

**Identificación de marcadores moleculares
ligados a la resistencia a la mancha angular
(*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

Mónica Patricia Parreño Ruiz

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Abril, 2002

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

presentado por

Mónica Patricia Parreño Ruiz

Zamorano, Honduras

Abril, 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.

Mónica Patricia Parreño Ruiz

Zamorano, Honduras

Abril, 2002

Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

presentado por

Mónica Patricia Parreño Ruiz

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

Alfredo Rueda, Ph. D.
Coordinador de Área Temática

Aracely Castro, M.Sc.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, MBA
Coordinador de la Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Luwbia Aranda, Ing. Agr.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D. Decano
Académico

Pablo Paz, Ph.D.
Coordinador PIA-Fitotécnia/CCPA.

Keith L. Andrews, Ph.D.
Director General

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen María

A mis padres Antonio y Mariana

A Ignacio Alejandro

A mis hermanos: Leopoldo, Jimena y Doris.

A mis sobrinos: Johana, Ismael, Jefry, Kevin y Leopoldo.

A toda las personas que me dieron su apoyo.

A mi país Ecuador

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen María por iluminar mi vida y darme la fuerza para continuar en momentos difíciles.

A mis padres Antonio y Mariana por su cariño, su confianza y apoyo, durante todo este tiempo.

A Ignacio Alejandro por su amor, por todos los momentos compartidos, por estar siempre ahí y permanecer pendiente de mí durante los largos meses de estar lejos. Gracias por permitirme ser parte de tu vida.

A mi hermano Leopoldo, por ser un ejemplo de dedicación y trabajo, por enseñarme a luchar en tiempos difíciles.

A mi hermana Jimena, por su cariño y apoyo a pesar de la distancia.

A mi hermana Doris, por tu apoyo y cuidar de nuestros padres durante mi ausencia.

A mis sobrinos: Johana, Ismael, Jefry, Kevin, Leopoldo por todo su cariño y regalarles sus sonrisas a mis padres.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por su importante ayuda y guía en este trabajo.

A la Ing. Aracely Castro por su tiempo y los aportes brindado a este trabajo.

A La Ing. Luwbia Aranda por su colaboración para la realización del trabajo.

Al Dr. Raúl Espinal por su apoyo y su amistad.

A María Bravo, Nilda Chávez, Gabriela Santos, Diana Fajardo, María Omonte, Wladimir Illescas, por ser unas personas maravillosas que han estado a mi lado.

A la familia Pilz, gracias por recibirme en su casa como a una hija. A doña Angélica por sus valiosos consejos y darme su mano amiga cuando más lo necesité.

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

A Deysi por su amistad y valiosos consejos.

Al personal del Programa de Investigación en Frijol (PIF) por su colaboración y amistad.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Agradezco Al Programa Bean/Cowpea CRSP-USAID por el financiamiento parcial brindado para continuar con mis estudios en el programa de Ingeniería Agronómica.

Agradezco al Instituto Ecuatoriano de Becas y Crédito (IECE) por el financiamiento de mis estudios en el Programa de Agrónomo.

RESUMEN

Parreño Ruiz, Mónica Patricia. 2002. Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras.

En el frijol común uno de los principales problemas relacionados con su producción es el daño ocasionado por enfermedades, entre las más relevantes está la mancha angular. Esta enfermedad está delimitada a regiones tropicales y subtropicales, causa reducciones en rendimientos de 40% hasta 80% de la producción. El objetivo fue identificar y utilizar marcadores moleculares RAPD y SCAR como herramientas para la selección en el mejoramiento por resistencia genética del frijol común a la mancha angular en Zamorano. El material que se usó fue de una población segregante F4 identificada como ALS 9951, derivada de la cruce de Tío Canela-75 (susceptible) × G06727 (resistente). El procedimiento a seguir incluyó la siembra, inoculación y evaluación en camas de infección de las poblaciones F5 y F6 y los padres. La reacción fenotípica a la incidencia de la enfermedad se utilizó como referencia en la búsqueda de marcadores moleculares ligados a la misma. Para ello, se utilizaron 44 cebadores RAPD. Se evaluó la reacción fenotípica a la inoculación en el laboratorio la presencia de bandas polimórficas ligadas a esta reacción fue la variable evaluada usando la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson para bondad de ajuste de las proporciones fenotípicas y genotípicas esperadas y observadas. Se usó el marcador molecular SCAR NO2 que indica la presencia del gen *Phg-2* que fue adaptado para las condiciones del laboratorio de Biología Molecular de Zamorano y se encontró que no hay ajuste con un $P < 0.01$ demostrándose así que los valores observados se atribuyen al azar; por esta razón es importante la identificación de marcadores moleculares RAPD como primer paso para encontrar marcadores moleculares potenciales. Se lograron identificar cinco marcadores RAPDs WO6₁₂₀₀, G3₁₄₀₀, G3₁₁₀₀, W09₁₁₀₀, PO9₃₀₀ y B10₁₂₀₀ ligados a la resistencia a la mancha angular, empleando mezclas compuestas de ADN de plantas resistentes y susceptibles, los cuales se comprobaron en la siguiente generación en la población F6; estos marcadores fueron utilizados en plantas individuales (F6). El marcador G3₁₄₀₀ muestra el ajuste más alto, considerándolo así como el marcador molecular más confiable en este estudio.

Palabras claves: ADN, bandas, cebadores, evaluación, inoculación, RAPD, SCAR, severidad, susceptible.

NOTA DE PRENSA

TECNICAS MOLECULARES FACILITAN LA IDENTIFICACION DE PLANTAS RESISTENTES A LA MANCHA ANGULAR

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes en la dieta de las familias de bajos ingresos en Centro y Sur América. Uno de los principales problemas relacionados con su producción es el daño ocasionado por enfermedades, encontrándose entre las más relevantes la mancha angular, ocasionada por el hongo *Phaeoisariopsis griseola*. Esta enfermedad está delimitada a regiones tropicales y subtropicales, causando reducciones en rendimientos que van desde el 40% hasta el 80% de la producción.

El mejoramiento tradicional tiene sus limitaciones como la rapidez y precisión para identificar y seleccionar características útiles en los programas de mejoramiento que pueden estar afectadas por el ambiente. A diferencia de la selección mediante mejoramiento tradicional, la efectividad de los marcadores moleculares no es afectada por el ambiente.

Se han identificado y utilizado marcadores moleculares como herramientas para la selección en el mejoramiento por resistencia genética del frijol a la mancha angular. Esto ha sido posible mediante el uso de marcadores moleculares del tipo RAPD y usando una población derivada de la cruce de Tío Canela-75 (susceptible) x G06727 (resistente) en el Laboratorio de Biología Molecular del Programa de Investigación en Frijol (PIF) en Zamorano.

El análisis con el marcador SCAR NO2 es efectivo para pirimidar genes seleccionando genotipos resistentes, pero en este estudio no se realizó ningún aislamiento de razas de *P. griseola*, por lo que dificulta la visualización de marcadores que estén ligados a la raza predominante en la región (63-63).

Este es el primer paso para encontrar marcadores moleculares potenciales que se encuentren ligados a la resistencia de la mancha angular, y que sean útiles para estudios posteriores donde se recomienda realizar aislamientos del patógeno.

CONTENIDO

| | | |
|-----------|--|----------|
| | Portada | i |
| | Autoría | ii |
| | Página de firmas | iii |
| | Dedicatoria..... | iv |
| | Agradecimientos | v |
| | Agradecimientos a patrocinadores | vi |
| | Resumen | vii |
| | Nota de prensa..... | viii |
| | Contenido..... | ix |
| | Índice de Cuadros..... | x |
| | Índice de Figuras..... | xi |
| | Índice de Anexos..... | xii |
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 2 |
| 1.2 | Objetivos Generales | 2 |
| 1.3 | Objetivos Específicos..... | 2 |
| 2. | REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 | IMPORTANCIA DEL FRIJOL: | 3 |
| 2.1.2 | Taxonomía del frijol..... | 3 |
| 2.1.3 | Origen y domesticación del frijol común..... | 3 |
| 2.2 | LA MANCHA ANGULAR..... | 4 |
| 2.2.1 | Importancia..... | 4 |
| 2.2.2 | Distribución geográfica | 4 |
| 2.2.3 | Descripción del patógeno | 4 |
| 2.2.4 | Epidemiología..... | 5 |
| 2.2.5 | Sintomatología..... | 5 |
| 2.2.6 | Hospederos | 6 |
| 2.2.7 | Evaluación del germoplasma..... | 6 |
| 2.2.8 | Etapas de desarrollo de la planta de frijol..... | 7 |
| 2.3 | DIFERENCIALES DE MANCHA ANGULAR | 7 |
| 2.4 | Marcadores Moleculares para el fitomejoramiento..... | 8 |
| 2.4.1 | Base genética de un marcador | 8 |
| 2.4.2 | Marcadores moleculares | 8 |
| 2.4.3 | Tipos de marcadores moleculares | 8 |
| 2.4.4 | Marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol | 9 |
| 2.4.5 | Marcadores moleculares tipo RAPD | 10 |
| 2.4.6 | Aplicaciones de los marcadores RAPD | 10 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.7 | Uso de marcadores tipo RAPD | 11 |
| 2.4.7.1 | Extracción de ADN..... | 11 |
| 2.4.7.2 | Replicación de ADN | 11 |
| 2.4.7.3 | Separación de ADN | 11 |
| 2.5 | MARCADORES MOLECULARES TIPO SCAR..... | 12 |
| 2.5 | Marcador molecular SCAR NO2..... | 12 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 3.1 | EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN ALS 9951..... | 13 |
| 3.1.1 | Localización del estudio..... | 13 |
| 3.1.2 | Material experimental | 13 |
| 3.1.3 | Variables evaluadas y su medición..... | 14 |
| 3.1.3.1 | Severidad | 14 |
| 3.1.3.2 | Siembra..... | 14 |
| 3.1.4 | Inoculación | 14 |
| 3.1.5 | Evaluación de severidad..... | 14 |
| 3.2 | USO DEL MARCADOR MOLECULAR SCAR NO2..... | 14 |
| 3.2.1 | Localización del estudio..... | 14 |
| 3.2.2 | Características del germoplasma | 14 |
| 3.2.3 | Siembra..... | 15 |
| 3.2.4 | Muestreo..... | 15 |
| 3.2.5 | Variables y su medición | 15 |
| 3.2.6 | Extracción de ADN..... | 15 |
| 3.2.7 | Cuantificación de ADN..... | 15 |
| 3.2.8 | Dilución de ADN | 15 |
| 3.2.9 | Amplificación de ADN | 15 |
| 3.3 | IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES RAPD | 16 |
| 3.3.1 | Muestreo..... | 16 |
| 3.3.2 | Variables analizadas y su medición..... | 16 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 18 |
| 4.1 | EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN ALS 9951 Y DE LOS DIFERENCIALES DE MANCHA ANGULAR | 18 |
| 4.2 | USO DEL MARCADOR MOLECULAR SCAR NO2 | 18 |
| 4.3 | IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES RAPD | 19 |
| 4.3.1 | Amplificación de ADN..... | 19 |
| 4.3.2 | Separación de ADN (electroforesis)..... | 19 |
| 4.3.3 | Marcadores ligados al gen de resistencia a la mancha angular en mezclas compuestas de ADN de plantas F5 y F6 | 19 |
| | Marcadores moleculares RAPD ligados a la resistencia a la mancha angular en plantas individuales F6..... | 21 |
| 4.3.4.1 | Evaluación con el cebador RAPD W06 | 21 |
| 4.3.4.2 | Evaluación con el cebador RAPD G3..... | 21 |
| 4.3.4.3 | Evaluación con el cebador RAPD W09..... | 22 |
| 4.3.4.4 | Evaluación con el cebador RAPD P09 | 23 |
| 4.3.4.5 | Evaluación con el cebador RAPD B10..... | 24 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5 | CONCLUSIONES | 26 |
| 6 | RECOMENDACIONES | 27 |
| 7 | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 28 |
| 8 | ANEXOS | 31 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | |
|--------|---|----|
| 1 | Escala general para la evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungosos..... | 7 |
| 2 | Mezcla maestra para amplificar marcadores moleculares tipo RAPD..... | 17 |
| 3 | Resultados del análisis de Chi-cuadrado en ADN compuesto de plantas F6 de frijol evaluadas con el SCAR NO2..... | 19 |
| 4 | Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador W06 ₁₂₀₀ | 21 |
| 5 | Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador G3 ₁₄₀₀ | 22 |
| 6 | Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador G3 ₁₁₀₀ | 22 |
| 7 | Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador W09 ₁₀₀₀ | 23 |
| 8 | Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador P09 ₃₀₀ | 24 |
| 9 | Resultado del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador B10 ₁₂₀₀ | 24 |
| 10 | Resultados de los análisis de Chi-cuadrado de las evaluaciones con los marcadores moleculares RAPD WO6 ₁₂₀₀ , G3 ₁₄₀₀ , G3 ₁₁₀₀ , W09 ₁₁₀₀ , P09 ₃₀₀ y B10 ₁₂₀₀ | 25 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Bandas generadas por el marcador SCAR NO2 ₈₉₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002..... | 19 |
| 2 | Expresión de bandas polimórficas asociadas a la resistencia a la mancha angular en ADN compuesto de plantas F5 resistentes y susceptibles de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras, 2002..... | 20 |
| 3 | Expresión de bandas polimórficas asociadas a la resistencia a la mancha angular en ADN compuesto de plantas F6 resistentes y susceptibles de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras, 2002..... | 20 |
| 4 | Bandas polimórficas generadas por el cebador W06 ₁₂₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002..... | 21 |
| 5 | Bandas polimórficas generadas por el cebador G3 ₁₄₀₀ y G3 ₁₁₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002..... | 22 |
| 6 | Bandas polimórficas generadas por el cebador W09 ₁₀₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002..... | 23 |
| 7 | Bandas polimórficas generadas por el cebador P09 ₃₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002..... | 23 |
| 8 | Bandas polimórficas generadas por el cebador B10 ₁₂₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002..... | 24 |

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas comestibles más importantes, debido a su amplia distribución en los cinco continentes. Es un complemento nutricional indispensable en la dieta alimenticia principalmente en Centro y Suramérica, estimándose que más del 45% de la producción mundial proviene de estas regiones. La producción de frijol en Centroamérica es de aproximadamente 350,000 toneladas, cosechadas en cerca de 0.5 millones de hectáreas con rendimientos promedio de 678 kg/ha (Rosas *et al.*, 2000). En Honduras, el frijol es un grano básico de importancia tanto por la superficie sembrada como por su consumo *per cápita* (CIAT, 1992).

Uno de los principales problemas relacionados con la producción de frijol es el daño ocasionado por enfermedades. Entre las más relevantes se encuentra la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.)) que se considera delimitada a regiones tropicales y subtropicales, encontrándose en diferentes zonas productoras de frijol (Campos-Ávila, 1987). En Centro América, las pérdidas en la producción de frijol común por causa de la mancha angular son aproximadamente 40% (Elvir, 1998).

En la actualidad no existen variedades comerciales de frijol resistentes a la enfermedad. Una alternativa al problema es la generación de resistencia genética empleando recombinaciones de germoplasma andino que presente resistencia, con materiales mesoamericanos que son generalmente susceptibles a la mancha angular.

Gracias a los rápidos avances en la biología molecular, se cuenta con nuevas herramientas para el mejoramiento genético de las plantas. Entre ellas se destacan los marcadores moleculares, que aparecen como herramientas indispensables de apoyo a los programas clásicos de mejoramiento.

El mejoramiento genético tradicional tiene sus limitaciones. Entre estos se encuentran la rapidez y precisión con que muchas de las características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas y utilizadas en los programas de mejoramiento, y que pueden ser afectadas por factores ambientales. A diferencia de la selección mediante mejoramiento tradicional, la efectividad de los marcadores moleculares no es afectada por el ambiente y no varía con la edad de la planta ya que se encuentran estrechamente ligados a los genes de resistencia, los cuales pueden ser seleccionados indirectamente y en ausencia del patógeno.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Identificar marcadores moleculares tipo RAPD como herramientas para la selección por resistencia genética del frijol común a la mancha angular en Zamorano.

1.1.2 Objetivos Específicos

2. Utilizar marcadores moleculares RAPD identificados en plantas individuales de líneas avanzadas F6 de frijol ligados a la resistencia a la mancha angular.
3. Identificar plantas resistentes a la mancha angular en líneas F6.
4. Evaluar marcadores moleculares SCAR ligados a la resistencia del frijol común a la mancha angular en líneas F6.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. IMPORTANCIA DEL FRIJOL

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se encuentra dentro del grupo de las leguminosas comestibles más importantes debido a su alta producción, que abarca áreas diversas en todo el mundo. Aproximadamente el 45% de la producción mundial proviene de América Latina, siendo ésta región la de mayor producción y consumo (Voyses, 2000).

El consumo *per cápita* más alto se encuentra en la región de los Grandes Lagos de África (47.7 kg/año); mientras en los países desarrollados, como los de América del Norte y Europa Occidental, el nivel de consumo más bajo (menos de 2.0 kg/año). El consumo *per cápita* en Centroamérica es 9.8 kg/año, aunque se asegura que este se podría incrementar si se mejorara la producción en la región y aumentando la disponibilidad del grano (Rosas, 1998).

Los principales productores y consumidores del grano seco de frijol son América Latina (45%) y África (25%). Otras regiones productoras se encuentran en América del Norte (13%), Europa (8%) y Asia (9%). Los principales países productores y consumidores de América Latina son Brasil, con más de 5.3 millones de hectáreas; y México, con 1.8 millones. Por otro lado, Colombia, Argentina y Nicaragua siembran entre 150 y 250,000 hectáreas (Singh, 1996).

2.1.2 Taxonomía

Según López y Fernández (1985), el nombre científico del frijol es *Phaseolus vulgaris* L., asignado por Linneo en 1753. Pertenece a la tribu *Phaseoleae* de la subfamilia *Papilionoideae* dentro del orden *Rosales*, familia *Leguminosae*.

2.1.3 Origen y domesticación del frijol común

Se conoce que el frijol común es originario de las Américas, desde México hasta Argentina, según las evidencias encontradas como restos arqueológicos de más de 7000 años, la botánica del cultivo por sus ancestros silvestres, la historia hallada en manuscritos españoles y la lingüística encontrada en la nomenclatura precolombina.

Dos centros primarios de domesticación, localizados en Mesoamérica (desde el sur de México hasta Nicaragua) y la región sur de los Andes (norte de Colombia hasta el norte de Argentina) dieron lugar a dos grupos mayores de cultivares. Después de su domesticación, estos fueron introducidos a otras regiones del mundo, siendo ambos cultivares (mesoamericanos y andinos) diseminados a las mismas regiones (Rosas, 1998).

2.2 LA MANCHA ANGULAR

2.2.1 Importancia

Uno de los principales problemas relacionados con la producción de frijol es el daño ocasionado por enfermedades. Entre las más relevantes se encuentra la mancha angular causada por el hongo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.), que se considera delimitada a regiones tropicales y subtropicales y distribuido en diferentes zonas productoras (Campos-Ávila, 1987). En Centro América, las pérdidas en la producción de frijol común a causa de esta enfermedad son de aproximadamente 40% en variedades susceptibles (Elvir, 1998).

La mancha angular (en inglés “angular leaf spot”, ALS) es una enfermedad muy importante del frijol en Brasil, particularmente en los estados del noreste, y en la región de África de los Grandes Lagos en África, aunque también es importante en otras áreas de Latinoamérica y África. Debido a que la mayor severidad de la enfermedad se presenta después de la floración, se consideraba que no había reducciones perceptibles en el rendimiento y por ello se le mencionaba como una enfermedad de menor importancia. Actualmente es considerada una enfermedad muy importante que causa considerables reducciones en la producción del cultivo (Chacón *et al.*, 1996; Beebe y Pastor Corrales, 1991).

Según Liebenberg y Pretorius (1997), las pérdidas en rendimiento han alcanzado más de 50 % en cultivares susceptibles en la India, 80% en Colombia, 70% en Brasil y el 80% en Costa Rica.

2.2.2 Distribución geográfica

La mancha angular ha sido reportada por lo menos en 78 países, casi todos localizados en zonas tropicales y templadas del mundo (Liebenberg y Pretorius, 1997).

Liebenberg y Pretorius (1997), señalan que *P. griseola* fue primero colectada en Barberton, Sur África de *P. vulgaris*. Se reportó el hongo en Salisbury (Zimbabwe), que luego fue confirmado sobre *P. vulgaris* bajo riego.

2.2.3 Descripción del patógeno

P. griseola pertenece al grupo de los hongos imperfectos, del orden Moniliales, familia Stilvaceae. Anteriormente se le conocía también con los sinónimos *Isariopsis Iaxa* (Ell) Sacc.; *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc) Ferraris; *Cercospora columnare* Ell y Ev; *Lyndaomyces griseola* Gonz. Frag; *Arthrobotryum puttemansii* Henn; y *Cercospora sthulmanni* Henn (Campos-Ávila, 1987).

En siembras fuertemente atacadas bajo condiciones de campo, sobre las lesiones se forman los cuerpos fructíferos constituidos por grupos de color oscuro que reciben el nombre de coremio o sinema, en el ápice de cada conidióforo se forman las esporas. El sinema puede tener un diámetro de 40 micras y una longitud de 500 micras. Con la madurez los conidióforos tienden a separarse cuando empiezan a fructificar. Los conidios son hialinos generalmente con tres septas aunque pueden tener hasta seis, en

conjunto son grises, de forma cilíndrica a fusiforme y ligeramente curvados; miden de 50 a 60 micras de largo y de 5.5 a 8 micras de ancho (Campos-Ávila, 1987).

2.2.4 Epidemiología

Las condiciones favorables para la infección y desarrollo de la enfermedad son temperaturas moderadas (16-28 °C, con un óptimo de 24 °C), alta humedad relativa (80 a 95%), alternada con períodos cortos de baja humedad y fluctuaciones en intensidad lumínica (EAP, 1994).

Puede ser transportado por medio de semilla contaminada proveniente de campos de producción con residuos de cosecha, donde es capaz de sobrevivir entre 5 y 18 meses. La dispersión del hongo puede ser a partir de residuos infectados en el campo mediante salpicaduras producidas por agua; y por esporulaciones que ocurren en lesiones ya establecidas, que se desprenden y arrastran las conidias por el viento (Castaño y Del Río, 1994). La semilla es un agente potencial de diseminación ya que el patógeno puede estar en el interior de la misma, pudiendo reiniciar su actividad si las condiciones son favorables, convirtiéndose en una fuente primaria de inóculo y causando defoliación prematura de la planta (Campos-Ávila, 1987).

Según Campos-Ávila (1987), *P. griseola* puede permanecer en residuos de plantas enfermas y en el suelo hasta por 500 días, siendo el agua de lluvia el factor que ayuda a su diseminación.

La infección aparece 6-9 días después que el hongo penetra el tejido vegetal a través de los estomas; luego avanza al interior de la célula en el mesófilo y en el tejido del parénquima de empalizada, el patógeno avanza por medio de lesiones necróticas (Fernández y López, 1985).

2.2.5 Sintomatología

La mancha angular puede llegar a cubrir gran parte del área foliar asociándose con diversos grados de clorosis. Ataques fuertes provocan la caída de las hojas desde el inicio de la floración hasta el final del ciclo vegetativo. En los pecíolos y tallos produce manchas café, y en las vainas lesiones café rojizas que también afectan las semillas (Pazmiño, 2001). Sin embargo, la pérdida exacta de la producción por *P. griseola* es a menudo difícil de determinar debido a la ocurrencia frecuente de otras enfermedades (Liebenberg y Pretorius, 1997).

En las vainas las manchas son superficiales, casi circulares de color rojizo a oscuro. Pueden cubrir el ancho de la vaina y afectar la semilla en variedades susceptibles, que se convierten en transmisores de la enfermedad. En los tallos y pecíolos, las manchas son longitudinales y a veces cubren toda el área afectada del tallo (Campos-Ávila, 1987).

En la actualidad no existen variedades comerciales de frijol resistentes a esta enfermedad, por lo que es importante generar recombinaciones genéticas que representen una solución al problema utilizando materiales andinos que presentan resistencia como donantes para materiales mesoamericanos susceptibles (Campos, 1987).

2.2.6 Hospederos

Campos-Ávila (1987) menciona que *P. griseola* tiene varios hospederos. Entre los de mayor importancia se encuentran *P. lunatus* y *P. multiflorus*; también señala que *Pisum sativum*, *Vigna sinensis* y *Glycine max* son hospederos de *P. griseola*, pero en esta última no se ha comprobado.

Bajo condiciones de invernadero se han inoculado varias especies del género *Phaseolus*, resultando susceptibles al hongo causante de la mancha angular a *P. aungularis*, *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. calcaratus*, *P. vulgaris silvestre* y *P. coccineus*. En esta última especie causa pérdidas totales, principalmente en plantas de rebrote, como también manchado de semilla (Campos-Ávila, 1987).

2.2.7 Evaluación del germoplasma

El cultivo del frijol común enfrenta un gran número de problemas de bióticos y abióticos, por lo que los programas nacionales e internacionales de frijol han establecido una red de mejoramiento genético en la cual intercambian los resultados de la evaluación del germoplasma y de la investigación sobre el cultivo. Existe un sistema estándar para la evaluación del germoplasma de frijol en condiciones de campo. El Proyecto de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) emplea este sistema en Colombia y en varios países de América Latina y África y de otras regiones, para clasificar el germoplasma en categorías útiles y prácticas, facilitando el intercambio de resultados de investigación. Con este sistema se puede evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos fungosos y bacterianos en condiciones de campo. La severidad de la enfermedad se define como la cantidad de tejido de la planta afectado por los organismos causantes de la enfermedad, expresada como porcentaje de la cantidad total de ese tejido. La incidencia de la enfermedad se define como el número de unidades afectadas considerando generalmente plantas enteras, aunque también se consideran unidades partes de la planta como hojas, tallos, vainas o raíces y expresando luego estas unidades como porcentaje de la población total de unidades escogidas (CIAT, 1987).

Diversas escalas se han utilizado para evaluar el germoplasma de frijol, principalmente escalas que van de 1 a 3, de 1 a 5 y de 1 a 9. Según el CIAT (1987), los datos de evaluación de germoplasma de frijol se basan en la escala fija de 1 a 9 (Cuadro 1), sin decimales de nivel medio, reservando la calificación 1 para la ausencia de síntomas (nivel más alto de resistencia), y el número 9 a una susceptibilidad extrema (presencia de síntomas, daño o estrés severos).

Ascendiendo en la escala, los números más altos representan, progresivamente, mayor susceptibilidad y un germoplasma menos deseable. Los valores 1, 2 y 3 se consideran “resistentes”; 4, 5 y 6 “intermedios”; y 7, 8 y 9 “susceptibles”. La calificación 0 está reservada para cualquier situación en que no se pueda evaluar y no representa una ausencia de síntomas.

El CIAT (1987), señala que al evaluar el germoplasma de frijol por su reacción a patógenos e insectos, debe usarse cultivares testigos conocidos por su reacción

distribuidos en el campo o vivero, para ayudar a establecer la presión por los insectos o el nivel de enfermedad y para evaluar la distribución de estas plagas.

Cuadro 1. Escala general para la 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).

2.2.8 Etapas de desarrollo de la planta de frijol

Según el CIAT (1987), es necesario referirse a la etapa de desarrollo de la planta en el momento que se hacen las evaluaciones para poder comparar los resultados de otras evaluaciones. Debido a que las plantas del mismo genotipo sembradas en distintas condiciones climáticas pueden encontrarse en una etapa de desarrollo diferente en el momento de la evaluación, es importante utilizar una escala basada en la morfología de la planta y en los cambios fisiológicos que ocurren durante el desarrollo. Estas etapas se pueden considerar para plantas individuales y para poblaciones.

2.3 DIFERENCIALES DE MANCHA ANGULAR

Hasta 1996 no existía un grupo estandarizado de cultivares diferenciales de frijol que sirviera de comparación significativa de diferentes partes del mundo. Los diferenciales identificados y propuestos por el CIAT para determinar las razas de *P. griseola*, seis de origen Andino (Don Timoteo, G11796, Bolón Bayo, Montcalm, Amendion y G05686) y seis Mesoamericanos (Pan 72, G02858, Flor de Mayo, México 54, Bat 332 y Cornell 49242), fueron aceptados en un taller internacional desarrollado en Colombia en 1995. Este grupo ha sido utilizados para estudios de virulencia realizados por el CIAT y otros centros de investigación (Lienbenberg y Pretorius, 1997).

2.4 MARCADORES MOLECULARES PARA EL FITOMEJORAMIENTO

Gracias a los rápidos avances en la biología molecular, se cuenta con nuevas herramientas para el mejoramiento genético de las plantas. Entre ellas se destacan los marcadores moleculares, que son herramientas indispensables de apoyo a los programas clásicos de mejoramiento. Un marcador es un indicador de la presencia de otro carácter, que sirve para reconocerlo indirectamente (Beebe, 1997).

2.4.1 Base genética de un marcador

Beebe (1997), señala que hay dos posibilidades para explicar el efecto de un marcador. Entre estos están la pleiotropía, que es cuando el gen que influye al marcador también influye al carácter de interés; y el ligamiento genético, que implica que el gen que influye el marcador existe en cercanía al gen que influye el carácter de interés. Es decir, los dos genes se encuentran en el mismo cromosoma; y pasan de padre a prole juntos. El ligamiento genético no es permanente, se puede romper por el fenómeno llamado recombinación genética que cuando existe mayor distancia entre el marcador y el gen de interés hay mayor probabilidad de romper el ligamiento (Castro *et al.*, 2001).

2.4.2 Marcadores moleculares

En los últimos años se han desarrollado estrategias generales para la detección de polimorfismos moleculares como hibridación molecular, amplificación enzimática y secuenciación de ADN. Entre estos se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por “*Polymerase Chain Reaction*”), un método *in vitro* de amplificación enzimática de segmentos específicos de ADN que ha simplificado el estudio de la variación genética y ha transformado los análisis genéticos (Otero, 1997).

Los marcadores de ADN se basan en diferencias en longitud y/o secuencia de fragmentos de ADN. Los de diferente longitud se diferencian mediante electroforesis, donde los fragmentos más grandes migran en un gel más lentamente quedándose en su parte superior, y los pequeños migran más rápidamente y se ven más abajo en la gel. El polimorfismo o diferencia entre dos plantas se observa por el tamaño del fragmento (Beebe, 1997).

2.4.3 Tipos de Marcadores Moleculares

Beebe (1997), señala que los marcadores se basan en diferencias en la longitud y secuencia de sus fragmentos. Los marcadores moleculares han evolucionado rápidamente; 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 de Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Pedraza, 1997).

La técnica de PCR ha sido la base para el desarrollo y uso intensivo de marcadores como los RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), de los que se derivaron inicialmente los SCARs, los AFLPs (Polimorfismo de los Fragmentos Amplificados, que combinan aspectos de RAPDs y RFLPs), y finalmente los microsatélites (Aranda Rocha, 2000).

Para obtener marcadores del tipo RAPD, la técnica utilizada es más rápida, menos sofisticada y más apropiada para un programa de mejoramiento genético aplicado (Kelly, *et al.*, 1994). La electroforesis de enzimas es económica, rápida y los protocolos son relativamente sencillos. Por ejemplo construyeron un mapa genético de *Arabidopsis thaliana* usando RAPDs con poco esfuerzo; en sólo 4 meses marcaron y mapearon 225 loci, calcularon la eficiencia de mapeo para sus poblaciones y encontraron que los marcadores dominantes pueden ser tan eficientes como los codominantes cuando se usan poblaciones recombinantes (Otero, 1997).

2.4.4 Marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol

Entre los principales problemas del cultivo del frijol común están el mosaico común (MC), mosaico dorado amarillo (MDA), bacteriosis común (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*), mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), antracnosis, roya, mustia hilachosa (*Rhizoctonia solani*), picudo, salta hojas, gorgojos, baja fertilidad del suelo y sequía. En Mesoamérica y El Caribe se cultivan más de 500,000 ha de frijol de semilla pequeña de origen Mesoamericano (negros y rojos en su mayoría); y más de 200,000 ha de origen Andino (semilla grande). Los mayores progresos del mejoramiento genético se han obtenido en frijol de semilla pequeña, desarrollándose cultivares resistentes a mosaico común y dorado amarillo, picudo, bacteriosis común, mustia hilachosa y salta hoja (Singh, 1996).

Para asegurar el éxito en el mejoramiento genético es importante la identificación de padres donantes de genes necesarios de alta resistencia, que se hayan probado en evaluaciones repetidas en diferentes localidades y años contrastantes, para problemas importantes como VMDAF, mancha angular, picudo, bacteriosis, antracnosis y roya. Además de las evaluaciones realizadas en campo tanto para antracnosis, mancha angular y roya, se debe verificar las resistencias en invernaderos y laboratorios (Singh, 1996).

En los programas de mejoramiento genético, los padres donantes y líneas élites receptoras de genes se deben seleccionar y agrupar en las combinaciones que se van a cruzar, cuando ya se tiene la información necesaria de características morfológicas (adaptación, hábito de crecimiento), y agronómicas (reacción a estrés hídrico y baja fertilidad del suelo, plagas y rendimiento) de los cultivares que se quieren mejorar. Así se planifica cómo conformar las cruza finales, considerando la distancia genética entre los padres involucrados en cada crusa, sus relaciones y origen evolucionario como acervo y razas, tipo de semilla, y los genes útiles de resistencia que va a aportar (Singh, 1996).

Los marcadores que se han usado en el mejoramiento del frijol común para caracteres agronómicos son los morfológicos, incluyendo el hábito de crecimiento; reacción a enfermedades; tipo de proteína en semilla, como arcélina para resistencia al gorgojo; y los moleculares en base a ADN, como los RFLP, RAPD, SCAR y ASAP.

2.4.5 Marcadores moleculares tipo RAPD

En los años '90 se desarrollaron los marcadores RAPD, que son generados por la amplificación de segmentos aleatorios de ADN (Otero, 1997). Utiliza un solo cebador pequeño (6-10 pares de bases), de secuencia arbitraria con 50-80% del par guanina-citocina. Se basa en que la secuencia corta del cebador tiene más posibilidades de encontrar varios sitios complementarios en el genoma, originando la amplificación simultánea de varios fragmentos. El número de segmentos amplificados depende de la concentración y secuencia de bases en el ADN molde, de la longitud del cebador y de la temperatura de acoplamiento (Beebe, 1997).

El proceso consiste en el apareamiento aleatorio del cebador al molde de ADN en dos sitios, uno en cada cadena complementaria, y la amplificación del fragmento entre estos sitios mediante PCR. Los fragmentos obtenidos (200-3,000 pb) son identificados por su tamaño, determinados por la distancia entre los sitios de acoplamiento. El polimorfismo entre individuos puede deberse a cambios en una sola base, en la secuencia de uno o ambos sitios de acoplamiento o de los fragmentos amplificados entre ellos. Los polimorfismos generados por los RAPDs se deben a los cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento y por inserción de los fragmentos en estos sitios (Michelmore *et al.*, 1991).

Esta técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido a lo largo del genoma. Las bandas son generadas por la existencia de varios sitios de acoplamiento para un oligonucleótido en particular. En esta técnica no es posible distinguir homocigotos dominantes de heterocigotos para un fragmento en particular (Beebe, 1997). Los marcadores RAPDs son de naturaleza dominante/recesiva, ya que el carácter que se obtiene es la presencia/ausencia de una secuencia amplificada de ADN (Otero, 1997).

2.4.6 Aplicaciones de los marcadores RAPD

2.4.6.1 Mapeo genético e identificación de caracteres de interés. La elaboración de mapas genéticos es una herramienta importante para diseñar estrategias dentro de los programas de mejoramiento, pues permite manipular las características de interés agrícola con cierto grado de confiabilidad. Utiliza líneas isogénicas como diferentes generaciones (F_1 , F_2) de plantas cultivadas. Con estos se ha logrado identificar rápidamente marcadores ligados a genes de resistencia a diferentes enfermedades causados por bacterias, hongos, insectos, nemátodos y algunos virus (Otero, 1997)

Michelmore *et al.* (1991) desarrollaron el método de análisis de segregación en compuesto para identificar marcadores en regiones específicas del genoma. Dentro de cada compuesto los individuos son idénticos para la característica o gen de interés.

Pueden ser polimórficos (diferencia entre longitud de fragmentos de ADN y de naturaleza binaria: ausente o presentes), o monomórficos donde no existen variaciones, que son dos conjuntos contrastantes para la característica de interés. Al analizar los dos conjuntos se identifican a los marcadores que los distinguen (Castro *et al.*, 2001).

2.4.7 Uso de marcadores moleculares tipo RAPD

2.4.7.1 Extracción de ADN. El uso de RFLPs, PCR, AFLPs y librerías genómicas, para el análisis del genoma, depende de la habilidad de obtener ADN puro, con alto rendimiento y de buena calidad. Para esto se utilizan diversos métodos de extracción, de acuerdo con el tipo de tejido a emplear (fresco o seco). La mayor dificultad en la extracción de ADN vegetal, es la necesidad de romper la pared celular por que su composición dificulta la liberación de los constituyentes de las células (CIAT, 1999).

Para la extracción de ADN preferiblemente se debe utilizar tejido joven, debido a la alta actividad mitótica y en consecuencia mayor cantidad de material genético; y a que el tejido no esta lignificado, facilitando el rompimiento de la pared celular mediante técnicas que se complementan entre si: la química (químicos), mecánica (maceración de muestras de tejido) y la térmica (aplicación de calor). Con la extracción de ADN se logra purificar la muestra de sólidos y de ARN (Castro *et al.*, 2001).

2.4.7.2 Replicación de ADN. La reacción en Cadena de la Polimerasa, fue desarrollada por Mullis en 1983. Es una técnica para la duplicación enzimática *in vitro* de fragmentos específicos de ADN, en presencia de la enzima ADN polimerasa. Se basa en las propiedades del ADN que hacen posible su duplicación natural. Los puentes de hidrógeno que unen las cadenas complementarias se rompen para desnaturalizar la molécula de ADN en cadenas sencillas cuando esta es calentada a cierta temperatura. Siendo este proceso reversible, cuando la solución en que se encuentra el ADN es enfriada las cadenas complementarias se encuentran y reasocian en una molécula de doble cadena, mediante el apareo específico de bases. Los mecanismos necesarios para la PCR es la reacción del ADN a los cambios de temperatura (Castro *et al.*, 2001).

Para efectuar la reacción son necesarios una horma o molde (fragmento) de ADN, que provee la información genética de interés; como ejemplo, las secuencias ligadas a la resistencia a enfermedades o a la adaptación a condiciones ambientales adversas, que se desea amplificar para su visualización. Son necesarios los cebadores (“primers” en inglés), que son fragmentos “sintéticos” de ADN con una secuencia de bases nitrogenadas específica y conocida, que se acoplan en los segmentos de las cadenas individuales de ADN para comenzar el proceso de hibridización con el fragmento de ADN requerido. La *Taq*-polimerasa, proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, que extiende los cebadores (polimerización enzimática de ADN); es una polimerasa termoestable que puede ser sometida a cambios sucesivos y repetitivos de temperaturas que oscilan entre 70-100°C. Las bases nitrogenadas libres se encuentran en forma de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's), y son usadas para extender la nueva cadena de ADN mediante su acoplamiento a la original por acción de la *Taq*-polimerasa (Castro *et al.*, 2001).

2.4.7.3 Separación de ADN. La electroforesis es una técnica muy utilizada para la separación de los ácidos nucleicos y otras moléculas, , con base en su movimiento bajo la influencia de un campo magnético (Beebe, 1997).

Beebe (1997), señala que las diferencias en longitud que se observan al correr un gel resultan de la distancia entre los sitios en que los cebadores pueden unirse al ADN. Si la distancia entre los sitios de acoplamiento es más larga, el fragmento resulta más largo y lento para migrar en la gel, y se ubica en su parte superior. Si los sitios de acoplamiento están más cercanos, el fragmento es corto y corre más abajo en el gel.

2.5 MARCADORES MOLECULARES TIPO SCAR

Este es un tipo de marcador que se derivó del polimorfismo desarrollado por los marcadores moleculares tipo RAPD, para superar algunas de sus limitaciones. Los SCAR fueron introducidos en 1993 por Michelmore y sus colaboradores. Utilizan cebadores de 15-30 pb, diseñados a partir de secuencias encontradas mediante marcadores moleculares polimorficos (como los RAPDs) ligados a características de interés.

Según Beebe y Pedraza (1997), los SCAR (Regiones Amplificadas de Secuencia Caracterizada) son loci simples de ADN amplificados mediante la PCR de manera específica. Estos marcadores son más estables y proporcionan mayor confianza que los RAPD que generan polimorfismos; en muchos casos es necesario convertir los marcadores RAPD en SCAR para que su uso tenga un alto grado de confianza.

2.5.1 Marcador Molecular SCAR NO2. Dos marcadores RAPD OPN 02_{890c} y OPE 04_{650c}, fueron encontrados y están ligados en la pase de acoplamiento en 3.2 centimorgan (cM) y 12.5 cM del gen de resistencia a *P. griseola*. Para aumentar la reproducibilidad de la detección, el marcador OPN-02890c fue convertido a marcador SCAR. Esto fue con el propósito de designar al gen *Phg-2* como el de resistencia a la mancha angular, presente en Cornell 49-242 (Nietsche *et al.*, 2000).

El material genético para este estudio fue el cruce de los cultivares Cornell 49-242 y Rudá, resistente y susceptible a la mancha angular, respectivamente. El cultivar Cornell 49-242 es un material resistente a siete de 13 tipos de patógeno de *P. griseola* recientemente identificados en Minas (Brasil), (Nietsche *et al.*, 2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN ALS9951

3.1.1 Localización del Estudio

El estudio se realizó en las camas de infección asignadas al Programa de Investigaciones de 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. El estudio inició con evaluaciones fenotípicas por reacción a la mancha angular en las camas de infección, de plantas en generaciones F2, F3 y F4 de la población ALS 9951, por Díaz (primer semestre de 2001); y se continuó con las evaluaciones de las generaciones F5 y F6 (segundo semestre de 2001). De forma simultánea a la evaluación de la población F5 (octubre de 2001), en las camas de infección se realizaron evaluaciones fenotípicas de la reacción a la mezcla de inóculo utilizada, en los diferenciales de la mancha Angular.

3.1.2 Material Experimental

El material que se usó en el estudio proviene de una población segregante identificada como ALS 9951, derivada de la cruce de Tío Canela-75 x G06727. Tío Canela-75 es una variedad de frijol rojo pequeño liberada en Honduras en 1996, de Tipo II (hábito de crecimiento indeterminado arbustivo) y susceptible a la mancha angular (Zamorano, 1996). G06727, es un germoplasma de la región andina originario de Colombia, identificada como Guarzo- Popayán; es de color amarillo y rojo moteado, tiene grano grande (40g/100 semillas), presenta un hábito de crecimiento tipo I (determinado arbustivo) y es resistente a la mancha angular (CIAT,1992).

En el campo se sembraron los 12 genotipos diferenciales de la mancha angular con cuatro testigos. Este vivero fue evaluado al mismo tiempo que las plantas de la generación F5 de la población ALS 9951. Se usó inóculo de plantas infectadas con *P. griseola* proveniente de lotes comerciales del municipio de Güinope que es una zona aledaña a Zamorano.

Para la búsqueda de los marcadores moleculares asociados en la reacción de resistencia a *P. griseola*, se utilizó ADN extraído de las plantas individuales de la generación F5 de la población ALS 9951 identificadas como las más resistentes y las más susceptibles a la enfermedad.

3.1.3 Variables evaluadas y su medición

3.1.3.1 Severidad. Se evaluó la reacción a la inoculación con *P. griseola* utilizando la escala de severidad de daño sugerida por el CIAT (1987), que representa el nivel de desarrollo de los síntomas de la mancha angular.

3.1.3.2 Siembra. En octubre de 2001 se sembró en las camas de infección 40 familias F_{4,5}, 20 resistentes y 20 susceptibles, de la población ALS 9951 y sus padres con tres repeticiones. La siembra se hizo a una distancia de 15 cm entre plantas y 60 cm entre surcos, con 5 posturas por surco. Los progenitores, que se utilizaron como testigos, fueron sembrados con tres repeticiones cada 10 surcos. Se procuró un buen manejo proporcionando a las plantas condiciones adecuadas en sus requerimientos de fertilización, riego y control de insectos.

3.1.4 Inoculaciones

Se realizaron seis inoculaciones, desde a los 18 días después de la siembra (DDS) hasta los 60 DDS, a intervalos de una semana. Se utilizó inóculo líquido preparado con material vegetativo infectado con *P. griseola*, proveniente de hojas colectadas de plantas infectadas en la siembra anterior (generación F4) y de lotes comerciales infectados en zonas aledañas a Zamorano. El inóculo se preparó de hojas secas y frescas infectadas con *P. griseola*, mezclando 100 g del producto con 15 L de agua, y aplicándolo en las camas de infección con bombas de mochila. Las hojas infectadas por mancha angular fueron secadas por dos días para luego pulverizarlas y mezcladas con agua pasando la mezcla por los cedazos No. 10, 20, 40 y 60 para evitar obstruir la bomba de mochila. Las hojas frescas infectadas con *P. griseola* fueron licuadas a razón de 3 lb por cada inoculación, fueron pasadas por los cedazos No. 10, 20 y 40, e inoculados de forma similar a la anterior aplicando con una bomba de mochila de 15 L. Se hicieron dos pasadas uniformes sobre las plantas, procurando aplicaciones efectivas para el establecimiento del patógeno.

3.1.5 Evaluación de severidad

La evaluación de la severidad del daño causado por el patógeno en la población F5 se realizó a los 43 y 61 DDS utilizando la escala del CIAT. En la primera lectura se la evaluó la reacción por familia y en la segunda por plantas individuales. Las plantas fueron identificadas con etiquetas de plástico y las lecturas fueron registradas en los libros de campo, según el formato manejado por el PIF (Anexo 1).

3.2 USO DEL MARCADOR MOLECULAR SCAR NO2

El marcador SCAR NO2 está asociado al gen de resistencia la mancha angular denominado *Phg-2*. Este marcador fue evaluado por Díaz (2001) en plantas de la familia F4 de la misma población ALS 9951.

3.2.1 Localización del estudio

El estudio molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la CCPA de Zamorano. La siembra se realizó en las camas de infección manejadas por el PIF.

3.2.2 Características del germoplasma

La extracción del ADN se realizó en plantas de 21 familias F_{5,6} (11 familias resistentes y 10 susceptibles), como resultado de las evaluaciones fenotípicas realizadas en plantas F5.

3.2.3. Siembra

Las 21 familias fueron sembradas el 15 de febrero del 2002 empleando semillas recolectadas de plantas individuales de la familia F5 de la población ALS 9951. Como testigos se utilizaron los padres, sembradas al inicio y al final de las familias F_{5,6}.

3.2.4. Muestreo

Para la extracción de ADN de las familias F6 se realizó un muestreo recolectando tres brotes terminales en crecimiento activo a los 30 DDS. Las plantas fueron seleccionadas al azar, considerando que estas familias tienen una composición homocigota relativamente alta. El material vegetativo se colocó en tubos *ependorf* de 1.5 ml y se marcaron las plantas con etiquetas de plástico para su identificación.

3.2.5. Variables y su medición

Se evaluó la presencia o ausencia de las bandas indicadoras de resistencia (890 pb) o susceptibilidad de la mancha angular, usando el SCAR NO2 asociado al gen *Phg-2* (Díaz, 2001).

3.2.6 Extracción de ADN

El protocolo utilizado para extraer ADN puro fue el sugerido por la Universidad de Wisconsin-Madison (UW-Madison). Con el fin de romper las paredes celulares del tejido se usaron barras de *pexiglass* estériles para macerar muestras en los tubos *ependorf*, 500 µL de buffer PEX (etil xantogenato de potasio) para facilitar la ruptura de las paredes celulares (Anexo 3).

3.2.7 Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ADN de cada muestra se usó el fluorómetro (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant™200) que sus unidades son ng/µL, utilizando buffer TE de cuantificación para las muestras y para su calibración se usó ADN bovino estándar (100 ng/µL) (Anexo 4)

3.2.8 Dilución de ADN

La dilución del ADN se realizó a una concentración de 20 ng/ml, según el método sugerido por la Universidad de Wisconsin-Madison (Anexo 5).

3.2.9 Amplificación del ADN

El equipo utilizado para la amplificación de ADN fue el termociclador PCR-100™ (*Programable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling*). El programa de amplificación se usó el perfil térmico empleado por Niestche *et al* (2000) para marcadores moleculares SCAR NO2 (Anexo 9). La separación de fragmentos de ADN se efectuó en un tanque de electroforesis (*Maxicell EC 360M*, 22 orificios), empleándose gel de agarosa al 1%, y se utilizó 2µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).

En la electroforesis se utilizó una fuente de aplicación y regulación de voltaje (*Hoefer Scientific Instruments*, PS 250/2.5 AMP) (Anexo 10).

Para determinar la longitud de los fragmentos observados se utilizó una escalera de ADN de 100 pares de bases (100 pb DNA Ladder). Para la observación de las bandas, se utilizó un transiluminador de rayos ultravioletas (*Fotodyne*, Foto/UV[®] 26) y una cámara Polaroid[®] para fotografiar las geles y registrar los resultados (Aranda, 2000).

Como control positivo se utilizó una muestra de ADN de Cornell 49-242. Se visualizaron las muestras en un transiluminador y se registraron los resultados en fotografías instantáneas.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

Se identificó 5 familias resistentes y 5 susceptibles, de las que conformaron dos compuestos de ADN. Para la identificación de los marcadores moleculares tipo RAPD se usó 44 cebadores siguiendo el método de análisis segregante de ADN compuesto (Michelmore *et al.*, 1991). Entre los cebadores usados se incluyeron aquellos que han sido empleados en estudios anteriores y generando un alto grado de polimorfismo de ADN en plantas de frijol (Anexo 2).

3.3.1 Muestreo

Para la obtención de ADN de la generación de plantas F5, se realizó un muestreo de tejido a los 35 DDS; y para las plantas de la generación F6, a los 15 DDS. El tejido se obtuvo de las hojas más jóvenes (brotes terminales en crecimiento activo) y se colocó en tubos *ependorf* de 1.5 ml (Anexo 3). En la población F5 se recolectaron muestras de dos plantas individuales por familia, las que se marcaron con etiquetas plásticas en el campo para su cosecha. En la población F6, se tomaron mezclas al azar de plantas seleccionadas como las más resistentes y susceptibles, asumiendo que cada familia poseía una composición altamente homocigota.

Los protocolos utilizados para la extracción y cuantificación de ADN fueron similares a los especificados en los capítulos 3.2.6 y 3.2.7, respectivamente. La dilución del ADN se realizó a una concentración de 4 ng/ml, según el método sugerido por la Universidad de Wisconsin-Madison (Anexo 5). Para la amplificación de ADN se utilizó una mezcla maestra para marcadores RAPD (Cuadro 2). Las bandas fueron identificadas mediante su observación y determinación del peso molecular en la gel de agarosa, colocándose 21 muestras de las plantas F6 y como testigos sus padres. La escalera usada fue de 100 pares de bases.

3.3.2 Variables analizadas y su medición

La variable analizada en el laboratorio fue la presencia/ausencia de las bandas asociadas con las reacciones de resistencia/susceptibilidad de las cinco plantas mezcladas identificadas en el campo como resistentes y susceptibles en las generaciones F5 y F6 de la población ALS 9951. Las bandas fueron identificadas mediante separación en la gel de agarosa, visualizadas en el transiluminador y registradas en fotografías instantáneas. El análisis estadístico se realizó aplicando la

Distribución de X^2 (Chi cuadrado) de Pearson, para relacionar la concordancia entre los valores esperados y los observados de acuerdo a la segregación fenotípica de la reacción de las plantas a la inoculación con *P. griseola*.

Cuadro 2. Mezcla maestra para amplificar marcadores moleculares tipo RAPD.

| Componente | Volumen para una reacción (μ l) |
|--------------------------------------|---|
| Agua | 4.36 |
| Buffer (5X) | 4.40 |
| DNTP's (10 mM/u) + MgCl ₂ | 0.80 |
| Cebador (10 μ M) | 0.80 |
| <i>Taq</i> -polimerasa (5U/ μ l) | 0.50 |
| ADN (4ng/ml) | 10.00 |
| Volumen final | 20.00 |

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN ALS 9951 Y DE LOS DIFERENCIALES DE MANCHA ANGULAR

La evaluación fenotípica de familias F5 de la población ALS 9951 fue realizada en las camas de infección durante la época de postrera de 2001, empleando las escalas de severidad e incidencia del CIAT (1987). Se identificaron 11 plantas resistentes (calificación 1-5) y 10 susceptibles (calificación 6-9), provenientes de 20 familias F4 resistentes y 20 susceptibles, respectivamente (Anexo 1).

Los diferenciales de mancha angular se evaluaron durante la época de postrera de 2001. El grupo incluyó seis cultivares de origen Andino: Don Timoteo, G11796, Bolón Bayo, Montcalm, Amedoin y G05686; y seis cultivares de origen Mesoamericano: PAN 72, G02858, Flor de Mayo, Mex 54, BAT 332 y Cornell 49-242. Adicionalmente, se evaluaron los testigos Orguloso, Catrachita, Desarrural IR y Danlí-46. Se encontró que todos los diferenciales y los testigos presentaron susceptibilidad a la mancha angular, confirmando la virulencia de la mezcla de material infectado usado como inóculo. Debido a que este no provino de un cultivo monospórico (aislamiento puro del hongo), no se logró determinar la raza predominante de *P. griseola* usada en este estudio. Sin embargo, la susceptibilidad de todos los diferenciales indicó la máxima reacción posible (63-63), similar a la inducida por la raza del patógeno predominante en Honduras.

4.2 USO DE MARCADOR MOLECULAR SCAR NO2

En el año 2001, Díaz evaluó el marcador molecular SCAR NO2 en familias F4 de la población ALS 9951. El procedimiento para el uso de este marcador, que indica la presencia del gen *Phg-2* de resistencia a *P. griseola* (Niestche *et al.*, 2000), fue adaptado a las condiciones del laboratorio de Biología Molecular de Zamorano, encontrándose que la presencia de este gen no provee resistencia a la raza predominante que afecta mayormente al cultivo de frijol en Honduras y Nicaragua (Díaz, 2001).

Con la mezcla maestra empleada para marcadores moleculares SCAR (Anexo 7), se amplificaron 21 muestras de ADN provenientes de plantas individuales F6 de la población ALS 9951 (11 resistentes y 10 susceptibles), sembradas en la época de primera del año 2002. Como control positivo se usó una muestra de ADN de la línea Cornell 49-242, identificada por Díaz (2001). Se encontró que las bandas observadas no se ajustan a las esperadas de acuerdo a la evaluación fenotípica ($P < 0.01$), (Figura 1), sugiriendo que los resultados obtenidos en estas evaluaciones de ADN se atribuyen al azar. Niestche *et al.* (2000) señalan que el SCAR NO2 es útil cuando predominan las razas 63-19 y 31-17, donde el gen *Phg-2* actúa como una importante fuente de resistencia. Esto justifica la necesidad de identificar marcadores moleculares RAPD en las fuentes andinas resistentes (G06727 y G05686) bajo condiciones de

Honduras, como un primer paso para encontrar genes que se encuentren potencialmente ligados a la resistencia a las razas de la mancha angular predominantes en la región.

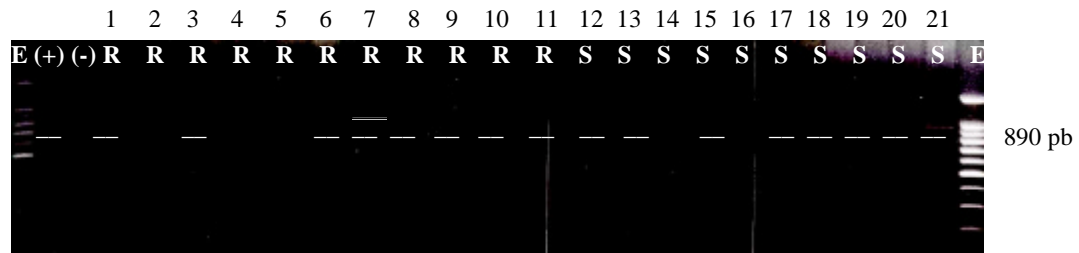


Figura 1. Bandas generadas por el marcador SCAR NO2₈₉₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002.

Cuadro 3. Resultados del análisis de Chi-cuadrado en ADN compuesto de plantas F6 de frijol evaluadas con el SCAR NO2.

| Clase (fenotipo) | Observado (RAPD) | Esperado (campo) | Obs-Esp | $[(O-E)-0.5]^2/E$ |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------|--------------------|
| Resistente | 8 | 11 | -3 | 1.1136 |
| Susceptible | 2 | 10 | -8 | 7.2250 |
| Total | 10 | 21 | | $(X^2) = 8.3386^*$ |

* Nivel de significancia á 0.01

4.3 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

4.3.1 Amplificación de ADN

Se realizó la amplificación de las muestras de ADN empleando una mezcla maestra, variando en las cantidades de *Taq* polimerasa y agua (Cuadro 2). Con estos ajustes en la mezcla maestra, se obtuvieron bandas muy claras, con buena nitidez y resolución de la presencia o ausencia de bandas polimórficas ligadas a la resistencia a la mancha angular. Se probaron 44 cebadores siguiendo el método de análisis compuesto de ADN segregante propuesto por Michelmore *et al.* (1991). El perfil térmico de la PCR utilizado en estos análisis fue el sugerido para RAPD por la UW-Madison.

4.3.2. Separación de ADN (electroforesis)

La separación de ADN se realizó empleándose geles de agarosa al 1%. Con modificaciones en el tiempo de duración (50 minutos) de la electroforesis y el voltaje (140 V), se obtuvo una clara visualización de las bandas de ADN.

4.3.3 Marcadores ligados al gen de resistencia a la mancha angular en mezclas compuestas de ADN de plantas F5 y F6

Las mezclas de ADN extraídas de plantas resistentes y susceptibles a la mancha angular, fueron evaluadas con 44 cebadores (Anexo 2). Se logró identificar cinco

bandas de ADN aparentemente asociadas a las reacciones indicadas, observándose los mejores resultados al usar ADN compuesto de plantas F5 (Figura 2). Los cebadores RAPD identificados ligados a la resistencia a la mancha angular fueron el W06 (1200 pb), G3 (1400 y 1100 pb), W09 (1200 pb), B10 (1200 pb) y P09 (300 pb). Estos posibles marcadores se evaluaron con plantas F6 derivadas de familias F5 de la población ALS 9951 (Figura 3). Se observó resultados similares en los ADN compuestos de plantas F5 y F6, en cuanto a la presencia de bandas polimórficas asociadas a la resistencia y susceptibilidad a la mezcla de inóculo de la mancha angular usado en el estudio.

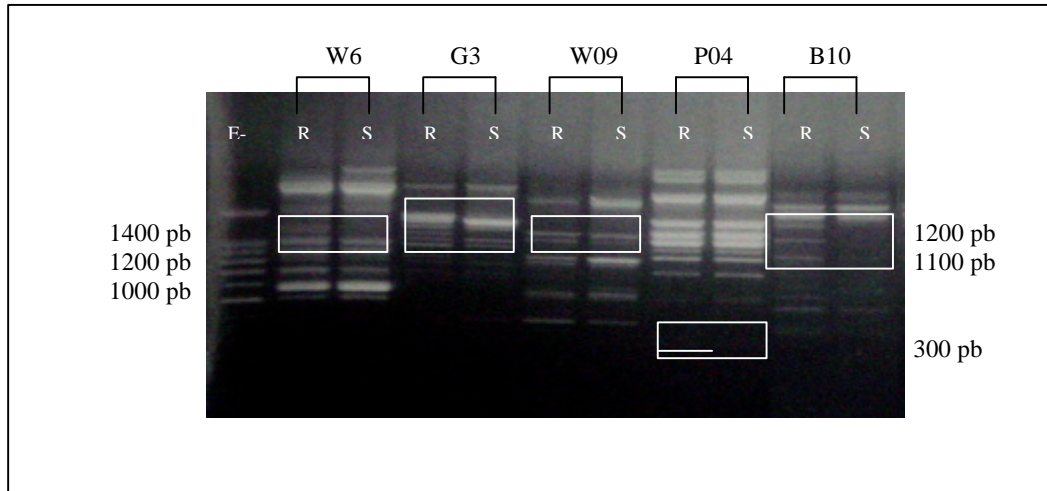


Figura 2. Expresión de bandas polimórficas asociadas a la resistencia a la mancha angular en ADN compuesto de plantas F5 resistentes y susceptibles de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras, 2002.

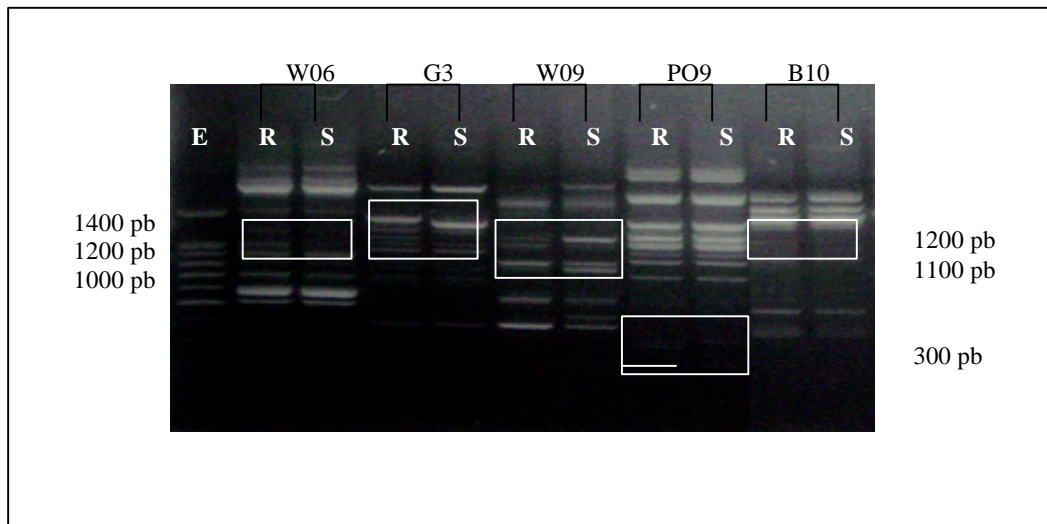


Figura 3. Expresión de bandas polimórficas asociadas a la resistencia a la mancha angular en ADN compuesto de plantas F6 resistentes y susceptibles de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras, 2002.

4.3.4 Marcadores moleculares RAPD ligados a la resistencia a la mancha angular en plantas individuales F6

4.3.4.1 Evaluación con el cebador RAPD W06. Los resultados obtenidos al usar el cebador W06 en ADN de 21 plantas F6 fueron 6 plantas resistentes observadas de 11 esperadas, según las evaluaciones de campo; mientras que con las plantas susceptibles se observaron 7 de 10 esperadas (Figura 4). Estos resultados indican que el posible marcador no se ajusta a la expresión esperada (P 0.05), (Cuadro 3), sugiriendo que los valores observados pueden deberse al azar.

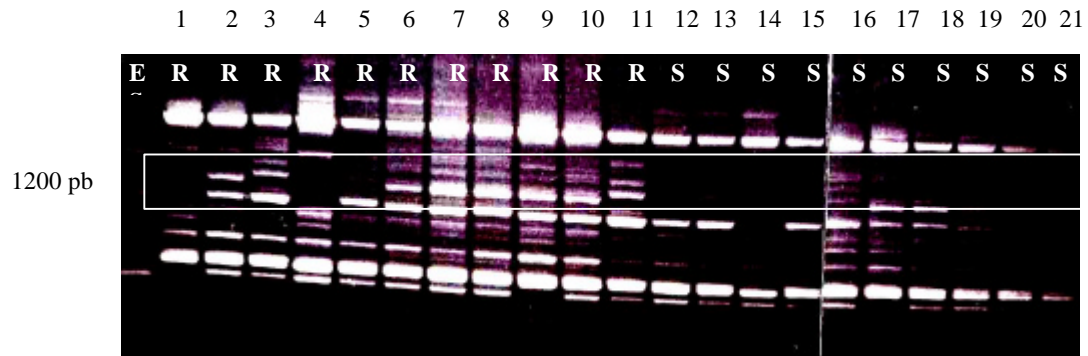


Figura 4. Bandas polimórficas generadas por el cebador W06₁₂₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002.

Cuadro 4. Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador W06₁₂₀₀.

| Clase (fenotipo) | Observado (RAPD) | Esperado (Campo) | Obs-Esp | $[(O-E)-0.5]^2/E$ |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------|-------------------|
| Resistente | 6 | 11 | -5 | 2.75 |
| Susceptible | 7 | 10 | -3 | 1.225 |
| Total | 13 | 21 | | $(X^2) = 3.975^*$ |

* Nivel de significancia á 0.05

4.3.4.2 Evaluación con el cebador RAPD G3. Los resultados obtenidos con el cebador G3 fueron dos bandas a 1400 y a 1100 pb. En la banda de 1400 pb se observaron 8 plantas resistentes de 11 materiales con esa reacción al nivel de campo, mientras que las 10 plantas esperadas como susceptibles expresaron esa condición. Este polimorfismo generado por el cebador G3 a 1400 pb, se considera el marcador con mejor ajuste entre la expresión fenotípica de campo y la genética a nivel de laboratorio (Cuadro 4). En la banda de 1100 pb se observaron 8 plantas resistentes de 11 esperadas, y 9 susceptibles de 10 esperadas. Esta banda también presenta tiene un buen ajuste (P 0.05), lo que sugiere que los datos observados no se deben al azar (Cuadro 5).

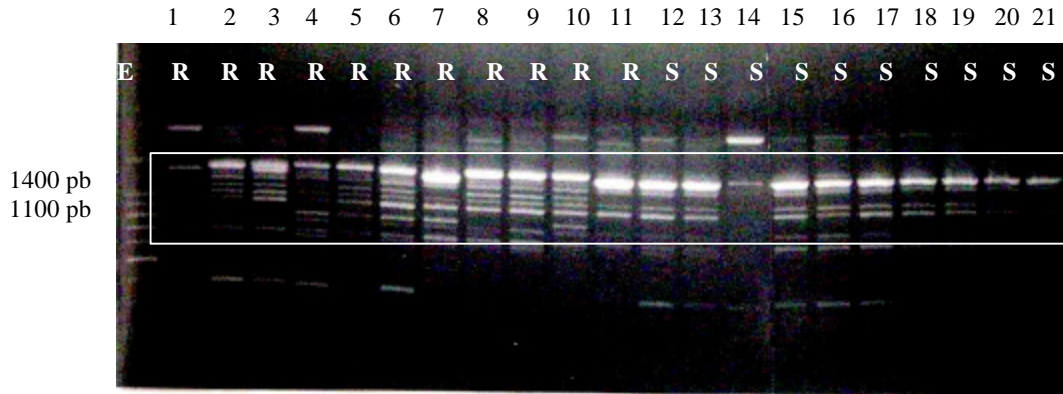


Figura 5. Bandas polimórficas generadas por el cebador G3₁₄₀₀ y G3₁₁₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002.

Cuadro 5. Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador G3₁₄₀₀.

| Clase (fenotipo) | Observado (RAPD) | Esperado (campo) | Obs-Esp | $[(O-E)-0.5]^2/E$ |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------|--------------------|
| Resistente | 8 | 11 | -3 | 1.1136 |
| Susceptible | 10 | 10 | 0 | 0.0250 |
| Total | 18 | 21 | | $(X^2) = 1.1386^*$ |

* Nivel de significancia á 0.05

Cuadro 6. Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador G3₁₁₀₀.

| Clase (fenotipo) | Observado (RAPD) | Esperado (Campo) | Obs-Esp | $[(O-E)-0.5]^2/E$ |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------|--------------------|
| Resistente | 8 | 11 | -3 | 1.1136 |
| Susceptible | 9 | 10 | -1 | 0.2250 |
| Total | 18 | 21 | | $(X^2) = 1.3386^*$ |

* Nivel de significancia á 0.05

4.3.4.3 Evaluación con el cebador RAPD W09. En la evaluación con el cebador W09 en ADN de 21 plantas F6, se obtuvo a la altura de 1000 pb, 9 plantas que mostraron la banda de 11 materiales identificados en el campo como resistentes; y 5 plantas de 10 identificadas susceptibles. Estos resultados muestran que no hubo un ajuste significativo (P 0.05) entre los resultados esperados y los observados en la expresión de bandas de ADN (Cuadro 6).

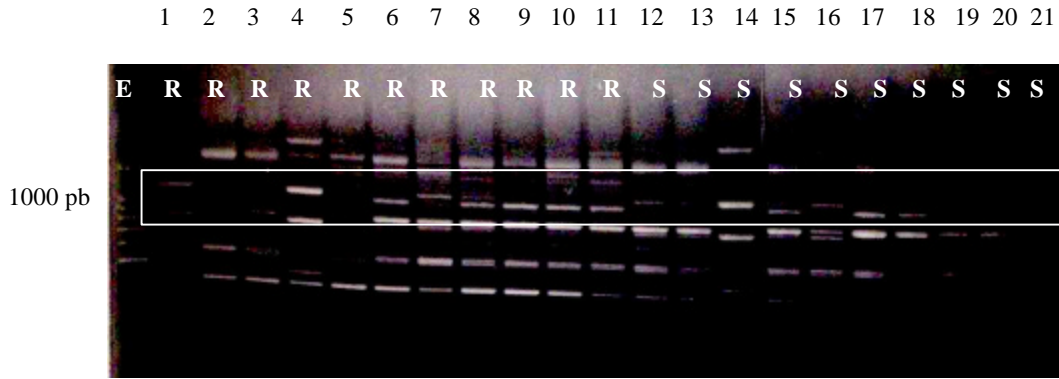


Figura 6. Bandas polimórficas generadas por el cebador W09₁₀₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002.

Cuadro 7. Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador W09₁₀₀₀.

| Clase (fenotipo) | Observado (RAPD) | Esperado (Campo) | Obs-Esp | $[(O-E)-0.5]^2/E$ |
|------------------|------------------|------------------|---------|--------------------|
| Resistente | 9 | 11 | -2 | 0.5681 |
| Susceptible | 5 | 10 | -5 | 3.0250 |
| Total | 14 | 21 | | $(X^2) = 3.5931^*$ |

* Nivel de significancia á 0.05

4.3.4.4 Evaluación con el cebador RAPD P09. Al utilizar el cebador P09 a 300 pb en ADN de 21 plantas F6, se observó 9 bandas polimórficas de 11 muestras evaluadas en el campo como resistentes; y 7 susceptibles de 10 observadas en la evaluación de campo. Estos datos muestran un ajuste al modelo de bandas esperado con la expresión fenotípica observada, con una P 0.05 (Cuadro 7).

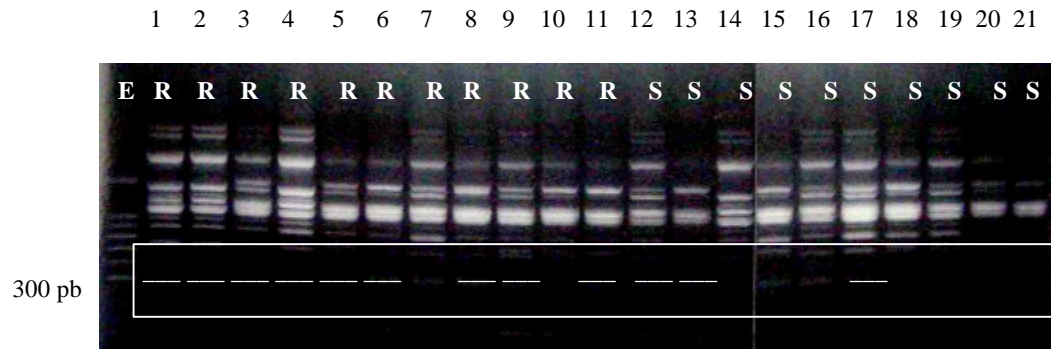


Figura 7. Bandas polimórficas generadas por el cebador P09₃₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002.

Cuadro 8. Resultados del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador P09₃₀₀.

| Clase (fenotipo) | Observado (RAPD) | Esperado (Campo) | Obs-Esp | $[(O-E)-0.5]^2/E$ |
|------------------|------------------|------------------|---------|--------------------|
| Resistente | 9 | 11 | -2 | 0.5681 |
| Susceptible | 7 | 10 | -3 | 1.2250 |
| Total | 16 | 21 | | $(X^2) = 1.7931^*$ |

* Nivel de significancia á 0.05

4.3.4.5 Evaluación con el cebador RAPD B10. Los resultados obtenidos con el cebador B10 a 1200 pb en ADN de 21 plantas F6, son 6 plantas de 11 esperadas como resistentes, de acuerdo con la evaluación de campo; y 6 plantas de 10 observadas susceptibles. Con una P 0.05, no existe un buen ajuste a la expresión de bandas esperada por lo que los resultados se atribuye al azar (Cuadro 8).

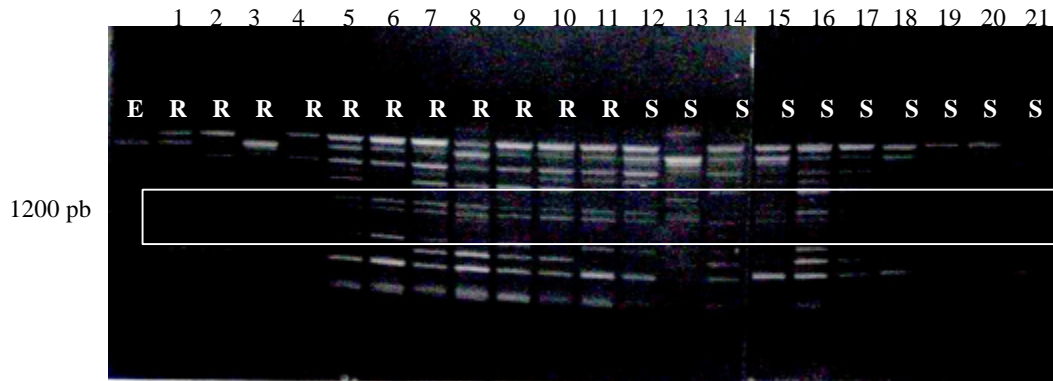


Figura 8. Bandas polimórficas generadas por el cebador B10₁₂₀₀ en ADN compuesto de plantas F6 de frijol. Zamorano, 2002.

Cuadro 9. Resultado del análisis de Chi-cuadrado en plantas F6 evaluadas con el cebador B10₁₂₀₀.

| Clase (fenotipo) | Observado (RAPD) | Esperado (Campo) | Obs-Esp | $[(O-E)-0.5]^2/E$ |
|------------------|------------------|------------------|---------|--------------------|
| Resistente | 6 | 11 | -5 | 2.7500 |
| Susceptible | 6 | 10 | -4 | 2.0250 |
| Total | 12 | 21 | | $(X^2) = 4.7750^*$ |

* Nivel de significancia á 0.05

Los resultados de los análisis de Chi-cuadrado sugieren que los cebadores y bandas G3₁₁₀₀, G3₁₄₀₀ y P09₃₀₀, muestran el mejor ajuste a la expresión fenotípica de resistencia y susceptibilidad a la mancha angular observada en las evaluaciones de campo (P 0.05). Por otro lado, las relaciones de los polimorfismos entre los

marcadores W06, W09 y B10 y las reacciones de resistencia y susceptibilidad, no presentan un ajuste significativo al modelo esperado, por lo que los resultados son atribuidos al azar y no a una asociación genética (Cuadro 9).

El polimorfismo de 1400 pb generado con el marcador G3 presentó el mejor ajuste al modelo de bandas observados y esperadas, por lo que se considera el más confiable para buscar una asociación con la expresión de resistencia a la mancha angular.

Cuadro 10. Resultados de los análisis de Chi-cuadrado de las evaluaciones con los marcadores moleculares RAPD W06₁₂₀₀, G3₁₄₀₀ y ₁₁₀₀, W09₁₁₀₀, P09₃₀₀ y B10₁₂₀₀.

| Cebador | Esperado (R:S) | Observado (R:S) | (X²) | Probabilidad |
|----------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------|
| W06 (1200 pb) | 11:10 | 6:7 | 3.9750 | 0.050>P>0.025 |
| G3 (1400 pb) | 11:10 | 8:10 | 1.1386 | 0.500>P>0.250 |
| G3 (1100 pb) | 11:10 | 8:9 | 1.3386 | 0.250>P>0.100 |
| W09 (1100 pb) | 11:10 | 9:5 | 3.5931 | 0.100>P>0.050 |
| P09 (300 pb) | 11:10 | 9:7 | 1.7931 | 0.250>P>0.100 |
| B10 (1200 pb) | 11:10 | 6:6 | 4.7750 | 0.050>P>0.025 |

5. CONCLUSIONES

1. Los marcadores RAPD G3₁₄₀₀, G3₁₁₀₀ y PO9₃₀₀, son los más confiables para estudios posteriores que permitan identificar ligamientos con los genes de resistencia a las razas predominantes en la región de la mancha angular en frijol común. Los marcadores WO6₁₂₀₀, W09₁₁₀₀, B10₁₂₀₀ generaron polimorfismos menos confiables en los compuestos de ADN de plantas resistentes y susceptibles.
2. Con el uso de marcadores moleculares ligados a la resistencia a la mancha angular, se puede comprobar la efectividad de la cruce de germoplasma andino resistente con germoplasma mesoamericano susceptible a las razas predominantes en la región.
3. El marcador SCAR NO2 es efectivo para verificar la incorporación del gen *Phg-2* en germoplasma de frijol. Aunque no se utilizó aislamientos específicos de razas de *P. griseola*, aparentemente no confiere resistencia a las razas predominantes en la región, representadas principalmente por la 63-63.
4. El método de ADN compuesto de plantas que segregan por resistencia y susceptibilidad a *P. griseola*, es un primer paso para estudios posteriores donde se deben emplear poblaciones segregantes y razas específicas del patógeno.

6. RECOMENDACIONES

1. Obtener aislamientos de *P. griseola* para identificar razas específicas con las que se debe trabajar en estudios posteriores con marcadores moleculares, que permitan identificar aquellos ligados a la resistencia del germoplasma andino y mesoamericano de frijol.
2. Usar poblaciones completas constituidas por líneas homocigotas (F6) para determinar marcadores ligados a la resistencia a la mancha angular.
3. Continuar evaluando las líneas F6 resistentes de la población ALS 9951 para avanzar la selección de material élite, sembrándolas en el campo bajo diferentes condiciones ambientales.
4. Seguir estudios con marcadores moleculares RAPD para posteriormente a partir de estos, generar marcadores SCAR específicos para las diferentes razas de *P. griseola* predominantes en la región.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aranda Rocha, L.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. El Zamorano, Honduras, EAP. 81 p.
- Beebe, S.E.; Pastor-Corrales, M.A. 1991. Breeding for disease resistance. *In: Common Bean: Research for Crop Improvement*. Ed. Van Schoonhoven, A. y Voyses, O. CAB, Orston, UK. p 561-617.
- Beebe, S. 1997. Marcadores Moleculares para brutos (y para frijoleros). s.l., s.n.t., 11 p. (manuscrito).
- Beebe, S.; Pedraza, F. 1998. Perspectivas para el uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. *In: Taller Internacional de Mejoramiento Genético de Frijol Negro Mesoamericano*. Ed. por Lépiz, R. Guatemala, PROFRIJOL. p 125-140.
- Campos-Ávila, J. 1987. Enfermedades del frijol. México, Ed. Trillas. 132p.
- Castaño, J.; Del Río, L. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. 3ª ed. Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press (ISBN 1885995-16-4). Publicación DPV-EAP No. 147. 290 p.
- Castro, A.; Rosas, J.C.; Aranda, L. 2001. Manual del Módulo de Biotecnología. EAP, Zamorano. 19 p (manuscrito).
- Chacón, M.I.; Jara, C.; Castellanos, G.; Posso, C.E.; Buruchaga, R.; Cuasquer, J.B.; Pastor-Corrales, M.A. 1996. Diversidad genética y relación entre aislamientos de África y América Latina del hongo de la mancha angular del frijol común: Implicaciones para el mejoramiento genético. *In: Memoria del Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina*. Cali, Colombia, CIAT. p 130-142.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Trad. por EDITEC. Ed. por Mata F., van Schoonhoven, A. y Pastor-Corrales, M.A. (comps.). Cali, Colombia, CIAT. 56 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1992. Catálogo de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Ed. Hidalgo, R.; Rubiano, H.; Toro, O. Cali, Colombia, CIAT. 450 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1999. Bean Program 1998 Annual Report. Cali, Colombia, CIAT. P. 55-70

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

EAP (Escuela Agrícola Panamericana). 1994. Enfermedades del frijol: La Mancha Angular. Departamento de Agronomía, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras (trifolio Ilustrado).

EAP (Escuela Agrícola Panamericana). 1996. Tío Canela: una nueva variedad de frijol de grano rojo de excelente potencial para zonas bajas e intermedias de la región centroamericana. Publ. AG-9605, Departamento de Agronomía, EAP/Zamorano, Honduras. 12 p.

Elvir Guevara, F.M. 1998. Evaluación de pérdidas en rendimiento ocasionadas por la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 20 p.

Fernández, F.; López, M. 1985. FRIJOL: Investigación y Producción. Cali, Colombia. CIAT. 417 p.

Kelly, J.; Afanador, L.; Harley, S.; Milkas, P. 1994. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento de frijol. *Agronomía Avanzada (Costa Rica)* 5:1-7.

Liebenberg, M.M.; Pretorius, Z. 1997. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *In African Plant Protection* 3(2): 81-106 p.

López, M.; Fernández, F. 1985. Frijol: Investigación y Producción. *In Referencia de los cursos de capacitación sobre Frijol por el Centro Internacional de Agricultura Tropical*. Ed. M. López; F. Fernandez. Cali-Colombia. CIAT. 417 p.

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

Michelmore, R.W.; Paran, I.; Desselu, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Genetics* 88:9828-9832.

Otero, A. 1997. El Uso de los RAPD's como Marcadores Moleculares en Plantas. D.F., México Vol. 60: 85- 117.

Pazmiño, R. 2001. Guía del Cultivo del Frijol. (En línea). México. Consultado 4 Septiembre 2001. Disponible en: www.infoagro.go.cr/tecnologia/frijol.html

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

Rosas, J.C. 1998. El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press. 52 p.

Rosas, J.C.; Castro, A.; Flores, E. 2000. Mejoramiento genético del frijol rojo y negro Mesoamericano para Centro América y El Caribe. *Agronomía Mesoamericana*. 2: 37-46.

Singh, S.P. 1996. Progreso, problemas y el futuro del mejoramiento de frijoles mesoamericanos y la mejora genética integrada. *In: Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina*. Ed. por S. Singh y O. Voysest. Cali, Colombia, CIAT. p. 334-350.

Voysest, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de las variedades de América Latina. Cali, Colombia. CIAT. 195 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Evaluación fenotípica de la población ALS 9951**Poblaciones ALS 9951 F5****Título: Población ALS 9951 F5**

Fecha siembra: 18-10-01

Procedencia: Poblaciones ALS 9951 F4

Ubicación: Cama # 6

Antecedente: TGD F4

Tamaño parcela: 1.2

Descripción: 40 Familias F4

| | | | Planta A | | Planta B | |
|----|----|--------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| Nº | #S | IDENT. | Severidad | Incidencia | Severidad | Incidencia |
| | 1 | TC-75 A | 9 | 100 | 9 | 100 |
| | 2 | GO6727 A | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | | RESISTENTES | | | | |
| 1 | 3 | ALS 9951-130 | 4 | 70 | 8 | 95 |
| 2 | 4 | ALS 9951-167 | 5 | 20 | 5 | 1 |
| 3 | 5 | ALS 9951-114 | 3 | 20 | 2 | 5 |
| 4 | 6 | ALS 9951-159 | 4 | 10 | 7 | 10 |
| 5 | 7 | ALS 9951-35 | 1 | 0 | 2 | 5 |
| 6 | 8 | ALS 9951-51 | 5 | 70 | 8 | 80 |
| 7 | 9 | ALS 9951-104 | 2 | 5 | 2 | 10 |
| 8 | 10 | ALS 9951-169 | 5 | 5 | 3 | 20 |
| 9 | 11 | ALS 9951-135 | 5 | 10 | 7 | 60 |
| 10 | 12 | ALS 9951-168 | 9 | 50 | 9 | 70 |
| 11 | 13 | ALS 9951-32 | 2 | 5 | 3 | 5 |
| 12 | 14 | ALS 9951-37 | 1 | 0 | 4 | 20 |
| 13 | 15 | ALS 9951-142 | 3 | 10 | 7 | 30 |
| 14 | 16 | ALS 9951-42 | 2 | 10 | 2 | 20 |
| 15 | 17 | ALS 9951-29 | 5 | 5 | 4 | 20 |
| 16 | 18 | ALS 9951-117 | 4 | 20 | 8 | 80 |
| 17 | 19 | ALS 9951-177 | 3 | 30 | 2 | 2 |
| 18 | 20 | ALS 9951-39 | 5 | 30 | 7 | 80 |
| 19 | 21 | ALS 9951-141 | 5 | 40 | 3 | 5 |
| 20 | 22 | ALS 9951-18 | 9 | 80 | 4 | 60 |
| | 23 | TC-75 B | 9 | 100 | 9 | 100 |
| | 24 | GO6727 B | 2 | 5 | 1 | 0 |

| N° | #S | IDENT. | Planta A | | Planta B | |
|----|----|---------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| | | | Severidad | Incidencia | Severidad | Incidencia |
| | | SUSCEPTIBLES | | | | |
| 21 | 25 | ALS 9951-23 | 8 | 70 | 9 | 60 |
| 22 | 26 | ALS 9951-94 | 9 | 90 | 9 | 95 |
| 23 | 27 | ALS 9951-138 | 7 | 70 | 8 | 30 |
| 24 | 28 | ALS 9951-112 | 9 | 95 | 9 | 100 |
| 25 | 29 | ALS 9951-154 | 8 | 90 | 8 | 80 |
| 26 | 30 | ALS 9951-19 | 9 | 90 | 9 | 80 |
| 27 | 31 | ALS 9951-57 | 5 | 50 | 4 | 30 |
| 28 | 32 | ALS 9951-70 | 8 | 60 | 7 | 40 |
| 29 | 33 | ALS 9951-134 | 9 | 95 | 9 | 95 |
| 30 | 34 | ALS 9951-68 | 3 | 20 | 4 | 50 |
| 31 | 35 | ALS 9951-128 | 9 | 70 | 9 | 70 |
| 32 | 36 | ALS 9951-137 | 9 | 95 | 9 | 90 |
| 33 | 37 | ALS 9951-149 | 8 | 70 | 4 | 40 |
| 34 | 38 | ALS 9951-151 | 7 | 90 | 8 | 85 |
| 35 | 39 | ALS 9951-98 | 9 | 90 | 9 | 70 |
| 36 | 40 | ALS 9951-99 | 8 | 90 | 8 | 80 |
| 37 | 41 | ALS 9951-131 | 4 | 30 | 4 | 30 |
| 38 | 42 | ALS 9951-175 | 9 | 95 | 9 | 100 |
| 39 | 43 | ALS 9951-184 | 8 | 60 | 8 | 70 |
| 40 | 44 | ALS 9951-197 | 3 | 5 | 4 | 50 |
| | 45 | TC-75 C | 9 | 95 | 9 | 100 |
| | 46 | GO6727 C | 1 | 0 | 1 | 0 |

■ Plantas seleccionadas para mezclas compuestas de 5 resistentes y 5 susceptibles.

Anexo 2. Cebadores RAPD usados para Identificar marcadores moleculares ligados a la resistencia de la mancha angular en frijol común

Cebadores RAPD usados para identificar marcadores moleculares ligados a la resistencia de la mancha angular en frijol común

| RAPD | SECUENCIA | pmoles | ug/tube |
|-------------|------------------|---------------|----------------|
| OPH 13 | GACGCCACAC | 5265 | 15.5 |
| OPA-02 | TGCCGAGCTG | 5493 | 16.5 |
| OPH-04 | GGAAGTCGCC | 5158 | 15.5 |
| OPH-05 | AGTCGTCCCC | 6014 | 18.0 |
| OPH-08 | GAAACACCCC | 5088 | 15.0 |
| OQ4 | AGTGCGCTGA | 5088 | 15.5 |
| OH20 | GGGAGACATC | 4799 | 14.5 |
| OAB3 | TGGCGCACAC | 5377 | 16.0 |
| OAH1 | TCCGCAACCA | 5413 | 16.0 |
| OAK 20 | TGATGGCGTC | 5413 | 16.5 |
| OZ4 | AGGCTGTGCT | 5413 | 16.5 |
| OW13 | CACAGCGACA | 4892 | 14.5 |
| OAD19 | CTTGGCACGA | 5300 | 16.0 |
| OS13 | GTCGTTCCCTG | 6059 | 18.0 |
| OC20 | ACTTCGCCAC | 5783 | 17.0 |
| OC11 | AAAGCTGCGG | 4799 | 14.5 |
| OR2 | CACAGCTGCC | 5615 | 16.5 |
| OJ13 | CCACACTACC | 5654 | 16.5 |
| OAC20 | ACGGAAGTGG | 4625 | 14.5 |
| OAE19 | GACAGTCCCT | 5531 | 16.5 |
| OG15 | ACTGGGACTC | 5300 | 16.0 |
| OY6 | AAGGCTCACC | 5192 | 15.5 |
| OPH19 | CTGACCAGCC | 5615 | 16.5 |
| OPC4 | CCGCATCTAC | 5783 | 17.0 |
| OPI 07 | CAGCGACAAG | 4710 | 14.5 |
| OPQ09 | GGTAACCGA | 4988 | 15.0 |
| OPR09 | TGAGCACGAG | 4799 | 14.5 |
| O16 | TCGGCGGTTC | 5874 | 18.0 |
| W6 | AGGCCCGATG | 5158 | 15.5 |
| TO7 | GGCAGGCTGT | 5265 | 16.0 |
| O13 | GTCAGAGTCC | 5300 | 16.0 |
| G3 | GAGCCCTCCA | 5615 | 16.5 |
| R04 | CCCGTAGCAC | 5615 | 16.5 |
| X01 | CTGGGCACGA | 5158 | 15.5 |
| U1 | ACGGACGTCA | 4988 | 15.0 |
| W09 | GTGACCGAGT | 5088 | 15.5 |
| m12 | GGGACGTTGG | 5056 | 15.5 |
| O19 | GGTGCACGTT | 5413 | 16.5 |
| PO9 | GTGGTCCGCA | 5493 | 16.5 |
| q14 | GGACGCTTCA | 5300 | 16.0 |
| B10 | CTGCTGGGAC | 5493 | 16.5 |
| O15 | TGGCGTCCTT | 6059 | 18.0 |
| LO4 | GACTGCACAC | 5192 | 15.5 |
| u19 | GTCAGTGCGG | 5265 | 16.0 |

Anexo 3. Extracción de ADN para el análisis de RAPDs (Método de la UW-Madison)

1. Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes).
2. Agregar 50 μ l del *buffer* de extracción (PEX) en un tubo de microcentrifuga *ependorf* de 1.5 ml. Macerar el tejido en el 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 min.
5. Centrifugar la muestra durante 10 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrifuga, para concentrar (*pellet*) los residuos de tejido.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo *ependorf* de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
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 microcentrifuga.
8. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300 μ l de RNAasa A (concentración de 100 μ g/ml) + *buffer* TE^a 0.1X (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 microcentrifuga de 1.5 ml.
11. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
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. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).

16. Rehidratar los pellets agregando 100-200 μ l de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos a 65 °C en baño maría durante 3 min.
17. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN (ng/ml), con el fin de preparar las diluciones necesarias para efectuar las reacciones para su amplificación.

^a Buffer TE (TRIS HCl 1 M, pH=7.5 ; EDTA 0.5 M, pH=8.0)

^b Usar acetato de sodio 3H₂O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

Anexo 4. Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., D y NA Quant™200)

1. Colocar 2 ml de *buffer* de cuantificación en una cubeta (*cuvette*) limpia y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 µl de muestra de ADN 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, enjuagarlo 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 µl solución para tinción concentrada + 100 ml buffer TNE 1X (pH=7.4)

Anexo 5. Diluciones de ADN (a 4 y 20 ng/ml) según el método de la UW-Madison

Dilución de ADN a 4 ng/ml

1. Agregar 100 µl 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 muestra en platos de 96 celdas con fondo redondeado (MicroplateTM96, 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.

Dilución de ADN a 20 ng/ml

1. Agregar 100 µl 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 $V_i = 2000 / C_i - 20$.
3. Diluir las muestra en platos de 96 celdas con fondo redondeado (MicroplateTM96, Polypropylene, MJ Research, INC.). Cubrir las celdas del plato 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 6. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores tipo 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 10 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 el plato en el termociclador y sellarlo con papel plástico para platos de 96 celdas (Microseal TM "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 (μ l) |
|--|--------------------------|
| Agua | 4.36 |
| Buffer (5 X) | 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 (4ng/ml) | 10.00 |
| Volumen final | 20.00 |

Anexo 7. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores tipo SCAR

1. Descongelar el ADN a temperatura ambiente del plato con las muestras diluidas de ADN guardados en el refrigerador.
2. Realizar los cálculos pertinentes para preparar la mezcla de reacción, según el cuadro anexo.
3. Preparar la mezcla de reacción sin incluir las muestras de ADN.
4. Colocar 13 μ l de la mezcla de reacción a cada celda del plato, luego agregar 2 μ l de muestra de ADN.
5. Tapar con papel plástico (Microseal TM "A") la caja de reacción (platos de 96 celdas).
6. Colocar el plato en el termociclador y amplificar con el perfil térmico para SCAR (Universidad de Puerto Rico).
7. Una vez finalizada la amplificación, guardar los platos con las muestras en el refrigerador hasta proceder a la electroforesis

Mezcla de reacción para la amplificación del marcador SCAR NO2.

| Componentes | 1 reacción (μ l) |
|---------------------------------------|--------------------------|
| Agua | 7.0 |
| Buffer (5 X) | 2.0 |
| dNTPs (4 mM c/u) + Mg Cl ₂ | 0.7 |
| Cebador DOR 21 A (10 μ M) | 0.1 |
| Cebador DOR 21 B (10 μ M) | 0.1 |
| <i>Taq</i> -polimerasa (5 U/ μ l) | 0.8 |
| ADN (20 ng/ml) | 2.5 |
| Volumen final | 15.0 |

Anexo 8. Protocolo para la amplificación de ADN usando marcadores tipo RAPD (Método de la UW-Madison)

Perfil térmico para la PCR usando marcadores tipo RAPD

| N° | 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

| N° | Paso (step) | 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 9. Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR NO2 para el gen *Phg-2*

Perfil térmico para la PCR del SCAR NO2

| N° | Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|----|----------------------------------|------------------|--------|--------|
| 1 | Desnaturalización (denaturation) | 94 | 30 seg | 30 |
| 2 | Acoplamiento (annealing) | 65 | 60 seg | 30 |
| | Elongación (polimerization) | 72 | 90 seg | 30 |
| 3 | Elongación final | 72 | 5 min | 1 |

Perfil de programación del termociclador para la PCR del SCAR NO2

| N° | Paso (step) | Temperatura (°C) | Tiempo (hh:mm:ss)/ciclo |
|----|-------------|------------------|-------------------------|
| 1 | 1 | 94 | 00:00:30 |
| 2 | 2 | 65 | 00:01:00 |
| 3 | 3 | 72 | 00:01:30 |
| 4 | 4 | | 29 veces al Paso 1 |
| 5 | 5 | 4 | 00:00:00 |
| 6 | 6 | Final | |

Anexo 10. Electroforesis para la amplificación de ADN

Preparación de geles (gelatinas) 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; ó 320 ml de buffer TBE 0.5X 3.2 g de agarosa, para bandejas de 44 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 GUANTES 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 11).

* 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, el 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 50 minutos a 140 V
3. Transferir las gelatinas al transiluminador, usando guantes de latex desechables.
4. Revisar el nivel de tinción de las bandas en el transiluminador de luz UV.
5. Fotografíar 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 fotografíar los geles en el transiluminador.

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

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Evaluación fenotípica de la población ALS 9951..... | 32 |
| 2 | Cebadores RAPD usados para identificar marcadores moleculares ligados a la resistencia a la mancha angular en frijol común..... | 34 |
| 3 | Extracción de ADN para el análisis de RAPDs (Método de la UW-Madison)..... | 35 |
| 4 | Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., D y NA Quant TM 200)... | 36 |
| 5 | Diluciones de ADN (a 4 y 20 ng/ml) según el método de la UW-Madison..... | 38 |
| 6 | Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores tipo RAPD..... | 39 |
| 7 | Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores tipo SCAR..... | 40 |
| 8 | Protocolo para la amplificación de ADN usando marcadores tipo RAPD (Método de la UW-Madison)..... | 41 |
| 9 | Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR NO2 para el gen <i>Phg-2</i> | 42 |
| 10 | Electroforesis para la amplificación de ADN..... | 43 |