

Caracterización genética de la resistencia del frijol común a la mancha angular

María Gabriela Díaz Gálvez

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Diciembre, 2001

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Caracterización genética de la resistencia del frijol común a la mancha angular

Tesis presentada como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

María Gabriela Díaz Gálvez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2001

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.

María Gabriela Díaz Gálvez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2001

Caracterización genética de la resistencia del frijol común a la mancha angular

Presentado por

María Gabriela Díaz Gálvez

Aprobada:

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor Principal

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

Aracely Castro, MSc.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D.
Decano Académico

Raúl Espinal, Ph. D.
Asesor

Keith Andrews, Ph. D.
Director General

Pablo Paz, Ph. D.
Coordinador PIA

DEDICATORIA

A todas las mujeres que arrancan suspiros a la tierra con sus manos calladas, mujeres anónimas que engrandecen al mundo, almas fuertes que todo lo dan y todo lo pueden, que despiertan al alba y duermen cuando cae el silencio, en especial a las mujeres que han hecho la diferencia en mi vida:

A mi abuela Gabriela (Q.E.P.D.) por enseñarme la firmeza de su carácter, lealtad, amor y entrega a la familia.

A mi abuelita Teña por enseñarme de la ternura y que nunca se tiene mucha edad para dejar salir al niño que se lleva en el alma.

A la Sra. Inés de Espinoza por compartir sus sabios consejos, los detalles y misticismos del día a día, el amor propio y siempre valorar lo que en esencia uno es y enseñarme que siempre se puede ser mejor.

A la mujer que sin duda resume todo en un sólo ser y un inmenso corazón, Mamá en especial este trabajo para ti por tu esfuerzo diario por que tus hijos seamos mejores, tu abnegación, las noches de desvelos, el invaluable apoyo que siempre me das y por darme el mejor ejemplo de una gran mujer, mi mayor orgullo en la vida es ser tu hija, por ti y para ti siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar a mi lado cuidándome siempre y por todas las personas maravillosas que a puesto en mi camino.

A mi madre Isabel por todo su amor y apoyo y a mi papá Gustavo por ser su regalona.

A mis hermanos Alejandro y Gustavo por su cariño, apoyo y por cuidar de nuestro tesoro mientras yo he estado en Honduras. Alejandro gracias por cuidarme como si fuera tu hija.

A mi familia materna y paterna que me han acompañado y ayudado de distintas formas en la distancia.

Al Dr. Raúl Espinal por su comprensión, apoyo invaluable por ser un ejemplo, por la paciencia que tuvo con el grupo y por haber sido en algún momento la mano amiga que necesite.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por compartir sus valiosos conocimientos, por su importante ayuda y por guiarme en la realización de este trabajo.

A la Ing. Aracely Castro por ayudarme en mis momentos de mayor confusión, por su paciencia y valiosos comentarios.

Al Dr. Isidro Matamoros por hacer posible que pudiese continuar mis estudios de Ingeniería y a su familia por el cariño sincero que siempre me han demostrado.

A la Sra. Inés y al Dr. Leonardo Espinoza, mis padres adoptivos, gracias por recibirme en su casa como a una hija, gracias por los consejos para realizar este trabajo, por darme un apoyo incansable, por ser mi fuente de paz y por ser mi pedacito de Chile en Honduras gracias de todo corazón, los quiero mucho.

A mis amigas Pamela, María José y Claudia gracias por acompañarme, por quererme y por ser mis incondicionales.

A Josué, Daniel, Miguel y Oscar gracias por estos dos años donde compartieron sus vidas enriqueciendo la mía, los quiero mucho.

A mis compañeros del Proyecto Zamorano/USAID Componente Frijol en especial a Cristina (gracias por tu apoyo), Nilda, Omar, Juan Pablo y Delfina.

Al Ing. Wolfgang Pejuán y al Ing. Hector Sierra, gracias por haber sido unos jefes tan comprensivos y más que jefes excelentes amigos.

A mis amigos de siempre Alexandra, Bertha, Jorge, Erick, Mauricio, Manuel, Byron, Rosa Amelia, Ana Gabriela, Sully, Elena, Raquel, Hernán, María Alexandra y en especial a Juan Aguilar, gracias a todos por haber compartido aquellos momentos especiales conmigo.

Al Ing. Rodrigo Martino por darme la oportunidad de esta experiencia académica.

A la Ing. Lubwia Aranda y a Elisa Erazo por su importante ayuda en el trabajo de laboratorio, la comprensión y el apoyo.

A la Ingeniera María A. Bravo por su ayuda en este trabajo y al Licenciado Roger Ramos por su apoyo en el trabajo de campo.

A todos y cada uno de los trabajadores del Programa de Investigación de Frijol que fueron parte fundamental de este trabajo.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Agradezco al proyecto de Revitalización del Sector Agrícola Post- Mitch Zamorano/USAID por haberme permitido realizar los estudios de Ingeniería Agronómica.

Agradezco a la Corporación Educacional Sociedad Nacional de Agricultura (CODESSER) de Chile por el financiamiento parcial de mis estudios del Programa de Agrónomo y del Programa de Ingeniería Agronómica.

Agradezco el apoyo en la realización de esta tesis al Programa de Investigaciones en Frijol, bajo el financiamiento del Programa Bean/Cowpea CRSP (Donación USAID No. DAN-1310-G-SS-6008-OO).

RESUMEN

Díaz Gálvez, María Gabriela 2001. Caracterización genética de la resistencia del frijol común a la mancha angular. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 45 p.

El daño ocasionado por enfermedades foliares constituye un serio problema para los productores de frijol en Honduras. La mancha angular, cuyo agente causal es el hongo *Phaeoisariopsis griseola*, es considerada una de las de mayor importancia económica debido a su amplia distribución geográfica y la reducción que causa en el rendimiento del cultivo, estimada aproximadamente en 40%. El objetivo de este estudio fue caracterizar genéticamente la resistencia del frijol común a la mancha angular, mediante análisis de segregación fenotípica, herencia genética y el uso de marcadores moleculares. Para este propósito se utilizó una población segregante derivada de la cruce de una variedad mesoamericana (Tío Canela-75) susceptible y un germoplasma andino (G06727) resistente a la mancha angular. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio y camas de infección del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de Zamorano. Se avanzó generacionalmente a partir de plantas F2 hasta familias F4 utilizando el método de descendencia de semilla individual, se evaluó la segregación fenotípica mediante una prueba de Chi-cuadrado utilizando los datos de las evaluaciones fenotípicas de las plantas F2. La herencia genética de la resistencia a la mancha angular se midió a través de un análisis de regresión padres/descendientes usando los datos de la reacción fenotípica de las plantas individuales F2 y sus progenies (F3). Se estimó la segregación de caracteres como rendimiento y otros. Se evaluó el marcador molecular SCAR NO2 utilizando la variedad Cornell 49-242 y se caracterizaron molecularmente las familias F4 de la población ALS 9951. La segregación fenotípica de la resistencia del frijol común a la mancha angular se ajusta al modelo Mendeliano 3:1, el cual propone que la resistencia está determinada por un gen recesivo. La herencia genética de la resistencia sugiere una alta heredabilidad (0.65) de la resistencia a la mancha angular y confirma el comportamiento de las plantas F2. El marcador SCAR NO2 no es útil para la identificación de familias que presenten resistencia a las razas de *P. griseola* presentes en Honduras. Sin embargo, es valioso para identificar familias que presentan resistencia a otras razas del patógeno.

Palabras claves: Cebadores, heredabilidad, marcadores moleculares, *Phaeoisariopsis griseola*, PCR, población, polimorfismo, segregante.

Abelino Pitty, Ph. D.

NOTA DE PRENSA

Marcadores moleculares, valiosa herramienta para el mejoramiento del frijol contra la mancha angular

La mancha angular es una enfermedad causada por el hongo *Phaeoisariopsis griseola* que causa pérdidas económicas importantes en el frijol común. Muchos países productores de frijol se han visto afectados por esta enfermedad, tanto en Latino América como en Africa ya que esta enfermedad produce pérdidas en el rendimiento que van desde 40 a 80% a causa de la defoliación temprana que produce la enfermedad.

El proceso de mejoramiento genético para resistencia a la mancha angular ha sido lento y difícil, debido a varias circunstancias. El hongo causante de la enfermedad posee diversas razas y la mayoría de los genotipos de frijol evaluados a la fecha muestran una reacción variable a su incidencia, siendo resistente a unas razas pero susceptible a otras.

El uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético de frijol, se presenta como 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.

En el laboratorio de Biología Molecular del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de Zamorano, se han probado diversos tipos de marcadores moleculares que afectan a la región de Centro América y el Caribe, entre ellas la mancha angular.

En estudios recientes se probó un marcador SCAR desarrollado en Brasil, sin embargo, la variabilidad del patógeno, requiere de marcadores específicos para las razas que prevalecen en Honduras y el resto de los países de Centro América, se espera continuar estudios en la búsqueda de genes de resistencia contra la mancha angular con la ayuda de marcadores moleculares ya que aceleran el proceso de mejoramiento. Contar con variedades comerciales resistentes a enfermedades es la práctica más barata y útil con la que cuentan los pequeños productores de nuestros países.

Licda. Sobeyda Alvarez

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
Resumen	vii
Nota de prensa.....	viii
Contenido	x
Índice de Cuadros.....	xiii
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Anexos.....	xvi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DEFINICION DEL PROBLEMA.....	2
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3 OBJETIVOS.....	2
1.3.1 Objetivo General.....	2
1.3.2 Objetivos Específico.....	2
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 El frijol y su importancia..	3
2.2 La mancha angular.....	3
2.2.1 Descripción del patógeno	4
2.2.2 Sintomatología.....	4
2.2.3 Epidemiología.....	5
2.2.4 Evaluación de germoplasma.....	5
2.2.5 Variabilidad del patógeno.	6
2.2.6 Control.....	6
2.2.6.1 Control cultural.....	6
2.2.6.2 Control químico.....	7
2.2.6.3 Control Genético.....	7
2.3 MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL FRIJOL.....	7
2.3.1 Mejoramiento para resistencia a enfermedades.....	8
2.4 MARCADORES PARA EL FITOMEJORAMIENTO.....	8

2.4.1	Marcadores Moleculares.....	9
2.4.2	Tipos de Marcadores Moleculares.....	9
2.4.3	Marcadores Moleculares SCAR.....	9
2.4.4	Uso de Marcadores Moleculares tipo SCAR.....	10
2.4.4.1	Extracción de ADN.....	10
2.4.4.2	Amplificaión de ADN.....	10
2.4.4.3	Separación de ADN.....	11
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN.....	
	ALS 9951.....	12
3.1.1	Localización del estudio.....	12
3.1.2	Material Experimental.....	12
3.1.3	Variables y su medición.....	12
3.1.3.1	Severidad.....	12
3.1.3.2	Segregación de la resistencia a la mancha angular.....	12
3.1.3.3	Estimación de la heredabilidad de la resistencia a la mancha angular	13
3.1.3.4	Estimaciones de la segregación del rendimiento y otros caracteres.....	
	Adicionales.....	13
3.1.4	Siembra.....	13
3.1.5	Inoculaciones.....	14
3.1.6	Evaluación de Severidad.....	14
3.2	EVALUACIÓN USANDO EL MARCADOR MOLECULAR NO2..	14
3.2.1	Localización del estudio.....	15
3.2.2	Característica del germoplasma.....	15
3.2.3	Siembra.....	15
3.2.4	Muestreo.....	15
3.2.5	Equipo y material de laboratorio.....	15
3.2.6	Adaptación de la amplificación de ADN.....	16
3.3	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FAMILIAS F4 DE LA POBLACIÓN ALS 9951.....	18
3.3.1	Localización del estudio.....	18
3.3.2	Característica del material experimental.....	18
3.3.3	Siembra.....	19
3.3.4	Muestreo.....	19
3.3.5	Variables y su medición.....	19
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ALS 9951.....	20

4.1.1	Severidad.....	20
4.1.2	Segregación por resistencia a la mancha angular.....	20
4.1.3	Heredabilidad.....	21
4.1.4	Segregación fenotípica.....	22
4.1.4.1	Evaluación de rendimiento y otras características morfológicas en familias F3:2.....	22
4.1.4.2	Evaluación de caracteres morfológicos de las familias F4:3.....	24
4.2	EVALUACION DEL MARCADOR MOLECULAR NO2.....	25
4.2.1	Adaptación de la amplificación.....	25
4.3	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FAMILIAS F4 DE LA POBLACIÓN ALS 9951.....	26
5	CONCLUSIONES.....	29
6	RECOMENDACIONES.....	30
7	BIBLIOGRAFÍA.....	31
8	ANEXOS...	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1	Escala general de evaluación para enfermedades.....	13
2	Mezcla maestra para marcadores SCAR.....	17
3	Variaciones de las mezclas para PCR con los cebadores PHG-2R y PHG-2F... ..	17
4	Variaciones de mezclas con perlas PCR para la amplificación con los cebadores PHG-2R y PHG-2F.....	18
5	Segregación fenotípica de plantas F2 de la reacción a la mancha mancha angulara los 75 DDS. Zamorano, Honduras, 2001.....	21

INDICE DE FIGURAS

Figura

1	Representación de la heredabilidad (h^2) estimada mediante el método de regresión padres: descendientes (F2:F3) (Smith y Kinman, 1965).....	22
2	Distribución del rendimiento de las familias F3 de la población ALS 9951 (Tío Canela-75 y G06727 se encuentran en la clase 21 y 40 g/planta). Zamoarno, Honduras, 2001.....	23
3	Distribución de la reacción a la mancha angular de las familias F3 de la población ALS 9951. G06727 presentó el grado 2 y Tío Canela-75 el grado 9. Zamorano, Honduras, 2001..	23
4	Distribución de los días de madurez de cosecha de las familias F3 de la población ALS 9951 (Tío Canela-75 maduró a los 79 y G06727 a los 84 DDS). Zamorano, Honduras, 2001.....	24
5	Distribución de las familias F4:3 de la población ALS 9951 de algunas características morfológicas de cada acervo. Zamorano, Honduras, 2001.....	25
6	Representación de polimorfismos generados con el SCAR NO2 (gen <i>Phg-2</i>) en ADN de cuatro plantas Cornell 49-242 (C1, C5, C9 y C10) usando reactivos convencionales, perlas de PCR y diferentes concentraciones de los cebadores para preparar las mezclas maestras. E= Escalera; C-= Control negativo; M= Mezclas para PCR y C= ADN de plantas Cornell 49-242. Zamorano, Honduras, 2001.....	26
7	Polimorfismos generados con el SCAR NO2 (gen <i>Phg-2</i>) en familias F4 resistentes a la mancha angular. P= Presente; A= Ausente. Zamorano, Honduras, 2001.....	27
8	Polimorfismos generados con el SCAR NO2 (gen <i>Phg-2</i>) en familias F4 susceptibles a la mancha angular. P= Presente; A= Ausente. Zamorano, Honduras, 2001.....	27

9	Polimorfismos generados con el SCAR NO2 en cuatro familias susceptibles F4 de la población ALS 9951 y sus progenitores Tío Canela-75 (TC) y G06727 (P= Presente; A= Ausente). Zamorano, Honduras, 2001.....	28
---	---	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1	Extracción de ADN para análisis de RAPD (Método de la UW-Madison).....	35
2	Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del Fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., D y NA Quant TM 200).....	37
3	Diluciones de ADN (20 ng/μl) según el método de la UW-Madison.....	38
4	Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores tipo SCAR.....	39
5	Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR NO2 para <i>el gen Phg-2</i>	40
6	Electroforesis para la amplificación de ADN.....	41
7	Características fenotípicas de acervos mesoamericano y andino.....	42
8	Características fenotípicas de acervos mesoamericano y andino.....	43
9	Comparación entre resultados de campo y laboratorio de las evaluaciones de las familias F4 de la población ALS 9951.....	44

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los granos básicos más importantes en la dieta de los hondureños, especialmente para las familias de escasos recursos (Rosas *et al.*, 2000). En Honduras, el frijol es el segundo grano básico en importancia después del maíz, por la superficie destinada a su producción y la cantidad consumida por la población. Este grano es considerado la fuente más barata de proteínas y calorías; adicionalmente, genera ingresos significativos para los productores dedicados a su cultivo (Rodríguez *et al.*, 1998).

La producción de frijol se caracteriza por sus variaciones en rendimiento, debido a los numerosos factores bióticos, climáticos y edáficos que afectan su crecimiento y desarrollo. Generalmente, se le cultiva bajo condiciones de lluvia que favorecen la incidencia de enfermedades, las cuales contribuyen considerablemente a que su productividad sea baja e inestable (CIAT, 1987). La mancha angular, cuyo agente causal es el hongo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, es actualmente considerada una de las enfermedades del frijol común de mayor importancia económica, debido a su amplia distribución geográfica y a la reducción que causa en el rendimiento del cultivo. Cuando ocurre una infección causada por *P. griseola*, son comunes los síntomas en las hojas que aparecen como lesiones en forma angular, delimitadas por las nervaduras. Estas lesiones pueden incrementarse y coalescer sobre la lámina foliar, llegando a cubrirla completamente (PIF, 2001).

El progreso en el mejoramiento genético para resistencia a la mancha angular ha sido lento y difícil, debido a varias circunstancias. *P. griseola* posee diversas razas y la mayoría de los genotipos de frijol evaluados a la fecha muestran una reacción variable a su incidencia, siendo algunos resistentes a unas razas pero susceptibles a otras. Por ello, el conocimiento de la diversidad genética, la organización poblacional y la evolución del patógeno (Beebe y Pastor-Corrales, 1991; Gepts y Debouck, 1991), y de la naturaleza de la resistencia genética a la enfermedad, son factores determinantes para desarrollar variedades de frijol común con resistencia duradera a esta enfermedad.

De manera complementaria, el uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético de frijol, se presenta como 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.

1.1 DEFINICION DEL PROBLEMA

La problemática central de este estudio son de las pérdidas en la producción y productividad del frijol común en Centro América, a causa de la mancha angular (PIF, 2001). En la actualidad no existen variedades comerciales de frijol resistentes a esta enfermedad en Centro América. Los materiales mesoamericanos disponibles en los bancos de germoplasma son susceptibles a las razas más virulentas de *P. griseola* del mismo origen; sin embargo, algunos materiales andinos presentan resistencia a estas razas. El mejoramiento a través de la generación de recombinaciones genéticas entre fuentes de resistencia de ambos acervos genéticos podría representar una solución estable a este problema.

1.2 JUSTIFICACION

En este estudio se pretendió caracterizar genéticamente, la resistencia a la mancha angular en la descendencia de un cruzamiento de frijol común, entre un genotipo andino resistente y una variedad mesoamericana susceptible a esta enfermedad, con el fin de incrementar los conocimientos necesarios para el mejoramiento genético contra *P. griseola*.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar genéticamente la resistencia del frijol común a la mancha angular, mediante el análisis de segregación fenotípica, la herencia genética y el uso de marcadores moleculares.

1.3.1.1 Objetivos Específicos

1. Determinar el control genético y la heredabilidad de la resistencia del frijol común a la mancha angular, en una cruce de germoplasma mesoamericano (susceptible) × andino (resistente).
2. Desarrollar líneas avanzadas con características resistentes a la mancha angular.
3. Evaluar marcadores moleculares SCAR ligados a la resistencia del frijol común a la mancha angular.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El frijol y su importancia

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de agricultores de pequeña escala en regiones de América Latina, África y Asia, donde predominan países en proceso de desarrollo en los que se genera aproximadamente el 77% de la producción mundial. Sin embargo, en países desarrollados en América del Norte, Europa y la Región Pacífica, el frijol común es un cultivo de alta tecnología y un rubro de exportación que representa aproximadamente el 23% de la producción mundial (Rosas, 1998). Según Singh (1996), dentro de las leguminosas, la importancia del frijol común solamente es superada por la soya (*Glycine max* (L.) Merr.) y el maní (*Arachis hypogea* L.).

El grano de frijol posee un alto valor nutricional en sus cotiledones (CIAT, 1991), por lo que es un componente esencial para la mayoría de la población rural y en algunos casos la urbana, de los países productores más pobres o en vías de desarrollo. El frijol es considerado una de las fuentes principales de proteína vegetal, aunque su contenido puede variar de acuerdo a la variedad (18-24%), superando al de muchos alimentos (Rosas, 1998).

2.2 La mancha angular

La mancha angular del frijol (en inglés “angular leaf spot” o “ALS”), es una enfermedad cuyo agente causal es el hongo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris. Se distribuye ampliamente en el trópico y subtropico, siendo importante en Brasil y en la región de los Grandes Lagos en África. Antes era considerada una enfermedad de menor magnitud en muchos países productores de América Latina (Chacón *et al.*, 1996; Beebe y Pastor-Corrales, 1991); sin embargo, en los últimos años los daños causados al cultivo se han visto incrementados en importancia, sobretodo en Centro América.

Beebe y Pastor-Corrales (1991), señalan que inicialmente muchos investigadores estimaban que la mancha angular no causaba pérdidas significativas, debido a que usualmente es mucho más severa después de floración y a veces se presenta en forma tardía en los cultivos. Sin embargo, trabajos recientes muestran claramente la importancia de esta enfermedad y las reducciones considerables que produce en los rendimientos.

Según Schwartz y Gálvez (1980), las pérdidas en rendimiento han alcanzado porcentajes importantes que van desde 40 a 80%, mencionando como ejemplo a Estados Unidos con pérdidas de hasta 50%, Colombia con 40-60% y México con 80%. Elvir (1998), señala que las pérdidas en Centro América oscilan alrededor del 40%.

2.2.1 Descripción del patógeno

P. griseola es un hongo imperfecto de la clase Deuteromycetes, orden Moliniales, familia Stilbaceae (Castaño y Del Río, 1994). Anteriormente se le conocía como *Isariopsis griseola*, y tenía otros sinónimos como *Isariopsis laxa* (Ell) Sacc; *Cercospora columnare* Ell y Ev; *Cercospora sthulmani* Henn. (Campos-Ávila, 1987; Schwartz y Gálvez, 1980).

En las hojas, la esporulación de *P. griseola* ocurre principalmente en el envés en forma de grupos compactos de 8 a 40 conidioforos tabicados, denominados sinemas o coremios, que tienen un diámetro de 10-40 micras y 80-500 micras de longitud (Castaño y Del Río, 1994). Según Schwartz y Gálvez (1980) sobre los sinemas, que son de forma columnar y de color oscuro, se desarrollan las conidiosporas.

2.2.2 Sintomatología

Los síntomas aparecen en las hojas primarias como lesiones circulares que se generalizan en la planta, después de la floración o al inicio de la formación de vainas. Esto se debe a que el inóculo proviene, principalmente, de los residuos de cosecha (EAP, 1994).

Las manchas son visibles tanto en el haz como en el envés de las hojas, llegando a cubrir una gran parte del área foliar y asociándose con diversos grados de clorosis. Inicialmente, se observan lesiones grises en el haz de las hojas, que luego se tornan color café y son cubiertas por muchos sinemas (Castaño y Del Río, 1994). Cuando las lesiones están bien establecidas en el follaje, son típicamente angulares y delimitadas por las nervaduras (EAP, 1994). A medida que envejecen, las manchas pueden tornarse de forma circular. En el campo no es muy común observar esta forma, ya que debido a la gran cantidad de lesiones hay clorosis sobre las hojas. Posteriormente las manchas se juntan y coalescen, causando defoliación desde el inicio de la floración hasta el final del ciclo vegetativo (Campos-Ávila, 1987).

Campos-Ávila (1987), menciona que las vainas también pueden ser afectadas; en estas, las manchas son casi circulares, superficiales y de color rojizo oscuro. En variedades son muy susceptibles, el hongo afecta la semilla transformándola en un transmisor potencial de la enfermedad. Las vainas infectadas pueden producir semillas mal desarrolladas o totalmente arrugadas. Adicionalmente, se pueden presentar lesiones alargadas de color café en los tallos, ramas y pecíolos de la planta (Schwartz y Gálvez, 1980).

Beebe y Pastor-Corrales (1991), señalan que con el conteo de las lesiones en hojas o vainas se pueden identificar variedades resistentes, ya que existe una correlación positiva entre la severidad de la enfermedad y el número de lesiones.

2.2.3 Epidemiología

P. griseola puede ser transportada por medio de semilla contaminada y es capaz de sobrevivir entre 5 y 18 meses en residuos de cosecha infectados en el suelo. Su dispersión

puede ocurrir a partir de estos residuos, mediante salpicaduras producidas por agua de lluvia o riego; o a partir de las esporulaciones en las lesiones ya establecidas, desde donde el viento desprende y transporta las conidias (Castaño y Del Río, 1994).

Ya en la planta, el patógeno penetra el tejido vegetal a través de los estomas, luego avanza intercelularmente en el mesófilo y en el tejido del parénquima de empalizada. La infección aparece aproximadamente 6-9 días después; posteriormente, el hongo avanza intracelularmente a través de las lesiones necróticas (Gálvez y Schwartz, 1980; Fernández y López, 1985).

Las temperaturas moderadas (18-25 °C) y la alta humedad relativa, alternada con períodos cortos de baja humedad, son condiciones favorables para la infección del hongo (EAP, 1994).

2.2.4 Evaluación de germoplasma

Las evaluaciones de germoplasma por su reacción a un patógeno determinado puede ser realizadas en el campo o en invernadero. Es muy importante considerar la localidad y las condiciones climáticas como la humedad relativa, temperatura y precipitación, y posiblemente el tipo de suelo (Beebe y Pastor-Corrales, 1991). Cuando se evalúa germoplasma o material genético, deben controlarse todos los factores posibles que influyan en la evaluación. Por ejemplo, al trabajar con enfermedades fungosas se deben controlar insectos, enfermedades bacterianas y cualquier otro factor biótico o abiótico que pueda conducir a conclusiones erróneas.

El CIAT, considera la necesidad de uniformizar una escala y ha propuesto un sistema estándar para la evaluación de la reacción de germoplasma del frijol común a factores bióticos y abióticos favorables y adversos, con el fin primordial de contar con un sistema uniforme, rápido y preciso (CIAT, 1987). Adicionalmente, señala la importancia de contar con cultivares testigos conocidos por su reacción que contribuyan a establecer el nivel o presión ejercida por enfermedades o plagas. Estos testigos son también indicativos importantes en estudios donde se realizan inoculaciones artificiales, para asegurar que la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad son debidas a características de la planta y no a una inoculación deficiente.

La EAP (1994) indica que las evaluaciones para enfermedades de frijol, incluyendo la mancha angular, se realizan en las etapas de desarrollo R6 (floración) y R8 (llenado del grano).

2.2.5 Variabilidad del patógeno

El CIAT (1997) señala que el comprender los patrones de diversidad de los patógenos permite un uso más racional de los recursos genéticos existentes.

En trabajos con aislamientos de *P. griseola*, científicos del CIAT encontraron que estos se separaban en dos grupos: uno Andino, asociado con frijoles andinos de semilla grande; y uno Mesoamericano, asociado con frijoles mesoamericanos de semilla pequeña y mediana. Los grupos de aislamientos mesoamericanos presentan más fenotipos (razas) virulentos, que atacan a un rango más amplio de diferenciales incluyendo algunos andinos, con cierta preferencia por los mesoamericanos. Los aislamientos andinos mostraron una marcada preferencia por los frijoles de este origen. Los trabajos de Chacón *et al.* (1996), realizados con aislamientos de *P. griseola* provenientes de África y América Latina, llegaron a resultados similares. Este es un factor muy importante a considerar al evaluarse germoplasma y hacer cruces para obtener resistencia a esta enfermedad.

El paralelismo entre la diversidad patogénica de *P. griseola* y su hospedero el frijol común, sugiere que la separación de los aislamientos del patógeno también ocurrió como dos eventos separados y diferentes. Los aislamientos originados en los Andes evolucionaron con el frijol común andino de semilla grande; mientras que, los aislamientos mesoamericanos se originaron en Mesoamérica y evolucionaron con los frijoles de esta región. La evolución paralela de *P. griseola* con el frijol común sugiere una coevolución que comenzó cientos de años atrás, probablemente antes de la domesticación del frijol cultivado (CIAT, 1997).

El CIAT reportó una investigación donde se evaluaron aislamientos de Centro América y El Caribe, mostrando los primeros una alta variabilidad y un alto grado de virulencia que también fue observado en aislamientos de África y América del Sur. Adicionalmente, en Honduras y Nicaragua fue detectada la raza más agresiva (63-63), que ataca a todos los diferenciales de mancha angular. Estos diferenciales constituyen un grupo de 12 variedades donde se conoce la reacción a la enfermedad, y donde cada uno tiene un código o valor usado para identificar la raza del patógeno. Con base en estos trabajos, la evaluación de fuentes de resistencia para la región son evaluados con un aislamiento hondureño altamente virulento de Honduras, identificado como Pg8 (CIAT, 1999).

2.2.6 Control

2.2.6.1 Control cultural Con el fin de disminuir los daños ocasionados por la mancha angular, Rodríguez *et al.* (1998) recomiendan reducir las fuentes de inóculo eliminando los residuos de cosecha en los cultivos donde se haya presentado la enfermedad usar semilla libre del patógeno y rotar con otros cultivos por un mínimo de dos años.

2.2.6.2 Control Químico La aplicación de fungicidas debe ser solamente un complemento de otras medidas preventivas, efectuándose preferentemente en los inicios del ataque. Se recomiendan los fungicidas Carbendazima, Benomilo, Oxiclورو de Cobre, Zineb y Maneb. La semilla puede ser tratada con Benomilo, antes de la siembra (EAP, 1994). De igual manera, Rodríguez *et al.* (1998) recomiendan productos como Dithane M-45 80 PM (mancozeb) y Benlate (benomilo).

2.2.6.3 Control Genético La mayoría de los agricultores del trópico no están en condiciones de prevenir o controlar mediante el uso de insumos, los factores bióticos y abióticos que afectan la producción de frijol (CIAT, 1987). Por esta razón, muchos programas de mejoramiento han intensificado la búsqueda de variabilidad genética para encontrar genes deseables que contribuyan a reducir los efectos adversos de estos factores.

Elvir (1998), señala que el CIAT ha distribuido fuentes de resistencia para mancha angular a distintos programas de mejoramiento de Latinoamérica y Africa, con el fin de que sean evaluados en diferentes regiones.

En términos generales, se conoce que la herencia de la resistencia a la mancha angular es conferida por genes dominantes y recesivos (Santos-Filho *et al.*, 1976; citados por Pastor Corrales y Shchwartz, 1989). Sin embargo, esta relativa resistencia genética ha reportado gran variabilidad debido a las múltiples razas de *P. griseola*, lo que obliga a trabajar con todas las herramientas posibles para obtener mayor estabilidad de resistencia en materiales mejorados.

2.3 MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL FRIJOL

El mejoramiento genético de plantas ha sido practicado con éxito desde los inicios de la civilización. El avance genético puede ser alcanzado a partir del momento en que exista o se genere suficiente variabilidad genética, que el efecto ambiental no enmascare por completo esta variabilidad, y que sea posible realizar selección y recombinación de genotipos superiores para garantizar el establecimiento de una generación superior (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los mejoradores han encontrado limitaciones en la rapidez y precisión con que muchas características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas y usadas en sus programas de mejoramiento (Kelly *et al.*, 1994). Tradicionalmente, el progreso en el mejoramiento se ha basado exclusivamente en el análisis de fenotipos; sin embargo, el éxito de este análisis depende en gran medida de la heredabilidad del carácter (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La heredabilidad expresa el grado de semejanza entre parientes (p.e. padres y descendientes), por lo que un uso importante de este parámetro es su papel predictivo, o expresión del grado de veracidad del valor fenotípico de un progenitor, como guía de su valor para el mejoramiento y la probable superioridad de su descendencia (Rosas, 1999). Según algunos estudios, la resistencia a la mancha angular es de heredabilidad intermedia, al igual que la resistencia a otras enfermedades como la bacteriosis común y el añublo del halo (Rosas y Young, 1992).

2.3.1 Mejoramiento para resistencia a enfermedades

Beebe y Pastor-Corrales (1991), señalan que las enfermedades son uno de los factores más importantes asociados con los bajos rendimientos de frijol común en las regiones

productoras de América Latina y África. Se reportan más de 200 patógenos que afectan al cultivo, aunque solamente una docena de ellos causan pérdidas económicas significativas.

El incremento de la diversidad genética mediante la mezcla de genotipos es una de las estrategias para adquirir resistencia con mayor estabilidad. Se ha observado que la diversidad genética ha contribuido a limitar el desarrollo de algunas enfermedades importantes (Beebe y Pastor-Corrales, 1991).

Los métodos de mejoramiento para piramidar genes de resistencia a las enfermedades comprenden generalmente cruzas, retrocruzas y cruzas de prueba encaminadas a verificar la presencia de una combinación deseada de esos genes. Las limitaciones inherentes a cada uno de estos procesos, incluyendo el muestreo de los padres, inciden en que finalmente no toda la progenie tenga la combinación de genes deseada. El esfuerzo de recombinación de genes de resistencia podría ser más eficiente si en el proceso se incorpora el uso de marcadores moleculares ligados estrechamente a ellos, seleccionando indirectamente y en ausencia del patógeno por la presencia de los genes responsables de la resistencia (Kelly *et al.*, 1994).

2.4 MARCADORES PARA EL FITOMEJORAMIENTO

Los marcadores, o caracteres que se pueden usar directa o indirectamente para obtener información acerca de la genética de caracteres de interés de un organismo en estudio, se pueden detectar a diferentes niveles como el morfológico (color de la flor), bioquímico (proteínas e isoenzimas) o de ADN (marcador molecular), (Angel, 1999).

Beebe (1997), señala que hay dos posibles bases genéticas para el efecto de un marcador: la pleiotropía y el ligamiento genético. La primera, implica que un gen que influye el marcador también influye el carácter de interés; mientras que, el ligamiento genético explica que un gen que influye al marcador se encuentra cerca del gen que influye al carácter de interés. Sin embargo, el ligamiento genético no es permanente y a mayor distancia entre el marcador y el gen de interés, mayor es la probabilidad de romper esta relación.

2.4.1 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son de interés para el mejoramiento de plantas, como fuente de información genética sobre los cultivos, y para su uso en la selección indirecta de caracteres ligados a ellos (Kelly, 1995). Un marcador es un indicador de la presencia de otro carácter, que sirve para reconocerlo indirectamente (Beebe, 1997).

A diferencia de los marcadores morfológicos y bioquímicos, los marcadores moleculares no son afectados por el ambiente y no varían con la edad de la planta, por lo que pueden utilizarse en cualquier fase de su desarrollo siempre que sea posible obtener suficiente cantidad de ADN (Angel, 1999; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La identificación de genotipos superiores en etapas iniciales del crecimiento, abre la posibilidad de acelerar el proceso de selección y recombinación de los individuos deseados, y consecuentemente, reducir el tiempo necesario para completar una generación de mejoramiento (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

De modo general, el uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético tiene diversas aplicaciones cuyos resultados presentan expectativas a corto, mediano y largo plazo. Las aplicaciones a corto plazo incluyen básicamente, la identificación y discriminación de genotipos. En aplicaciones analíticas de mediano y largo plazo, los marcadores permiten cuantificar la variabilidad genética existente a nivel de la secuencia de ADN y su correlación con la expresión fenotípica en procedimientos de mapeo genético (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.4.2 Tipos de Marcadores Moleculares

Los marcadores de ADN se basan en diferencias en la longitud de sus fragmentos (Beebe, 1997).

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares que han evolucionado rápidamente, utilizando como herramienta reacciones con enzimas de restricción y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su nomenclatura en inglés), (Pedraza, 1997).

Aranda (2000), señala que la técnica de PCR ha servido de base para el desarrollo y uso intensivo de otros marcadores como los “RAPD” (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), que son además los precursores de los “SCAR” (Región Amplificada de Secuencia Caracterizada); y en la actualidad los microsatélites o “SSR” (Repeticiones de Secuencias Simples).

2.4.3 Marcadores Moleculares SCAR

Los marcadores SCAR son fragmentos de ADN genómico localizados en un locus genéticamente definido e identificados por la amplificación vía PCR, utilizando un par de oligonucleótidos específicos como cebadores (iniciadores o “primers”), (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Según Beebe (1997), los SCAR pueden ser derivados de los RAPD, RFLP o AFLP. Sus cebadores constan de 15 a 23 nucleótidos, por lo que son muy específicos para un sitio del genoma y amplifican solamente este punto, produciendo una sola banda que sirve de marcador para el carácter deseado. Estos marcadores requieren bastante trabajo para ser desarrollados, pero una vez fabricados son baratos ya que al igual que los RAPD, dependen de una reacción de PCR, aunque son mucho más estables y confiables que estos (Beebe, 1997).

Nietsche *et al.* (2000), en un estudio conducido en Brasil para determinar la herencia de la resistencia a la mancha angular en la variedad Cornell 49-242, identificaron dos marcadores RAPD ligados al gen de resistencia, el OPN 02890c y el OPE 04650c. El fragmento correspondiente al marcador OPN 02890c fue clonado, parcialmente secuenciado y sintetizado en dos cebadores SCAR (ACCAGGGGCATTATGAACAG-ACCAGGGGCAACATACTATG), los que fueron evaluados mostrando una eficiencia de selección de 98%. Este marcador es ahora un SCAR denominado NO2.

2.4.4 Uso de marcadores tipo SCAR

2.4.4.1 Extracción de ADN. La aplicación de las diferentes técnicas empleadas en biología molecular (construcción de librerías genómicas, RFLPs, PCR, AFLPs) para el análisis del genoma, depende de la habilidad para obtener ADN puro, con alto rendimiento y de muy buena calidad. Para ello se utilizan diversos métodos de extracción, dependiendo del tipo de tejido a emplear (fresco o seco). Uno de los problemas en la extracción de ADN de plantas es la composición de su pared celular, pues ésta debe romperse para liberar los constituyentes celulares (CIAT, 1999).

Castro *et al.* (2001), señalan que la extracción de ADN preferentemente debe realizarse de muestras de tejido joven, debido a que se encuentran en una alta actividad metabólica (mayor actividad mitótica y en consecuencia mayor cantidad de material genético) y a que el tejido aún no se ha lignificado, facilitando el rompimiento de la pared celular. Esta actividad se realiza aplicando tres herramientas complementarias, la química (uso de reactivos químicos), la mecánica (maceración manual de muestras de tejido) y la térmica (aplicación de calor). En la extracción se logra separar el ADN que se desea estudiar de los sólidos y del ARN.

2.4.4.2 Amplificación de ADN. La técnica de PCR consiste en la síntesis *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN, en presencia de la enzima ADN polimerasa. Castro *et al.* (2001), indican que una reacción de PCR requiere de ADN (*template* o molde) extraído de la planta de interés; cebadores o iniciadores de la reacción que hibridizan a la cadena complementaria y opuesta del ADN; *Taq*-polimerasa, enzima aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, responsable de catalizar la elongación de los cebadores (polimerización enzimática de ADN); y deoxinucleótidos (nucleótidos libres).

La reacción se basa en el apareamiento de un par de pequeñas moléculas sintetizadas de ADN de cadena sencilla, que se usan como iniciadores de la reacción de polimerización a la vez que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena objeto de la amplificación (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Un ciclo de PCR consta de tres etapas. En la primera, el ADN de doble cadena es desnaturizado mediante el aumento de la temperatura entre de 92 y 95°C. En la segunda etapa, la temperatura es rápidamente reducida entre los 35 y 60 °C, dependiendo esencialmente del tamaño y secuencia del cebador usado, permitiendo su hibridación con

las secuencias complementarias y del ADN que flanquean la región de interés. En la tercera etapa, la temperatura es elevada a 72 °C para que la *Taq* polimerasa realice la extensión de la cadena a partir de cada terminal 3' de los cebadores, mediante la incorporación de nucleótidos libres usando como molde el ADN de interés, de modo que una copia es producida en el proceso. Este ciclo se repite sistemática y secuencialmente, resultando en una amplificación o duplicación geométrica del fragmento de ADN de interés (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.4.4.3 Separación de ADN. La separación de fragmentos de ADN se realiza por diferencias en el peso molecular, mediante la aplicación de una carga eléctrica en una gel de agarosa en donde se colocan las muestra de ADN. Ésta se efectúa en un aparato de electroforesis con un polo negativo y uno positivo; debido a que el ADN posee carga negativa se produce su migración hacia el polo positivo, proceso en el que las moléculas más grandes (mayor número de pares de bases o mayor peso molecular) migran más lento y se quedan arriba (Castro *et al.*, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACION ALS 9951

3.1.1 Localización del estudio

Este estudio se realizó en las camas de infección (bancales) del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria (CCPA), Zamorano, ubicado a 30 Km al este de Tegucigalpa, Honduras. En estas camas de infección se manejaron plantas de la generación F2, F3 y F4 de la población ALS 9951 y durante su desarrollo se realizaron evaluaciones fenotípicas.

3.1.2 Material experimental

Para la caracterización genética de la mancha angular se utilizó una población segregante identificada como ALS 9951, derivada de la cruce de Tío Canela-75 × G06727. Tío Canela-75 es una variedad de frijol raza mesoamericana, de grano rojo pequeño liberada en Honduras en 1996, de hábito de crecimiento tipo II (indeterminado arbustivo) y susceptible a la mancha angular bajo las condiciones de Honduras (Zamorano, 1996). El otro progenitor de la cruce en estudio es la accesión G06727, proveniente del germoplasma de frijol común del CIAT. Esta accesión es originaria de Colombia, identificada como Guarzo-Popayán, hábito de crecimiento tipo I (determinado arbustivo), es de grano color amarillo moteado y grande (40 g/100 semillas), (CIAT, 1992).

3.1.3 Variables y su medición

3.1.3.1 Severidad Entre las variables que se midieron está la severidad de daño (nivel de desarrollo de los síntomas) de la mancha angular. La severidad se evaluó utilizando una escala cualitativa, y de uso general, de 1-9 (donde 1= planta sin síntomas y 9= muerte de la planta por la enfermedad) (cuadro 1), (CIAT, 1987).

3.1.3.2 Segregación de la resistencia a la mancha angular La segregación fenotípica de la resistencia y la susceptibilidad a la mancha angular se estimó a través de una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) de bondad de ajuste de la reacción a la inoculación artificial de *P. griseola* en plantas F2 de la cruce ALS 9951. Para facilitar la explicación de los resultados en la F2, adicionalmente se evaluaron 46 plantas F1 por su reacción a la mancha angular.

3.1.3.3 Estimación de la heredabilidad de la resistencia a la mancha angular La heredabilidad de la resistencia se midió a través de un análisis de regresión padres/descendientes (Smith y Kinman, 1965), usando los datos de la reacción fenotípica a la mancha angular de las plantas individuales F2 y de sus progenies (familias) F3 según esto la heredabilidad de la mancha angular que fue estimada por la formula: $h^2 = 2/3/rxy$ donde h^2 = heredabilidad en sentido estrecho; b = pendiente y rx = intercepto.

3.1.3.4 Estimaciones de la segregación del rendimiento y otros caracteres adicionales Se hicieron evaluaciones para determinar la segregación de varias características y visualizar su distribución de frecuencias, incluyendo de días a madurez de cosecha, rendimiento y severidad de daño en las familias F3; en las familias F4, se midió adicionalmente el tipo de flor, forma de la hoja y de la vaina.

Cuadro 1. Escala general de evaluación para enfermedades

Calificación	Síntomas	
	Severidad	Clasificación general
1	Ausente	Resistente
2	Dudosos	
3	Débiles	
4	Moderados	Intermedio
5	Intermedios	
6	Generales	
7	Intensos	Susceptible
8	Severos	
9	Muerte	

Fuente: CIAT (1987)

3.1.4 Siembra

Se realizaron cuatro siembras de diferentes generaciones de la población ALS 9951. El avance generacional de esta población se realizó por el método de descendencia de semilla individual (Brimm, 1966) a partir de la F2. En cada siembra se utilizaron como testigos los padres de la cruce (Tío Canela-75 y G06727). La primera siembra se realizó en la época de primera del año 2000, sembrándose 221 plantas F2 en las camas de infección del PIF, a una distancia de 15 cm entre plantas y 60 cm entre hileras, a razón de cinco plantas por hilera. Los testigos (progenitores) fueron sembrados cada 10 hileras de plantas F2. El 27 de octubre del 2000, se realizó la segunda siembra incluyéndose 195 familias F3 provenientes de las plantas individuales F2 cosechadas en el ensayo anterior (F3:F2). La siembra se realizó en las camas de infección del PIF empleándose el distanciamiento anterior y dos repeticiones. La tercera siembra se llevó a cabo en el verano del año 2001; se sembraron 40 familias F4 provenientes de la siembra anterior (F4:3), incluyendo a las 20 familias más

resistentes y las 20 familias más susceptibles. Las condiciones ambientales no favorecieron una incidencia adecuada de la enfermedad, limitando la confiabilidad de las evaluaciones. Por lo tanto, se repitió la siembra de las familias F4 el 14 de junio del 2001, usando distanciamientos similares a los anteriores.

En todas las siembras se dio a las plantas condiciones adecuadas requerimientos de fertilización, disponibilidad de agua y control de insectos, babosas y pájaros.

3.1.5 Inoculaciones

Para completar la presión natural del patógeno, y asegurar una infección e incidencia adecuadas, se realizaron inoculaciones artificiales en las plantas F2 y familias F3 y F4. Se utilizó un inóculo líquido preparado con hojas infectadas con *P. griseola*, recolectadas de lotes comerciales cercanos a Zamorano, y de plantas inoculadas crecidas en casas de malla/plástico bajo condiciones de alta humedad. Se utilizaron 3 lb aproximadamente de hojas infectadas frescas por cada inoculación; las hojas se licuaron con agua corriente y fueron pasadas por cedazos No. 10, 20 y 40. La solución fue aplicada con bombas de mochila de 15 L. Las inoculaciones se realizaron a partir de los 20 DDS hasta los 40 DDS, a razón de cinco inoculaciones por siembra. Las familias F4 sembradas en la primera del 2001, fueron inoculadas utilizando un preparado de 100 g de hojas infectadas, previamente secadas a la sombra y pulverizadas, diluidas en 14 L de agua corriente y pasadas por cedazos No. 10, 20, 40 y 60, lográndose una mejor cobertura de las plantas.

3.1.6 Evaluación de la severidad

La evaluación visual (expresión fenotípica) de la severidad del daño causado por la mancha angular en las plantas F2 se realizó a los 47, 58 y 75 DDS; en las familias F3 se tomaron dos lecturas de severidad a los 48 y 70 DDS; y en las familias F4 sembradas en la primera del 2001, se registraron tres lecturas a los 45, 55 y 66 DDS. También se evaluaron 46 plantas F1. Para facilitar el manejo del material experimental se identificó a las plantas y a las familias con etiquetas de plástico y los resultados de las evaluaciones fueron registradas en los libros de campo correspondientes.

3.2 EVALUACIÓN USANDO EL MARCADOR MOLECULAR SCAR NO2

Para la evaluación del SCAR NO2 se utilizó la variedad Cornell 49-242, diferencial de frijol, en el cual se había identificado previamente el RAPD con el cual se elaboró este SCAR (Niestche *et al.*, 2000). El SCAR NO2 es usado como marcador del gen de resistencia a la mancha angular denominado *Phg-2*. Esta evaluación del SCAR NO2 se hizo para probar su utilidad en las actividades de mejoramiento del PIF. La evaluación de este marcador SCAR se hizo empleándose plantas de familias F4 de la población ALS 9951.

3.2.1 Localización del estudio

El estudio molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de Zamorano. Las plantas de la variedad Cornell 49-242 para extracción de ADN fueron sembradas en una casa de malla del PIF.

3.2.2 Características del germoplasma

El cultivar Cornell 49-242 es de raza mesoamericana, y es uno de los 12 genotipos de frijol usados en los viveros diferenciales de la mancha angular y la antracnosis. Es de hábito de crecimiento tipo II (indeterminado arbustivo), y grano color negro, pequeño y opaco. En estudios realizados por Niestche *et al.* (2000), se identificó que este cultivar posee un gen que le confiere resistencia a la mancha angular, específicamente a las razas 31-17 y 63-19.

3.2.3 Siembra

Con el objetivo de obtener tejido para las pruebas de ADN y la evaluación del SCAR, se sembraron 15 plantas de Cornell 49-242 en la casa de malla el día 23 de agosto del 2001, colocando cuatro semillas por pote estándar no. 4 (9.5 cm de ancho y de alto).

3.2.4 Muestreo

Para la obtención de ADN de las plantas de Cornell 49-242, se realizó un muestreo a los 19 DDS. El tejido se obtuvo de las hojas más jóvenes (cuatro brotes terminales en crecimiento activo) de cada una de las plantas, colocándolos en tubos *ependorf* de 1.5 ml

3.2.5 Equipo y material de laboratorio

Para la extracción de ADN de las plantas de Cornell 49-242, de los padres de la cruce y de las familias F4 de la población ALS 9951, se usó tubos *ependorf* de 1.5 ml y barras de pexiglass previamente esterilizadas, soluciones amortiguadoras (*buffers*) de extracción y lavado para purificar el ADN (Anexo 1), micropipetas (0.5-10 μ l, 10-100 μ l y 20-200 μ l), puntas estériles para las micropipetas y una microcentrifuga.

La cuantificación de ADN se realizó por medio de un fluorómetro (Hoefler Pharmacia Biotech Inc., D y NA Quant TM200), expresado en ng/ μ l, usando buffer de cuantificación TE para las muestras y ADN bovino estándar (100 ng/ μ l) para calibrar el fluorómetro. La amplificación de ADN se realizó en un termociclador (PCR-100TM, Programable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling); y la separación en un tanque de electroforesis (EC Maxicell EC 360M, 40 orificios), usando una fuente de aplicación y regulación de voltaje (Hoefler Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP). Para visualizar los resultados (bandas) se utilizó un transiluminador (Fotodyne, Foto/UV®26), y una cámara Polaroid® para fotografiar las geles.

3.2.6 Adaptación de la amplificación de ADN

Esta fase fue la única en adaptarse en el proceso para obtener las reacciones (bandas polimórficas) esperadas. Se utilizaron cuatro muestras de Cornell 49-242, dos elegidas al azar y dos que previamente habían presentado bandas muy tenues.

Extracción de ADN. Se utilizó el protocolo de extracción de ADN total por el método de UW-Madison (regularmente aplicado para pruebas RAPDs en el laboratorio de Biología Molecular), con el cual se obtiene ADN puro (Anexo 1).

Cuantificación de ADN. La calibración del fluorómetro y la cuantificación de ADN se hizo siguiendo el manual del fluorómetro y un protocolo del laboratorio de Biología Molecular, respectivamente (Anexo 2).

Dilución de ADN. En esta fase se llevó el ADN a una concentración de 20 ng/μl siguiendo el método de UW-Madison (Anexo 3).

Amplificación de ADN. Para la amplificación de ADN se utilizó el perfil térmico empleado por Niestche *et al.* (2000) (Anexo 5). En esta etapa se probaron 10 mezclas para PCR diferentes, separadas en dos grupos de cinco. En el primer grupo se variaron los reactivos, la cantidad de ADN de cada muestra y el volumen final de la mezcla; en el segundo grupo se evaluaron principalmente las concentraciones de los cebadores PHG-2R y PHG-2F.

Primer grupo de mezclas para PCR. Se utilizó la mezcla normalmente usada en el laboratorio de Biología Molecular, para marcadores SCAR (Cuadro 2), y cuatro mezclas donde se utilizaron perlas de PCR (beads, Amersham Pharmacia Biotech, Inc.). Las perlas contienen 1.5 unidades de *Taq* polimerasa, 10 mM de Tris-HCL (pH 9.0), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 200 μM de cada dNTPs y esterilizadores incluyendo ASB (albúmina de bovino) cada una. Las mezclas con perlas de PCR consistieron en: una primera mezcla donde las perlas de PCR fueron reconstituidas con 19 μl de agua y 0.5 μl de cada cebador, para una mezcla de reacción de 20 μl/muestra a la que se le agregó 5 μl de cada muestra de ADN. La segunda mezcla con una perla de PCR utilizada para dos muestras, reconstituida con 21 μl de agua y 1 μl de cada cebador para utilizar 11.5 μl por muestra, 1 μl de ADN de cada muestra y 2.5 μl de agua adicionales para llevarlo a un volumen final de 15 μl. La tercera mezcla también se utilizó una perla para dos muestras, y se le agregó 2 μl de ADN de cada muestra y 1.5 μl adicionales de agua para obtener un volumen final de 15 μl. En la cuarta mezcla también se usó una perla para dos muestras, las perlas fueron rehidratadas y divididas de igual manera que las mezclas anteriores y se adicionaron 5 μl de ADN de cada muestra para un volumen final de 16.5 μl.

Cuadro 2. Mezcla maestra para marcadores SCAR

Componente	Volumen para una reacción (μ l)
Agua	9.2
Buffer (10 X) + Mg Cl ₂ (25mM)	2.0
DNTPs (4 mM c/u)	0.7
Cebador PHG-2R	0.3
Cebador PHG-2F	0.3
<i>Taq</i> -polimerasa (5 U/ μ l)	0.5
ADN	2.0
Volumen final	15.0

Segundo grupo de mezclas para PCR. En este segundo grupo de mezclas se probaron dos con perlas de PCR (Cuadro 4) y tres con reactivos normales, y diferentes concentraciones de los cebadores (Cuadro 3).

Cuadro 3. Variaciones de las mezclas para PCR con los cebadores PHG-2R Y PHG-2F

Componente	Mezclas			
	M1	M2	M3	
Agua	9.2	7.3	15.2	
Buffer (10 X) + Mg Cl ₂ (25mM)		2.0	2.0	2.5
DNTPs (4 mM c/u)	0.7	0.7	1.2	
Cebador PHG-2R	0.3	1.0	0.5	
Cebador PHG-2F		0.3	1.0	0.5C
<i>Taq</i> -polimerasa (5 U/ μ l)		0.5	0.5	0.1
ADN	2.0	2.5	5.0	
Volumen final (μ l)	15.0	15.0	25.0	

Cuadro 4. Variaciones de mezclas con perlas de PCR para la amplificación con los cebadores PHG-2R Y PHG-2F.

Componentes	Mezclas	
	M1	M2
Perlas de PCR (unidades)	1.0	1.0
Agua (μ l)	19.0	21.0
Cebador PHG-2R (μ l)	1.0	2.0
Cebador PHG-2F (μ l)	1.0	2.0
ADN (μ l)	4.0	2.5
No. De muestras (unidades)	1.0	2.0
Volumen final (μ l)	25.0	15.0

Separación de ADN y fotografía. La separación de las bandas de ADN amplificadas se realizó colocando las muestras en un gel de agarosa al 1% en un buffer TBE 0.5X de 22 orificios, un gel para cada grupo de mezclas y se sometieron a una electroforesis de 140 voltios durante dos horas. En la preparación de la gel se agregó 2 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml), (Anexo 6).

3.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FAMILIAS F4 DE LA POBLACIÓN ALS 9951

3.3.1 Localización del estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de Zamorano, donde se hicieron las evaluaciones para determinar la presencia del gen de resistencia *Phg-2* a la mancha angular en las familias F4 de la población ALS 9951, empleando el SCAR NO2.

3.3.2 Características del material experimental

Para la evaluación molecular de las familias F4:3, se emplearon las 20 familias más resistentes y las 20 familias más susceptibles de la población ALS 9951 (capítulo 3.1.2.), de acuerdo a las evaluaciones fenotípicas realizadas en familias F3.

3.3.3 Siembra

Las 40 familias F4 fueron sembradas el 14 de junio del 2001 a un distanciamiento de 15 cm entre plantas, a razón de 5 plantas por hilera, y a 60 cm entre hileras. Se utilizaron los padres de la cruce (Tío Canela-75 y G06727) como testigos; estos fueron sembrados a distanciamientos similares que las familias F4, y se emplearon tres hileras de cada testigo.

3.3.4 Muestreo

Para la obtención de ADN procedente de las familias F4 y los testigos, se realizó un muestreo a los 50 DDS. El tejido se obtuvo de las hojas más jóvenes (cuatro brotes terminales en crecimiento activo) de cada familia de plantas, colocándolos en tubos *ependorf* de 1.5 ml rotulados con la identificación de cada planta.

3.3.5 Variables y su medición

En esta etapa se determinó la presencia o ausencia de bandas indicadoras de resistencia o susceptibilidad a la mancha angular 890 pb para la resistencia, usando el SCAR NO2 marcador del gen *Phg-2*.

La extracción, cuantificación y dilución de ADN se realizaron como se especifica en el capítulo 3.2.6. La amplificación de ADN se realizó utilizando el perfil térmico para el marcador SCAR NO2 (Anexo 5), y como mezcla para la reacción se utilizó la adaptada al laboratorio (Anexo 4).

Para la separación de ADN (electroforesis) de las muestras se utilizó tres geles de agarosa al 1% en un buffer TBE 0.5X para las 40 muestras de plantas F4 y cuatro testigos (dos muestras de ADN de cada padre de la cruce). En el primer pozo de la gel se colocó una escalera de ADN de 500 pb a 12 kb, usada específicamente para estas evaluaciones. En el segundo pozo, se colocó la muestra de Cornell 49-242 utilizada como control positivo (C+, donde se conoce la reacción). En el tercero pozo, el control negativo (C- mezcla sin ADN, para eliminar errores de interpretación por contaminación). Luego las muestras amplificadas de las plantas de las 40 familias F4 y los padres, las que se sometieron a una electroforesis de 140 voltios durante 90 minutos. En la preparación de la gel se agregó 2 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), (Anexo 6).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ALS 9951

La caracterización genética de poblaciones para características de interés agronómico, es importante para los programas de investigación; de esta manera, se evalúan las estrategias de mejoramiento seguidas y a seguir. Cuando se identifican plantas o familias con características deseadas, estas se mantienen y se llevan a generaciones avanzadas para futuras evaluaciones por la característica de interés y para otras de importancia para el mejorador.

4.1.1 Severidad

En la evaluación de esta variable utilizando la escala de 1-9 del CIAT (1987), se registró como resistentes las plantas calificadas de 1-5 y como susceptibles a aquellas que tenían una calificación de 6-9 en severidad.

4.1.2 Segregación por resistencia a la mancha angular

La segregación de la resistencia a la mancha angular se midió en las plantas F2. Se hicieron tres evaluaciones de severidad en plantas inoculadas artificialmente a los 47, 58 y 73 DDS. La severidad fue cambiando conforme la enfermedad incrementa su nivel de daños; los síntomas de las plantas susceptibles se volvieron más intensos conforme las plantas avanzaron en su desarrollo. En la tercera evaluación se observó la máxima expresión de la reacción a la mancha angular, por lo que se utilizó estos resultados para determinar la segregación 3:1 (susceptible:resistente) como el modelo más apropiado. Se observó que la proporción de plantas resistentes y susceptibles se ajustó al modelo Mendeliano 3:1 de una cruce monohíbrida (Cuadro 5). El proceso de desarrollo de síntomas de la enfermedad, sugiere que las estimaciones de la resistencia a esta enfermedad deben hacerse cuando la enfermedad está bien establecida en las plantas usando testigos susceptibles como indicadores. El modelo propone que la resistencia a la mancha angular, bajo las condiciones del estudio, está determinada por un gen recesivo.

Cuadro 5. Segregación fenotípica de plantas F2 de la reacción a la mancha angular a los 75 DDS. Zamorano, Honduras, 2001.

Clase (fenotipo)	Observado	Esperado (modelo 3:1)	Obs-Esp	$[O-E - 0.5]^2/E$
BB/BB y BB/Bb (susceptibles)	160	161	-1	0.0047
bb/bb (resistentes)	54	53	1	0.0015
Total	214	214	0	$(\chi^2) = 0.0062^*$

* nivel de significancia $\alpha = 0.05$

La hipótesis de segregación 3:1 (susceptible:resistente) fue reforzada con los resultados de la evaluación de 46 plantas F1 de la población ALS 9951. En la población F1 se observó que la generalidad de las plantas presentaron síntomas susceptibles; se puede asumir que el padre susceptible es dominante y el padre resistente es recesivo y la descendencia (F1) es heterocigota susceptible.

4.1.3 Heredabilidad

El estimado de heredabilidad (h^2) medido a través de una regresión padres/descendientes fue de 0.65 (Figura 2), considerado como alto, es decir, que una alta proporción de la variación fenotípica observada para la resistencia a la mancha angular se debió a factores genéticos y es una característica poco influenciada por factores no-genéticos. La alta heredabilidad permite sugerir que se puede aplicar métodos de selección para la resistencia a la mancha angular desde generaciones tempranas (p.e. familias F3), si se cuenta con técnicas que permitan seleccionar plantas resistentes en forma eficiente en estas generaciones.

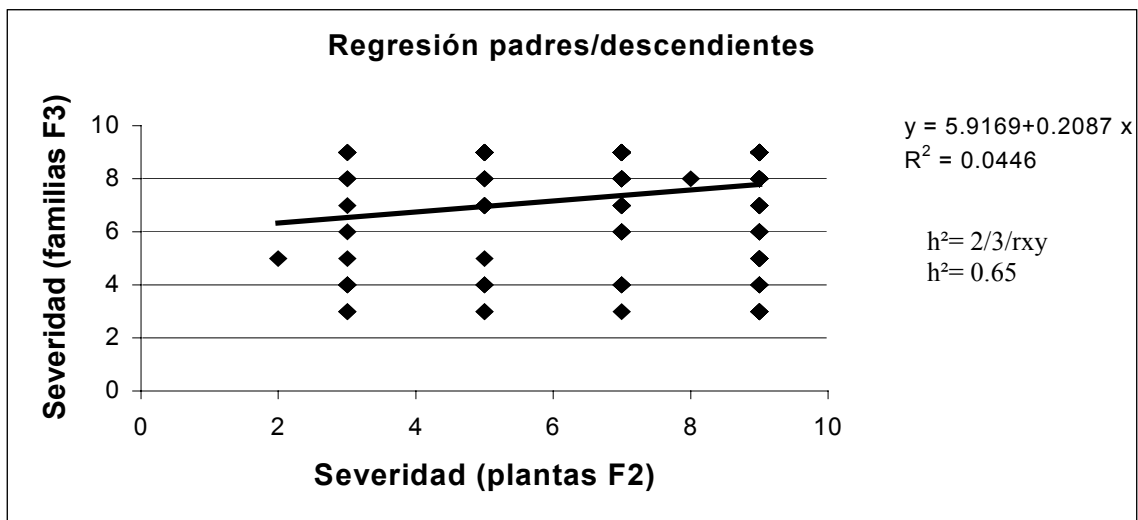


Figura 1. Representación de la heredabilidad (h^2) estimada mediante el método de regresión padres:descendientes (F2:F3) (Smith y Kinman, 1965).

4.1.4 Segregación fenotípica

La segregación fenotípica explica fundamentalmente el arreglo de los alelos que provienen de los padres, los que se expresan en las características evaluadas visualmente en la descendencia generada de la cruz de estos padres.

4.1.4.1 Evaluaciones de rendimiento y otras características morfológicas en familias F3:2

Rendimiento. La separación del rendimiento en clases fenotípicas presentó una distribución normal que representa una gran variación con respecto a los padres (ambos se ubicaron en la misma clase con rendimientos de Tío Canela-75 de 30.1 g/planta y G06727 de 33.0 g/planta). Un gran número de familias alcanzó rendimientos superiores a los padres, sugiriendo recombinaciones favorables de alelos de rendimiento aportados por estos padres procedentes de reservorios genéticos diferentes. La mayoría de las familias F3 obtuvieron rendimientos entre 41 y 60 g/planta (Figura 2).

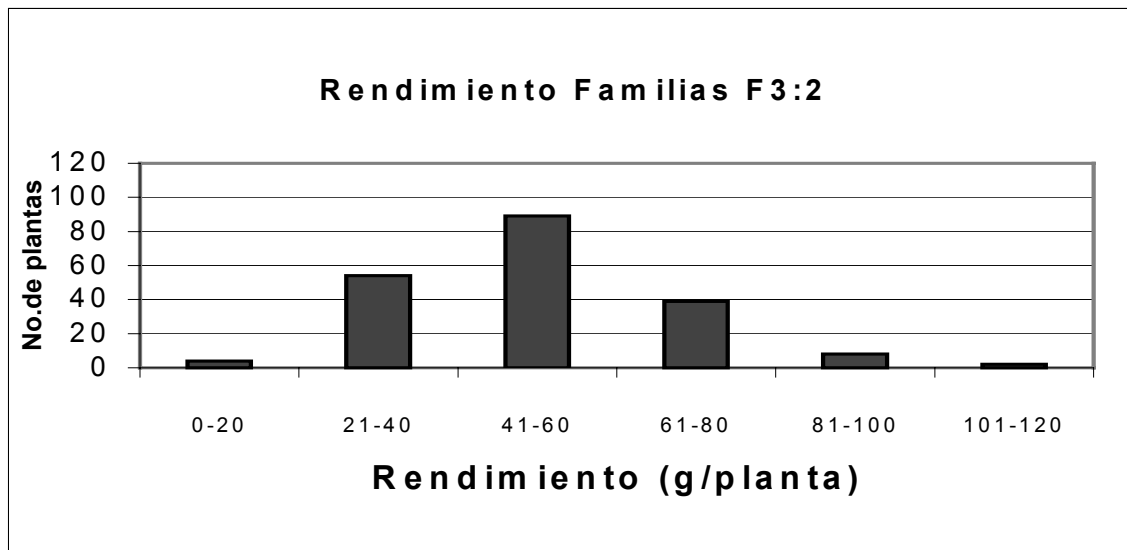


Figura 2. Distribución del rendimiento de las familias F3 de la población ALS 9951 (Tío Canela-75 y G06727 se encuentran en la clase 21 y 40 g/planta). Zamorano, Honduras, 2001.

Evaluación de la Severidad de la mancha angular. Las familias F3 se distribuyeron en todas las clases fenotípicas de severidad (1-9) (Figura 3). Los padres se ubicaron en la clase de 2 (G06727, resistente) y 9 (Tío Canela-75, susceptible). La segregación observada en las familias F3 derivadas de la cruce de Tío Canela-75 (susceptible) x G06727 (resistente), permitió identificar y seleccionar familias resistentes con características agronómicas similares al padre susceptible.

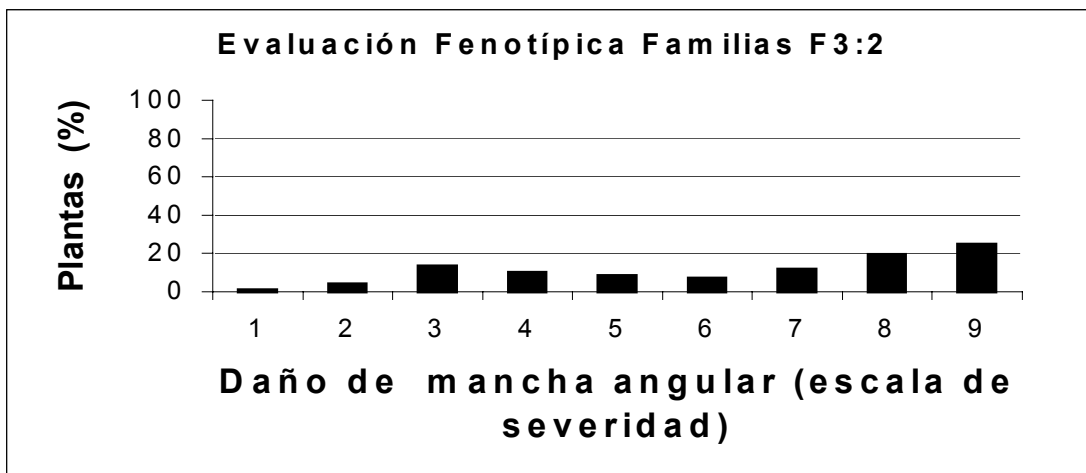


Figura 3. Distribución de la reacción a la mancha angular de las familias F3 de la población ALS 9951. G06727 presentó el grado 2 y Tío Canela-75 el grado 9. Zamorano, Honduras, 2001

Madurez de cosecha. Los días a madurez de cosecha de las familias F3 se distribuyeron en un rango relativamente amplio representado por seis clases fenotípicas (Figura 4). La mayoría de las familias se distribuyeron hacia los extremos, describiendo aparentemente una distribución bimodal; donde los padres Tío Canela-75 y G06727 (79 y 84 DDS, respectivamente), se encuentran en cada una de ellas. Se presentaron familias más precoces que Tío Canela-75 y otras más tardías que G06727.

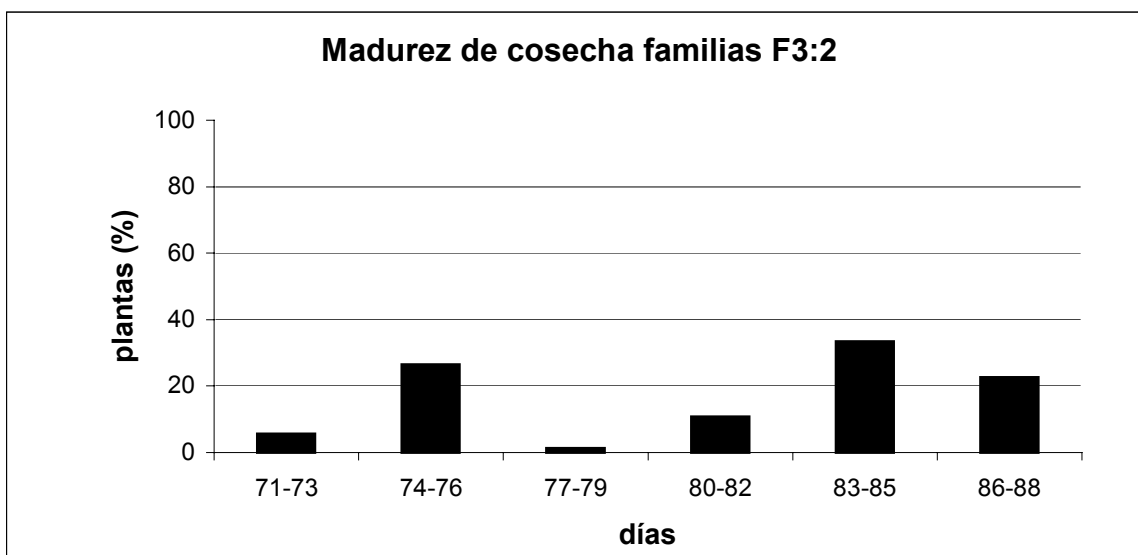


Figura 4. Distribución de los días de madurez de cosecha de las familias F3 de la población ALS 9951 (Tío Canela-75 maduró a los 79, y G06727 a los 84 DDS). Zamorano, Honduras, 2001.

4.1.4.2 Evaluación de caracteres morfológicos de las familias F4:3

Tipo de flor, hoja y vaina. Algunas características morfológicas presentan diferencias marcadas entre genotipos de diferente acervo genético (Andino vs. Mesoamericano) los padres usados en la cruce se diferencian por estas características (Anexo 7 y 8). En las evaluaciones de las familias F4 derivadas de estos padres de diferente acervo, se observó que un alto número de familias fueron evaluadas como andinas según el tipo de flor. Sin embargo, según el tipo de hoja y vaina la mayoría de las familias presentaron características mesoamericanas (Figura 5). Estas diferencias morfológicas nos sugieren presencia de segregación en la población ALS 9951 como resultado de recombinaciones de genes entre los progenitores involucrados (de distintos orígenes). La conservación de algunas características provenientes del padre mesoamericano es deseable por las preferencias de los productores de la región.

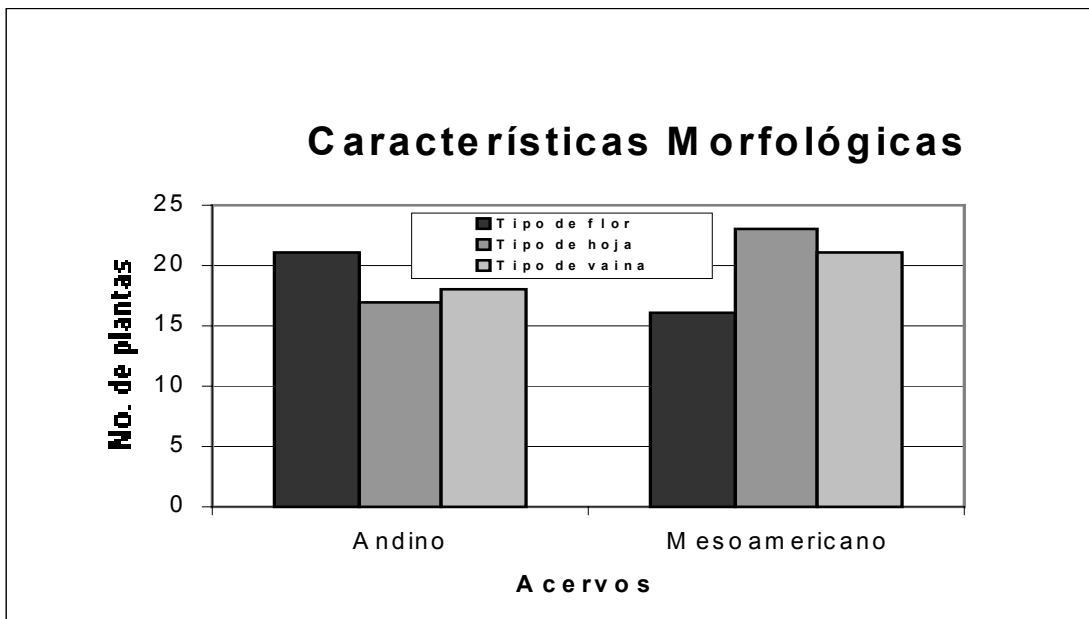


Figura 5. Distribución de las familias F4:3 de la población ALS 9951 según algunas características morfológicas de cada acervo. Zamorano, Honduras, 2001.

4.2. EVALUACIÓN DEL MARCADOR MOLECULAR SCAR NO2

La adaptación de marcadores moleculares para las condiciones del laboratorio de Biología Molecular de Zamorano, es importante por que su empleo implica reducir el tiempo e incrementar la eficiencia en los procesos de identificación de germoplasma resistente a enfermedades de importancia económica como la mancha angular.

4.2.1 Adaptación de la amplificación

Luego de la extracción, cuantificación y dilución de ADN como se especifica en el capítulo 3.2.6, se realizó su amplificación usando el perfil térmico sugerido por Niestche *et al.*(2000). Para el SCAR NO2 se utilizó la mezcla que se emplea en el laboratorio para estos marcadores (Cuadro 2); con estas mezclas se amplificaron 15 muestras de ADN de Cornell 49-242. Solamente se pudieron visualizar dos bandas muy tenues en las plantas identificadas como Cornell 9 (C9) y Cornell 10 (C10). Para descartar la posibilidad de que los reactivos estuviesen dañados, se probó con perlas de PCR (beads) variando el uso de una perla por cada muestra o una perla para dos muestras (Capítulo 3.2.6.). Se usó las dos muestras de ADN donde se presentaron bandas (C9 y C10) y dos muestras al azar en este análisis, pero en ninguna de las mezclas utilizadas se visualizaron bandas.

Con base en estos resultados se probó un segundo grupo de cinco mezclas. Se utilizó nuevamente perlas de PCR para tener una comprobación adicional del estado de los

reactivos; además se usó distintas concentraciones de los cebadores, debido a que se tenían antecedentes con los cebadores del SCAR SW13 (gen *bgm-1* ligado a VMDAF), que concentraciones más altas que las recomendadas facilita la visualización de bandas. Con este grupo de mezclas se comprobó que la concentración de los cebadores debía aumentarse a 1.0 µl para visualizar bandas (Figura 6). Con base en estos resultados, se descartó que los reactivos estuvieran en mal estado y se seleccionó la muestra C10 de Cornell 49-242 como control positivo para la evaluación de las familias F4.

La mezcla seleccionada M2 utiliza reactivos tradicionales y una concentración de 1 µl de cada cebador (aumentado en 0.7 µl) (Anexo 4); esta mezcla M2 fue utilizada para la evaluación molecular de las 40 familias F4 y los testigos.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
E	C-	M1	M1	M1	M1	M2	M2	M2	M2	M3	M3	M3	M3	M4	M4	M4	M4	M5	M5	M5	M5
		■	■				■	■	■									■			
		C9	C1	C1	C5	C9	C1	C1	C5	C9	C1	C1	C5	C9	C1	C1	C5	C9	C1	C1	C5

Figura 6. Representación de polimorfismos generados con el SCAR NO2 (gen *Phg-2*) en ADN de cuatro plantas de Cornell 49-242 (C1, C5, C9 Y C10) usando reactivos convencionales, perlas de PCR y diferentes concentraciones de los cebadores para preparar las mezclas maestras E=Escalera; C=Control negativo; M= Mezclas para PCR y C=ADN de plantas Cornell 49-242. Zamorano, Honduras, 2001.

4.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FAMILIAS F4 DE LA POBLACIÓN ALS 9951

En esta parte del estudio se evaluó molecularmente las 20 familias F4 más resistentes (procedentes de las 20 familias F3 con calificaciones 1-4) y las 20 familias más susceptibles (familias F3 con calificación de 9); además, se midió la eficiencia del SCAR NO2 bajo las condiciones del laboratorio de Biología Molecular. Los resultados de esta evaluación se muestran en las figuras 3, 4 y 5, en las que se observan bandas polimórficas en varias familias resistentes y susceptibles de la población ALS 9951, así como en los progenitores Tío Canela-75 (susceptible) y G06727 (resistente).

Las reacciones fenotípicas de las 40 familias F4 con el SCAR NO2 (Anexo 9) comparadas con la severidad de daño determinada en las camas de infección fueron inconsistentes (se observaron en plantas susceptibles y resistentes). Por lo tanto, se asume que la presencia del gen *Phg-2* (indicado por el SCAR NO2) no provee resistencia a la raza predominante en el estudio (raza 63-63 según evaluación de los diferenciales sembrados en las mismas condiciones); la cual es la raza que afecta mayormente al cultivo de frijol en Honduras. La prueba con el SCAR NO2 es valiosa para asegurar la presencia del gen *Phg-2* en el enfoque del PIF de piramidar genes de resistencia, y proveer resistencia a la mancha angular. Asimismo el SCAR NO2 es útil para la selección asistida por marcadores (SAM)

en regiones donde predominan las razas 63-19 y 31-17, para las cuales el gen de resistencia *Phg-2* resulta ser útil (Niestche *et al.*, 2000).

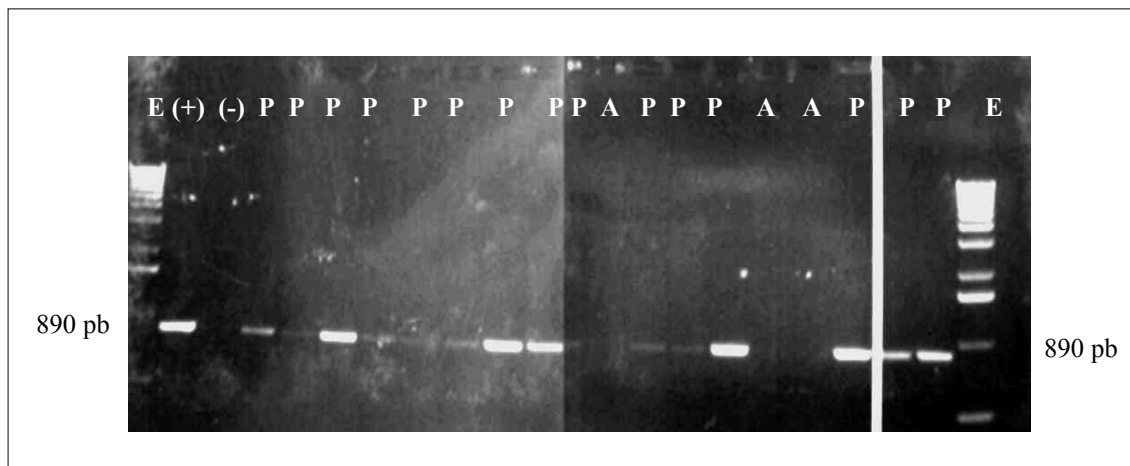


Figura 7. Polimorfismos generados con el SCAR NO2 (gen *Phg-2*) en familias F4 resistentes a la mancha angular. P= Presente; A= Ausente. Zamorano, Honduras, 2001.

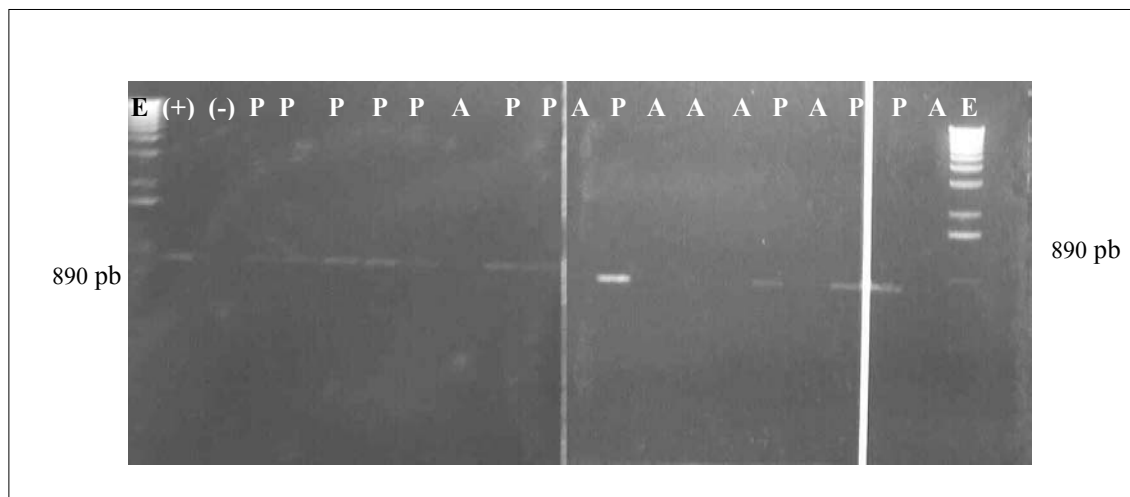


Figura 8. Polimorfismos generados con el SCAR NO2 (*Phg-2*) en familias F4 susceptibles a la mancha angular. P= Presente; A= Ausente. Zamorano, Honduras, 2001.

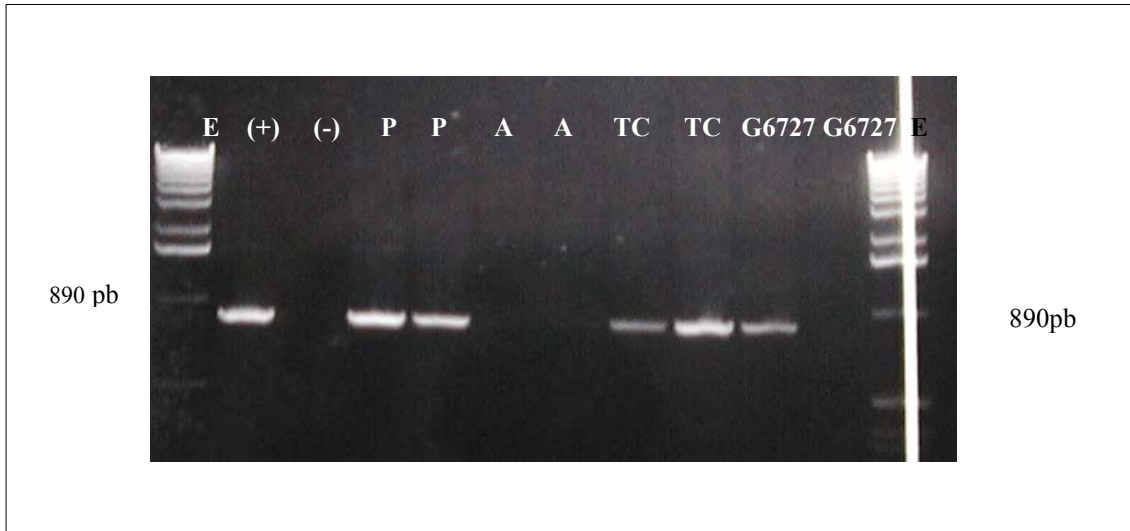


Figura 9. Polimorfismos generados con el SCAR NO2 en cuatro familias susceptibles F4 de la población ALS 9951 y sus progenitores Tío Canela-75 (TC) y G06727 (P= Presente; A= Ausente). Zamorano, Honduras, 2001.

5. CONCLUSIONES

1. El control genético de la resistencia a la mancha angular para las razas presentes en Honduras, está determinado por un gen recesivo.
2. La alta heredabilidad de la resistencia a la mancha angular observada en los estudios (0.65), sugiere la posibilidad del mejoramiento del frijol mesoamericano resistente a las razas controladas por el gen andino recesivo.
3. Aunque el marcador SCAR NO2 no es útil para identificar genotipos resistentes a la raza predominante en el estudio (63-63); sin embargo, es valioso para seleccionar genotipos resistentes a las razas del patógeno 31-17 y 63-19, y para desarrollar enfoques de ampliación de la resistencia a la mancha angular basados en la piramización de genes.
4. La presencia o ausencia de bandas en los análisis de las familias evaluadas son reacciones negativas o positivas al SCAR utilizado en el estudio, el cual es empleado para indicar indirectamente la ausencia o presencia del gen de resistencia.
5. Las cruzas entre accesiones de diferentes reservorios genéticos (Mesoamericano y Andino) permiten generar recombinaciones genéticas para diferentes caracteres. En la población ALS 9951, utilizada en este estudio, además de las recombinaciones de la resistencia/susceptibilidad a la mancha angular, se observó una amplia recombinación para rendimiento y otros caracteres morfológicos que pueden facilitar la selección de líneas que combinen buena resistencia con rendimiento, y otros caracteres deseables.

6. RECOMENDACIONES

1. Los genotipos más valiosos a utilizar en futuros estudios genéticos y moleculares de la reacción a la mancha angular, son aquellos que resultaron resistentes en la evaluación fenotípica (reacción a la inoculación o infección natural) y molecular.
2. Se sugiere continuar los estudios que permitan identificar marcadores moleculares RAPD de los cuales se puedan derivar marcadores moleculares SCAR, específicos a las razas de mancha angular presentes en Honduras.
3. Al realizar las evaluaciones de ADN con marcadores moleculares, se debe considerar las concentraciones del o los cebadores utilizados para obtener reacciones claras y precisas.
4. Las evaluaciones de la reacción a la mancha angular deben hacerse cuando la enfermedad esta bien establecida, y las plantas y testigos susceptibles expresan síntomas de severidad bien definidos.
5. En posteriores estudios genéticos y moleculares, utilizar inóculos basados en aislamientos de razas específicas para facilitar la identificación precisa de genes resistentes a la mancha angular que sean útiles para el mejoramiento de frijol en Honduras.

7. BIBLIOGRAFÍA

Angel, F. 1999. Marcadores moleculares. *In*: Genética molecular para el mejoramiento y caracterización de la biodiversidad. Cali, Colombia, CIAT. p 13 (manuscrito).

Aranda, L.L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al Virus del Mosaico Dorado Amarillo en frijol común. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, EAP. 81 p.

Beebe, S.E.; Pastor-Corrales, M.A. 1991. Breeding for disease resistance. *In*: Common Bean: Research for Crop Improvement. Ed. van Shoonhoven, A. y Voyses, O. CAB, ORSTON, UK. p 561-617.

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

Brimm, C.A. 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Science* 6:220

Campos-Ávila, J. 1987. Enfermedades del frijol. México, Ed.Trillas. 132p.

Castaño, J.; Del Río, L. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. 3ª ed. Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press (ISBN 1885995-16-4). Publicación DPV-EAP no. 147. 290 p.

Castro, A.; Rosas, J.C.; Aranda, L.L. 2001. Manual del módulo de Biotecnología. EAP, Zamorano. 19 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). 1991. Manual de recetas culinarias de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Ed. por Guillermo E. Gálvez. Lima, Perú, CIAT. 97 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1992. Catálogo de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Ed. Hidalgo, R.; Rubiano, H.; Toro, O. Cali, Colombia, CIAT. 450 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1997. Bean Program 1995 Annual Report. Cali, Colombia, CIAT. p. 38-49.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1999. Bean Program 1998 Annual Report. Cali, Colombia, CIAT. p. 55-69.

Chacón, M.I.; Jara, C.; Castellanos, G.; Posso, C.E.; Buruchaga, R.; Cuasquer, J.B.; Pastor-Corrales, M.A. 1996. Diversidad genética y relación entre aislamientos de Africa y América Latina del hongo de la mancha angular del frijol común: Implicaciones para el mejoramiento genético. *In: Memoria del Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina.* Cali, Colombia, CIAT. p. 135-142.

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

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

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

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

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. Introdução au uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília, Brasil, EMBRAPA-CENARGEN. 220 p

Gepts, P.; Debouck, D.G. 1991. Origin, domestication and evolution of the common bean, *P. vulgaris*. *In: Common Bean: Research for Crop Improvement.* Ed. van Schoonhoven, A. y Voysest, O. CAB. ORSTON, UK. P. 7-53.

Kelly, J.; Afanor, L.; Haley, S.; Miklas, P. 1994. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. *Agronomía Mesoamericana (Costa Rica)* 5:1-7.

Kelly, J. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *HortScience* 30(3):461-465.

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

Pastor-Corrales, M.; Schwartz, H. 1989. Bean Production Problems in the Tropics. 2 ed. Cali, Colombia. CIAT. 654 p.

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

Programa de Investigaciones en Frijol (PIF). 2001. Principales enfermedades del cultivo del frijol en Centro América y El Caribe. EAP, Zamorano, Honduras. 45 p. (en preparación).

Rodríguez, F.; Quan, S.; Escoto, D. 1998. Cultivo del frijol: Guía para el manejo del cultivo del frijol. Tegucigalpa, Honduras. 39 p.

Rosas, J.C.; Young, R. 1992. Principios y prácticas de mejoramiento de plantas. EAP, Zamorano, Honduras. 121 p.

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

Rosas, J.C. 1999. Heredabilidad. Zamorano, Honduras. 6 p. (manuscrito).

Rosas, J.C.; Castro, A.; Flores, E. 2000. Mejoramiento genético del frijol rojo y negro para Centro América y El Caribe. *Agronomía Mesoamericana* 11(2):37-46.

Schwartz, H.F.; Gálvez, G. 1980. Problemas de Producción del Frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Cali, Colombia, CIAT. 424 p.

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 Singh P. S. y Voysest O. Cali, Colombia, CIAT. p. 334-350.

Smith, J. D.; Kinman, M.L. 1965. The use of parent-offspring regression as an estimation of heretability. *Crop Sci.* 5:595-596.

8. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN para análisis de RAPDs (Método de la UW-Madison)

1. Cosechar 0.5-0.75 g de tejido fresco de las plantas (6-8 mitades de hojas primarias) a los 10-12 días después de la siembra.
2. Agregar 50 μ l del *buffer* de extracción (PEX) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (*pestle*) de *plexiglass* de laboratorio.
3. Agregar 450 μ l adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en un vortex.
4. Lo más pronto posible (antes de una hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 min.
5. Centrifugar la muestra durante 10 min. a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar (*pellet*) los residuos de tejido.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla de 6:1 de etanol:Acetato de Amonio 7.5 M. Mezcla
7. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min. en una microcentrífuga.
8. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300 μ l de RNAasa A (concentración de 100 μ g/ml) + buffer 0.1X TE¹ (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.
9. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por 1 min (3 min se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
11. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol: Acetato de Sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
12. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletearlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
13. Vaciar el Etanol/Acetato de Sodio² y lavar los pellets llenando los tubos con 70% de etanol; agitar manualmente.
14. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.
15. Separar los pellets usando el vortex.

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

¹ Buffer TE (TRIS 1nM, pH=7.5; EDTA 0.1 mM, pH=8.0).

² Usar acetato de sodio 3H₂O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

Anexo 2. Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., D y NA Quant TM200)

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

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

* Buffer de cuantificación:

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

Anexo 3. Diluciones de ADN (20 ng/μl) según el método de la UW-Madison.

Dilución de ADN a 20 ng/μl

1. Agregar 100 μl de buffer TE 0.1X + Tartrazine en tubos eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar el volumen inicial de la muestra de ADN extraído de tejido, estimado mediante la fórmula $V_i = 2000 / C_i - 20$.
3. Transferir 150 μl de cada muestra a platos de 96 celdas con fondo redondeado (Microplate TM96, Polypropylene, MJ Research, Inc.). Tapar los platos y almacenar en el congelador (refrigerador si se va a usar en los siguientes días). Guardar el resto de ADN en el congelador.

Anexo 4. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores tipo SCAR.

1. Descongelar el ADN en baño maría a 65 °C durante 3 min o a temperatura ambiente si el plato con las muestras diluidas de ADN (20 ng/ μ l) se ha guardado en la refrigeradora.
2. Realizar los cálculos pertinentes para la preparación de la mezcla de reacción, según el cuadro anexo.
3. Preparar la mezcla de la reacción sin incluir las muestras de ADN.
4. Colocar 13 μ l de la mezcla maestra por cada celda en platos con fondo V.
5. Alicuotar 2.5 μ l de cada muestra de ADN.
6. Tapar con papel plástico (Microseal TM "A") el plato de reacción (platos de 96 celdas).
7. Realizar la amplificación mediante el perfil térmico que se presenta en el anexo 6.

Mezcla de la reacción para la amplificación del marcador SCAR NO2.

Componente	Volumen para una reacción (μ l)	
Agua	7.3	
Buffer (10 X) + Mg Cl ₂ (25mM)		2.0
DNTPs (4 mM c/u)	0.7	
Cebador PHG-2R	1.0	
Cebador PHG-2F		1.0
<i>Taq</i> -polimerasa (5 U/ μ l)		0.5
ADN	2.5	
Volumen final	15.0	

Anexo 5. Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR NO2 para el gen *Phg-2*

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

Perfil de programa del termociclador para la PCR del SCAR NO2

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

Anexo 6. Electroforesis para la amplificación de ADN.

Preparación de geles (gelatinas) al 1% de agarosa

1. Agregar 170 ml de buffer TBE 0.5X + 1.7 g de agarosa en un erlenmeyer, para bandejas de 22 orificios; ó 370 ml de buffer TBE 0.5X + 3.7 g de agarosa, para bandejas de 44 orificios.
2. Colocar el erlenmeyer (con uno más pequeño invertido en su boca) en un horno microondas por 4 min.
3. Retirar el erlenmeyer del microondas y colocarlo en una bandeja con agua sobre un plato agitador para enfriar la mezcla de agarosa/TBE buffer. Introducir cuidadosamente un imán de agitación, usando una barra plástica con punta imán (Usar guantes resistentes al calor al retirar el erlenmeyer del microondas).
4. Verificar la temperatura introduciendo un termómetro en el erlenmeyer. Cuando la temperatura baje a 60 °C, agregar 2 µl de bromuro de etidio, y vaciar la solución de agarosa y buffer TBE en una bandeja de electroforesis para correr muestras. Colocar los peines de inmediato y dejar solidificar por 30-60 min.

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

* Buffer TBE (Trisborate).

* Para detalles del porcentaje de agarosa, revisar manuales; éste varía de acuerdo a las características de las muestras, el tamaño del gel, el equipo de electroforesis y otros factores.

Electroforesis

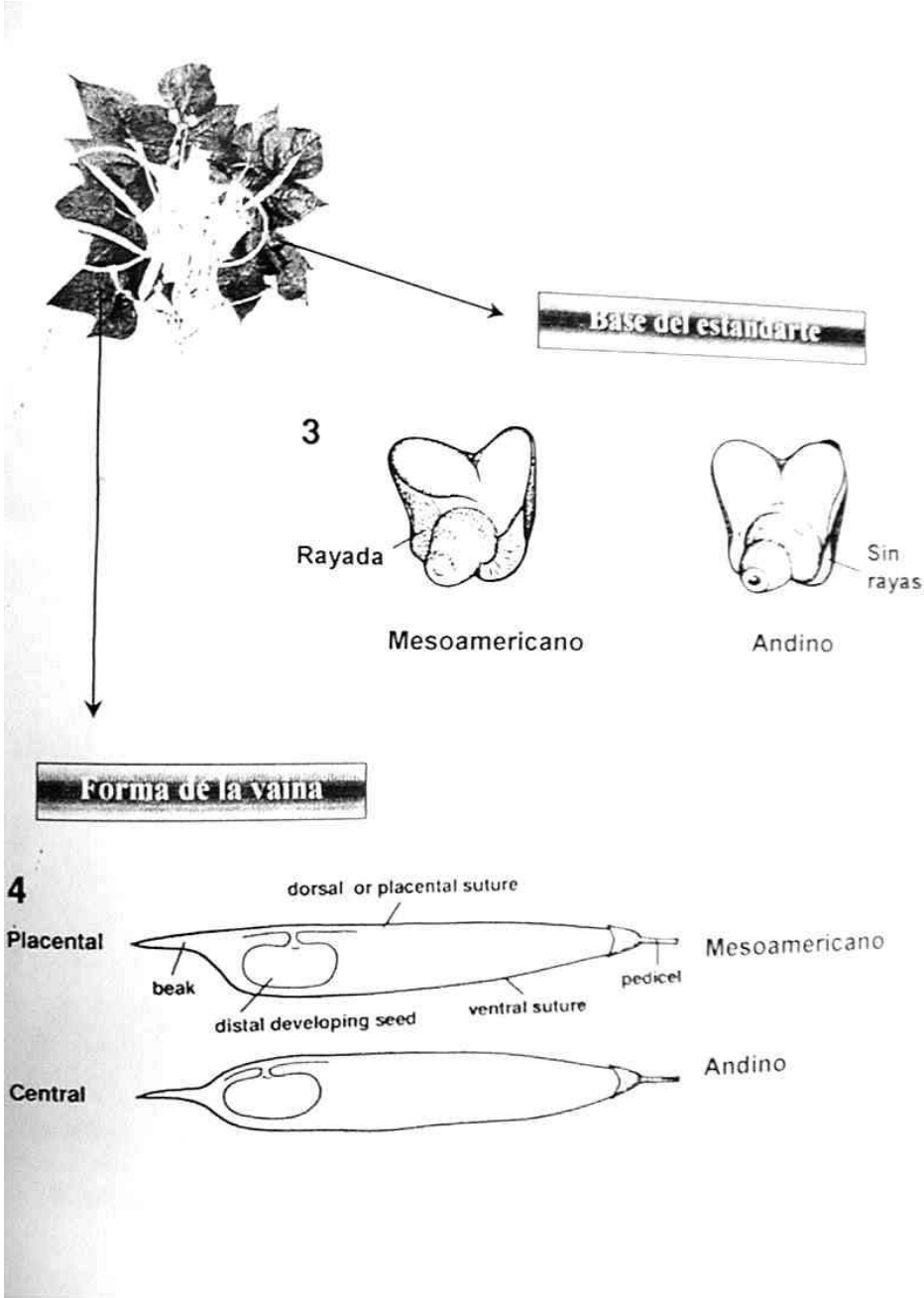
1. Colocar 15 µl de cada muestra de ADN amplificado en cada orificio del gel.
2. Dejar correr la electroforesis por hora y media a ~140 V.
3. Transferir las gelatinas al trasiluminador, usando guantes de latex desechables.
4. Revisar el nivel de tinción de las bandas en el trasiluminador de luz UV.
5. Fotografiar las gelatinas.

* El bromuro de etidio es altamente cancerígeno.

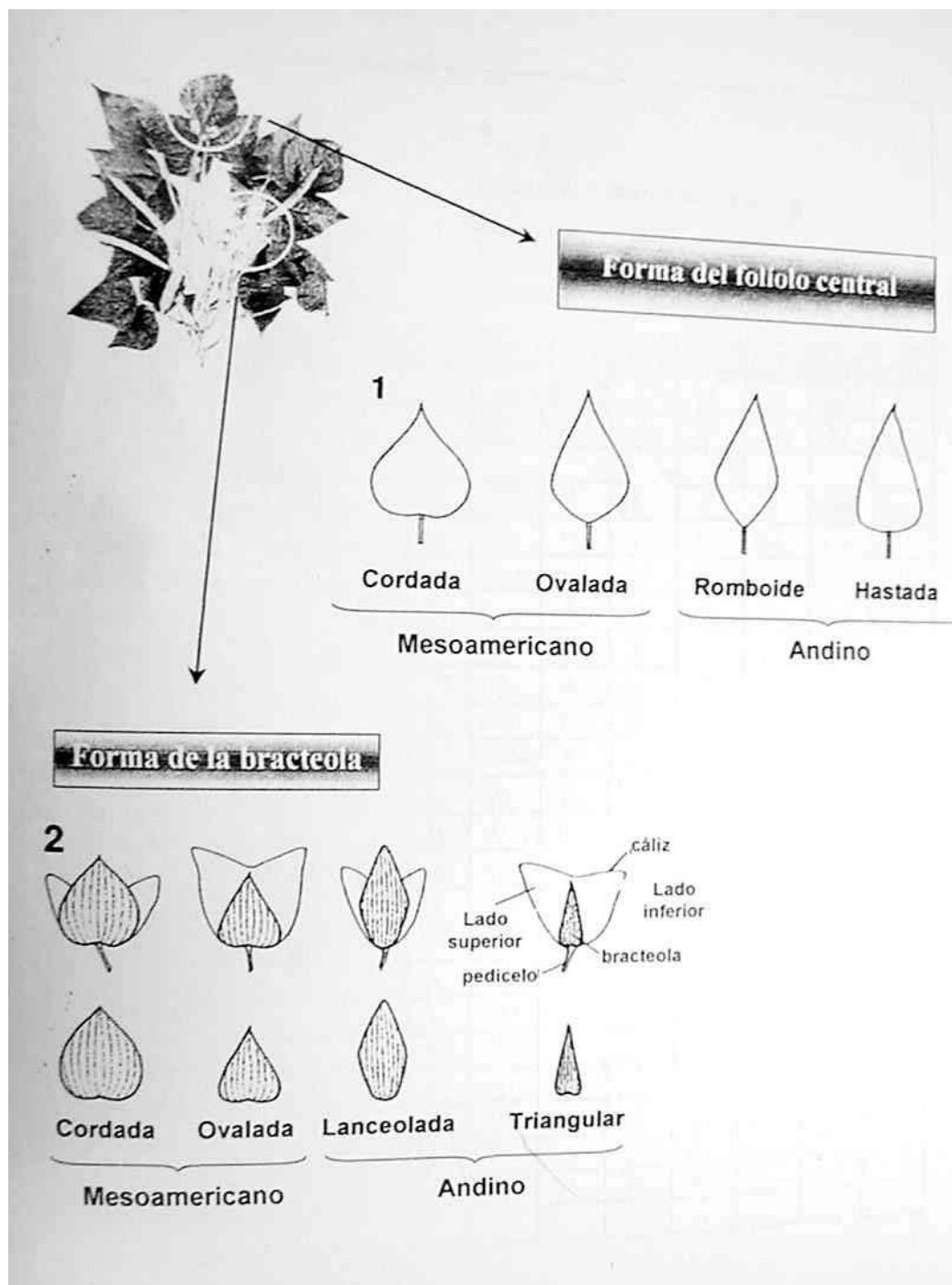
* Proteger los ojos y piel de los rayos UV, usando el equipo apropiado al visualizar y fotografiar las geles en el trasiluminador.

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

Anexo 7. Características fenotípicas de acervos mesoamericanos y andinos.



Anexo 8. Características fenotípicas de acervos mesoamericanos y andinos.



Anexo 9. Comparación entre resultados de campo y laboratorio de las evaluaciones de las familias F4 de la población ALS 9951

Poblaciones ALS 9951 F4										
Fecha siembra:		<u>14-6-01</u>			Procedencia: Poblaciones ALS 9951 F3					
Ubicación:		<u>Bancales A</u>			Antecedente: T GD F4					
Tamaño parcela:		<u>1.2</u>			Descripción : 40 Familias seleccionadas F4					
#S	IDENT.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
	1 Testigo 1/Tío Canela-75	S	R							
	2 Testigo 2/G06727	R	R							
	RESISTENTES									
1	108 ALS 9951-130	S	R							
2	144 ALS 9951-167	R	R							
3	93 ALS 9951-114	S	R							
4	136 ALS 9951-159	S	R							
5	27 ALS 9951-35	R	R							
6	41 ALS 9951-51	S	R							
7	84 ALS 9951-104	R	R							
8	146 ALS 9951-169	R	R							
9	113 ALS 9951-135	S	R							
10	145 ALS 9951-168	R	S							
11	25 ALS 9951-32	R	R							
12	29 ALS 9951-37	S	R							
13	120 ALS 9951-142	S	R							
14	33 ALS 9951-42	S	S							
15	22 ALS 9951-29	R	S							
16	96 ALS 9951-117	S	R							
17	154 ALS 9951-177	S	R							
18	31 ALS 9951-39	S	R							
19	119 ALS 9951-141	S	R							
20	14 ALS 9951-18	S	R							

#S	IDENT.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
	Testigo 1/Tío Canela-75	S	R							
	Testigo 2/G06727	R	R							
	SUSCEPTIBLES									
21	18ALS 9951-23	S	R							
22	75ALS 9951-94	S	R							
23	116ALS 9951-138	S	R							
24	91ALS 9951-112	S	S							
25	131ALS 9951-154	S	R							
26	15ALS 9951-19	S	R							
27	45ALS 9951-57	S	S							
28	56ALS 9951-70	S	R							
29	112ALS 9951-134	S	S							
30	54ALS 9951-68	S	S							
31	106ALS 9951-128	S	S							
32	115ALS 9951-137	S	R							
33	126ALS 9951-149	R	S							
34	128ALS 9951-151	S	R							
35	79ALS 9951-98	S	R							
36	80ALS 9951-99	S	S							
37	109ALS 9951-131	S	R							
38	152ALS 9951-175	S	R							
39	160ALS 9951-184	S	S							
40	172ALS 9951-197	S	S							
43	Testigo 1	S	R							
44	Testigo 2	R	R							

Descripción de variables:

(1) Evaluación fenotípica-visual (Campo)
Evaluación fenotípica-con SCAR NO2

(3)

(2) (Laboratorio)

(4)