

**Caracterización de razas de *Uromyces
appendiculatus* y líneas de frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a la roya**

**Michael Palomino Chávez
Edwin Palomino Velasque**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Caracterización de razas de *Uromyces
appendiculatus* y líneas de frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a la roya**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el
Grado Académico de licenciatura

Presentado por:

**Michael Palomino Chávez
Edwin Palomino Velasque**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2016

Caracterización de razas de *Uromyces appendiculatus* y líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a la roya

Michael Palomino Chávez
Edwin Palomino Velasque

Resumen. El frijol es uno de los granos básicos con mayor valor en proteínas. Este cultivo es afectado por varias enfermedades, una de la principales es la roya causada por el hongo *Uromyces appendiculatus*. Para fines de mejoramiento de la resistencia es necesario conocer la diversidad patogénica del agente causal y la identificación de los genes del frijol que confieran resistencia al patógeno. El estudio se enfocó en la caracterización de razas de *Uromyces appendiculatus* de muestras colectadas en Honduras, usando los viveros de 12 líneas diferenciales, 11 líneas con genes de resistencia específicos y la identificación de genes de resistencia en líneas mejoradas usando marcadores moleculares SCAR. A los 10 días después de siembra (DDS), las plantas de los viveros fueron inoculadas con esporas de roya colectadas en lotes comerciales de ocho localidades con un aspersor manual. A los 20 DDS, se realizó la evaluación de los síntomas en las líneas de los viveros usando la escala de 1 al 9 (1-3 resistente, 4-9 susceptible) del CIAT (1987). Mediante los valores binarios asignados a los genotipos del vivero de diferenciales con reacción susceptible, se caracterizaron las razas de cada localidad. Mediante el vivero de genes se identificaron los genes resistentes a razas locales. Adicionalmente, se evaluaron en camas de infección 33 líneas de la Universidad de Puerto Rico inoculadas con esporas colectadas en los lotes comerciales, identificándose 17 líneas resistentes a la roya. Usando cuatro marcadores SCAR se confirmaron los genes de resistencia a las razas locales.

Palabra clave: Marcadores SCAR, severidad, vivero diferencial, vivero de genes.

Abstract. Common bean is one of the basic grains with greater protein value. This crop is affected by several diseases, one of the principal is rust caused by the fungus *Uromyces appendiculatus*. To know the pathogen diversity and to identify the bean genes which confer resistance to this pathogen. The study was focused in races characterization of *Uromyces appendiculatus* from samples collected in eight sites of Honduras, using 12 bean lines of the differential nursery, 11 bean lines from the rust genes nursery, and the identification of the genes of resistance present in bean improved lines using SCAR molecular markers. At 10 days after planting (DAP), plants from the nurseries were inoculated with rust spores collected in commercial bean fields from eight localities of Honduras. At 20 DAP, rust symptoms were evaluated in the nurseries using the 1 to 9 scale (1-3 resistance, 4-9 susceptible) from CIAT (1987). Using the binary values assigned to bean genotypes of the differential nursery with susceptible reaction, rust races from each site were characterized. Using the rust genes nursery, resistant genes to the local races were identified. In addition, 33 improved lines from the University of Puerto Rico were evaluated using a mix rust spores inoculant collected in commercial bean fields, identifying 17 rust resistant lines. Using four SCAR markers the presence of four resistant genes were identified in some of the lines.

Keyword: Differential nursery, rust genes nursery, SCAR marker, severity.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	v
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	17
5. RECOMENDACIONES.....	18
6. LITERATURA CITADA.....	19
7. ANEXOS.....	20

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Datos de las ocho localidades de recolección de muestras de esporas de <i>Uromyces appendiculatus</i> causante de la roya del frijol. Honduras, 2015-2016...	4
2. Genotipos, genes de resistencia, reservorio genético y valores binarios del Vivero de Diferenciales de la Roya del Frijol, Zamorano, Honduras.....	5
3. Genotipos, genes de resistencia y reservorios genéticos del Vivero de Genes de la Roya del Frijol, Zamorano, Honduras.....	5
4. Variedades, marcadores moleculares SCAR, genes de resistencia a la roya asociados y secuencia de los primer.....	8
5. Dosis de reactivos a usar en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los marcadores moleculares SCAR asociados a los genes de resistencia a la roya del frijol.....	9
6. Perfiles térmicos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los SCAR asociados a genes de resistencia (Ur) a la roya del frijol.....	9
7. Reacciones de resistencia (R) y susceptibilidad (S) de la severidad de daños causados por patotipos de <i>Uromyces appendiculatus</i> de ocho localidades de Honduras en líneas del Vivero de Diferenciales de la Roya del Frijol y dos variedades testigos. Zamorano, Honduras, 2016.....	10
8. Identificación de razas de las muestras de <i>Uromyces appendiculatus</i> colectados en ocho localidades de Honduras mediante el valor binario asignado a las 11 líneas del Vivero de Diferenciales de la Roya del Frijol.....	11
9. Reacciones de resistencia (R) y susceptibilidad (S) de la severidad de daños causados por patotipos de <i>Uromyces appendiculatus</i> de ocho localidades de Honduras en 11 líneas del Vivero de Genes de la Roya del Frijol y dos variedades testigos. Zamorano, Honduras, 2016.....	11
10. Identificación de genes de resistencia a las razas de roya (<i>Uromyces appendiculatus</i>) de ocho localidades de Honduras usando el Vivero de Genes. Zamorano, Honduras, 2016.....	13
11. Identificación de la presencia de genes de resistencia <i>Ur</i> en 17 líneas resistentes a <i>Uromyces appendiculatus</i> de la Universidad de Puerto Rico usando marcadores SCAR.....	14

Figuras	Página
1. Mapa de la ubicación de las localidades de recolección de esporas de <i>Uromyces appendiculatus</i> causante de la roya de frijol. Honduras, 2015.....	4
2. Escala 1 - 9 del CIAT (1987) para evaluación de la severidad de daños causados por la roya del frijol. Valores 1 - 3= resistente (pocas pústulas cubriendo <2% del área foliar) y 4- 9= susceptible (pústulas cubriendo >2% del área foliar).....	7
3. Amplificación del SCAR SK-14 asociado al gen Ur3.....	14
4. Amplificación del SCAR SBC6-14 asociado al gen Ur6.....	15
5. Amplificación del SCAR SOAD12 (537pb) asociado al gen Ur7.....	15
6. Amplificación del SCAR GTO2 asociado al gen Ur11.....	16

Anexos	Página
1. Extracción de ADN para el análisis de SCAR (Método de la Universidad de Wisconsin, (UW) - Madison).	20
2. Procedimiento para cuantificar el ADN con Quantus Fluorómetro.....	21
3. Procedimiento para realizar las diluciones para el PCR (reacción en cadena de polimerasas).....	22
4. Cálculo de concentración para realizar las diluciones para PCR.....	22
5. Protocolo para la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando marcadores SCAR.....	23
6. Protocolo para elaboración de geles de agarosa al 1.2% utilizados en electroforesis.....	23
7. Resultado de la evaluación de la severidad de daños de <i>Uromyces appendiculatus</i> en 33 líneas avanzadas de frijol de la Universidad de Puerto Rico. Zamorano, 2015.....	24
8. Análisis de suelos.....	25

1. INTRODUCCIÓN

El frijol *Phaseolus vulgaris* es una de las fuentes más importantes de proteínas en la dieta de una gran mayoría de los pobladores de América y África. En América Latina, una de las principales enfermedades que afecta a su cultivo es la roya causada por el hongo *Uromyces appendiculatus*, la cual causa pérdidas importantes en la economía de los sectores frijoleros (Rosas 2003). Esta enfermedad ocasiona pérdidas de hasta 50% del rendimiento, debido que la mayoría de las variedades cultivadas en las zonas tropicales son susceptibles a esta enfermedad.

Uromyces appendiculatus (Pers.) Unger es el agente causal de esta enfermedad que se desarrolla en ambientes con temperaturas de 17 a 27 °C y humedad relativa >80%. La elevación ideal para un buen desarrollo de la enfermedad está ubicada a más de 800 msnm donde se puede encontrar las condiciones antes mencionadas (Rosas 2003).

Aunque actualmente existen variedades resistentes que reducen el daño causado por el hongo, es necesario estudiar la variabilidad del agente causal y las formas de recombinación de los genes de resistencia disponibles para usarlos con fines de una resistencia amplia y duradera que ayude a combatir la enfermedad a largo plazo. Estudios previos en Honduras, indican la existencia de una gran diversidad patogénica del hongo y una gran cantidad de hospederos alternos silvestres que afectan al cultivo y reducen su productividad (Acevedo *et al.* 2005, 2008, 2013).

La diversidad genética del frijol común representada por los reservorios andino y mesoamericano ha facilitado que el agente causal haya generado una gran variabilidad patogénica por co-evolución. Las condiciones climáticas y las diferentes características ecológicas han influenciado y acelerado el proceso de adaptación y diversificación del agente causal (Araya 1996). Varios estudios previos han permitido identificar variedades de frijol con resistencia debido a la presencia de los genes Ur1 al Ur10 (Kelly *et al.* 1996). Posteriormente fue identificado el gen Ur11 de resistencia a la roya en las líneas PI 181996 y PI 190078. Por otro lado, los genes Ur3, Ur4, Ur5, Ur6, Ur9 y Ur11 han demostrado que confieren resistencia a más de 90 razas de roya (Stavelly 1998).

Existen varios marcadores moleculares SCAR (región amplificada de secuencias caracterizadas) que permiten identificar la presencia de los genes de resistencia a la roya en el frijol común (BIC 2010). En el presente estudio se utilizarán los marcadores SCAR para identificar la presencia de los genes Ur3, Ur4, Ur5, Ur6, Ur7 y Ur11 en un grupo de líneas mejoradas de frijol provenientes de la Universidad de Puerto Rico.

Los objetivos del presente estudio fueron caracterizar la diversidad patogénica de *Uromyces appendiculatus*, agente causal de la roya del frijol, a partir de muestras colectadas en

diversas localidades de Honduras utilizando el vivero de diferenciales de la roya del frijol; identificar los genes Ur que confieren resistencia a estas razas mediante el uso del vivero de genes de resistencia a la roya del frijol; evaluar la resistencia a la roya de 33 líneas mejoradas de la Universidad de Puerto Rico (UPR) e identificar la presencia de genes de resistencia en estas líneas UPR usando marcadores moleculares SCAR.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en condiciones de invernadero, bancales y laboratorio del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, departamento de Francisco Morazán, Honduras, localizada a 800 msnm y que presenta una temperatura promedio anual de 24 °C, y una precipitación anual promedio de 1100 mm. El estudio se llevó a cabo entre los meses de octubre del 2015 y septiembre 2016.

A. Caracterización de razas de *Uromyces appendiculatus*.

Recolección de esporas de *U. appendiculatus*. Para la caracterización de la variabilidad patogénica de la roya del frijol, se recolectaron muestras de esporas de roya en ocho localidades frijoleras de Honduras: Güinope, La Chorrera y Yuscarán del Departamento de El Paraíso; Tatumbula y Joya Grande de Francisco Morazán; y El Carreto, El Barro y Las Águilas de Santa Bárbara. Las muestras de esporas de roya colectadas fueron utilizadas como inóculo para determinar las razas del hongo presente en las localidades muestreadas, utilizando la técnica de viveros móviles (Steadman *et al.* 2002), y los viveros de genotipos diferenciales y el de genes de roya (Pastor-Corrales y Liebenberg 2010).

Pre-germinación y preparación de viveros. Para el establecimiento de los ensayos se pre-germinaron semillas de las 12 líneas del Vivero de Diferenciales de la Roya (Cuadro 2), y de las 11 líneas del Vivero de Genes de la Roya y dos testigos, Danlí 46 susceptible y Don Silvio RR resistente (Cuadro 3). La semilla fue previamente desinfectada sumergiéndola 30 segundos en una solución de etanol al 70%, luego durante 3-5 minutos en cloro al 5%, seguido de varios lavados con agua destilada. Las semillas se colocaron en papel Kraft para pre-germinar, se amarraron con alambre, y se colocaron dentro de un vaso de precipitado con capacidad de 5 litros, con un volumen de 1 litro de agua para mantener la humedad, y se cubrió con bolsas de aluminio para uniformizar la pre-germinación. Las semillas se incubaron durante dos días a una temperatura de 24-28°C en el laboratorio de Biotecnología Aplicada.

Dos días después de la pre-germinación, se realizó la siembra en bandejas de poliestireno de alto impacto de 36 alveolos (6 x 6 x 6 cm cada alveolo), en un sustrato con 30% de suelo estéril y 70% de mulch de marca Kekkila. Se sembraron tres semillas por alveolo con dos repeticiones de cada línea. Las bandejas permanecieron en un invernadero del PIF donde se les proveyó riego por micro-aspersión según fue necesario.

Cuadro 1. Datos de las ocho localidades de recolección de muestras de esporas de *Uromyces appendiculatus* causante de la roya del frijol. Honduras, 2015-2016.

Localidad	Departamento	Fecha de Muestreo	Variedad	Altitud (msnm)
Güinope	El Paraíso	07/11/2015	Amadeus	1304
La Chorrera	El Paraíso	12/11/2015	Zamorano	1232
Yuscarán	El Paraíso	14/11/2015	Clavija	999
Joya Grande	F. Morazán	07/11/2015	Frijol común	1339
Tatumbula	F. Morazán	07/11/2015	Clavija	1255
El Carreto	S. Bárbara	10/08/2016	Papa	1038
El Barro	S. Bárbara	10/08/2016	Campechano	781
Las Águilas	S. Bárbara	10/08/2016	Amadeus	742

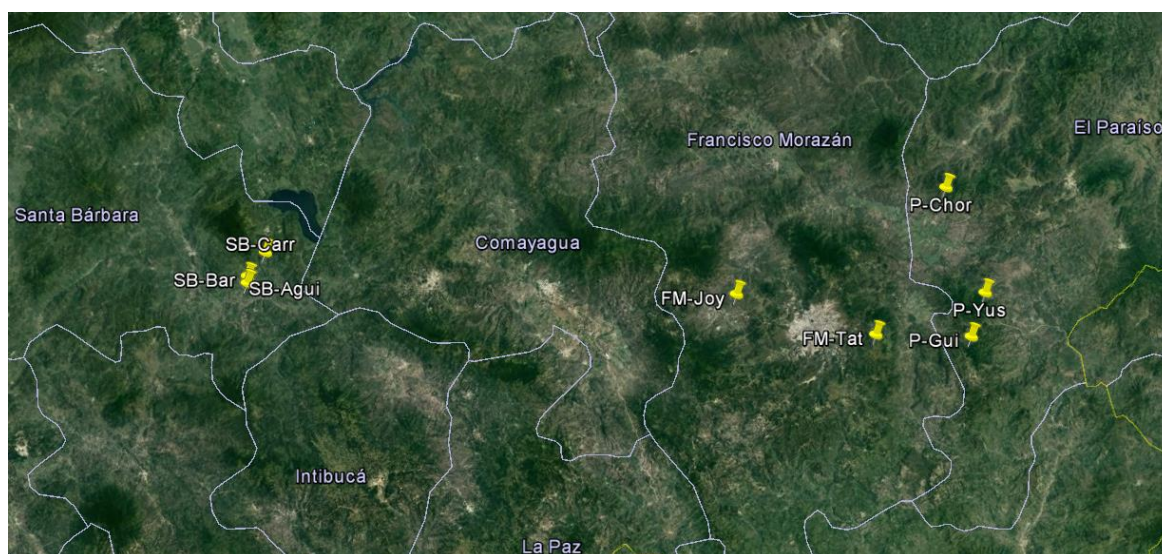


Figura 1. Mapa de la ubicación de las localidades de recolección de esporas de *Uromyces appendiculatus* causante de la roya de frijol. Honduras, 2015.

Cuadro 2. Genotipos, genes de resistencia, reservorio genético y valores binarios del Vivero de Diferenciales de la Roya del Frijol, Zamorano, Honduras.

Genotipo diferencial	Gen resistencia	Reservorio genético	Valor binario
Early Gallatin	Ur4	A/MA	1
Redlands Pioneer	Ur13	A	2
Montcalm	Desconocido	A	4
PC 50	Ur9, Ur12	A	8
Golden Gate Wax	Ur6	A/MA	16
PI 260418	Desconocido	A	32
GN 1140	Ur7	MA	1
Aurora	Ur3	MA	2
México 309	Ur5	MA	4
México 235	Ur3+	MA	8
CNC	Desconocido	MA	16
PI 181996	Ur11	MA	32

Fuente: (Pastor-Corrales y Liebenberg 2010).

Cuadro 3. Genotipos, genes de resistencia y reservorios genéticos del Vivero de Genes de la Roya del Frijol. Zamorano, Honduras.

Genotipo	Gen resistencia	Reservorio genético
Aurora	Ur3	MA
Early Gallatin	Ur4	A/MA
Mex 309	Ur5	MA
Olathe	Ur6	MA
GN 1140	Ur7	MA
PC50	Ur9	MA
Resisto	Ur10	A
PI 181996	Ur11	MA
Weihing	Ur3, Ur6	A
BelDakMi 2	Ur4, Ur6	A/MA
BelDakMi RMR 14	Ur3, Ur6, Ur11	A/MA
Testigos:		
Don Silvio RR	Resistente	MA
Danlí 46	Susceptible	MA

Fuente: Pastor-Corrales y Liebenberg (2010).

Inoculación con esporas de *Uromyces appendiculatus*. Las hojas de frijol con síntomas típicos de la roya (incidencia de >50% y severidad >7 de la enfermedad) recolectadas en el campo provienen de lotes de frijol comercial. En Zamorano, las hojas se dejaron secar en la sombra por cuatro días, para luego recolectar las esporas usando una brocha y envasándolas en tubos de 1 ml conteniendo sílica gel. La inoculación de las plantas de los viveros diferenciales y de genes se realizó a los 10 días después de siembra (DDS), usando

una dosis de 1 gramo de esporas/litro de agua destilada y aplicando el inóculo con un aspersor manual. Las plantas se mantuvieron en la casa de malla usando un sistema de riego por micro-aspersión automatizado.

Lectura y evaluación de los síntomas. A los 20 días DDS, 10 días después de la inoculación, se realizó la lectura de los síntomas en las líneas de los viveros y los testigos usando la escala de 1 al 9, donde 1-3 es resistente, 4-9 es susceptible (CIAT 1987). Luego de realizar la lectura, se procedió a identificar las razas de roya de las muestras colectadas en las localidades del estudio, con base en la sumatoria de los valores binarios de las líneas que presentaron una reacción de susceptibilidad (Cuadro 2).

B. Verificación de la resistencia a la roya de líneas mejoradas. Para evaluar la resistencia a la roya de 33 líneas avanzadas de la Universidad de Puerto Rico (UPR), estas fueron sembradas en un sistema de bancales o camas de infección, utilizando un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. En este ensayo, la variedad Danlí 46 fue utilizada como testigo susceptible y Don Silvio RR como resistente. A los 15, 22 y 29 días, las líneas fueron inoculadas utilizando inóculo natural recolectado de hojas de frijol de lotes comerciales que presentaron alta incidencia y severidad. Las esporas procedieron de muestras de hojas infectadas con pústulas de roya de las localidades de Güinope, La Chorrera y Yuscarán en el departamento del Paraíso, y de Tatumbla y Joya Grande en el departamento de Francisco Morazán. El inóculo se preparó lavando las hojas con pústulas de roya con 5 litros de agua para luego aplicarlas al follaje con un aspersor de mochila de 20 litros.

La reacción de las líneas a la inoculación con *Uromyces appendiculatus* se evaluó a los 43 y 47 DDS, utilizando una escala 1 al 9 para evaluar la severidad del daño y el porcentaje de plantas dañadas (figura 2). De las 33 líneas de la UPR, se seleccionaron 17 líneas con resistencia a la roya, las cuales se evaluaron posteriormente usando marcadores moleculares SCAR asociados a los genes *Ur* de resistencia a *Uromyces appendiculatus*, en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada.

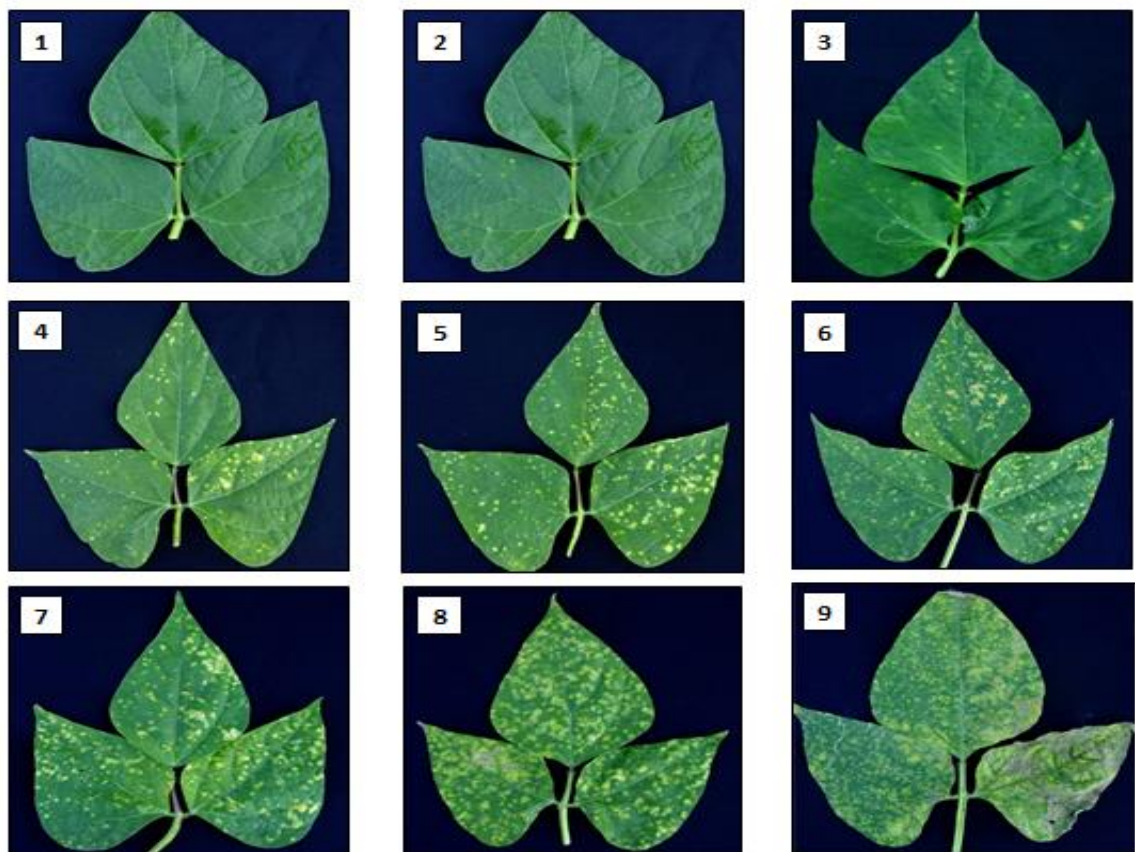


Figura 2. Escala 1-9 del CIAT (1987) para evaluación de la severidad de daños causados por la roya del frijol. Valores 1-3= resistente (pocas pústulas cubriendo <2% del área foliar) y 4-9= susceptible (pústulas cubriendo >2% del área foliar).

C. Evaluación de líneas con marcadores moleculares SCAR. Para la extracción de ADN se sembraron las 17 líneas UPR seleccionadas en el ciclo anterior por su resistencia a la roya en el sistema de camas de infección. Se pre-germinaron 20 semillas de cada línea previamente desinfectadas en una solución de etanol al 70% por 30 segundos y luego en cloro al 5% 3-5 min, seguido de varios lavados con agua destilada. Las semillas se colocaron en papel Kraft para su pre-germinación, se colocaron dentro de un vaso de precipitado con capacidad de 5 litros, con un volumen de 1 litro de agua para mantener la humedad y se cubrió con bolsas de aluminio para uniformizar la pre-germinación. Se incubaron durante dos días en el laboratorio a una temperatura de 24-28°C. Al tercer día, las semillas se sembraron en maceteros de 8'' de diámetro usando 4 repeticiones por línea y 4 semillas por macetero (16 semillas por línea).

Extracción de ADN. La extracción de ADN de cada línea de frijol se realizó a los 20 DDS siguiendo el protocolo de la Universidad de Wisconsin- Madison (Anexo 1).

Cuantificación de ADN. Una vez realizada la extracción se determinó la concentración de ADN en cada línea avanzada de frijol para estandarizar la muestra de trabajo. El equipo

usado fue el QuantiFluor el cual fue previamente calibrado para la cuantificación de las muestras (Anexo 2).

Dilución de ADN. Previo a proceder a realizar la amplificación del ADN por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés), cada muestra de ADN fue llevada a una concentración de 30 ng/μl en un volumen final de 100 μl de buffer TE 0.1X (Anexo 3).

Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el Laboratorio de Biotecnología Aplicada, se hicieron los cálculos para la preparación de la mezcla maestra de la PCR de acuerdo al protocolo para los seis marcadores SCAR asociados a los genes de resistencia a la roya con que se cuenta el laboratorio (Cuadro 4). La mezcla para el PCR se realizó siguiendo el protocolo para cada marcador utilizado en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada (Cuadro 5). Luego se añadió una gota de aceite mineral a cada pozo para evitar la deshidratación de las muestras, y se cubrió el plato con una lámina de aluminio y se colocó en el termociclador MJ Research PTC-100™ para realizar la PCR utilizando el perfil térmico óptimo para cada marcador molecular (Cuadro 6). Una vez terminada la reacción de PCR, se procedió a la visualización de las bandas mediante la electroforesis.

Cuadro 4. Variedades, marcadores moleculares SCAR, genes de resistencia a la roya asociados y secuencia de los primers, Zamorano, Honduras.

Variedades	SCAR	Gen	Primers
Aurora	SK-14 620pb	Ur3	F-5' CCC GCT ACA CAC CAA TAC CTG R-5' CCC GCT ACA CTT GAT AAA ATG TTA G
Early Gallatin	SA-14 1079/800pb	Ur4	F-5' CTA TCT GCC ATT ATC AAC TCA AAC R-5' GTG CTG GGA AAC ATT ACC TAT T
México 309	SI-19 460pb	Ur5	F-5' AAT GCC GGA GAT ATT AA AGG AAA G R-5' AAT GCC GGA GTT CAA TAG AAA AAC C
Golden Gate Wax	SBC-6 308pb	Ur6	F-5' GAA GGC GAG AAG AAG AAA AAG AAA AAT R-5' GAA GCG GAG AGC ACC TAG CTG AAG
GN 140	SOAD- 12 537pb	Ur7	F-5' AAG AGG GCG TGA GAT CGT CG R-5' AAG AGG GCG TCT TGA AGG TT}
PI 181996	GT-2 490/450pb	Ur11	F-5' CGC ACT TAG GAG CAC AAA R-5' TGG TGG GTC CCA TAT TTT G

Fuente: Bean Improvement Cooperative (2010).

Cuadro 5. Dosis de reactivos a usar en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los marcadores moleculares SCAR asociados a los genes de resistencia a la roya del frijol.

Banda	Marcadores moleculares			
	SK 14 (Ur3)	SBC 6 (Ur6)	SOAD 12 (Ur7)	UR11-GTO (Ur11)
	620 bp	308 bp	537 bp	490/450 bp
Control +	Aurora	Golden Gate	GN 1140	PI181996
Reactivos (uL)				
dd H ₂ O	8.1	7.6	7.5	8.2
PCR Buffer	2.5	2.5	3.0	2.5
d NTPs MgCl ₂	1.2	1.2	1.2	1.2
Primer (F)	0.5	0.5	0.5	0.5
Primer (R)	0.5	0.5	0.5	0.5
Taq enzima	0.2	0.7	0.3	0.1
ADN template	2.0	2.0	2.0	2.0
Total	15.0	15.0	15.0	15.0

Fuente: Laboratorio de Biotecnología Aplicada. bp (pares de bases).

Cuadro 6. Perfiles térmicos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los SCAR asociados a genes de resistencia (Ur) a la roya del frijol.

SCAR	Desnaturalización			Acoplamiento			Elongación			Elongación final		
	C	°C	T	C	°C	T	C	°C	T	C	°C	T
SK-14	34	94	10s	34	63	40s	34	72	2min	1	72	5min
SA-14 ^a	35	94	1min	35	55	1min	35	72	1min	1	72	5min
SI-19 ^a	34	94	10s	34	67	40s	34	72	2min	1	72	5min
SBC-6 ^a	30	94	30s	30	59	1min	30	72	2min	1	72	7min
SOAD-12 ^a	35	94	1min	35	65	1min	35	72	90s	1	72	5min
GT02	38	94	10s	38	60	40s	38	72	2min	1	72	5min

C= ciclo, T= tiempo y a= presentan ciclo adicional de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Caracterización de razas de *Uromyces appendiculatus*. En la caracterización de raza se inocularon los 6 genotipos andinos y 6 genotipos mesoamericanos con muestras del patógeno provenientes de los departamentos: El Paraíso en sus localidades de Güinope, Chorrera y Yuscarán; Francisco Morazán en Joya Grande y Tatumbula, y en el departamento de Santa Bárbara sus localidades de El Carreto, El Barro y Las Águilas. En la localidad de Güinope se identificó la raza 22-31, en El Carreto la raza 18-30, en El Barro la raza 2-22 y en Las Águilas la raza 9-33, estas 4 localidades presentaron las razas de menor capacidad virulenta; las localidades de Chorrera presento la raza 55-63, Yuscarán la 63-61, Joya Grande 63-63 y Tatumbula la 63-63 consideradas como las razas de mayor virulentas del estudio. En el departamento de Francisco Morazán se identificó solo una raza en sus dos localidades caracterizada como la raza más virulenta la 63-63, este resultado se atribuye a la cercanía de las localidades, así como la semejanza en condiciones de temperatura mayores a los 24°C, humedad relativa >80, variedades mejoradas de frijol, la capacidad de virulencia del patógeno ha desarrollado mayor resistencia (Cuadro 8).

Cuadro 7. Reacciones de resistencia (R) y susceptibilidad (S) de la severidad de daños causados por patotipos de *Uromyces appendiculatus* de ocho localidades de Honduras en líneas del Vivero de Diferenciales de la Roya del Frijol y dos variedades testigos. Zamorano, Honduras, 2016.

	Genotipos	GU	CH	YU	JO	TA	CA	BA	AG
1	Early Gallatín	R	S	S	S	S	R	R	S
2	Red Pioneer	S	S	S	S	S	S	S	R
3	Montcalm	S	S	S	S	S	R	R	R
4	PC 50	R	R	S	S	S	R	R	S
5	Golden Gate wax	S	S	S	S	S	S	R	R
6	PI 260418	R	S	S	S	S	R	R	R
7	GN 1140	S	S	S	S	S	R	R	S
8	Aurora	S	S	S	S	S	S	S	R
9	Mex 309	S	S	S	S	S	S	S	R
10	Mex 235	S	S	S	S	S	S	R	R
11	CNC	S	S	S	S	S	S	S	R
12	PI 181996	R	S	R	S	S	R	R	S
T1	Don Silvio RR	S	S	R	S	S	R	R	R
T2	Danlí 46	S	S	S	S	S	S	R	S

GU=Güinope, CH= La Chorrera, YU= Yuscarán, JO= Joya Grande, TA= Tatumbula, CA= El Carreto, BA= El Barro, AG= Las Águilas, R= Resistente (escala 1-3) y S= Susceptible (escala 4-9).

Cuadro 8. Identificación de razas de las muestras de *Uromyces appendiculatus* colectados en ocho localidades de Honduras mediante el valor binario asignado a las 12 líneas del Vivero de Diferenciales de la Roya del Frijol, Zamorano, Honduras.

Línea	N° Binario	GU	CH	YU	JO	TA	CA	BA	AG
Diferenciales Andinos									
Early Gallatín	1	-	+	+	+	+	-	-	+
Redlands Pioneer	2	+	+	+	+	+	+	+	-
Montcalm	4	+	+	+	+	+	-	-	-
PC 50	8	-	-	+	+	+	-	-	+
Golden Gate Wax	16	+	+	+	+	+	+	-	-
PI 260418	32	-	+	+	+	+	-	-	-
Diferenciales Mesoamericanos									
GN 1140	1	+	+	+	+	+	-	-	+
Aurora	2	+	+	+	+	+	+	+	-
Mex 309	4	+	+	+	+	+	+	+	-
Mex 235	8	+	+	+	+	+	+	-	-
CNC	16	+	+	+	+	+	+	+	-
PI 181996	32	-	+	-	+	+	-	-	+
Raza		22-31	55-63	63-31	63-63	63-63	18-30	2-22	9-33

GU=Güinope, CH= La Chorrera, YU= Yuscarán, JO= Joya Grande, TA= Tatumbula, CA= El Carreto, BA= El Barro, AG= Las Águilas. -= Resistente (escala 1-3) y += Susceptible (escala 4-9).

Cuadro 9. Reacciones de resistencia (R) y susceptibilidad (S) de la severidad de daños causados por patotipos de *Uromyces appendiculatus* de ocho localidades de Honduras en 11 líneas del Vivero de Genes de la Roya del Frijol y dos variedades testigos. Zamorano, Honduras, 2016.

Línea	GU	CH	YU	JO	TA	CA	BA	AG
1 Aurora	S	S	S	S	S	R	R	R
2 Early Gallatín	R	S	S	S	S	R	R	R
3 Mex 309	S	S	S	S	S	S	S	S
4 Olathe	R	S	S	S	S	S	R	S
5 GN 1140	R	S	S	S	S	R	R	R
6 PC50	S	S	R	S	S	R	S	R
7 Resisto	R	S	S	S	S	P	S	R
8 PI 181996	R	S	S	S	S	S	S	S
9 Weihing	S	S	S	S	S	R	R	S
10 BelDakMi 2	R	S	R	S	S	R	R	R
11 BelDakMi RMR 14	R	S	R	S	S	R	R	S
T1 Don Silvio RR	S	S	R	S	S	R	R	R
T2 Danlí 46	S	S	S	S	S	S	R	S

GU=Güinope, CH= La Chorrera, YU= Yuscarán, JO= Joya Grande, TA= Tatumbula, CA= El Carreto, BA= El Barro, AG= Las Águilas. R: Resistente, S= susceptible, T1 y T2= testigos y P=dato perdido

Identificación de genes de resistencia a las razas de roya (*Uromyces appendiculatus*) de las ocho localidades de Honduras usando el Vivero de Genes. Para determinar la resistencia de los 11 genotipos se sometieron a las 8 razas caracterizadas para poder identificar los genes de resistencia usando los Viveros de Genes. La línea Mex 309 con presencia del gen Ur5 presentó susceptibilidad a las 8 razas caracterizadas; la línea Aurora con gen Ur3 presentó resistencia a las razas provenientes del departamento de Santa Bárbara (18-30, 2-22 y 9-33); los genotipos Early Gallatín y GN 1140 con sus genes Ur4 y Ur7 respectivamente presentaron resistencia a las razas 22-31, 18-30, 2-22 y 9-33; el genotipo Olathe presentó resistencia a las razas 22-31 y 2-22; el genotipo PC50 con su gen Ur9 presentó resistencia a las razas 63-31, 18-30 y 9-33; todos los genotipos presentaron diferentes capacidades de resistencia a las diferentes razas identificadas: Resistó con gen Ur10 fue resistente a las razas 22-31 y 9-33, PI 181996 con gen Ur11 presentó solo resistencia a la raza 22-31 y muy susceptible a las demás razas, Weihing con su doble gen Ur3 Y Ur6 presentó resistencia a las razas 18-30 y 2-22, el genotipo BelDakMi RMR 14 con su tripe juego de genes Ur3, Ur6 y Ur11 presentó resistencia a las razas 22-31, 63-31, 18-30 y 2-22. La mejor combinación de genes representó el genotipo BelDakMi 2 con genes Ur4 y Ur6 que presentaron resistencia a las razas 22-31, 63-31 y las tres razas del departamento de Santa Bárbara 18-30, 2-22 y 9-33, este genotipo ha demostrado mayor capacidad de resistencia a las 5 razas que se caracterizaron como las menos virulentas. Ninguno de los 11 genotipos asociados a un gen de resistencia logró poseer resistencia a las razas 55-63 y 63-63 la última caracterizada para las dos localidades del departamento de Francisco Morazán, lo que le atribuye como las dos razas más virulentas (Cuadro 10).

B...Verificación de la resistencia a la roya de líneas mejoradas. La siembra de las 33 líneas avanzadas de frijol de la Universidad de Puerto Rico en el sistema de bancales, mediante la lectura de severidad y virulencia de la roya del CIAT se descartaron 14 líneas, así mismo presentaron susceptibilidad al virus del mosaico dorado amarillo del frijol, las líneas descartadas fueron: 1572-6, 1572-8, 1572-9, 1572-16, 1572-17, 1572-18, 1572-19, 1572-23, 1572-24, 1572-25, 1572-26, 1572-27, 1572-29 y 1572-1572-30 (Anexo 6), de la misma forma se descartaron las líneas 1572-1 y 1572-13 estas por presentar problemas por plaga de gorgojo en almacén, las 17 líneas seleccionadas tuvieron la mejor respuesta a la inoculación de roya de las localidades de Güinope, Chorrera, Joya Grande y Tatumbla, esta resistencia fenotípica es la respuesta a los genes que presentan las 17 líneas y su interacción con el ambiente.

Cuadro 10. Identificación de genes de resistencia a las razas de roya (*Uromyces appendiculatus*) de ocho localidades de Honduras usando el Vivero de Genes. Zamorano, Honduras, 2016.

Línea	Gen	GU	CH	YU	JO	TA	CA	BA	AG
		(22-31)	(55-63)	(63-31)	(63-63)	(63-63)	(18-30)	(2-22)	(9-33)
Aurora	Ur3	S	S	S	S	S	R	R	R
Early Gallatín	Ur4	R	S	S	S	S	R	R	R
Mex 309	Ur5	S	S	S	S	S	S	S	S
Olathe	Ur6	R	S	S	S	S	S	R	S
GN 1140	Ur7	R	S	S	S	S	R	R	R
PC50	Ur9	S	S	R	S	S	R	S	R
Resisto	Ur10	R	S	S	S	S	DP	S	R
PI 181996	Ur11	R	S	S	S	S	S	S	S
Weihing	Ur(3y6)	S	S	S	S	S	R	R	S
BelDakMi 2	Ur(4y6)	R	S	R	S	S	R	R	R
BelDakMi RMR14	Ur(3,6y11)	R	S	R	S	S	R	R	S

GU=Güinope, CH= La Chorrera, YU= Yuscarán, JO= Joya Grande, TA= Tatumbula, CA= El Carreto, BA= El Barro y AG= Las Águilas. Resistente (1-3), S= Susceptible (4-7), DP= dato perdido.

C. Evaluación de líneas con marcadores moleculares SCAR. De las 33 líneas avanzadas de la Universidad de Puerto Rico se seleccionaron 17 líneas que presentaron resistencia fenotípica en el sistema de siembra en bancales las cuales se identificaron la presencia de genes de resistencia usando marcadores SCAR. Las líneas 1572-7 y 1572-33 confirmaron la presencia del gen Ur7 usando el marcador molecular SOAD12, las líneas que presentaron los 4 genes de resistencia usando los marcadores moleculares fueron las líneas 1572-5, 1572-10, 1572-15, 1572-20, 1572-28 y la 1572-32 los cuales presentaron los genes mediante el uso de los marcadores como SK14 (Ur3), SBC6 (Ur6), SOAD12 (Ur7) y GTO2 (Ur11) estas 6 líneas poseen un gran potencial en el uso de líneas paternas en el mejoramiento genético. Como resultado del uso del marcador SA14 el gen dominante marca en 1079 pb y el gen recesivo en las 800 pb, ninguna de las 17 líneas estudiadas marcaron en la banda dominante, sin embargo las líneas 1572-10, 1572-11, 1572-15, 1572-20, 1572-21, 1572-22 y 1572-32 marcaron en las 800 pb el cual no atribuye la presencia del gen Ur4 que solo se encuentra en el gen dominante.

Con el uso del marcador GTO2, el control positivo marca en las 490 pb como dominante y 450 como recesivo, las líneas 1572-2, 1572-5, 1572-10, 1572-15, 1572-20 1572-28 y 1572-32 presentaron heterocigosis presentando el gen dominante y el recesivo al mismo tiempo, estas líneas mediante multiplicación perderán su carácter recesivo y estas mismas líneas son las que presentan las mejores combinaciones de genes de la 17 estudiadas que se usaran con fines de mejoramiento genético (Cuadro 11).

Cuadro 11. Identificación de la presencia de genes de resistencia Ur en 17 líneas resistentes a *Uromyces appendiculatus* de la Universidad de Puerto Rico usando marcadores SCAR.

No. Línea	SK14	SBC6	SOAD12	GTO2
	Ur3	Ur6	Ur7	Ur11
1 1572-2	+	+	-	+/-
2 1572-3	+	+	+	-
3 1572-4	+	+	+	-
4 1572-5	+	+	+	+/-
5 1572-7	-	-	+	-
6 1572-10	+	+	+	+/-
7 1572-11	-	+	+	+/-
8 1572-12	-	+	+	+/-
9 1572-14	+	+	+	-
10 1572-15	+	+	+	+/-
11 1572-20	+	+	+	+/-
12 1572-21	-	+	-	+/-
13 1572-22	+	+	-	+/-
14 1572-28	+	+	+	+/-
15 1572-31	+	+	-	-
16 1572-32	+	+	+	+/-
17 1572-33	-	-	+	-

Presencia (+); ausencia (-); heterocigota (+/-).

SK-14 Gen presente Ur3. Mediante el uso de SCAR SK-14 de las 17 líneas evaluadas 12 presentaron el gen Ur3 en la banda de 620 pb, la variedad Aurora como control positivo (C+) confirma su presencia (Figura 3).

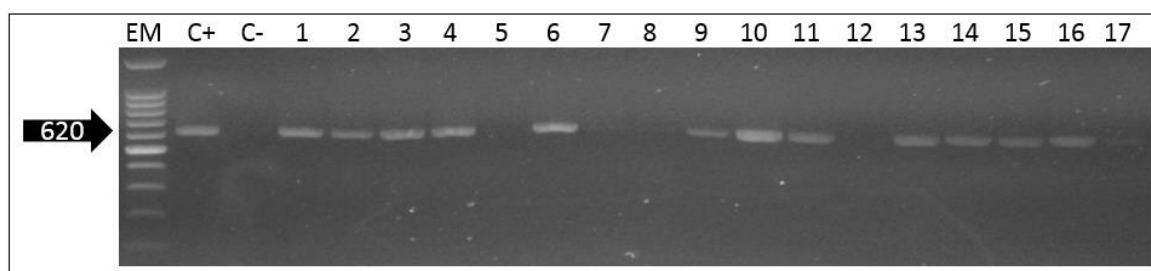


Figura 3. Amplificación del SCAR SK-14 asociado al gen Ur3 presente en los 620 pb, las líneas que presentan dicho gen son: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15 y 16.

SBC6 Gen presente Ur6. Se identificó 15 líneas que presentaron el gen Ur6 mediante el marcador SCAR SBS6 que amplifica la banda 308 pb, utilizando el control positivo la variedad Golden (C+) que confirma la presencia del gen (Figura 4).

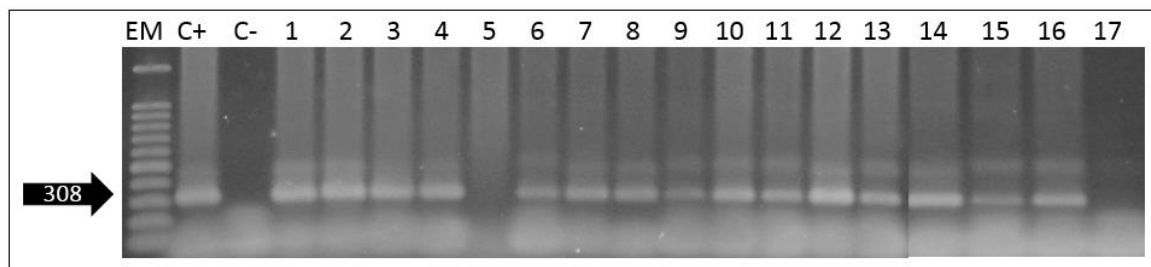


Figura 4. Amplificación del SCAR SBC6 (308 pb) asociado al gen Ur6, el gen solo no se presenta en la línea 5 y 17.

SOAD12 Gen de resistencia Ur7. Se identificó 13 líneas que presentaron el gen Ur7 mediante el marcador SCAR SOAD12 que amplifica la banda 537pb, utilizando el control positivo la variedad GN 1140 (C+) que confirma la presencia del gen (Figura 5).

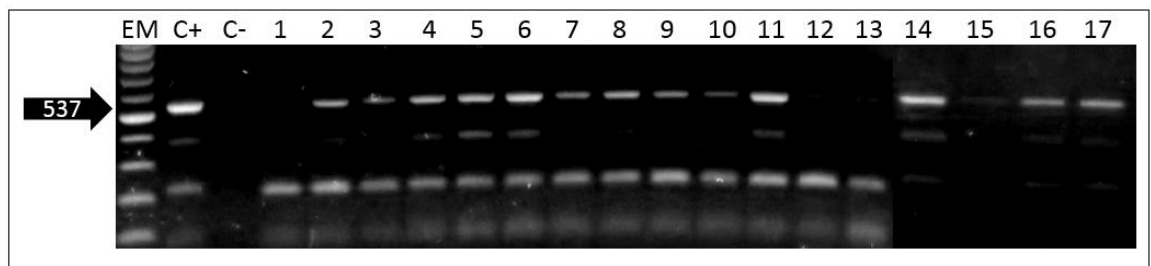


Figura 5. Amplificación del SCAR SOAD12 (537pb) asociado al gen Ur7, el gen solo no se presenta en la línea 1, 12, 13 y 15.

GTO2 Gen de resistencia Ur11. Mediante la amplificación de dos bandas 490/450 pb por medio del SCAR GTO2, usando como control positivo PI 181996 (C+) de las 17 líneas se confirma la presencia del gen de resistencia en el heterocigoto en 11 líneas y 2 líneas presentan únicamente gen recesivo (Figura 6).

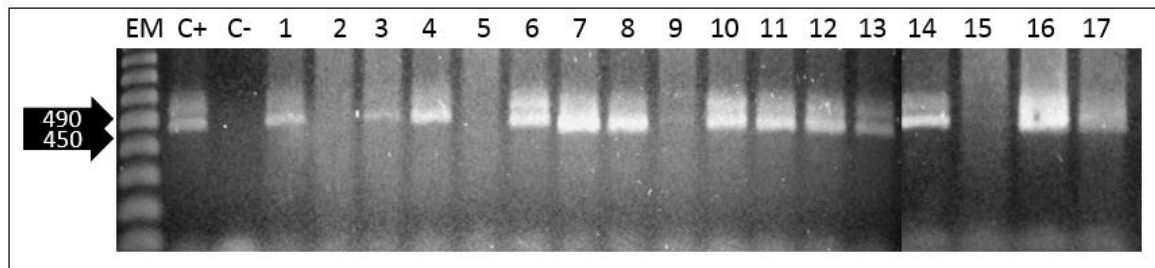


Figura 6. Amplificación del SCAR GTO2 asociado al gen Ur11. Las líneas 1, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14 y 16 presentan las dos bandas y la banda de 450 pb las líneas 3 y 17.

4. CONCLUSIONES

- Mediante el Vivero de Diferenciales de caracterizaron siete razas de las muestras colectadas en localidades de Honduras, lo que sugiere la presencia de una gran variabilidad de *Uromyces appendiculatus* agente causal de la roya del frijol. Se identificó la raza más virulenta (63-63) en dos localidades de Francisco Morazán.
- La utilización del Vivero de Genes de Resistencia a la Roya del Frijol facilitó la identificación de los genes y sus combinaciones de genes que ofrecen resistencia a la mayoría de las razas de *Uromyces appendiculatus* caracterizadas a partir de las muestras de localidades de Honduras.
- Se identificaron líneas de la Universidad de Puerto Rico (UPR) con resistencia fenotípica a la roya del frijol en la evaluación con inóculo proveniente de las localidades de estudio, y la presencia de genes resistentes con marcadores moleculares SCAR.

5. RECOMENDACIONES

- Ampliar la caracterización de la variabilidad patogénica de *Uromyces appendiculatus* agente causal de la roya del frijol, colectando muestras del patógeno en otras regiones frijoleras de Honduras.
- Utilizar las líneas resistentes de la UPR con las mejores combinaciones de genes de resistencia a la roya del frijol, para incrementar la resistencia a través de mejoramiento genético.
- Ampliar la caracterización de las líneas resistentes de la UPR con otros marcadores SCAR asociados a genes de resistencia adicionales a los usados en el estudio como SI19 (Ur5).

6. LITERATURA CITADA

Acevedo M, Steadman JR, Rosas JC, Venegas J. 2005. Characterization of virulence diversity of the bean rust pathogen *Uromyces appendiculatus* in wild bean populations as a tool for effective resistance gene deployment. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 48:132-133.

Acevedo M, Steadman JR, Rosas JC, Venegas J. 2008. Co-evolution of the bean rust pathogen *Uromyces appendiculatus* with its wild, weedy and domesticated hosts (*Phaseolus* spp.) at a center of diversity. Ann. Rep. of the Bean Improv. Coop. 51: 22-23.

Acevedo M, Steadman JR, Rosas JC. 2013. *Uromyces appendiculatus* in Honduras: Pathogen diversity and host resistance screening. Plant Disease 97(5):652-661.

BIC (Bean Improvement Cooperative). 2010. Bean Genetics Committee: SCAR Markers. Bean Improvement Cooperative, Michigan State University, 1 p.
(http://bic.css.msu.edu/_pdf/SCAR_Markers_2010.pdf/).

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

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

Pastor-Corrales M, Liebenberg M. 2010. Common bean rust: Research Techniques. Bean Improvement Cooperative, Michigan State University, 18 p.
(<http://bic.cssmsu.edu/pdf/Rust.pdf/>).

Rosas JC. 2003. El Cultivo del Frijol Común en América Tropical. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 2da. Edición, Imp. Litocom, Tegucigalpa, Honduras, 57 p.

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

Steadman JR, Godoy-Lutz G, Rosas JC, Beaver JS. 2002. Uso de un vivero móvil para obtener patrones de virulencia de la roya del frijol común. Agronomía Mesoamericana 13:37-39.

7. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN para el análisis de SCAR (Método de la Universidad de Wisconsin, (UW) - Madison)

1. Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes).
2. Agregar 50 µl del buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (pestle) de plexiglass de laboratorio. Agregar 450 µl adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.
3. Lo más pronto posible (antes de 1 hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 min.
4. Centrifugar la muestra durante 10 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejido (pellet).
5. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
6. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.
7. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300 µl de RNAasa A (concentración de 100 µg/ml) + buffer TE^b 0.1X (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocar a incubar en baño maria a 37 °C por 1 hora.
8. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por 1 min (3 min si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
10. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
11. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletearlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
12. Vaciar el etanol/acetato de sodio^c y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
13. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.
^a Buffer TE (TRIS HCl 1M, pH=7.5 ; EDTA 0.5 M, pH=8)
^b Usar acetato de sodio 3H₂O (pH 5.2, usando ácido acético glacial)
14. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre
15. Papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).
16. Rehidratar los pellets agregando 100-200 µl de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos en baño maría a 65 °C durante 15 minutos.

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.

Anexo 2. Procedimiento para cuantificar el ADN con Quantus Fluorómetro

1. Preparar la solución de trabajo con el Dye QuantiFluor.
2. Se necesitará 100 µL de solución de trabajo para el blanco, el estándar y las 17 muestras. Diluir Dye QuantiFluor 1:200 en Buffer TE 1X de la siguiente manera.
Cálculos para la solución de trabajo
 $17 \text{ muestras de ADN} \times 100 \mu\text{L (constante)} \times 1.1 \text{ (error de pipeteo)} = \text{solución de trabajo}$
 $1870 \mu\text{L necesario} \times 0.005 = 9.35 \mu\text{L de Dye.}$
 $\text{Solución de trabajo } 1870 \mu\text{L necesario} - 9.35 \mu\text{L Dye} = 1860.65 \mu\text{L Buffer TE 1X}$
NOTA: el número de muestras incluye las 17 muestras de ADN + blanco + estándar.
La muestra de trabajo debe estar protegida contra la luz y mezclar en vortex.
3. Preparar Buffer TE 1X, mediante la dilución del Buffer TE 20X con agua libre de nucleasas.
Cálculos para nuestro análisis
 $\text{Cantidad total de Buffer TE1X} = (98 \mu\text{L (blanco)} + 100 \mu\text{L (estándar)} + (99 \mu\text{L} \times 17 \text{ muestras})) \times 1.1 = 2069.1 \mu\text{L} + 1860.65 \mu\text{L (Buffer para solución de trabajo)} = 3929.75 \mu\text{L de Buffer TE1X.}$
4. Dilución del Buffer TE 20X con agua libre de nucleasas. Cantidad total de buffer TE 1X ÷ 20 (buffer TE 20X).
Cálculos necesarios para nuestro caso.
 $\text{Cantidad total} = 3929.75 \mu\text{L Buffer TE 1X} \div 20 \text{ (Buffer TE 20X)} = 196.49 \mu\text{L Buffer TE 20X} + 3733.26 \mu\text{L de agua libre de nucleasas.}$
5. Prepare la muestra estándar en un tubo de 0.5 ml: añadiendo 2 µL del estándar de ADN Lambda + 98 µL de TE 1X, luego se añadió 100 µL de solución de trabajo. Mezclar con la pipeta lentamente.
6. Prepare el blanco en un tubo de 0.5 ml: luego se añadió 100 µL de solución de trabajo + 100 µL TE 1X. luego se mezcló con una pipeta lentamente.
7. Incubar el estándar y blanco en la oscuridad a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Seleccione el protocolo dsDNA y vaya a la pantalla de calibración. Coloque en la máquina y seleccione “leer blanco”. Coloque la muestra estándar en la máquina y seleccione “leer std”. La norma de relación entre el blanco y el estándar se calcula automáticamente como un control de calidad y debe mostrar la palabra “valido” en verde. Guarde los datos de calibración seleccionado “guardar”.
9. Cuantificar muestras desconocidas: seleccione el protocolo dsDNA. El volumen de la muestra debe fijarse en 1 µL.
10. En un tubo de 0.5 ml, diluir 1 µL de ADN de la muestra en 99 µL de Buffer TE 1X y luego 100 µL de solución de trabajo. Incubar las muestras preparadas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 5 minutos.
11. Coloque la muestra en la máquina y el instrumento medirá automáticamente una vez se cierra la tapa y se muestra la concentración calculada

Anexo 3. Procedimiento para realizar las diluciones para el PCR (reacción en cadena de polimerasas)

Se realizó la dilución de ADN a 3 ng/ml como concentración óptima para el PCR, para obtener esta concentración se estimó mediante la siguiente fórmula para las 17 muestras que presentaron diferentes concentraciones.

$$V_i = 30 \times 100 / (C_i - 30) \quad C_i = \text{concentración de cada muestra}$$

V_i = volumen inicial

C_f = 30 ng/μl

Se hizo la dilución usando platos de 17 celdas con fondo redondeado (Microplate TM96, polypropylene, MJ Research, INC.) primero se colocó la diferencia con la misma micropipeta la diferencia de 100 – V_f de Buffer TE 1X y luego completar con el V_f de cada muestra para completar a 100 μl, luego se selló el Microplate TM96 y se almaceno en el congelador.

Anexo 4. Calculo de concentración para realizar las diluciones para PCR

N°	Protocolo	Concentración	Unidad	Status	ADN	TE 1X
1	dsDNA	91	ng/uL	OK	49.2	50.8
2	dsDNA	70	ng/uL	OK	75.0	25.0
3	dsDNA	81	ng/uL	OK	58.8	41.2
4	dsDNA	101	ng/uL	OK	42.3	57.7
5	dsDNA	110	ng/uL	OK	37.5	62.5
6	dsDNA	145	ng/uL	OK	26.1	73.9
7	dsDNA	211	ng/uL	OK	16.6	83.4
8	dsDNA	106	ng/uL	OK	39.5	60.5
9	dsDNA	59	ng/uL	OK	100.0	0.0
10	dsDNA	210	ng/uL	OK	16.7	83.3
11	dsDNA	144	ng/uL	OK	26.3	73.7
12	dsDNA	225	ng/uL	OK	15.4	84.6
13	dsDNA	165	ng/uL	OK	22.2	77.8
14	dsDNA	64	ng/uL	OK	88.2	11.8
15	dsDNA	57	ng/uL	OK	100.0	0.0
16	dsDNA	176	ng/uL	OK	20.5	79.5
17	dsDNA	64	ng/uL	OK	88.2	11.8

Anexo 5. Protocolo para la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando marcadores SCAR

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

Anexo 6. Protocolo para elaboración de geles de agarosa al 1.2% utilizados en electroforesis.

- a. Pesar 1.32 gr de agarosa utilizando una balanza analítica.
- b. Aforar 110 ml de buffer TBE (Trisborate) 0.5X utilizando una probeta de 200 ml.
- c. Añadir la agarosa pesada a un frasco Erlenmeyer de 500 ml y mezclarlo con el buffer TB 0.5X aforado, dejar reposar por 5 minutos para que haya una buena hidratación.
- d. Calentar en un horno microondas durante 4 minutos y con una agitación constante.
- e. Retirar la solución de agarosa caliente y ponerla sobre agua fría para bajar la temperatura hasta 55-66 °C, utilizando un termómetro para altas temperaturas.
- f. Sellar un molde para geles de agarosa una cinta adhesiva.
- g. Colocar un peine en la parte superior del molde del gel, evitando que roce en la parte inferior del molde, dejar un espacio de 0.5 a 1 mm.
- h. Dejar polimerizar el gel durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- i. Retirar los peines y la cinta de adhesiva con cuidado de no romper el gel.
- j. Colocar el molde con el gel de agarosa, dentro de la cisterna para electroforesis.
- k. Sembrar el producto de PCR en las celdas del gel, de acuerdo al tipo de marcador que se está utilizando.
- l. Una vez sembrada la escalera, los controles y las muestras, se debe tapar la cisterna y conectar los electrodos a la fuente de poder.
- m. Encender la fuente de poder y regular el voltaje a 110 V durante una hora o hasta que la banda de color amarillo este al borde del gel.
- n. Una vez terminada la corrida electroforética se debe desconectar los cables, retirar la tapa y sacar el gel.
- o. Colocar el gel dentro del recipiente con la solución de bromuro de etidio y dejarlo durante 30 minutos con agitación constante.
- p. Retirar el gel colocarlo en el recipiente con agua destilada y dejarlo durante 15 minutos a agitación constante.
- q. Retirar el gel de agua destilada y colocar sobre el transiluminador para observar y fotografiar el gel como respaldo.

Anexo 7. Resultado de la evaluación de la severidad de daños de *Uromyces appendiculatus* en 33 líneas avanzadas de frijol de la Universidad de Puerto Rico (UPR). Zamorano, 2015.

Línea UPR	Lectura 1		Lectura 2		Susceptible a BGYMV
	Severidad	Reacción	Severidad	Reacción	
1572-1	3	R	3	R	
1572-2	3	R	4	S	
1572-3	3	R	3	R	
1572-4	3	R	4	S	
1572-5	3	R	3	R	
1572-6	4	S	3	R	S
1572-7	4	S	3	R	
1572-8	3	R	3	R	S
1572-9	2	R	1	R	S
1572-10	2	R	1	R	
1572-11	6	S	4	S	
1572-12	6	S	5	S	
1572-13	3	R	3	R	
1572-14	4	S	5	S	
1572-15	3	R	4	S	
1572-16	3	R	4	S	S
1572-17	2	R	1	R	S
1572-18	2	R	3	R	S
1572-19	4	S	3	R	S
1572-20	3	R	1	R	
1572-21	3	R	2	R	
1572-22	4	S	2	R	
1572-23	4	S	1	R	S
1572-24	3	R	3	R	S
1572-25	3	R	3	R	S
1572-26	4	S	3	R	S
1572-27	3	R	1	R	S
1572-28	4	S	1	R	
1572-29	3	R	1	R	S
1572-30	3	R	1	R	S
1572-31	1	R	1	R	
1572-32	5	S	4	S	
1572-33	6	S	5	S	
Don Silvio RR	5	S	4	S	
Danlí 46	7	S	5	S	

Escala del CIAT (1987): (1-3) R= resistente, (4-9) S= susceptible y BGYMV= virus de mosaico dorado amarillo del frijol.

Anexo 8. Análisis de suelos

LABORATORIO DE SUELOS ZAMORANO		LSZ-F126-1	
INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS DE SUELOS		VERSIÓN	V01
Sistema de Gestión de Calidad ISO 17025:2005			
Solicitante	Fecha Ingreso Muestra	Fecha Envío Informe	Procedencia de la muestra
Daniel Valle/ PIF	2015-11-19	2015-12-09	EAP Zamorano
Dirección del cliente	N° Lote de Análisis	Cultivo	Informe N°
EAP Zamorano	2015-31	--	2015-347,1
		Sí:	No: X

Código Interno Lab.	Muestra	pH (H ₂ O)	g/100g		mg/Kg (extractable)				
			M.O.	N total	P	K	Ca	Mg	Na
15-S-3329	Bancales	4,49	2,11	0,11	554	156	1696	92	23
15-S-3330	Cofradia, Tatumbula	5,68	2,00	0,10	141	488	2570	761	19
15-S-3331	Hoya Grande	5,00	5,20	0,26	19	198	1192	151	4
15-S-3332	Chorrera, Danli	6,37	2,18	0,11	48	683	1351	172	1
15-S-3333	Ocotol, Yuscaran	4,95	1,92	0,10	40	172	1151	275	21
15-S-3334	Guinope, Paraiso	5,58	3,20	0,16	5	162	1763	303	14

Rango Medio	2,00	0,20	13	Por: Saturación de bases
	4,00	0,50	30	

Métodos: K, Ca, Mg, Na: Solución extractora Mehlich 3, determinados por espectrofotometría de absorción atómica. P: Solución extractora Mehlich 3, determinado por colorimetría. % M.O.: Metodo de Walkley & Black. % N total: 5% de M.O. pH: Relación suelo : agua; 1:1.

El laboratorio no se hace responsable por el estado de la muestra al ingresar a nuestras instalaciones. Los resultados se relacionan solo con las muestras recibidas. El laboratorio se exonera de responsabilidad por reproducción parcial o total del informe, o el uso que pueda dársele. El lote de análisis remite la fecha de ejecución de análisis

Responsable del análisis: M. Sánchez Amaya
Ing. Moisés Sánchez Amaya

Interpretación: J. Ernesto Saavedra
Ing. Joaquín Ernesto Saavedra

Vs. Bto. G. Arévalo
Ing. Gloria Arévalo de Gauspel M.Sc.

LABORATORIO DE SUELOS

Se recolectó muestras de suelo de cada localidad de estudio, en el Análisis de suelo se observa que los bancales tienen suelos muy fuertemente ácidos con pH de 4.5; los suelos de Yuscarán y Joya Grande son fuertemente ácidos con pH de 4.9 y 5.0, respectivamente; y moderadamente ácidos en Güinope, Tatumbula y Danlí con pH de 5.6, 5.7 y 6.4, respectivamente. Los suelos de Yuscarán tienen deficiencia en materia orgánica y los suelos de Joya Grande son los únicos que tienen nitrógeno en el rango medio, sin embargo se observa buena concentración de fósforo en la mayoría de los suelos con excepción en la localidad de Güinope en cual presenta 5 g/100 g de suelo el cuál esta debajo del rango medio.