

**Identificación de la resistencia a razas
específicas de *Phaeoisariopsis griseola* en frijol
común**

Samanta Zeledón

Honduras
Diciembre, 2003

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Identificación de la resistencia a razas
específicas de *Phaeoisariopsis griseola* en frijol
común**

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

Presentado por:

Samanta Zeledón

Honduras
Diciembre, 2003

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.

Samanta Zeledón

Honduras
Diciembre, 2003

**Identificación de la resistencia a razas específicas de *Phaeoisariopsis
griseola* en frijol común**

Presentado por:

Samanta Zeledón

Aprobada:

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor principal

Alfredo Rueda, Ph. D.
Coordinador de Área Temática

Luwbia Aranda, Ing. Agr.
Asesor

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

Jorge Venegas, Ing. Agr.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D.
Decano Académico

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

DEDICATORIA

A Dios

A mi familia, en especial Madre Norma y Abuelita Amada

A mi primo Johnson

A mis hermanos: Rosario, Richard y Ana Julia

A mis amigos que me apoyaron

A Erick por ser parte de mi vida

A mi Patria

AGRADECIMIENTOS

A Dios por iluminarme, ampararme y darme fuerzas para seguir luchando cada día de mi vida.

A mi Madre Norma por darme todo su amor, confianza durante toda mi vida.

A mi Abuelita por confiar en mí, por brindarme su cariño, fortaleza, ánimos y enseñarme a seguir adelante en los momentos difíciles.

A mi primo Johnson y su esposa Giana por su cariño y el apoyo que me han brindado durante estos años de esfuerzo.

A mis hermanos que estuvieron conmigo en el transcurso de estos años, aunque a distancia.

A Erick por su amor, su apoyo, por compartir conmigo esta experiencia, por comprenderme y estar ahí siempre en los momentos difíciles y salir adelante juntos.

A mis amigos: Sara Blandón, Elizabeth Tamayo, Alejandra Cabrera, Ingrid Urrutia, Mariela Medina, Johana Córdova, Luis Castillo, por su amistad y apoyo.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por su apoyo y asesoría en este trabajo.

A la Ing. Luwbia Aranda por su gran ayuda para la elaboración de este trabajo y amistad.

Al Ing. Jorge Venegas por estar siempre pendiente y apoyarme en este trabajo.

A Luz, Tomasa y el Lic. Roger, por su amistad y colaboración.

Al personal del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) por su colaboración.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE).

Al programa de becas de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano.

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

Al Dr. Johnson Zeledón por su ayuda financiera en mi manutención.

RESUMEN

Zeledón, Samanta. 2003. Identificación de la resistencia a razas específicas de *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 17 p.

Una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo del frijol, por su amplia distribución geográfica en las regiones tropicales y subtropicales y asociada a bajos rendimientos, es la mancha angular causada por el hongo *Phaeoisariopsis griseola*. El objetivo de este estudio fue identificar marcadores moleculares tipo RAPD ligados a la resistencia a razas específicas del patógeno en la población ALS 9951 (derivada del cruce Tío Canela 75 × G06727), y determinar la presencia del gen de resistencia “Phg-2” usando el marcador SCAR SNO2. El estudio se llevó a cabo en Zamorano, Honduras. Se evaluó la segregación a la resistencia a la raza 63-59 de *P. griseola* en la generación F2, y la reacción fenotípica a las razas 63-59 y 15-17 de *P. griseola* en las generaciones F6 y F7 de la población ALS 9951, respectivamente, y la presencia del gen “Phg-2”. En las generaciones F6 y F7 se evaluaron 50 “primers” tipo RAPD para identificar marcadores ligados a la resistencia a *P. griseola*. Se evaluó la segregación de la resistencia a la raza 63-59 en la población F2 y la reacción fenotípica de las generaciones F6 y F7 con una escala del 1-9, siendo de 1-4 resistente y 5-9 susceptible; también se evaluó la presencia de bandas polimórficas de ADN con la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). Se encontró que la segregación fenotípica de la resistencia a esta enfermedad en la generación F2 se ajustó al modelo Mendeliano 3:1, ($P > 0.750$), lo cual indica que la resistencia está determinada por un gen dominante. De los marcadores RAPD sólo los “primer” P-09 y W-06 mostraron polimorfismos asociados a la resistencia, debida al gen del padre resistente andino (G06727). Estos “primers” se ajustaron a los resultados esperados fenotípicamente con una $P > 0.250$, atribuyéndose que estos resultados observados no se deben al azar. El uso del marcador SCAR SNO2 indicó la presencia del gen “Phg-2” ligado a la resistencia a la mancha angular en varias líneas de la población ALS 9951, incluyendo algunas susceptibles, lo que sugiere que la resistencia a las razas 63-59 y 15-17 está asociada al gen de resistencia del padre andino G06727.

Palabras clave: ADN, mancha angular, marcadores moleculares, *Phaseolus vulgaris* L., polimorfismo, “primers”.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Autoría	ii
Página de firmas	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES	vi
RESUMEN	vii
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	3
CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ALS 9951	3
Ubicación del estudio	3
Evaluación fenotípica con cepas de <i>P. griseola</i> en Honduras	3
Material experimental	3
Siembra	3
Inoculaciones	3
Evaluación de severidad de daños	4
Herencia de la resistencia a la mancha angular (generación F2).....	5
Evaluación genotípica con marcadores moleculares	5
Material experimental	5
Utilización de marcadores moleculares tipo RAPD	5
Marcadores moleculares tipo SCAR	6
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
Herencia de la resistencia a la mancha angular (generación F2)	8
Evaluación de líneas F6 y F7 con aislamientos de <i>P. griseola</i> de Honduras	8
Evaluación genotípica con marcadores moleculares	9
Utilización de marcadores moleculares tipo RAPDs	9
Marcadores moleculares tipo SCAR	11
CONCLUSIONES	14
RECOMENDACIONES	15
BIBLIOGRAFÍA	16

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Página
1	“Primer” RAPD usados para identificar marcadores moleculares ligados a la resistencia de la mancha angular en la población ALS 9951 de frijol común. Zamorano, Honduras. 2003	6
2	Segregación fenotípica de la resistencia y susceptibilidad en 115 plantas F2 de la población ALS 9951 inoculadas con la raza 63-59 de <i>P. griseola</i> . Zamorano, Honduras. 2003	8
3	Líneas de la población ALS 9951 de la generación F6 identificadas como resistentes a la raza 63-59 de <i>P. griseola</i> . Zamorano, Honduras. 2003	9
4	Líneas de la población ALS 9951 de la generación F7 resistentes a la raza 15-17 de <i>P. griseola</i> . Zamorano, Honduras. 2003	9
5	Análisis de Chi-cuadrado de las líneas F6 de la población ALS 9951 resistentes y susceptibles a la raza 63-59 de <i>P. griseola</i> , evaluadas con el “primer” P-09. Zamorano, Honduras. 2003	10
6	Análisis de Chi-cuadrado de las líneas F6 de la población ALS 9951 resistentes y susceptibles a la raza 63-59 de <i>P. griseola</i> , evaluadas con el “primer” W-06. Zamorano, Honduras. 2003.....	11
7	Comparación de las evaluaciones de resistencia y presencia del marcador SNO2 en líneas F6 resistentes a <i>P. griseola</i> de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras. 2003	12
8	Comparación de la reacción de resistencia fenotípica a las razas 63-59 y la presencia del marcador SCAR SNO2 en líneas resistentes F6 de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras. 2003	13

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Escala de daño causada por la mancha angular sugerida por el CIAT (1987).....	4
2	Bandas polimórficas generadas por el “primer” P-09 (300 pb) en ADN de líneas F6 de la población ALS 9951 resistentes y susceptibles a la raza 63-59 de <i>P. griseola</i> . Zamorano, Honduras. 2003	10
3	Bandas polimórficas generadas por el “primer” W-06 (700 pb) en ADN de líneas F6 de la población ALS 9951 resistentes y susceptibles a la raza 63-59 de <i>P. griseola</i> . Zamorano, Honduras. 2003	11
4	Representación de polimorfismos de 14 muestras de ADN generados con el marcador SCAR SNO2 en líneas F6 de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras. 2003	12

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es uno de los granos básicos de mayor importancia en América Latina, debido a que es una de las fuentes de proteína de mayor consumo y menor costo para habitantes de escasos recursos. En Honduras, el frijol es el grano básico más importante después del maíz, por su producción y consumo *per capita* (CIAT, 1992).

Esta leguminosa de grano se domesticó en dos centros (andino y mesoamericano), originándose dos reservorios de genes aislados geográficamente, lo cual causó divergencias genéticas, al ser introducidas a otras regiones del mundo como cultivares (Rosas, 2003).

Entre las principales enfermedades asociadas al bajo rendimiento del frijol, se encuentra la mancha angular, cuyo agente causal es el hongo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris. Actualmente esta enfermedad es considerada como una de las de mayor importancia económica por su amplia distribución geográfica en las regiones tropicales y subtropicales (Mahuku *et al.*, 2002). La mancha angular afecta el crecimiento del frijol en más de 60 países causando bajos rendimientos (Oliveira, *et al.*, 2003).

Las condiciones favorables para el desarrollo de este patógeno son temperaturas entre 16 a 28°C y alta humedad relativa con periodos cortos de baja humedad (Rosas, 2003). Los síntomas se observan fácilmente en hojas, tallos y vainas, causando una defoliación prematura (Ferreira *et al.*, 2000). Inicialmente las lesiones aparecen en las hojas primarias como manchas color gris que se tornan oscuras a medida que se va desarrollando la enfermedad, presentando formas angulares en ambos lados, delimitadas por las nervaduras, con un halo clorótico de márgenes indefinidos (Liebemberg, *et al.*, 1997). En las vainas las lesiones son manchas circulares de color rojo marrón, las cuales pueden expandirse hasta las semillas y diseminarse a través de ellas (CIAT, 1997).

Debido a la amplia diversidad patogénica de *P. griseola*, la inmunidad no ha sido encontrada en las accesiones evaluadas por el CIAT (Singh, 1996). Actualmente no existen variedades comerciales de frijol resistentes a esta enfermedad en la región Centroamericana (Parreño, 2002).

Estudios recientes han demostrado que la variabilidad del patógeno y el grado de virulencia en América Central, es mayor que los observados en América del Sur y África. En Nicaragua y Honduras se ha encontrado la raza más agresiva (63-63) que ataca todos los genotipos diferenciales; seguida de la raza 31-63 que se presenta en Costa Rica y México (CIAT, 1999).

En el avance del mejoramiento genético de frijol, el uso de marcadores moleculares es una herramienta de gran utilidad en la selección indirecta de caracteres de interés como la resistencia a enfermedades, ya que puede resultar más rápida y eficiente que los métodos tradicionales (Díaz, 2001). Los marcadores moleculares a diferencia de los marcadores morfológicos y bioquímicos, no son afectados por el ambiente y no varían con la edad de la planta (Castro *et al.*, 2003).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) es la técnica para la duplicación enzimática *in vitro* de los fragmentos específicos de ADN, la cual ha sido base para el uso de marcadores moleculares. Para este estudio entre los marcadores de interés se encuentran los del tipo RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), de los cuales se derivan los SCAR (regiones amplificadas de secuencia caracterizada) (Ravinow, 1996).

El RAPD es una técnica basada en la amplificación de segmentos de ADN al azar, usando un “primer” de 6 – 10 pares de bases (pb); estos son usados para construir mapas genéticos en una variedad de especies (Otero, 1997). Según Michelmore *et al.* (1991), los marcadores RAPD son de naturaleza dominante-recesiva, ya que el carácter que se obtiene es la ausencia o presencia de una secuencia amplificada de ADN.

Los SCAR utilizan “primers” específicos de 20 - 30 pb, diseñadas a partir de las secuencias establecidas mediante marcadores RAPD ligados a una característica de interés (Castro *et al.*, 2003).

Nietsche *et al.* (2000), encontraron dos marcadores RAPD que son el OPN 02_{890c} y el OPE 04_{650c}, ligados en la fase de acoplamiento en 3.2 y 12.5 centimorgan (cM), respectivamente, al gen mesoamericano de resistencia a *P. griseola* en una población derivada del cruce de los cultivares Cornell 49-242 (resistente) y Ruda (susceptible). Para incrementar la reproducibilidad de la detección del marcador OPN 02_{890c}, este fue convertido a un marcador SCAR, con el propósito de facilitar la identificación de la presencia del gen “Phg-2” resistente a la mancha angular presente en Cornell 49-242.

Debido a la gran variabilidad y la virulencia de este patógeno, la estrategia para reducir la infección de *P. griseola* es el uso de genotipos resistentes. Para esto es necesario identificar genes de resistencia específicos para las poblaciones del patógeno presente en cada región, lo cual permite asegurar mayor durabilidad de la resistencia (Araya, 2003). Una alternativa al problema, es la generación de resistencia genética empleando recombinaciones de germoplasma andino resistente con genotipos mesoamericanos que son generalmente susceptibles a la mancha angular (Parreño, 2002).

Esta investigación generará información sobre la resistencia a la mancha angular, incluyendo datos específicos de “primers” ligados al gen de resistencia andino proveniente de la accesión G06727, mediante la identificación de polimorfismos asociados a la resistencia de razas específicas del patógeno en la población ALS 9951 (derivada del cruce Tío Canela 75 × G06727). Así mismo, se determinará la presencia o ausencia del gen mesoamericano “Phg-2” usando el marcador SCAR SNO2 en esta población.

MATERIALES Y MÉTODOS

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ALS 9951

Ubicación del estudio. Las evaluaciones de resistencia a razas de *P. griseola* se realizó en las camas de infección (bancales) y casas mallas del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), y los estudios moleculares en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano ubicada en el Valle del Yeguaré, a 30 Km de Tegucigalpa, Honduras, latitud 14° norte y 87° longitud oeste. El Zamorano se encuentra a una altura de 800 msnm, temperatura media de 24°C y precipitación media anual de 1,100 mm.

Evaluación fenotípica con cepas de *P. griseola* de Honduras

Material experimental. Se utilizó la población ALS 9951 compuesta de 118 líneas endogámicas recombinantes (RILs, siglas en inglés), derivadas de la cruce de Tío Canela 75 × G06727. La variedad Tío Canela 75 liberada en Honduras en 1996 (Rosas *et al.*, 1997), es de grano rojo de origen mesoamericano y susceptible a mancha angular. La accesión de germoplasma G06727 es originario de la región andina de Colombia, identificado como Guarzo-Popayán; su grano es de color amarillo moteado, grande y resistente a la mancha angular (CIAT, 1992).

Siembra. Se hicieron dos siembras (ensayos) de las líneas de la población ALS 9951 en camas de infección.. El “ensayo” se sembró el 4 de febrero con líneas F6, a una distancia de 15 cm entre plantas y 50 cm entre surcos, con cinco posturas por surco y dos semillas por posturas. Los padres Tío Canela y G06727, se utilizaron como testigos ubicados cada 20 RILs. El segundo ensayo se sembró el 13 de agosto con la generación F7 de la misma población, utilizando los mismos distanciamientos y testigos del “primer” ensayo.

Durante las etapas del cultivo se dieron las condiciones necesarias de humedad para el desarrollo de la enfermedad. Se hicieron aspersiones continuas para mantener una lámina de agua constante sobre las hojas, condición necesaria para que *P. griseola* produzca lesiones.

Inoculaciones. Se utilizaron dos aislamientos de *P. griseola* que fueron recolectados en los sectores de El Ocotál-Yuscarán (*Pg-O1*) y Zamorano (*Pg-Z1*). Estos aislamientos que fueron identificados corresponden a las razas 63-59 y 15-17, respectivamente, (Venegas, 2002). En el “primer” ensayo de la generación F6 de la población ALS 9951, se realizaron tres inoculaciones con la raza 63-59, a los 15, 30 y 45 días después de siembra (DDS). En

el segundo ensayo (generación F7 de la misma población), se realizaron tres inoculaciones con la raza 15-17, a los 15, 30 y 45 DDS.

El inóculo se obtuvo de las colonias de *P. griseola* puras multiplicadas en medio V8 para la producción abundante de esporas; se obtuvo inóculo con concentraciones de 2×10^4 conidias/ml. Al inóculo licuado se le colocó una gota de Tween 20[®] por cada litro de inóculo final, para evitar que las esporas se agreguen y facilitar la adhesión de éstas en el follaje. La inoculación se realizó con una bomba de mochila de 15 L.

Evaluación de la severidad de daños. Se evaluó la reacción de la población ALS 9951 a los aislamientos de *P. griseola* utilizando la escala de severidad 1-9 sugerida por el CIAT (1987). En este estudio se consideró como resistente la severidad ≤ 4 y susceptible la severidad ≥ 5 (Figura 1). Según el CIAT (1987), para realizar las evaluaciones de severidad es necesario conocer la etapa de desarrollo y las distintas condiciones climáticas en la que se encuentra el cultivo. Estas evaluaciones se pueden realizar en plantas individuales y en poblaciones.

La severidad de la enfermedad en la población fue evaluada tres veces con cada aislamiento. La primera lectura se hizo a los 42 DDS (15 días después de la inoculación); la segunda en la floración a los 58 DDS y la tercera en el llenado de vainas a los 75 DDS.

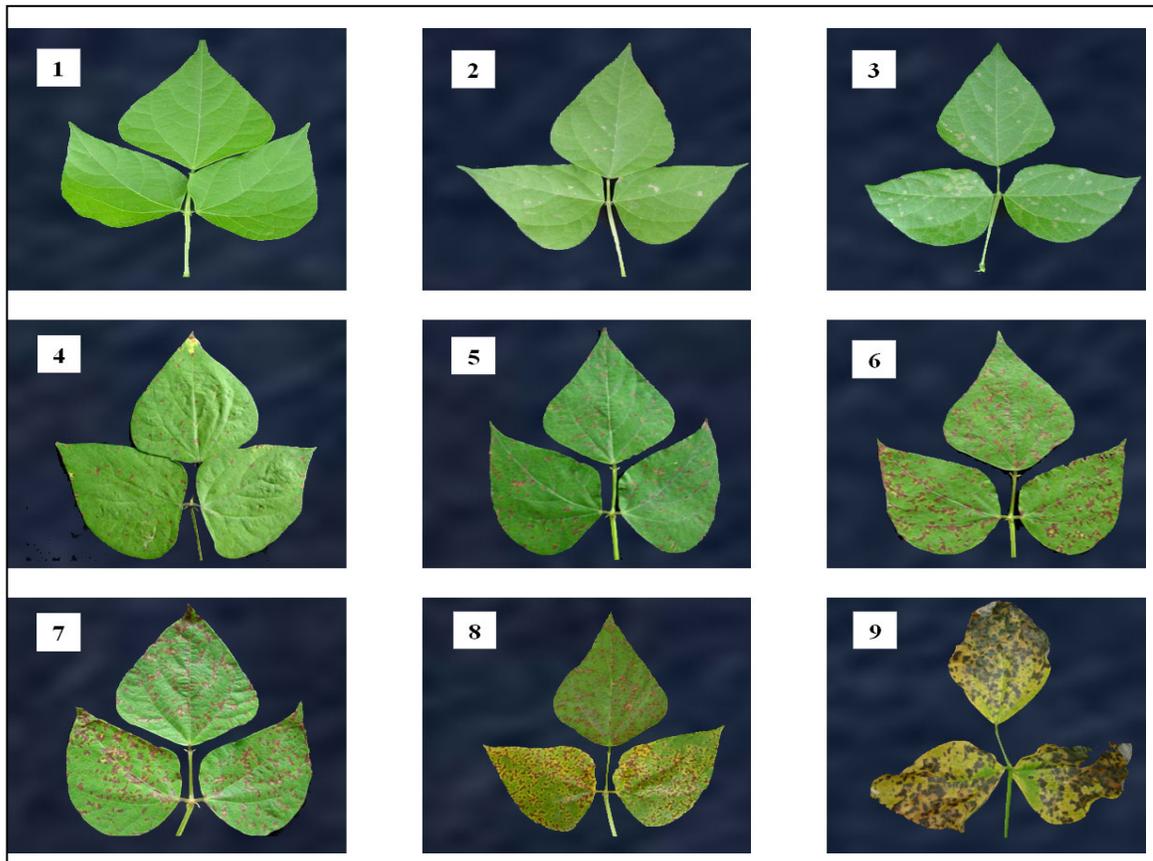


Figura 1. Escala de daño causada por la mancha angular sugerida por el CIAT (1987).

Herencia de la resistencia a la mancha angular (generación F2).

Para el estudio de herencia basada en la segregación fenotípica de resistencia y susceptibilidad, se sembraron 115 plantas de la generación F2 de la población ALS 9951, en maceteros medianos de 6 pulgadas de diámetro, el 15 de agosto del 2003. La inoculación se hizo a los 18 DDS con la raza 63-59, bajo condiciones controladas de humedad en una casa de malla con sistema de nebulización. La severidad de daños se evaluó usando la escala del 1-9. La segregación de la población por resistencia (1-4) y susceptibilidad (5-9) a la mancha angular fue analizada con la prueba de Chi-cuadrado (χ^2).

Evaluación genotípica con marcadores moleculares

Material experimental. Se utilizaron 118 líneas RILs, de la generación F6 de la población ALS 9951, derivada de la cruce de Tío Canela 75 × G06727. Para la identificación de marcadores ligados a la resistencia a *P. griseola*, se utilizaron las siete líneas más susceptibles y las siete más resistentes a las razas 63-59 y 15-17 de las 118 líneas ALS 9951. Para la identificación de la presencia del gen “Phg-2” con el marcador SCAR SNO2 se empleó la población completa.

Utilización de marcadores moleculares tipo RAPD. Para la identificación de marcadores tipo RAPDs, ligados a la presencia o ausencia de genes andinos o mesoamericanos resistentes a *P. griseola* en la población ALS 9951, se utilizaron los protocolos de extracción, cuantificación, dilución, amplificación y separación de ADN sugeridos por la Universidad de Wisconsin–Madison.

Para la extracción del ADN se recolectaron tres brotes terminales de plantas individuales de la población ALS 9951 en tubos *ependorf* de 1.5 ml; se agregó 50 μ l de buffer PEX (*etil xantogenato de potasio*) para macerar el tejido, se adicionó 450 μ l de buffer PEX. Las muestras se colocaron en baño María a 65°C por 60 min; para concentrar los residuos de tejidos se centrifugaron a 14,000 RPM por 10 min. Luego se precipitaron los ácidos nucleicos con 6:1 etanol acetato de amonio 7.5 M por 30 min; se pelletizaron los ácidos nucleicos centrifugando las muestras a 3,000 RPM durante 10 min. Se adicionó 300 μ l de RNAasa A (100 μ g/ml) + buffer TE 0.1X y se colocó en baño María a 37°C por 1 hora para eliminar el ARN de las muestras. Posteriormente se precipitó el ADN con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M. El pellet de ADN lavado con etanol al 70%, secado al ambiente. Después de 3 horas se rehidrató con 100 μ l de buffer TE 0.1X y se almacenó a –20°C.

La cuantificación se realizó empleando un fluorómetro Hoefler Farmacia Biotech Inc., D y NA Quant TM200, colocando 2 ml de buffer de cuantificación y 2 μ l de ADN en una cubeta de vidrio para medir la concentración de ADN en ng/ μ l. El fluorómetro se calibró con ADN de bovino estándar de 100 ng/ μ l. Las muestras se diluyeron a una concentración de 6 ng/ μ l, agregando 100 μ l de buffer TE 0.1 + tartrazine y ADN según la concentración

y el volumen estimado mediante la fórmula $V_i=2000/C_i-20$. (V_i = volumen inicial; C_i = concentración inicial).

El ADN se amplificó en un termociclador PCR-100TM (Programable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling) de MJ research, INC. En la amplificación se utilizaron 50 “primers” (Cuadro1), incluyendo aquellos usados en anteriores investigaciones (Parreño, 2002). La reacción fue preparada con una mezcla maestra de 4.36 µl de agua, 4.40 µl de buffer (5X), 0.80 µl de dNTPs (10mM c/u) + Mg Cl₂, 0.80 de cebador (10 mM), 0.50 de Taq- Polimerasa (5 U/µl) y 10 µl de ADN (6 ng/ml). La amplificación fue realizada siguiendo el perfil térmico iniciando con 2 ciclos de desnaturalización a 91°C por 1 minuto, acoplamiento a 42°C por 15 seg y elongación a 72°C por 70 seg, seguido por 38 ciclos de 91°C por 15 seg de desnaturalización, a 42°C de acoplamiento y elongación a 72°C por 70 seg, y finalizando con un ciclo de elongación a 72°C por 4 min.

Cuadro 1. “Primer” RAPD usados para identificar marcadores moleculares ligados a la resistencia de la mancha angular en la población ALS 9951 de frijol común. Zamorano, Honduras. 2003.

“Primer”	Secuencia	“Primer”	Secuencia	“Primer”	Secuencia
OPC-04	CCGCATCTAC	OPU-19	GTCAGTGCGG	OPAH-01	TCCGCAACCA
OPH-04	GGAAGTCGCC	OPH-20	GGGAGACATC	OPC-15	GACGGATCAG
OPY-06	AAGGCTCACC	OPH-05	AGTCGTCCCC	OPE-04	GTGACATGCC
OPW-13	CACAGCGACA	OPAC-20	ACGGAAGTGG	OPU-01	ACGGACGTCA
OPT-07	GGCAGGCTGT	OPC-11	AAAGCTGCGG	OPG-15	ACTGGGACTC
OPH-08	GAAACACCCC	OPR-16	CTCTGCGCGT	OPO-16	TCGGCGGTTT
OPW-09	GTGACCGAGT	OPM-12	GGGACGTTGG	OPZ-04	AGGCTGTGCT
OPW-06	AGGCCCGATG	OAE-19	GACAGTCCCT	OPR-02	CACAGCTGCC
OPG-03	GAGCCCTCCA	OPA-02	TGCCGAGCTC	OPQ-04	AGTGCGCTGA
OPP-03	CTGATACGCC	OPO-15	TGGCGTCCTT	OPR-04	CCCGTAGCAC
OPP-09	GTGGTCCGCA	OPS-13	GTCGTTCTTG	OPT-11	TTCCCCGCGA
OPB-10	CTGCTGGGAC	OPJ-13	CCACACTACC	OPO-20	ACACACGCTG
OPO-13	GTCAGAGTCC	OAK-20	TGATGGCGTC	OPK-19	CACAGGCGGA
OPX-01	CTGGGCACGA	OAD-19	CTTGGCACGA	OPD-11	AGCGCCATTG
OPO-19	GGTGCACGTT	OPP-07	CCCCGATGGT	OPQ-01	GGGACGATGG
OPQ-14	GGACGCTTCA	OPA-01	CAGGCCCTTC	OPP-01	GTAGCACTCC
OPL-04	GACTGCACAC	OPZ-01	TCTGTGCCAC	OPAA-03	TTAGCGCCCC

El ADN amplificado de cada línea, se sembró en geles de agarosa al 1% con 2 µl de bromuro de etidio; se utilizó un tanque de electroforesis (Maxicell EC 360M, 22 orificios) para la separación de fragmentos de ADN por diferencia de cargas. Se incluyeron un control negativo y una escalera de ADN de 100 pares de bases (100 pb DNA Ladder). Luego se visualizaron las bandas de ADN un transluminador de rayos ultravioletas (Fotodyne, Foto-UV 26), y se utilizó una cámara *Polaroid* para fotografiar los geles y registrar los resultados.

Marcadores moleculares tipo SCAR. Para identificar la presencia del gen de resistencia “Phg-2” en la población ALS 9951 se utilizó el marcador SCAR SNO2 asociado a este gen identificado en la accesión Cornell 49-242 (Nietsche *et al.*, 2000). Se utilizó ADN puro obtenido por los procesos de extracción, cuantificación y dilución sugeridos por la UWM previamente descritos. Se llevó las muestras de ADN a una concentración de 30 ng/μl. Para la amplificación, la mezcla maestra fue preparada con 6.0 μl de agua, 2.0 μl de buffer (10X), 1.0 μl de dNTPs (4 mM c/u), 1.4 μl de cebador PHG-2R (10 mM), 1.4 μl de cebador PHG-2F (10 mM), 0.7 de Taq- polimerasa (5 U/μl) y 2.5 μl de ADN (30 g/ml). Estos cebadores (PHG-2R y PHG-2F) tienen la secuencia de ACCAGGGGCATTATGAACAG y ACCAGGGGCAACATACTATG, respectivamente, y el marcador SNO2 se encuentra a 890 pb. La amplificación se realizó utilizando el perfil térmico para el marcador SCAR SNO2 iniciando con 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, acoplamiento a 65°C por 60 seg, elongación a 72°C por 90 seg; seguido por un ciclo de elongación a 72°C por 5 min (Castro et al., 2003).

Las bandas de ADN de las muestras amplificadas fueron separadas mediante electroforesis. En éste análisis se utilizó la muestra de ADN de Cornell 49-242 como control positivo para conocer la reacción, y un control negativo. Luego se determinó la presencia o ausencia de las bandas indicadoras del marcador SNO2 en el transluminador de rayos ultravioleta anteriormente mencionado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de la segregación fenotípica de la herencia de la resistencia y susceptibilidad a la raza 63-59 de la mancha angular en las líneas F2 de la población F2 ALS 9951, se realizó aplicando la distribución X^2 (Chi-cuadrado), para observar la concordancia entre los valores esperados y observados. Además se utilizó análisis Chi-cuadrado para identificar la presencia del marcador de resistencia a la mancha angular en la generación F6, por medio de lo esperado y lo observado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Herencia de la resistencia a la mancha angular (generación F2)

Para el análisis de segregación se consideraron como resistentes las plantas que presentaban una severidad de 1-4 y susceptibles a las de severidad de 5-9, inoculadas con la raza 63-59 de *P. griseola*. De las 115 plantas evaluadas, 87 resultaron resistentes y 28 susceptibles, obteniéndose una relación 3:1 (resistente: susceptible). Según el análisis de Chi-cuadrado, la segregación fenotípica de las plantas se ajustó al modelo mendeliano 3:1 con una $P > 0.750$ (Cuadro 2). La segregación fenotípica explica el arreglo de los alelos que provienen de los padres, características que se expresan en las evaluaciones visuales de la descendencia generada de la cruce de estos progenitores.

Los resultados muestran que la resistencia a la mancha angular en las plantas F2, está determinada por un gen dominante. Estos resultados difieren de los reportados por Díaz (2001) que encontró que la resistencia era determinada por un gen recesivo; sin embargo, hay que tener en cuenta que en este estudio se usó un inóculo proveniente de plantas infectadas de lotes comerciales, resultando en infecciones probablemente debidas a diversas razas. La resistencia dominante observada está asociada a la raza 63-59 que se usó como inóculo.

Cuadro 2. Segregación fenotípica de la resistencia y susceptibilidad en 115 plantas F2 de la población ALS 9951 inoculadas con la raza 63-59 de *P. griseola*. Zamorano, Honduras. 2003.

Fenotipo	Observado	Esperado	Obs-Esp	$[(O-E)-0.5]^2/E$
Resistente	87	86.25	0.75	0.0007246
Susceptible	28	28.75	-0.75	0.054
Total	115	115		$X^2=0.053^*$

* $P > 0.750$ con 1 gl

Evaluación de líneas F6 y F7 con aislamientos de *P. griseola* de Honduras

En la evaluación de las 118 líneas F6 de la población ALS 9951 inoculadas con la raza 63-59, se identificaron 10 materiales resistentes (severidad de 1-4) y 108 susceptibles identificadas (severidad de 5-9) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Líneas de la población ALS 9951 de la generación F6 identificadas como resistentes a la raza 63-59 de *P. griseola*. Zamorano, Honduras. 2003.

Líneas F6	Severidad ^z	Líneas F6	Severidad
ALS 9951-36	4	ALS 9951-46	3
ALS 9951-37	3	ALS 9951-91	4
ALS 9951-38	3	ALS 9951-94	3
ALS 9951-39	4	ALS 9951-99	4
ALS 9951-40	4	ALS 9951-116	4

^zseveridad: 1-4 (resistente), 5-9 (susceptible).

En la evaluación de las 118 líneas de la población ALS 9951 de la generación F7 inoculadas con la raza 15-17 de *P. griseola*, se identificaron 13 líneas resistentes y 105 susceptibles (Cuadro 4). Cuatro líneas (ALS 9951-36, 37, 38 y 46) mostraron resistencia a las dos razas, con las cuales fueron inoculadas en la F6 y F7. Estudios realizados por Parreño (2002), indican a la línea ALS 9951- 37 como resistente; en este estudio, la población F5 fue inoculada con una mezcla de inóculo proveniente de lotes comerciales.

Cuadro 4. Líneas de la población ALS 9951 de la generación F7 resistentes a la raza 15-17 de *P. griseola*. Zamorano, Honduras. 2003.

Líneas F7	Severidad	Líneas F7	Severidad
ALS 9951-20	4	ALS 9951-53	3
ALS 9951-32	4	ALS 9951-56	4
ALS 9951-36	4	ALS 9951-62	3
ALS 9951-37	3	ALS 9951-108	3
ALS 9951-38	4	ALS 9951-111	4
ALS 9951-46	3	ALS 9951-117	4
ALS 9951-51	3		

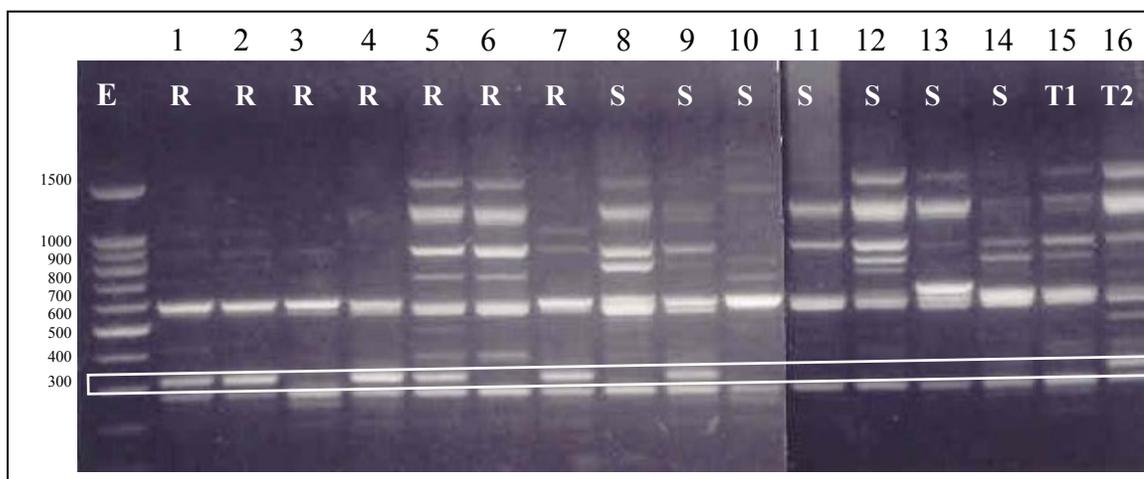
^zseveridad: 1-4 (resistente), 5-9 (susceptible).

Evaluación genotípica con marcadores moleculares

Utilización de marcadores moleculares tipo RAPDs

La evaluación de la población ALS 9951 con marcadores RAPD fue realizada para identificar aquellos que pudieran estar ligados al gen de resistencia a *P. griseola* aportado por el progenitor andino G06727. Se utilizaron 50 “primers” incluyendo los usados por Parreño (2002), G-03, P-09, W-06, W-09 y B-10, que se ajustaron a los resultados esperados según las evaluaciones de resistencia. La mayoría de los marcadores generaron bandas polimórficas, pero sólo los “primers” P-09 y W-06 mostraron bandas de ADN, (300 pb y 700 pb, respectivamente), que se ajustaron a los resultados esperados de acuerdo a la evaluación fenotípica. Estos dos “primers” mostraron polimorfismos similares, asociados a la resistencia a la mancha angular, a los encontrados en estudios anteriores (Parreño, 2002).

Los resultados obtenidos con el “primer” P-09 utilizando ADN de 14 líneas (7 resistentes y 7 susceptibles), permitieron identificar la presencia de una banda polimórfica a 300 pb en 6 de las 7 líneas resistentes y 6 presentes en las 7 líneas susceptibles (Figura 2). En el estudio de Parreño (2002), el “primer” P-09 presentó esta banda polimórfica en 11 líneas resistentes y 7 susceptibles de las 10 esperadas fenotípicamente. De acuerdo con el análisis de Chi- cuadrado, los resultados sugirieron que el marcador P-09 se ajusta a la expresión esperada de resistencia/susceptibilidad ($P > 0.250$), atribuyéndose que estos resultados observados no se deben al azar (Cuadro 5).



E= escalera, S= susceptible, R= resistente, T1= testigo 1 (Tío Canela-75), T2= testigo 2 (G06727).

Figura 2. Bandas polimórficas generadas por el “primer” P-09 (300 pb) en ADN de líneas F6 de la población ALS 9951 resistentes y susceptibles a la raza 63-59 de *P. griseola*. Zamorano, Honduras. 2003.

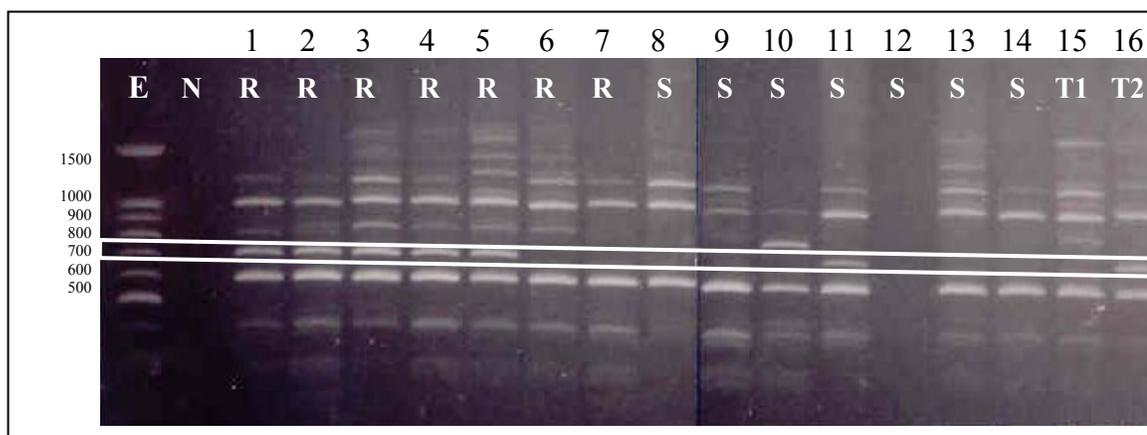
Cuadro 5. Análisis de Chi-cuadrado de las líneas F6 de la población ALS 9951 resistentes y susceptibles a la raza 63-59 de *P. griseola*, evaluadas con el “primer” P-09. Zamorano, Honduras. 2003.

Fenotipo	Observado	Esperado	Obs-Esp	$[(O-E)-0.5]^2/E$
Resistente	5	7	-2	0.8928
Susceptible	6	7	-1	0.3214
Total	11	14		$X^2 = 1.2142^*$

* $P > 0.250$ con 1 gl.

Los resultados obtenidos con el “primer” W-06 en ADN de 14 líneas F6 de la población ALS 9951, permitió identificar la presencia de una banda polimórfica a 700 pb en las 7 líneas resistentes y la ausencia de esta banda en las 7 líneas susceptibles (Figura 3). En el

estudio realizado por Parreño (2002), el “primer” W-06 presentó una banda polimórfica presente en 11 líneas resistentes y ausente en 7 susceptibles de las 10 esperadas fenotípicamente. El análisis de Chi-cuadrado mostró que el marcador W-06 se ajustó a la expresión esperada ($P>0.250$), atribuyendo que estos resultados observados no se deben al azar (Cuadro 6). Este análisis indicó que estos “primers” tuvieron un mejor ajuste que en estudios anteriores (Parreño, 2002).



E= escalera, N= control negativo, S= susceptible, R= resistente, T1= testigo 1 (Tío Canela-75), T2= testigo 2 (G06727).

Figura 3. Bandas polimórficas generadas por el “primer” W-06 (700 pb) en ADN de líneas F6 de la población ALS 9951 resistentes y susceptibles a la raza 63-59 de *P. griseola*. Zamorano, Honduras. 2003.

Cuadro 6. Análisis de Chi-cuadrado de las líneas F6 de la población ALS 9951 resistentes y susceptibles a la raza 63-59 de *P. griseola*, evaluadas con el “primer” W-06. Zamorano, Honduras. 2003.

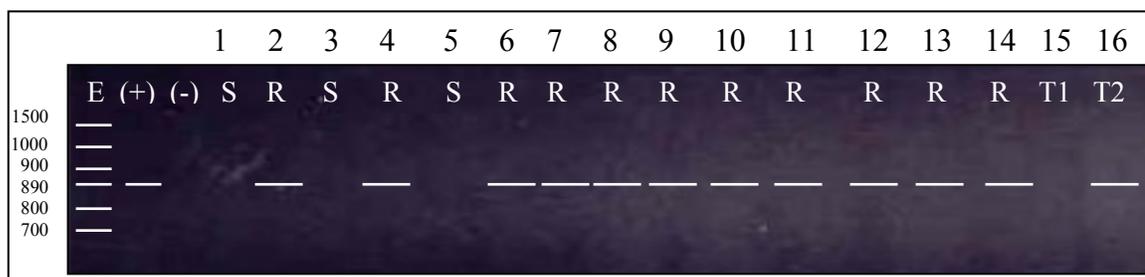
Fenotipo	Observado	Esperado	Obs-Esp	$[(O-E)-0.5]^2/E$
Resistente	5	7	-2	0.8928
Susceptible	6	7	-1	0.3214
Total	12	14		$X^2 = 1.2142^*$

* $P>0.250$ con 1 gl.

Marcadores moleculares tipo SCAR

El marcador SCAR SNO2 indica la presencia del gen origen mesoamericano “Phg-2” de resistencia a la mancha angular raza 31-17 (Nietsche, *et al.*, 2000). De las 118 líneas de la población ALS 9951 evaluadas con el marcador SNO2, 26 líneas no presentaron el

marcador SNO2 y 92 líneas presentaron la banda de ADN a 890 pb que expresa la presencia de este marcador (Figura 4).



E= escalera, + = control positivo (marcador SNO2), - = control negativo, S= susceptible, R= resistente, T1= testigo 1 (Tío Canela-75), T2= testigo 2 (G06727).

Figura 4. Representación de polimorfismos esperados en muestras de ADN generados con el marcador SCAR SNO2 en líneas F6 de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras. 2003.

Los resultados moleculares de las líneas F6 de la población ALS 9951 inoculadas con la raza 63-59, muestran que sólo siete líneas de la 10 resistentes presentaron el marcador SNO2. En las líneas F7 inoculadas con la raza 15-17, sólo siete líneas de las 13 resistentes presentaron el marcador (Cuadro 7). Por lo tanto, se asume que el gen dominante identificado en la F2 proveniente del padre andino G06727, es el responsable de la resistencia a las razas 63-59 y 15-17. Sin embargo, el marcador SNO2 podría servir para identificar materiales resistentes a la raza 31-17 u otras a las cuales el gen “Phg-2” presente resistencia. Para fines de estabilidad de la resistencia a *P. griseola* en la región, sería deseable desarrollar líneas resistentes que posean ambos genes.

Cuadro 7. Comparación de las evaluaciones de resistencia y presencia del marcador SNO2 en líneas F6 resistentes a *P. griseola* de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras. 2003.

Generación	Susceptible	Resistente	Marcador SNO2		Relación Marcador/ Resistencia*
			Ausente	Presente	
F6	108	10	26	92	7/10
F7	105	13			

* Número de plantas resistentes que presentaron el marcador SNO2.

Comparando las reacciones fenotípicas a las razas 63-59 y 15-17 con las del marcador SCAR SNO2, se trató de identificar líneas resistentes a ambas razas. Solo la línea ALS 9951-46 es resistente a ambas razas y presenta el marcador SNO2 (Cuadro 8). Se observa que el marcador SNO2 también está presente en líneas susceptibles a una u otra raza de *P. griseola*, lo que sugiere que la resistencia es debida al gen andino procedente del padre

andino G06727, y no al gen “Phg-2” de origen mesoamericano. Como antes se ha mencionado, el marcador SNO2 expresa el gen de resistencia de origen mesoamericano identificado en la raza 31-17 (Nietsche *et al.*, 2000).

Cuadro 8. Comparación de la reacción de resistencia fenotípica a la raza 63-59 y la presencia del marcador SCAR SNO2 en líneas resistentes F6 de la población ALS 9951. Zamorano, Honduras. 2003.

Líneas F6	Resistencia (Raza 63-59)	SNO2 (Raza 31-17)
ALS 9951-36	R	-
ALS 9951-37	R	-
ALS 9951-38	R	-
ALS 9951-39	R	+
ALS 9951-40	R	+
ALS 9951-46	R	+
ALS 9951-91	R	+
ALS 9951-94	R	+
ALS 9951-99	R	+
ALS 9951-116	R	+
Tío Canela 75	S	-
G06727 (testigo)	R	-

R= resistente; S= susceptible; (+) marcador presente; (-) marcador ausente.

CONCLUSIONES

La segregación fenotípica de la resistencia a la mancha angular en la generación F2 evaluada con la raza 63-59, muestra un ajuste al modelo mendeliano de segregación 3:1 ($P > 0.75$), lo que sugiere que la resistencia observada está determinada por un gen dominante.

Las evaluaciones fenotípicas de la población ALS 9951 en las generaciones F6 y F7, permitieron identificar 10 líneas resistentes a la raza 63-59 y 13 a la raza 15-17. Las líneas ALS 9951-36, 37, 38, y 46 mostraron resistencia a ambas razas.

Sólo la línea ALS 9951-46, presentó además de la resistencia a ambas razas (63-59 y 15-17) de *P. griseola*, la presencia del marcador SNO2 (gen "Phg-2").

Los marcadores tipo RAPD P-09 y W-06 presentaron polimorfismos asociados a la resistencia a las razas 63-59.

El marcador SCAR SNO2 se puede utilizar de manera confiable para identificar la presencia del gen "Phg-2" resistente a la raza 31-17. Sin embargo, según este estudio la resistencia a las razas 63-59 y 15-17 se debe al gen dominante aportado por el padre andino G06727.

RECOMENDACIONES

Continuar caracterizando aislamientos de *P. griseola* para identificar razas específicas de la región y la resistencia específica al patógeno.

Confirmar los resultados de este estudio y de estudios anteriores, haciendo evaluaciones con las razas disponibles.

Ampliar la evaluación de la población ALS 9951 con un mayor número de “primers” para identificar polimorfismos adicionales asociados a la resistencia presente en esta población.

Determinar el ligamiento genético de los “primers” P-09 y W-06 con el gen andino de resistencia presente en la población ALS 9951 mediante la técnica RAPD.

BIBLIOGRAFÍA

Araya, C. M. 2003. Diversidad genética de *Phaeoisariopsis griseola* y selección de fuentes de resistencia para poblaciones del patógeno en América Central y el Caribe. Propuesta de Investigación. 7 p.

Castro, A.; Rosas, J. C.; Aranda, L. L. 2003. Manual del módulo de Biodiversidad y Fitomejoramiento. EAP, Zamorano. 23 p. (manuscrito).

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.; H.; Toro, O. Cali, Colombia, CIAT. 450 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1997. Bean Program 1995. Annual Report. Cali, Colombia, CIAT. 49 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1999. Programa Cooperativo Regional de Frijol para Centro América, México y El Caribe (PROFRIJOL). Informe Técnico Anual. Cali, Colombia. 13 p.

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

Ferreira, C. F.; Carvalho, G. A.; Nietsche, S.; Paula Jr, T. J.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. 2000. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of RAPD marker linked to resistance gene.

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

Mahuku, G. S.; Jara, C.; Cuasquer, J. B.; Castellanos, G. 2002. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and implications for resistance breeding of common bean. Cali, Colombia, CIAT. Plant Pathology 51:594

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

Nietsche, S.; Borem, A.; Carvalho, G.; Rocha, R.; Paula, T.; De Barros, E.; Moreira, M. 2000. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. *Journal of Phytopathology* 148(2): 117-121.

Oliveira, L. B.; Alzate, A. L.; Alcantara, A.; Damiao, C.; Moreira, M. A.; Goncalves de Barro, E. 2003. Mapping of genomic region associated with resistance to angular leaf spot in common beans. *Ann. Report BIC* 46:149-150.

Otero, A. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *D. F., México.* 60:85-117.

Parreño, M. P. 2002. Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) en frijol común (*Phaseolus Vulgaris* L). Tesis Ing. Agr. EAP, El Zamorano, Honduras. 25 p.

Ravinow, P. 1996. Reacción en cadena de la polimerasa y marcadores moleculares: RAPD y SCAR. Ed. University of Chicago. 4 p.

Rosas, J. C. 2003. El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano, Honduras. Zamorano Academia Press. 52 p.

Rosas, J. C.; Varela, O. I.; Beaver, J. S. 1997. Registration of “Tío Canela-75” Small Red Bean (Race Mesoamerica). Reprinted from *Crop Science*. 37(4):139.

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. 334-350 p.

Venegas, J. 2002. Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de *Collectotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Ing. Agr. EAP, El Zamorano, Honduras. 33 p.