utilizados en la identificación de los marcadores SCAR por los autores que se citan en el cuadro 1. En la evaluación de los marcadores, también se incluyeron las variedades Catrachita y Desarrural, como testigos resistente y susceptible, respectivamente.

Cuadro 1. Marcadores SCAR, genes de resistencia a la antracnosis del frijol y genotipos de frijol en los que fueron identificados.

SCAR	Gen	Banda (pb)	Genotipo	Referencia
SAB3	Co-5	400	TU	Vallejo y Kelly 2001
SAS13	Co-4 ²	950	G2333	Young <i>et al.</i> 1998
SCAreoli	Co-2	1000	Cornell 49242	Geffroy <i>et al.</i> 1998

El marcador SCAR SAB3 está conformado por los cebadores 5'-tggcgcacacataagttctcagg-3' y 5'-tggcgcacaccatcaaaaaaggtt-3' creados a partir de la secuencia RAPD subrayada. Este SCAR detecta la presencia del gen Co-5 mediante la amplificación de una banda de 400 pb con el perfil térmico de 34 ciclos 10 s a 94 °C (desnaturalización), 40 s 67 °C (acoplamiento), y 2 min a 72 °C (elongación), seguido por un ciclo de 5 min a 72 °C (elongación) (Vallejo y Kelly 2001).

El marcador SCAR SAS13 está conformado por los cebadores 5´-cacggaccgaataaagccacc aaca-3´ y 5´-cacggaccgaccgaggatacagtgaaag-3´, creados a partir de la secuencia RAPD (subrayada). Este SCAR permite detectar la presencia del gen Co-4² mediante la amplificación de una banda de 950 pb, con el perfil térmico de 34 ciclos 10s a 94 °C (desnaturalización), 2.4 min a 72 °C (elongación y acoplamiento), seguido por un ciclo de 5 min a 72 °C (elongación final) (Young *et al.* (1998).

El marcador SCAR SCAreoli fue obtenido después de la digestión del producto de PCR de SCH20-1 (5´-gggagacatccatcagacaactcc-3´) y Areoli-1 (5´gtatccattgaaggagct-3´) con la enzima DraI . La PCR fue conducida con el perfil térmico descrito por Paran y Michelmores (1993), exceptuando la temperatura de acoplamiento que incluye 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 58 °C (acoplamiento) y 2 min a 72 °C (elongación) según Geffroy *et al.* (1998). Después de la digestión con la enzima DraI (tipo II) de la amplificación de la PCR, se observó la banda de 1000 pb que permite detectar la presencia del gen Co-2.

2.1.2.2 Siembra: En los invernaderos del PIF se sembraron los genotipos diferenciales de frijol TU, G2333 y Cornell 49242, que poseen los genes resistentes a la antracnosis caracterizados por los marcadores SCAR SAB3, SAS13 y SCAreoli, respectivamente, y los testigos resistente (Catrachita) y susceptible (Desarrural). Se colocaron un promedio de 15 semillas por macetero y dos maceteros de 15.24 cm de altura × 15.24 cm de diámetro por cada genotipo.

2.1.2.3 Extracción de ADN: El ADN se extrajo de los primeros trifolios de plantas a los 13 días después de la siembra siguiendo el protocolo establecido por la Universidad de Wisconsin-Madison. Se cosecharon y recolectaron las muestras en tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 50 µl de buffer PEX (etil xantogenato de potasio), se maceró el tejido usando barras de plexiglass en tubos eppendorf y se adicionó 450 µl de buffer PEX. Las muestras se colocaron en baño María a 65°C por una hora y se centrifugaron por 10 min a 14000 rpm para concentrar los residuos de tejido. Se precipitaron los ácidos nucleicos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M, y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min para peletizarlos. Se agregó 300µl de ARNasa y se incubaron en baño María a 37°C por una hora. Los tejidos remanentes se peletizaron centrifugando a 14000 rpm por 1 min. Se precipitó el ADN con 10:1 etanol:acetato de sodio (3 M), y se peletizó centrifugándolo a 3000 rpm por 5 min. Los pellets de ADN se lavaron con etanol al 70%, y se centrifugaron a 14000 rpm por 15 segundos. Se secaron por 2-3 horas o de un día para otro. Luego, se rehidrataron los pellets con 100 µl de buffer TE 0.1x, colocándolos en baño María a 65°C por 15 min. Finalmente, se almacenaron las muestras de ADN a -20°C.

2.1.2.4 Cuantificación y dilución de ADN: La cuantificación de ADN se realizó con un fluorómetro Hoefer QuantTM 200, calibrado con ADN estándar de timo de bovino a 100 ng/ml. Se agregaron 2 µl de muestra de ADN en buffer de cuantificación (100 ml de TNE 1x y 10 µl de solución concentrada de tinción), colocados en una cubeta de cuarzo puro para minimizar el margen de error al momento de la lectura. Las muestras de ADN se

diluyeron a 30 ng/ml con 100 μ l de Buffer TE 0.1x usando platos de 96 celdas con fondo redondo (polypropylene), para la amplificación con marcadores moleculares tipo SCAR .

2.1.2.5 Optimización de protocolos de PCR para marcadores de antracnosis: Se realizaron pruebas de ajuste con variaciones en Taq polimerasa de 1.2 a 0.1 μ l en la mezcla maestra (Cuadro 2) para la PCR, que permitan determinar con eficiencia la presencia o ausencia de genes de resistencia a la antracnosis del frijol común en las variedades a evaluar con marcadores SAS13, SAB3 y SCAreoli.

Cuadro 2. Mezcla maestra de PCR del Laboratorio de Biotecnología de Zamorano.

Componentes	Volumen (μ l)
Agua	7.8
Buffer (10x) con MgCl (15mM)	2.5
dNTP's (4 mM) Sin MgCl ₂	1.2
Cebador 1 (10 mM)	0.5
Cebador 2 (10 mM)	0.5
Taq polimerasa (5U/ μ l)	0.5
ADN (30 ng/ml)	2.0
Volumen final	15.0

2.1.2.6 Electroforesis: Se empleó una escalera molecular de ADN con una rango de 100-1500 pares de bases (pb) de Promega, un control negativo (mezcla maestra sin ADN) y las muestras amplificadas, mezcladas con un buffer de carga (loading dye 6x) y tinte azul, en geles de agarosa al 1% acomodadas en tanques de electroforesis a 110 voltios, con Buffer TBE 0.5x por una hora. Las geles se tiñeron en una solución de 1:10 bromuro de etidio y agua destilada (10 μ l a 1 mg/ml en 100 ml), luego se visualizaron las bandas de ADN en el transiluminador Fotodyne Foto UV 26 y se fotografiaron con una cámara digital.

2.1.3 ETAPA II: VERIFICACIÓN DE UTILIDAD DEL PATRÓN SCAR

2.1.3.1 Material Experimental: Se usaron los mismos genotipos y testigos de frijol utilizados en la etapa I.

2.1.3.2 Siembra: Se sembraron en los invernaderos del PIF los genotipos TU, G2333 y Cornell 49242, que poseen genes los resistentes a la antracnosis caracterizados por marcadores SCAR, y los testigos resistente (Catrachita) y susceptible (Desarrural). Se colocaron cuatro semillas por macetero, y se utilizaron diez maceteros por cada variedad.

2.1.3.3 Extracción de ADN: Se utilizó el protocolo descrito anteriormente.

2.1.3.4 Cuantificación y dilución de ADN: Se utilizó el protocolo descrito anteriormente.

2.1.3.5 Aplicación de protocolos de PCR optimizados para los SCAR: Se aplicaron las mezclas maestras de PCR para cada marcador con las concentraciones de Taq polimerasa que presentaron los mejores patrones de bandas en las condiciones del Laboratorio de Biotecnología de Zamorano, usando ADN de los genotipos de referencia de los testigos resistente y susceptible.

2.1.3.6 Electroforesis: Se hizo de la misma manera que en la etapa I.

2.1.3.7 Análisis estadístico: Se realizó un análisis de Chi cuadrado de la presencia o ausencia de bandas en las 40 plantas de cada genotipo y testigos de frijol. En este análisis se evaluó el patrón (esperado y observado), como grado de ajuste, de los marcadores a las condiciones del laboratorio de Zamorano, para poder definir la confiabilidad en utilizar estos marcadores para la selección asistida.

2.1.4 ETAPA III: APLICACIÓN DE LOS PROTOCOLOS AJUSTADOS PARA LOS MARCADORES.

Después de efectuar los ajustes para la optimización de los protocolos, se utilizaron para evaluar los 12 genotipos diferenciales de antracnosis (Michelite, MDRK, Perry Marrow, Cornell 49242, Widusa, Kaboon, México 222, PI 207262, TO, TU, AB 136 y G2333) y 14 variedades comerciales (Milenio, Tio Canela 75, Amadeus 77, Carrizalito, Cardenal, DEORHO, UCR 55, Desarrural, Catrachita, AND 277, VAX 1, MPCR 202-26-1, Palmichal 1 y Nueva Esperanza 01).

2.2 EVALUACIÓN DE LA ANTRACNOSIS EN EL CAMPO

2.2.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

La activación de los cultivos monospóricos de antracnosis y optimización de protocolos para los marcadores moleculares se hicieron en el laboratorio de Biotecnología de Zamorano, Honduras. Las evaluaciones de campo se realizaron en un lote ubicado en la aldea El Ocotal, Yuscarán, El Paraíso, Honduras, a 1150 msnm.

2.2.2 METODOLOGÍA PARA LA INOCULACIÓN DE *Colletotrichum lindemuthianum*

2.2.2.1 Preparación del inóculo: Se utilizaron los aislamientos de antracnosis Co-J, Co-R, Co-P que se conservan en cultivos monospóricos a -20 °C en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano (Salazar 2003). La preparación de esporas se realizó colocando 0.5 cm² de la gasa que conserva el cultivo monospórico, en el centro de un plato petri que contiene medio Mathur's. Los cultivos se incubaron durante 10 días a

temperatura ambiente para que colonizaran los platos petri. Luego, a cada plato se le colocó 30 ml de agua destilada estéril con 1 µl de Tween 20. Después se raspó el inóculo con una espátula y se filtró con una gasa estéril a un beaker de 100 ml. La concentración de esporas se ajustó a 1.2×10^6 conidias/ml con la ayuda de un microscopio y un hemacitómetro.

2.2.3 EVALUACIÓN EN CAMPO

Debido a que las condiciones de Zamorano no son favorables para el desarrollo de la antracnosis, se usó una parcela (10 × 15 m) ubicada en El Ocotal, Yuscarán, El Paraíso, Honduras, donde las condiciones de humedad y temperatura son más adecuadas. Se sembraron los genotipos diferenciales Michelite, MDRK, Perry Marrow, Cornell 49242, Widusa, Kaboon, México 222, PI 207262, TO, TU, AB 136 y G2333, y las variedades comerciales Milenio, Tio Canela 75, Amadeus 77, Carrizalito, Cardenal, DEORHO, UCR 75, Desarrural, Catrachita, AND 277, VAX 1, MPCR 202-26-1, Palmichal 1 y Nueva Esperanza 01. De cada genotipo diferencial o variedad se sembró un surco de 1.5 m de longitud con dos repeticiones. A los 13 días de sembradas las plantas, se hizo una aplicación con bomba de mochila del inóculo de *Colletotrichum lindemuthianum*. Una semana después se hizo una segunda inoculación. Al borde de la parcela se sembraron dos hileras de Desarrural, que es una variedad altamente susceptible a la antracnosis, para que ayudara a diseminar el patógeno de manera natural. Al mes, se hizo la primera lectura de hojas, 15 días después se hizo una segunda lectura. Las lecturas fueron basadas en la escala de severidad del CIAT (1987) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungos (CIAT 1987).

Calificación	Severidad	Categoría	Descripción	Incidencia (%)
1	Ausente	Resistente	Síntomas no visibles o muy débiles	0
2	Dudosa			1-10
3	Débiles			10-25
4	Moderados	Intermedio	Síntomas visibles y conspicuos que solo 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

2.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

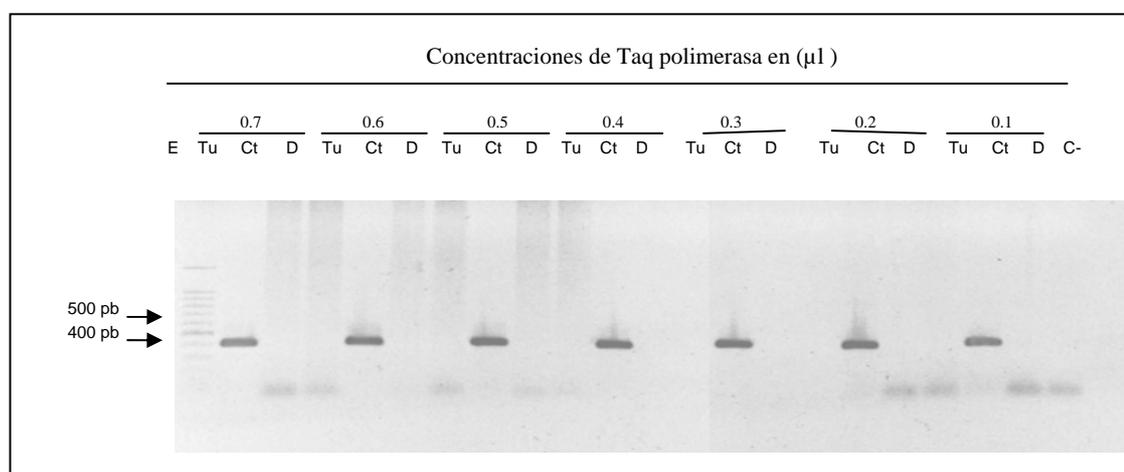
Se utilizó un diseño completamente al azar, una prueba múltiple de medias DMS y un análisis de correlación entre severidad e incidencia. Todas las pruebas se hicieron con el programa Statistical Analysis System (SAS).

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 ESTUDIO CON MARCADORES MOLECULARES

3.1.1 ETAPA I: ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS PARA SCAR

3.1.1.1 Marcador SCAR SAB3: Partiendo del protocolo de PCR estándar que se utiliza en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano (Cuadro 2), se utilizaron siete concentraciones de Taq polimerasa 5U/μl (0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 μl) por muestra. Todos las concentraciones se probaron en los genotipos de frijol TU, Catrachita (testigo resistente) y Desarrural (testigo susceptible). En el genotipo TU, todas las concentraciones amplificaron un fragmento de 400 pb, pero a 0.5 μl de Taq polimerasa, se observó con mejor nitidez la banda. En Catrachita y Desarrural, ninguna de las concentraciones de Taq polimerasa amplificó banda alguna, lo cual indica que en estas variedades está ausente el gen Co5 (Fig 1).

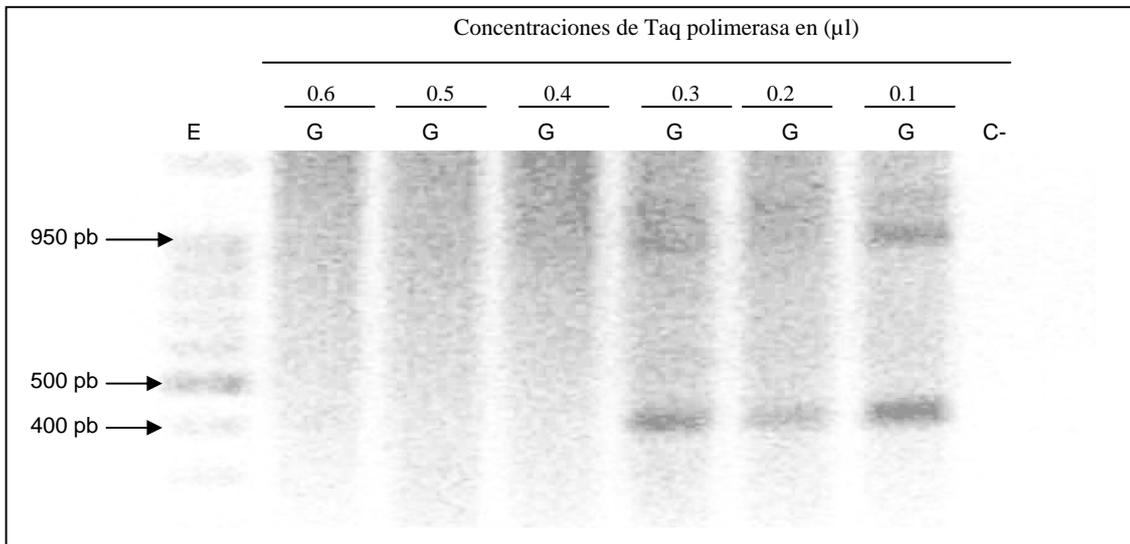


E=Escalera, TU=TU, Ct=Catrachita, D=Desarrural, C-=Control negativo

Figura 1. Variaciones en la amplificación del SCAR SAB3 (400 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa).

3.1.1.2. Marcador SCAR SAS13: Se evaluaron los genotipos de frijol G2333, Catrachita (testigo resistente) y Desarrutal (testigo susceptible), con el protocolo para SCAR utilizado en el Laboratorio de Biotecnología, con el perfil térmico sugerido por Young *et al.* (1998), pero no se logró amplificar las bandas esperadas por el SCAR SAS13 en ninguna muestra.

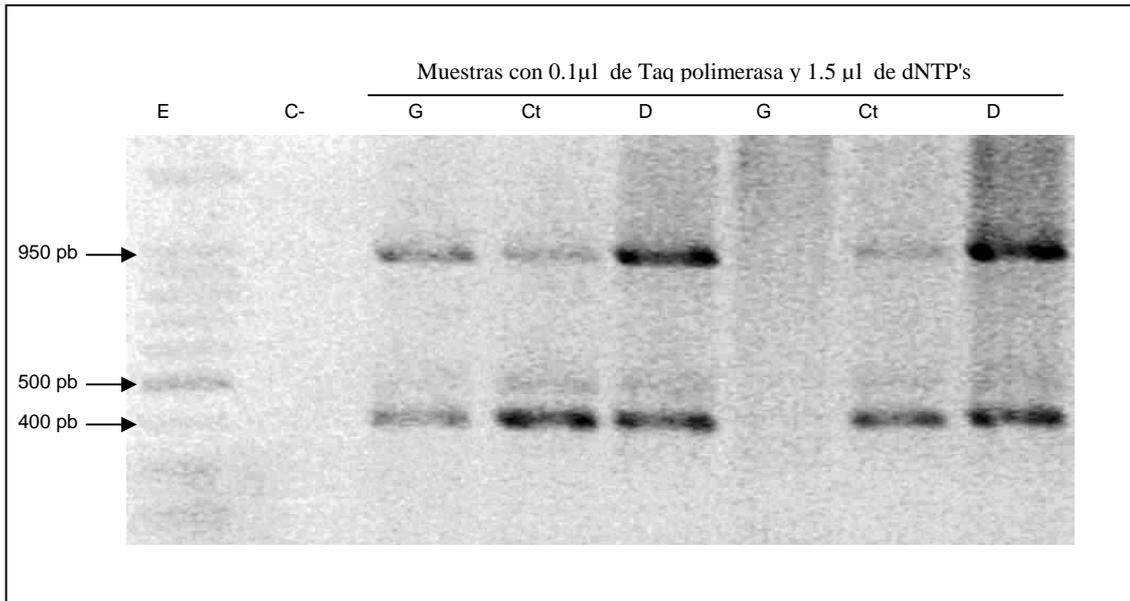
Posteriormente, se evaluó sólo el genotipo diferencial G2333, usando seis concentraciones de Taq polimerasa 5U/ μ l (0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 μ l) por muestra, y empleando el perfil térmico de 34 ciclos 10 s a 94°C (desnaturalización) 30 s a 65 °C (acoplamiento), 2 min 24 s a 72 °C (elongación). Se amplificaron las bandas del SCAR SAS13 en las concentraciones de 0.3, 0.2 y 0.1 μ l de Taq polimerasa; observándose a 0.1 μ l la mejor amplificación (Fig 2).



E=Escalera, G=G2333, C-= Control negativo

Figura 2. Variaciones en la amplificación del SCAR SAS13 (950 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa).

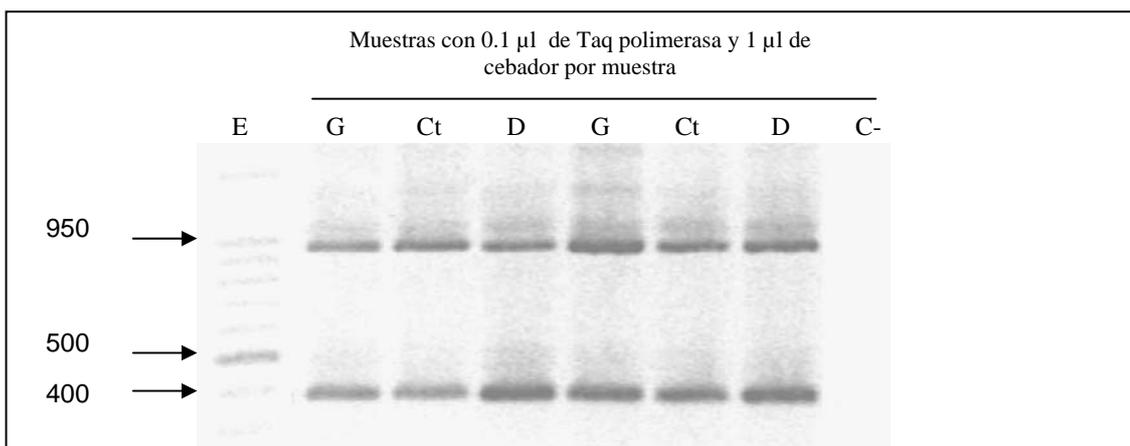
Luego, se evaluaron los genotipos G2333, Catrachita y Desarrutal usando 0.1 μ l de Taq-Polimerasa y 1.5 μ l de dNTP's, pero no se mejoró la mayor nitidez en la amplificación de las bandas por el SCAR SAB13 (Fig 3).



E=Escalera, C-=Control negativo, G=G2333, Ct=Catrachita, D=Desarrural

Figura 3. Variaciones en la expresión del SCAR SAS13 (950 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa y dNTP's en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa).

Utilizando 0.1µl de Taq Polimerasa, 1.2 µl de dNTP's y 1µl de cada cebador, se amplificaron con mayor nitidez las bandas en los genotipos G2333, Catrachita y Desarrural, sugiriendo que el gen $Co-4^2$ está presente en estos tres genotipos. Sin embargo, se presentó otra banda de 400 pb, lo cual probablemente se debió a los cambios de temperatura en el perfil térmico; debido a esto, se sugiere corregir este defecto mediante pruebas con incrementos de dos en dos grados °C en la temperatura (Fig 4).

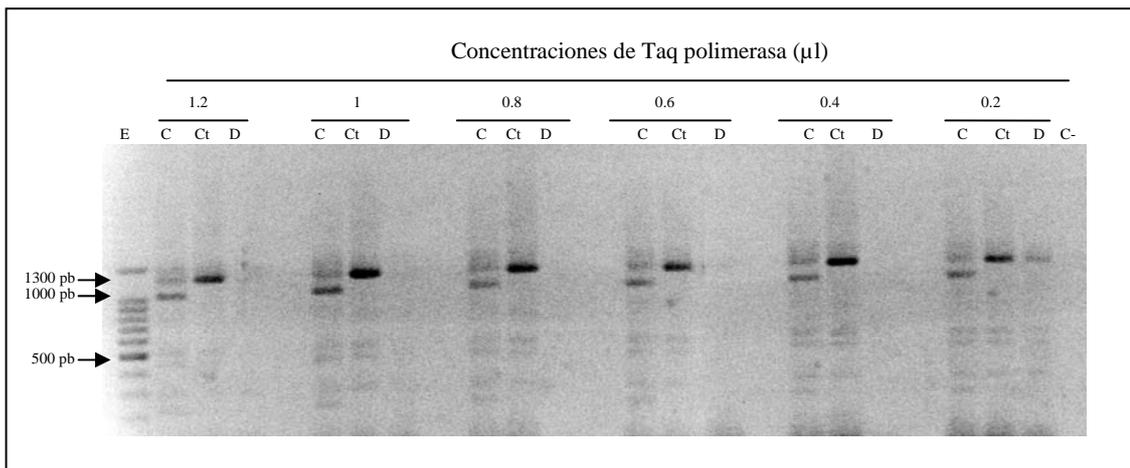


E=Escalera, G=G2333, Ct=Catrachita, D=Desarrural, C-=Control negativo

Figura 4. Variaciones en la expresión del SCAR SAS13 (950 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa y cebador en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa).

3.1.1.3. Marcador SCAR SCAreoli: Se trabajó con una mezcla maestra de 30 μ l duplicando todos los ingredientes de la mezcla, con el propósito de hacer una corrida en electroforesis con 15 μ l para observar la banda de 1300 pb, y en caso esté presente dicha banda digerir 10 μ l del producto amplificado con la enzima DraI. Se hizo una prueba con 1.2 y 0.6 μ l de Taq polimerasa (5U/ μ l) en los genotipos Cornell 49242, Catrachita y Desarrural, pero no se consiguió amplificar ninguna muestra de ADN. Luego, se cambió las concentraciones de 4 y 6 μ l de buffer y 0.6 μ l de Taq Polimerasa pero tampoco se amplificó ninguna muestra.

Subiendo la cantidad de ADN a 6 μ l y utilizando variaciones de la concentración de Taq polimerasa (0.2 a 1.2 μ l) se lograron amplificar las bandas esperadas a 1300 pb que posteriormente fueron digeridas con la enzima DraI (figura 5). Con 1.0 μ l de Taq polimerasa se observó la banda después de la digestión con mejor nitidez en el genotipo Cornell 49242, en el que está presente el gen Co-2. En la variedad Catrachita y Desarrural no se presentaron las bandas esperadas después de la digestión a 1000 pb, indicando que en ambas variedades está ausente el gen Co-2. El genotipo Cornell 49242 presentó las bandas observadas a 1000 pb que identifican al gen Co-2.



E=Escalera, C=Cornell 49242, Ct=Catrachita, D=Desarrural, C-=Control negativo

Figura 5. Variaciones en la expresión del SCAR SCAreoli (1000 pb) debido a diferentes concentraciones de Taq polimerasa en la mezcla maestra (gel de 1% agarosa).

3.1.2 ETAPA II: VERIFICACIÓN DE UTILIDAD DE LOS MARCADORES SCAR

3.1.2.1 Análisis Estadístico

En cuanto al marcador SAB3 se amplificó un fragmento de 400 pb que especifica la presencia del gen de resistencia Co-5 en las 40 muestras de ADN del genotipo TU

(Cuadro 4). En las variedades Catrachita y Desarrural se corrieron 38 muestras de cada una, pero ninguna muestra amplificó la banda correspondiente, indicando la ausencia del gen Co-5 en estas variedades susceptibles.

Por otro lado, el marcador SAS13 amplificó un fragmento de 950 pb en 40, 38, 38 muestras de G2333, Catrachita y Desarrural, respectivamente, indicando la presencia del gen Co-4² en los tres genotipos.

El marcador SCAreoli amplificó un fragmento de 1000 pb en 40 de las muestras de Cornell 49242 indicando la presencia del gen Co-2; mientras que en Catrachita y Desarrural, no se amplificó ninguna muestra sugiriendo la ausencia de este gen en estos cultivares susceptibles.

De acuerdo al análisis de Chi cuadrado, los marcadores SAB3, SAS13 y SCAreoli, se ajustaron a las ampliaciones esperadas con un nivel de confianza de $P > 0.9$; esto indica que la repetibilidad de la presencia de los marcadores en las muestras es muy alta, y que estos se pueden usar con confianza en la selección asistida con marcadores para la selección por resistencia a la antracnosis conferida por los genes correspondientes.

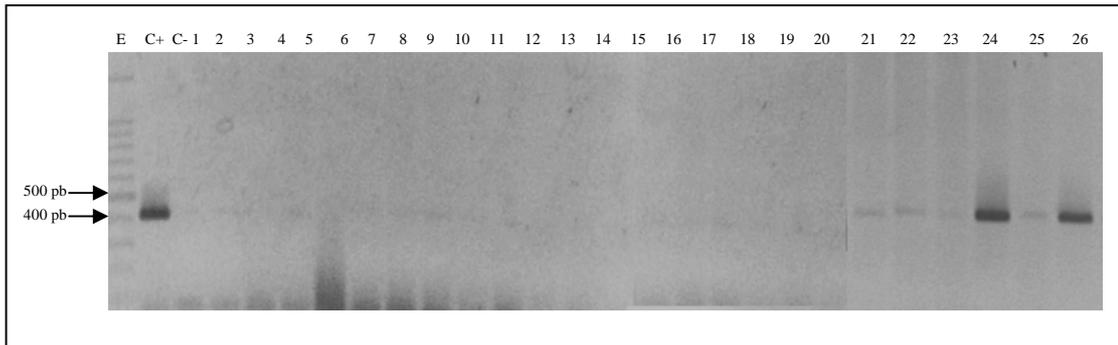
Cuadro 4. Análisis de Chi cuadrado obtenido con los marcadores SCAR y genotipos de frijol.

SCAR	Genotipo	Observado	Esperado	Obs-Esp ¥	$[(O-E)-(0.5)]^2/E$
SAB3	TU	40	40	0	0.01
	Catrachita	0	0	0	0.01
	Desarrural	0	0	0	0.01
SAS13	G2333	40	40	0	0.01
	Catrachita	38	38	0	0.01
	Desarrural	38	38	0	0.01
SCAreoli	Cornel 49242	39	40	-1	0.05
	Catrachita	0	0	0	0.01
	Desarrural	0	0	0	0.01

¥ Obs=Observado, Esp=esperado

3.1.3. ETAPA III: APLICACIÓN DE LOS MARCADORES OPTIMIZADOS

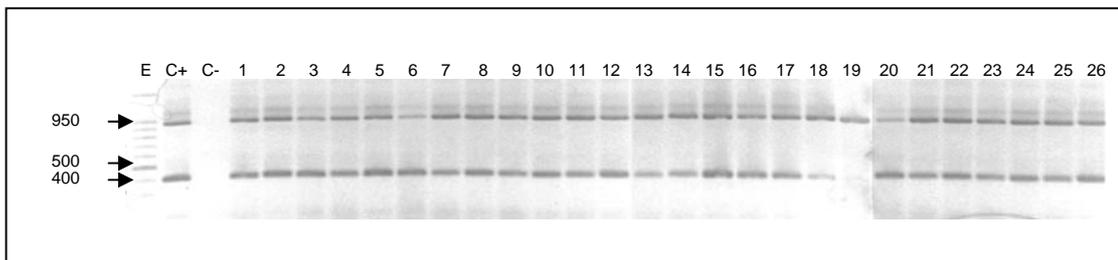
3.1.3.1 Evaluación con el marcador SAB3: De las 14 variedades comerciales que se evaluaron con el marcador SAB3, en ninguna se observó la presencia de este marcador que permite detectar el gen Co5, lo que sugiere que ninguna posee este gen. De los 12 diferenciales evaluados con SAB3, se amplificaron las muestras de ADN de los genotipos TU y G2333, lo cual sugiere que únicamente estos dos genotipos diferenciales poseen el gen Co-5 (Fig 6). Young y Kelly (1996) también confirmaron que el gen Co-5 está presente en estos dos, y ausente en los otros 10 genotipos diferenciales.



E=Escalera, C+=control positivo, C-=Control negativo, 1=Milenio, 2=Tío Canela 75, 3=Amadeus 77, 4=Carrizalito, 5=Cardenal, 6=DEORHO, 7=UCR 75, 8=Desarrural, 9=Catrachita, 10=AND 277, 11=VAX 1, 12=MPCR 202-26-1, 13=Palmichal 1, 14=Nueva Esperanza 01, 15=Michelite, 16=MDRK, 17=Perry Marrow, 18=Cornell 49242, 19=Widusa, 20=Kaboon, 21=México 222, 22=PI 207262, 23=TO, 24=TU, 25=AB 136, 26=G2333.

Figura 6. Identificación de la presencia/ausencia del marcador SAB3 (gen Co-5) en 14 variedades comerciales (1-14) y 12 genotipos diferenciales (15-26) (gel de agarosa al 1%).

3.1.3.2. Evaluación con el marcador SAS13: La evaluación con el marcador SAS13 sugiere que todos los diferenciales de antracnosis y las variedades comerciales incluidas, poseen el gen Co-4², ya que en todas las muestras de ADN se observó la presencia del marcador SAS13 a 950 pb.

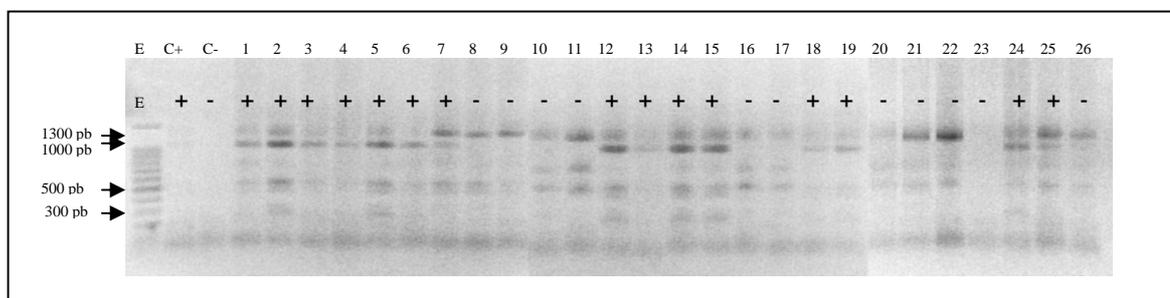


E=Escalera, C+=control positivo, C-=negativo, 1=Milenio, 2=Tío Canela 75, 3=Amadeus 77, 4=Carrizalito, 5=Cardenal, 6=DEORHO, 7=UCR 75, 8=Desarrural, 9=Catrachita, 10=AND 277, 11=VAX 1, 12=MPCR 202-26-1, 13=Palmichal 1, 14=Nueva Esperanza 01, 15=Michelite, 16=MDRK, 17=Perry Marrow, 18=Cornell 49242, 19=Widusa, 20=Kaboon, 21=México 222, 22=PI 207262, 23=TO, 24=TU, 25=AB 136, 26=G2333.

Figura 7. Identificación de la presencia/ausencia del marcador SAS13 (gen Co-4²) en 14 variedades comerciales (1-14) y 12 genotipos diferenciales (15-26) (gel de agarosa al 1%).

3.1.3.3 Evaluación con el marcador SCAreoli: Los resultados de la evaluación con el marcador SCAreoli sugieren que de los 12 genotipos diferenciales sólo Michelite, Cornell 49249, Widusa, TU y AB 136, poseen el gen Co-2. Cuando Geffroy *et. al.* (1998) desarrollaron el marcador SCAreoli, incluyeron los genotipos diferenciales TO, G2333 y Cornell 49242; sin embargo, el marcador sólo se presentó en Cornell 49242, lo cual concuerda con los presentes resultados. De la misma manera, las 14 variedades comerciales evaluadas por la presencia del marcador sugiere que Milenio, Tío Canela 75,

Amadeus 77, Carrizalito, Cardenal, DEORHO, UCR 55, MPCR 202-26-1, Palmichal 1 y Nueva Esperanza 01, poseen el gen Co-2 (Fig.8).



E=Escalera, C+=Control positivo, C-=Control negativo, 1=Milenio, 2=Tío Canela 75, 3=Amadeus 77, 4=Carrizalito, 5=Cardenal, 6=DEORHO, 7=UCR 75, 8=Desarrural, 9=Catrachita, 10=AND 277, 11=VAX 1, 12=MPCR 202-26-1, 13=Palmichal 1, 14=Nueva Esperanza 01, 15=Michelite, 16=MDRK, 17=Perry Marrow, 18=Cornell 49242, 19=Widusa, 20=Kaboon, 21=México 222, 22=PI 207262, 23=TO, 24=TU, 25=AB 136, 26=G2333.

Figura 8. Identificación de la presencia/ausencia del marcador SCAreoli (gen Co-2) en 14 variedades comerciales (1-14) y 12 genotipos diferenciales (15-26) (gel de agarosa al 1%).

3.2 EVALUACIÓN DE LA ANTRACNOSIS EN EL CAMPO

3.2.1 Evaluación en el campo

La variedad Desarrural, la línea MP 202-26-1 y el genotipo diferencial AB 136 presentaron susceptibilidad a la inoculación con los aislamientos Co-J, Co-R y Co-P de *Colletotrichum lindemuthianum*; sin embargo, en los tres genotipos se presenta el marcador SAS13 indicador del gen Co-4². Por otro lado, la línea MP 202-26-1 y el genotipo diferencial AB136 también mostraron presencia del marcador SCAreoli que detecta la presencia del gen Co-2. Estos resultados sugieren que probablemente los aislamientos Co-J, Co-R y Co-P son patogénicos a dichos genotipos.

En las variedades comerciales y genotipos diferenciales que presentaron la categoría resistente o intermedia, y que poseen los genes Co-2 y Co-4², indicados por la presencia de los marcadores SCAreoli y SAS13, respectivamente, probablemente esta resistencia se deba a la presencia de otros genes. Según Kelly *et al.* (1994), el uso de los genes Co-2, Co-5 y Co-6 puede ser limitado en Centro América, debido a la virulencia de las razas de antracnosis de la región. Sin embargo, la piramidación del gen Co-1, con los genes Co-2, Co-5 y Co-6, podría ser la mejor estrategia para la protección contra antracnosis en Centro América. Según Young *et al.* (1998), la alta variabilidad natural del patógeno hace que continuamente emerjan razas nuevas, lo que ocasiona es que la resistencia genética del hospedero no sea durable, por lo que se requiere la presencia de genes múltiples precedentes de reservorios diversos.

Cuadro 5. Variaciones en la presencia/ausencia de marcadores moleculares (SAB3, SAS13 y SCAreoli), reacción a la inoculación con tres aislamientos (Co-J, Co-R y Co-P) de antracnosis de Honduras, y clasificación de la resistencia de 14 variedades comerciales y 12 genotipos diferenciales de frijol. El Ocotal, Yuscarán, El Paraíso, Honduras.

Genotipos	Marcadores [¥]			Reacción		Resistencia [✓]
	A Co-2	B Co-4 ²	C Co-5	Severidad ^{&} (1-9)	Incidencia (%)	
Variedades Comerciales						
Desarrural	-	+	-	9a	95	S
MPCR 202-26-1	+	+	-	9a	85	S
DEHORO	+	+	-	5 b	35	I
Milenio	+	+	-	5 b	45	I
Catrachita	-	+	-	4 bc	20	I
Nueva Esperanza 01	+	+	-	4 bcd	35	I
Tio Canela 75	+	+	-	4 bcd	15	I
Cardenal	+	+	-	4 bcd	25	I
Amadeus 77	+	+	-	4 bcd	25	I
Palmichal 1	+	+	-	4 bcde	30	I
Carrizalito	+	+	-	3 defgh	30	R
UCR 55	+	+	-	2 ghij	5	R
Vax 1	-	+	-	2 ij	5	R
AND 277	-	+	-	1 j	5	R
Genotipos diferenciales						
AB 136	+	+	-	8a	70	S
Pi 20 72 62	-	+	-	3 cdef	15	R
Michelite	+	+	-	3 cdefg	15	R
México 222	-	+	-	3 efghi	20	R
TO	-	+	-	2 efghij	10	R
Cornell 49242	+	+	-	2 efghij	10	R
TU	+	+	+	2 efghij	5	R
Widusa	+	+	-	2 fghij	5	R
MDRK	-	+	-	2 hij	5	R
Perry Marrow	-	+	-	2 hij	5	R
Kaboon	-	+	-	2 hij	5	R
G 2333	-	+	+	1 j	5	R

¥ Marcadores (A=SCAreoli, Co-2; B=SAS13, Co-4² y C=SAB3)

& Valores con igual letra no difieren significativamente (P<0.05) según la prueba DMS.

✓ Resistencia (S= Susceptible, I= Intermedia y R= Resistente)

Existe correlación de 0.914 entre severidad e incidencia, es por ello que la prueba DMS se hizo solamente en severidad.

Cuadro 6. Distribución de variedades comerciales (14) y genotipos diferenciales (12) de acuerdo a la categoría de reacción a los aislamientos Co-J, Co-R y Co-P de *Colletotrichum lindemuthianum*, y a la ausencia o presencia de los marcadores SCAreoli, SAS13 y SAB3, respectivamente.

Resistencia	SCAreoli (Co-2) [‡]		SAS13 (Co-4 ²)		SAB3 (Co-5)	
	P	A	P	A	P	A
Susceptible	2	1	3	0	0	3
Intermedia	7	1	8	0	0	8
Resistente	7	8	15	0	2	13
Total	16	10	26	0	2	24

[‡] P=Presente, A=Ausente

4. CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares SCAR complementan las evaluaciones fenotípicas para la identificación de genes de resistencia a la antracnosis en frijol común.

Se determinó la presencia o ausencia de tres genes de resistencia a la antracnosis en genotipos diferenciales y variedades comerciales de frijol mediante el uso de marcadores SCAR.

Se caracterizó la reacción a la antracnosis debido a la presencia de tres genes mediante el uso de marcadores SCAR y la inoculación con tres aislamientos de antracnosis de Honduras.

Los aislamientos de antracnosis utilizadas probablemente son patogénicos a los genotipos con presencia de los genes Co-2 y Co-4²; sin embargo, las variedades con resistencia en el campo y que presentaron los marcadores de los genes Co-2 y Co-4² se pueden usar en programas de mejoramiento.

La resistencia observada en el campo que no pudo explicarse por la presencia de los genes Co-2, Co-4 y Co-5 usando los marcadores, probablemente se deba a otros genes en los genotipos resistentes.

5. RECOMENDACIONES

Implementar marcadores moleculares adicionales para poder explicar la resistencia observada con algunos genotipos en Honduras que identifiquen otros genes de resistencia a la antracnosis en Honduras.

En los programas de mejoramiento genético para desarrollar variedades para la región Mesoamericana se debe utilizar por lo menos un gen de resistencia proveniente de variedades andinas.

Hacer evaluaciones de germoplasma de frijol con razas específicas de la antracnosis en Honduras.

Evaluar variaciones en la temperatura de acoplamiento en el perfil térmico usado para la amplificación del marcador SAS13 a fin de eliminar la banda que se amplifica a 400 pb.

6. LITERATURA CITADA

Araya, C.M. 2003. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. *Fitopatología Brasileira* 28:221-228.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) 1987. Sistema estandar para la evaluación de germoplasma de frijol. Trad. EDITEC. Eds. Mata F.; van Schoonhoven.; Pastor – Corrales M. Cali, Colombia. CIAT. 56 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1997. Problemas de campo en los cultivos de frijol en el trópico. Trad. Por EDITEC. Ed. Por Mata F., Van Schoonhoven, A. y Pastor-Corrales, M.A. (comps.). Cali, Colombia, CIAT. 220 p.

Cornide, M. 2002. Marcadores Moleculares: Nuevos Horizontes en la Genética y la Selección de las Plantas. Editorial Félix Varela. La Habana, Cuba. 366p.

Geffroy, V; Creusot, F; Falquet, J. Seignac; A; Blondon, A; Banerrot, H; Gepts, P; Dron, M; 1998. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potencial use in marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet* 96: 494-502.

Kelly, J.D; G.L Hosfield, G.V; Varner, M.A; Uebersax, S.D; Haley, A; Taylor, J 1994. Registration of “Isles” dark red kidney bean. *Crop Science* 34:1406-1407.

Param, I; Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet* 85:985-993.

Rosas, J. 2003. El cultivo del frijol común en América Tropical. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 56 p.

Salazar, J. 2003 Caracterización de la diversidad patógena de *Colletotrichum lindemuthianum* causante de la antracnosis del frijol en Honduras. Tesis. Ing. Agr. Zamorano, Honduras, EAP. 17 p.

Vallejo, V; Kelly, J. 2001 Development of a SCAR marker linked to Co-5 locus in common bean. Department of Crop and Soil Sciences, Michigan State University, E. Lansing, MI, 48824, USA

Young, R.A; Kelly, J.D. 1996 Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. Plant Dis 80:650-654.

Young, R.A; Kelly, J.D. 1997 RAPD Markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. Crop Science Vol. 37:940-946

Young, R.A; Melotto, M; Nodari, R.O; Kelly, J.D. 1998. Marker assisted selection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar G2333. Theor. Appl. Genet. 96:87-94.

7. ANEXOS

Anexo 1 Escala de evaluación de severidad de antracnosis en germoplasma de frijol común.

