

**Caracterización de razas de *Phaeoisariopsis
griseola* e implementación de la selección
asistida con marcadores para la resistencia a
la mancha angular del frijol**

Nelson Fernando Proaño Triana

Zamorano, Honduras
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Noviembre, 2005

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Caracterización de razas de *Phaeoisariopsis*
griseola e implementación de la selección asistida
con marcadores para la resistencia a la mancha
angular del frijol**

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

Presentado por:

Nelson Fernando Proaño Triana

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005

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.

Nelson Fernando Proaño Triana

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005

**Caracterización de razas de *Phaeoisariopsis griseola* e
implementación de la selección asistida con marcadores para la
resistencia a la mancha angular del frijol**

Presentado por:

Nelson Fernando Proaño Triana

Aprobado por:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor Principal

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Área
Temática Fitotecnia

Jorge Venegas, Ing. Agr.
Asesor

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

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

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

DEDICATORIA

A Dios.

A mi padre José Nelson y a mi madre Elizabeth.

A mi hermano Renato.

A mi tía Alexandra Triana.

A mi abuelita Rita Morán.

A todos mis amigos y amigas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme iluminado y dado fuerzas en los momentos que más lo he necesitado.

A mi padre Nelson por su gran esfuerzo, confianza y apoyo en estos cuatro años de formación Zamorana.

A mi madre Elizabeth por su inmenso amor y esos sabios consejos en los momentos más difíciles.

A mi hermano Renato por su cariño y confianza.

A mi tía Alexandra por su inmenso cariño.

A mi abuelita Rita por haber estado siempre pendiente de mi padre, madre y hermano.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por su gran apoyo y conocimientos para llevar a cabo la realización exitosa de este trabajo.

A Jorge Venegas por su valiosa amistad e infinita paciencia y apoyo para cumplir con los objetivos de esta investigación.

A Byron Reyes, María Bravo y Becky Herrera por su amistad y consejos.

A Tomasa Colindres y Luz Henríquez por su constante atención en el trabajo diario y por su gran afecto.

A mis amigos y compañeros de trabajo durante cuarto año; Damián Pulla, Erika Cabanilla, Wilmer Rodríguez y José de la Cadena por su amistad y apoyo incondicional.

A todo el personal del Programa de Investigaciones en Frijol: Roger, Jorge, Calixto, Santos, Enrique, Hernán, Amilcar, Alonso, Adolfo, José, Sergio, Gerardo, Manuel y Raúl por su ayuda en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis grandes amigos y hermanos Ronald Navarrete, Wilmer Pacheco y César Nogales por todos los buenos momentos compartidos.

A mi compañero de cuarto Henry Paz por su estimación y apoyo cada día de estudio y trabajo.

A mis queridas amigas Carmen Lucía Velasco, Thelma Cálix, Jacqueline Solíz y Eliana Sakamoto por haber sido parte importante de mi vida Zamorana.

A la familia Cálix Lara porque en ocasiones me permitieron compartir agradables momentos en su hogar brindándome también su cariño y atención.

A la familia Morales Vanegas por su inigualable hospitalidad y cariño.

A todos mis amigos, tanto los de Zamorano como los de mi querida ciudad Guayaquil.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A Zamorano por el apoyo económico brindado durante mis cuatro años de estudio.

Al Programa de Investigaciones en Frijol, bajo el financiamiento del Programa Bean/Cowpea CRSP, por el apoyo para la culminación de este trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por la ayuda financiera brindada en el momento que más la necesité.

Al Instituto Ecuatoriano de Crédito Estudiantil (IECE) por el financiamiento brindado durante el primer trimestre de mi cuarto año en Zamorano.

RESUMEN

Proaño, N. 2005. Caracterización de razas de *Phaeoisariopsis griseola* e implementación de la selección asistida con marcadores para la resistencia a la mancha angular del frijol. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 33 p.

La mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) es una de las enfermedades del frijol que causa grandes pérdidas económicas a nivel mundial. La mancha angular causa lesiones angulares en el follaje de la planta, y afecta tallos, pecíolos y vainas. El objetivo de este estudio fue caracterizar razas patogénicas del agente causal de la mancha angular (*P. griseola*) y adaptar un protocolo para la implementación del SCAR SH-13. Los estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y las facilidades de invernaderos del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF). Se hicieron inoculaciones en variedades diferenciales andinas y mesoamericanas de frijol (12 genotipos diferenciales) usando aislamientos de *P. griseola*. Los genotipos fueron sembrados en maceteros de 15 cm de diámetro e inoculados con *P. griseola* a los 18 días después de la siembra (DDS) con una suspensión de 2×10^4 conidias/ml. Las plantas inoculadas permanecieron por 48 horas en una cámara de incubación y luego se mantuvieron a una temperatura aproximada de 28°C y humedad relativa $\geq 85\%$. Se evaluó la reacción de los diferenciales a los 14 días después de la inoculación (DDI), usando la escala de severidad de daño del CIAT para determinar la segregación por resistencia (1-3) y susceptibilidad (4-9). La mayoría de los diferenciales de mancha angular presentaron susceptibilidad a los aislamientos de *P. griseola*, pero la incidencia fue menor en las variedades de origen andino. Se identificaron ocho razas (13-55, 15-39, 15-43, 31-38, 31-39, 31-51, 55-59 y 63-63), lo que implica que este hongo posee una alta variabilidad patogénica. Los diferenciales G5686, Mex 54 y BAT 332, fueron los que presentaron la mayor resistencia a los aislamientos evaluados. Se recomienda ampliar la caracterización del patógeno en el ámbito regional para entender mejor su comportamiento y avanzar con la búsqueda de fuentes de resistencia que permitan la ampliación de la base genética y una constante resistencia a la mancha angular. Para la implementación del SCAR SH-13 se elaboraron tres protocolos, uno de estos mostró una mejor calidad de bandas y resultó ser el más idóneo para la adaptación a las condiciones del laboratorio. La mezcla maestra para el protocolo 3 fue: 7.1 μl de agua, 3.0 μl de buffer (10X promega), 1.2 μl de dNTP's (4mM c/u) sin MgCl_2 , 0.5 μl de *primer* SH-13-F, 0.5 μl de *primer* SH-13-R, 0.7 μl de Taq-Polimerasa y 2.0 μl de ADN extraído de las plantas de la variedad AND 277 que posee el gen *Phg-1* que confiere la resistencia a la mancha angular del frijol. El SCAR SH-13 se ajustó a la expresión de resistencia esperada ($P > 0.9$) mediante la prueba de Chi-Cuadrado.

Palabras clave: Aislamientos, base genética, genotipos diferenciales, inoculación, razas patogénicas, SCAR, variabilidad patogénica.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADILLA	i
AUTORÍA	ii
PÁGINA DE FIRMAS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES	vii
RESUMEN	viii
ÍNDICE DE CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	4
UBICACIÓN DEL ESTUDIO	4
CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	4
Material experimental	4
Genotipos diferenciales	5
Siembra	5
Inoculación de plantas con aislamientos de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> de Honduras, Nicaragua y Puerto Rico	5
Evaluación de la severidad de daño	6
IMPLEMENTACIÓN DE LA SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES (SAM)	6
Material experimental	6
Extracción de ADN	7
Cuantificación y Dilución de ADN	7
Optimización de protocolo usado para el SCAR SH-13	7
Amplificación	7
Separación de ADN	8
Evaluación del patrón de amplificación del SCAR SH-13	9
Análisis estadístico	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	10
Distribución geográfica de las razas caracterizadas	11
IMPLEMENTACIÓN DE LA SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES (SAM)	14

Optimización de protocolo para marcadores tipo SCAR	14
Optimización de SCAR SH-13.....	14
EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE AMPLIFICACIÓN DEL SCAR SH-13.....	15
Análisis estadístico	15
CONCLUSIONES	16
RECOMENDACIONES	17
BIBLIOGRAFÍA	18
ANEXOS	20

ÍNDICE DE CUADROS

1. Aislamientos hondureños de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> caracterizados por Arroyo 2004. Zamorano. 2005.....	2
2. Aislamientos de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> de muestras de frijol recolectadas en Honduras, Nicaragua y Puerto Rico. Zamorano. 2005.....	4
3. Protocolo #1 para la mezcla maestra de reacción en la amplificación del SCAR SH-13 para el gen <i>Phg-1</i>	8
4. Protocolo 2 y 3 para la mezcla maestra de reacción en la amplificación del SCAR SH-13 para el gen <i>Phg-1</i>	8
5. Caracterización de los ocho aislamientos de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> mediante el uso de 12 genotipos diferenciales de frijol. Zamorano, Honduras. 2005.....	10
6. Comparación de patotipos de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> caracterizados en Honduras. ...	12
7. Comparación de patotipos de Honduras y Nicaragua de <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	13

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Diferenciales de mancha angular (1 al 12), testigo resistente G06727 (T ₁) y susceptible TC-75 (T ₂).	5
2. Representación de la escala de severidad de daño (CIAT 1987) para la evaluación de lesiones causadas por <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	6
3. Razas patogénicas de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> identificadas en Honduras en los años 2004 y 2005.	11
4. Razas patogénicas de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> identificadas en Nicaragua en el año 2005.	12
5. Razas patogénicas de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> identificadas en Puerto Rico en el año 2005.	13
6. Optimización del SCAR SH-13 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2005.	14
7. Patrón de amplificación de banda del SCAR SH-13.	15

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa comestible más importante sobre la tierra, proveyendo nutrientes importantes para más de 500 millones de personas de naciones en vías de desarrollo. Según Rosas (2003a), los factores más importantes que afectan el desarrollo del frijol incluyen el genotipo (cuyas características hábito de crecimiento y precocidad pueden variar), el clima y las enfermedades. Dentro de estos factores, las enfermedades, en su mayoría causadas por hongos, virus y bacterias, son una de las limitantes que más contribuyen a su bajo rendimiento.

La mancha angular del frijol es causada por el hongo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.), que se presenta con frecuencia en algunas zonas frijoleras de América Latina. *P. griseola* pertenece al grupo de los hongos imperfectos, del orden moniliales, familia stilvaceae. Es una enfermedad de amplia distribución y económicamente importante debido a que puede causar reducciones en rendimiento de hasta un 80% en variedades susceptibles (Rosas 2003a).

P. griseola, tiene un rango de hospederos que incluyen *P. vulgaris*, *P. acutifolius*, *P. coccineus* y *P. lunatus*. Este patógeno requiere temperaturas de 16 a 24°C para su desarrollo y una humedad relativa de 80 a 95% que permite que esporule en forma abundante. El viento es uno de los principales agentes que diseminan las esporas de este hongo, ya que al madurar se desprenden fácilmente del conidióforo y son arrastradas a otras siembras de frijol. Los insectos también contribuyen a la diseminación de esporas, éstas se adhieren al cuerpo, las patas y allí las transportan a otras plantas (Campos 1987).

La semilla es un agente potencial de diseminación ya que este patógeno puede estar en el interior de la misma y reiniciar su actividad cuando las condiciones le sean favorables, entonces se convierte en fuente de inóculo primario y causa defoliación prematura de la planta. Según Rosas (2003b), la transmisión por semilla es relativamente baja, pero representa un peligro potencial según el nivel de daños en las vainas. El patógeno también puede permanecer en los residuos de las plantas enfermas hasta por 500 días, así como en el suelo; el agua de lluvia favorece su diseminación (Campos 1987).

El patógeno de la mancha angular posee razas. La mayoría de los genotipos evaluados hasta ahora son resistentes a unas razas y susceptibles a otras. Existe evidencia que indica que la organización de la diversidad genética del hongo que causa la mancha angular del frijol es paralela a su hospedero.

En 1995 se aprobó un grupo de 12 genotipos diferenciales y su valor binario para la caracterización de razas de *P. griseola* desarrollado por el CIAT (Centro Internacional de

Agricultura Tropical) (Pastor-Corrales y Jara 1995). Estos diferenciales se clasifican en dos grupos de genotipos: Seis andinos (Don Timoteo, G11796, Bolón Bayo, Montcalm, Amendoin y G5686) y seis mesoamericanos (PAN 72, G2858, Flor de Mayo, Mex 54, BAT 332 y Cornell 49242).

Previo a este estudio, utilizando los 12 genotipos diferenciales, Arroyo 2004 identificó siete razas de *P. griseola* con el uso de siete aislamientos recolectados en diferentes zonas frijoleras de Honduras (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislamientos hondureños de *Phaeoisariopsis griseola* caracterizados por Arroyo 2004. Zamorano. 2005.

Código de aislamiento	Lugar de recolección	Material recolectado	Año de recolección	Raza
Pg-C	Cabañas, Marcala, La Paz	<i>Phaseolus coccineus</i>	2003	0-32
Pg-Jm	Jamastrán, Danlí, El Paraíso	<i>P. vulgaris</i>	2003	23-43
Pg-Jc	Jacaleapa, Danlí, El Paraíso	<i>P. vulgaris</i>	2003	17-7
Pg-L	Linaca, Tatumbla, Fco. Morazán	<i>P. vulgaris</i>	2003	25-17
Pg-Lm	Las Moras, Güinope, El Paraíso	<i>P. vulgaris</i>	2003	23-59
Pg-La	Los Almendros, Danlí, El Paraíso	<i>P. vulgaris</i>	2003	0-33
Pg-Mh	Mina Honda, Yorito, Yoro	<i>P. vulgaris</i> var. Macuzalito	2004	31-59

Existen tres tipos de control de la mancha angular que son: Cultural, químico y genético. De estos, el control genético mediante el uso de variedades resistentes es la medida más segura y económica para prevenir esta enfermedad. Actualmente existen líneas avanzadas de grano mesoamericano con resistencia intermedia a la enfermedad y se están desarrollando variedades resistentes empleando fuentes andinas y mesoamericanas.

Entre otras opciones para el control y manejo de esta enfermedad se cuenta con nuevas herramientas para el mejoramiento genético de las plantas. Aquí se destacan los marcadores moleculares, los cuales aparecen como herramientas indispensables de apoyo a los programas clásicos de mejoramiento.

En general, el trabajo con marcadores moleculares es útil porque se pueden usar en la selección mediante la identificación de genes. La aplicación de esta herramienta en el fitomejoramiento es conocida como Selección Asistida con Marcadores Moleculares (SAM) (Singh 1996).

El Laboratorio de Biodiversidad y Fitomejoramiento de Zamorano ha hecho uso de marcadores tipo SCAR, tal es el caso del marcador SNO2, el cual fue implementado y utilizado en estudios anteriores.

El objetivo general de este estudio es caracterizar la diversidad patogénica de *Phaeoisariopsis griseola* utilizando aislamientos recolectados en zonas frijoleras de Honduras, Nicaragua y Puerto Rico; e implementar SAM en la resistencia de la mancha angular del frijol.

Como objetivos específicos se planteó, identificar las razas patogénicas de *P. griseola* presentes en zonas frijoleras de Honduras, Nicaragua y Puerto Rico mediante el uso de 12 genotipos diferenciales inoculados con aislamientos monospóricos y adaptar protocolos para el SCAR SH-13 para la implementación de SAM en la resistencia de la mancha angular del frijol.

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo a partir del mes de febrero hasta septiembre de 2005, en las instalaciones del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; ubicada en el valle del Yeguaré, a 30 km de Tegucigalpa, Honduras, con una altitud de 800 msnm, temperatura media de 24°C y precipitación media anual de 1,100 mm.

El manejo *in vitro* de *P. griseola* y el análisis molecular se realizaron en el Laboratorio de Biodiversidad y Fitomejoramiento, mientras que las inoculaciones y evaluaciones de severidad, en invernaderos con ambiente controlado y en una casa de malla como cámara de incubación.

CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE *P. griseola*

Material experimental

Se utilizaron cultivos puros de ocho aislamientos de *P. griseola* recolectados en Honduras, Nicaragua y Puerto Rico (Cuadro 2); conservados a -20°C en el Laboratorio de Biodiversidad y Fitomejoramiento de Zamorano. Para la reactivación de estos aislamientos se utilizó una solución de peptona (10%) y sucrosa (20%).

Cuadro 2. Aislamientos de *Phaeoisariopsis griseola* de muestras de frijol recolectadas en Honduras, Nicaragua y Puerto Rico. Zamorano. 2005.

Código de aislamiento	Lugar de recolección	Material recolectado	Año de recolección
Pg-19 - 1HND ¹	El Paraíso, Honduras	<i>P. vulgaris</i>	2005
Pg-P	Palmichal, Comayagua, Honduras	<i>P. vulgaris</i>	
Pg-Sb	Santa Bárbara, Honduras	<i>P. vulgaris</i>	2005
Pg-E	Estelí, Nicaragua	<i>P. vulgaris</i>	2004
Pg-Pn	Pueblo Nuevo, Nicaragua	<i>P. vulgaris</i>	2004
Pg-Sl	Santa Lucía, Nicaragua	<i>P. vulgaris</i>	2004
Pg-I1	Isabela, Puerto Rico	<i>P. vulgaris</i>	2005
Pg-I2	Isabela, Puerto Rico	<i>P. vulgaris</i>	2005

¹ Aislamiento donado por el CIAT

Genotipos diferenciales

Se emplearon 12 genotipos diferenciales de frijol para la caracterización de las razas patogénicas, las cuales consisten en variedades con diferentes genes de resistencia que dan, mediante un valor binario, el espectro patogénico del organismo en estudio.

Para la caracterización de los aislamientos, además de los genotipos diferenciales, se utilizaron plantas de G06727 y Tío Canela-75 como testigos resistente y susceptible respectivamente.

Siembra

Las plantas de los diferenciales fueron sembradas en los invernaderos de las instalaciones del PIF. Las plantas crecieron en maceteros medianos de 15 cm de diámetro y profundidad (2,651 cm³), a razón de tres plantas por macetero y dos maceteros por cada genotipo.

Los maceteros estuvieron distribuidos en tres grupos de 28 maceteros por grupo (Figura 1).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	T ₁	T ₂
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Figura 1. Diferenciales de mancha angular (1 al 12), testigo resistente G06727 (T₁) y susceptible TC-75 (T₂).

Inoculación de plantas con aislamientos de *P. griseola* de Honduras, Nicaragua y Puerto Rico

La inoculación de los cultivos monospóricos en el grupo de 12 genotipos diferenciales fue realizada con un atomizador *DeVilbiss*[®] adaptado a un compresor de aire. Para aplicar el inóculo se agregaron a la suspensión, de 2×10^4 conidias/ml, dos gotas de Tween 20 como dispersante de esporas por litro de inóculo. Las plantas de 18 días de germinadas o con dos hojas trifoliadas, fueron inoculadas por el haz y el envés y permanecieron 48 horas en incubación a 90 % de humedad relativa y 24-28 °C en una casa de malla adecuada a las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad. Se efectuaron riegos diarios, tutoro y cortes de guías apicales según fue necesario.

Evaluación de la severidad de daño

A los 14 días después de la inoculación (DDI), las plantas fueron evaluadas mediante la escala de severidad 1-9 (1-3 = resistente, 4-9 = susceptible), propuesta por el CIAT (1987) (Figura 2).

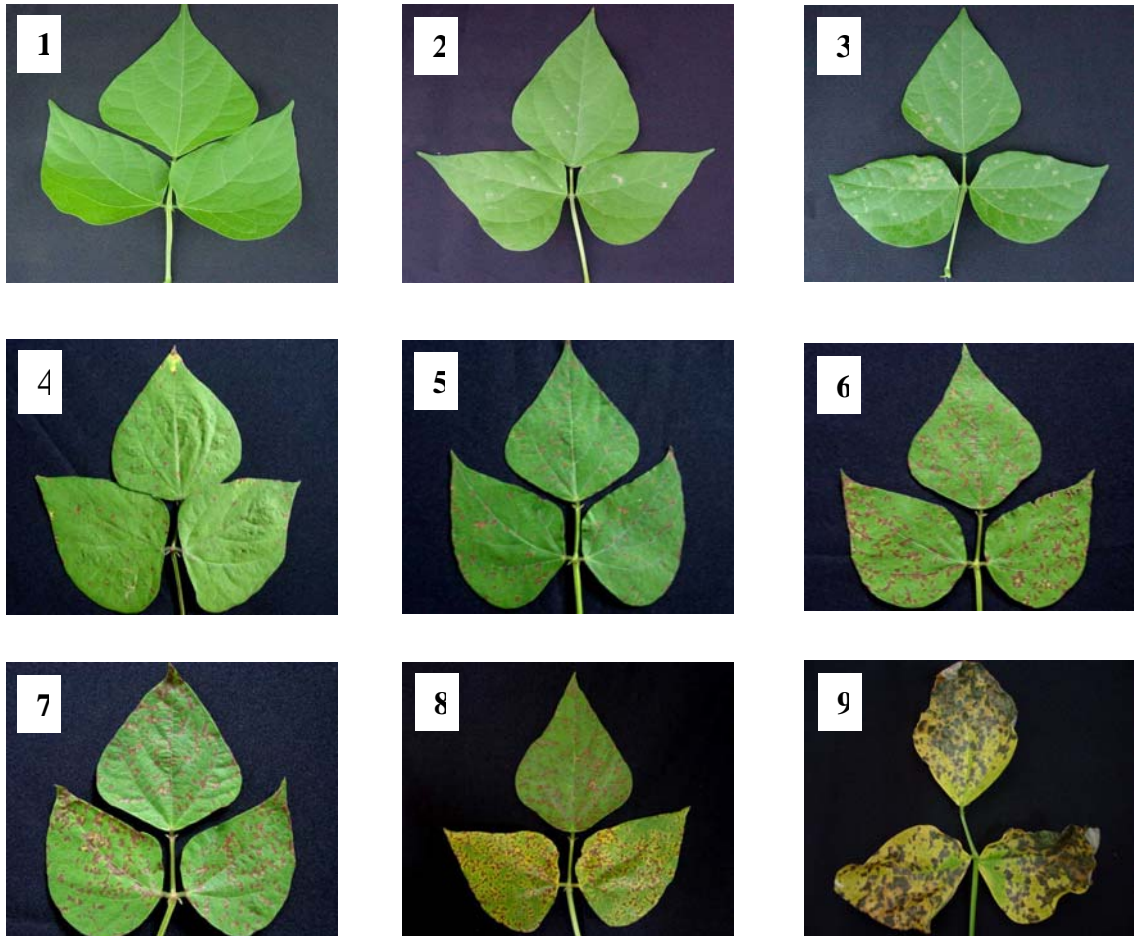


Figura 2. Representación de la escala de severidad de daño (CIAT 1987) para la evaluación de lesiones causadas por *P. griseola*.

IMPLEMENTACIÓN DE LA SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES (SAM)

Material experimental

Se emplearon plantas de la variedad AND 277 y el SCAR SH-13, para el estudio de la resistencia de la mancha angular del frijol mediante el gen *Phg-1*. La siembra de las plantas de la variedad AND 277 se hizo el 13 de julio del 2005 en los bancales de las instalaciones del PIF. Para la implementación del marcador molecular SH-13 se utilizaron los protocolos de extracción, cuantificación, dilución, y separación de ADN sugeridos por

la Universidad de Wisconsin-Madison (Zeledón 2003). El protocolo de amplificación se originó a partir de varias pruebas de ajuste de reactivos y sus concentraciones.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se recolectaron cuatro brotes terminales de 48 plantas de la variedad AND 277. El material vegetativo se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml. Con el fin de romper las paredes celulares del tejido se usaron barras de plexiglass para macerar las muestras en los tubos eppendorf con 500 μ l de buffer PEX (Etil Xantogenato de Potasio). Luego se colocaron las muestras en baño María a 65°C por 60 min y para la concentración de los residuos de tejido, estos se centrifugaron a 14000 RPM durante 10 min. Se precipitaron los ácidos nucleicos con 6:1 etanol acetato de amonio 7.5M por 30 min y se peletizaron los ácidos nucleicos centrifugando las muestras a 3000 RPM durante 10 min. Se adicionó 300 μ l de RNAasa a (100 μ g/ml) + buffer TE 0.1X y se colocó en baño María a 37°C por 60 min para eliminar el ARN de las muestras. Se precipitó el ADN con una mezcla de 10:1 de etanol acetato de sodio 3 M. El pellet de ADN fue lavado con etanol al 70% para luego dejarlo secar al ambiente. Después de tres horas se rehidrató con 100 μ l de buffer TE 0.1X y se almacenó a -20°C.

Cuantificación y Dilución de ADN

Para cuantificar el ADN de cada muestra, se usó el fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA QuantTM200, colocando 2 ml de buffer de cuantificación y 2 μ l de ADN muestra en una cubeta de cuarzo para medir la concentración de ADN en ng/ μ l. Para la calibración del fluorómetro se usó ADN de bovino estándar (100 ng/ μ l). La dilución de ADN se realizó a una concentración de 30 ng/ml, agregando 100 μ l de buffer TE 0.1X y ADN según la concentración y el volumen estimado mediante la fórmula $V_i = 3000/C_i - 30$. Estas muestras fueron diluidas en platos de 96 celdas con fondo redondeado.

Optimización de protocolo de amplificación usado para el SCAR SH-13

Para detectar la presencia o ausencia de bandas en la variedad AND 277, usando el SCAR SH-13 ligado al gen *Phg-1* (Queiroz *et al.* 2004), se realizaron pruebas empleando soluciones con cantidades y concentraciones diferentes para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), obteniendo de esta manera nuevas mezclas maestras para la optimización del SCAR, adaptándolo a las condiciones del Laboratorio de Biodiversidad y Fitomejoramiento de la Escuela Agrícola Panamericana.

Amplificación

Las tres mezclas maestras de prueba se prepararon de acuerdo a los volúmenes de agua, buffer 5X y 10X, cebadores (primers), dNTP's y Taq-Polimerasa (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Protocolo #1 para la mezcla maestra de reacción en la amplificación del SCAR SH-13 para el gen *Phg-I*.

Componentes	1er. Protocolo
Agua	9.0
Buffer (5X) + (Xylene Cyanole)	2.0
dNTP's (4mM c/u) con MgCl ₂	0.7
SH-13-F	0.3
SH-13-R	0.3
Taq-Polimerasa (5U/μl)	0.7
ADN	2.0
Volumen final	15.0

Cuadro 4. Protocolo 2 y 3 para la mezcla maestra de reacción en la amplificación del SCAR SH-13 para el gen *Phg-I*.

Componentes	2do. Protocolo	3er. Protocolo
Agua	7.6	7.1
Buffer (10X <i>Promega</i>)	2.5	3.0
dNTPs (4mM c/u) sin MgCl ₂	1.2	1.2
SH-13-F	0.5	0.5
SH-13-R	0.5	0.5
Taq-Polimerasa (5U/μl)	0.7	0.7
ADN	2.0	2.0
Volumen final	15.0	15.0

El equipo utilizado para la amplificación de ADN fue el termociclador PCR-100TM (Programmable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling). El programa de amplificación usó el perfil térmico para el marcador molecular SCAR SH-13 descrito por Miklas (2002). El perfil térmico constó de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s; acoplamiento a 59°C por 60 s, elongación a 72°C por 90 s y un ciclo final de elongación a 72°C por 5 min.

Separación de ADN

Se efectuó en un tanque de electroforesis (Maxicell EC 360M, 22 orificios), empleándose gel de agarosa al 1%, para luego teñirla con 10 μl de bromuro de etidio en 100 ml de agua. En la electroforesis se utilizó una fuente de poder eléctrico y regulación de voltaje (Hoefler Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP). Para determinar la longitud de los fragmentos observados se utilizó una escalera de ADN de 100 pares de bases (100 pb DNA Ladder). Para la observación de las bandas se utilizó un transiluminador Fotodyne, Foto/UV[®] 26 y una cámara digital SONY para fotografiar los geles y registrar los resultados.

EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE AMPLIFICACIÓN DEL SCAR SH-13

Se utilizó 48 muestras de ADN extraídas de 48 plantas de la variedad AND 277 sembradas en los bancales del PIF, con el fin de evaluar y comprobar el patrón de bandas del SCAR SH-13 correspondiente a 520 pares de bases.

Análisis estadístico

Para determinar el porcentaje de aceptabilidad se aplicó la distribución de X^2 (Chi-cuadrado) de Pearson, para comprobar la concordancia entre los valores esperados y observados identificando la relación en el patrón de bandas empleando 48 muestras de la variedad AND 277 con el SCAR SH-13.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE *P. griseola*

Se identificó ocho razas distintas al evaluar los ocho aislamientos de *P. griseola* colectados en Honduras, Nicaragua y Puerto Rico, lo que confirma la gran variabilidad patogénica del hongo causante de la mancha angular en la región. El aislamiento Pg-Pn de Nicaragua presentó menos virulencia que los demás, ya que se obtuvo una severidad de grado bajo (1-3) a medio (4-6), incluso en el testigo susceptible Tío Canela-75. La resistencia intermedia observada en Tío Canela-75 a estos aislamientos, puede atribuirse a la presencia del gen *Phg-2*, identificado en esta variedad mediante el marcador SCAR SNO2 (Díaz 2001). Los diferenciales G5686, Mex 54 y BAT 332 fueron los genotipos con mayor resistencia a los aislamientos evaluados. G5686 tuvo una resistencia muy parecida al testigo G06727; razón que se atribuye a que ambos pertenecen al mismo acervo andino.

Cuadro 5. Caracterización de los ocho aislamientos de *Phaeoisariopsis griseola* mediante el uso de 12 genotipos diferenciales de frijol. Zamorano, Honduras. 2005.

Aislamientos	Genotipos diferenciales												Razas	Testigos	
	Andinos						Mesoamericanos							A ^y	B
	1 ^z	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
Pg-19 - 1HND	+	+	+	+	+	- ^x	+	+	+	-	-	+	31-39	2 ^w	7
Pg-P	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	31-51	3	7
Pg-Sb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	63-63	1	6
Pg-E	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	13-55	3	7
Pg-Pn	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	15-43	2	6
Pg-SI	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	55-59	2	8
Pg-I1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	31-38	1	7
Pg-I2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	15-39	2	8

^z 1=Don Timoteo, 2=G11796, 3=Bolón Bayo, 4=Montcalm, 5=Amendoin, 6=G5686, 7=Pan 72, 8=G2858, 9=Flor de Mayo, 10=Mex 54, 11=Bat 332 y 12=Cornell 49242

^y A=G06727, B=Tío Canela-75

^x Severidad: (-)=Resistente, (+)=Susceptible

^w Escala de Severidad: (1-3)=Resistente, (4-9)=Susceptible

Cuatro de las ocho razas identificadas en este estudio (15-43, 31-39, 31-51 y 63-63), han sido anteriormente reportadas en Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Puerto Rico.

Distribución geográfica de las razas caracterizadas

Con el uso del grupo de 12 genotipos diferenciales establecidos por el CIAT 1995, se han reportado en Honduras y Nicaragua, países correspondientes al área mesoamericana y Puerto Rico, en El Caribe, 35 razas del hongo causante de la mancha angular.

En el caso de Honduras se han identificado anteriormente 20 de estas 35 razas. En estudios realizados por Arroyo 2004, se reportaron siete razas pertenecientes a los departamentos de La Paz, El Paraíso, Fco. Morazán y Yoro; y en el presente estudio se identificaron tres razas, pertenecientes a los departamentos de El Paraíso, Comayagua y Santa Bárbara (Figura 3).

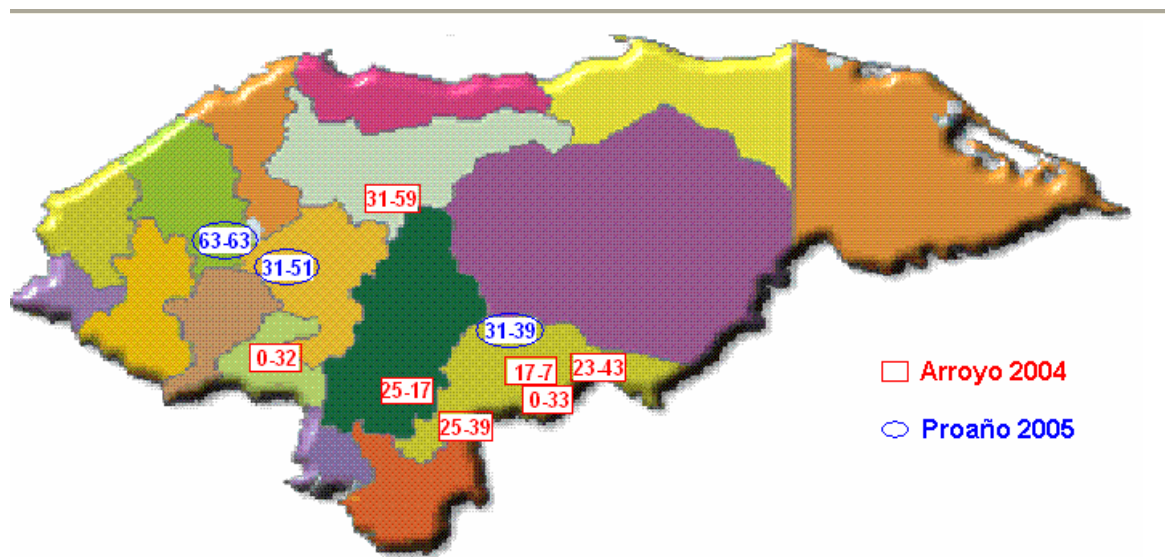


Figura 3. Razas patogénicas de *P. griseola* identificadas en Honduras en los años 2004 y 2005.

Comparando los resultados de las razas identificadas en Honduras por otros autores y Arroyo 2004 con las razas caracterizadas en este estudio; se encontraron dos patotipos iguales confirmando la existencia de estos en los sistemas agroecológicos hondureños. También se observó una similitud entre dos patotipos de Honduras evaluados en este estudio con patotipos identificados por otros autores en Nicaragua, atribuyéndose esto al permanente movimiento de material genético entre los países de esta región y por la similitud de sistemas agroecológicos dentro de estos dos países (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de patotipos de *Phaeoisariopsis griseola* caracterizados en Honduras.

Razas identificadas anteriormente		Arroyo 2004	Proaño 2005
7-43 ^{zyxw}	32-39 ^x	0-32	31-39
15-11 ^{zyw}	32-47 ^x	23-43	31-51
15-43 ^{zyw}	63-11 ^{zyx}	17-7	63-63
15-59 ^{zyw}	63-27 ^{zy}	25-17	
15-63 ^{zyxw}	63-31 ^{zyx}	23-59	
31-11 ^{zy}	63-43 ^{zy}	0-33	
31-27 ^{zyw}	63-47 ^{zyx}	31-59	
31-39^{zy}	63-51 ^{zy}		
31-47 ^{zyw}	63-59 ^{zy}		
31-63 ^{zyxw}	63-63^{zyx}		

^z Mahuku et al. (2002a)

^y PROFRIJOL (1999)

^x Mahuku et al. (2002b)

^w CIAT (1997)

En lo que respecta a Nicaragua no se encontró ninguna relación entre las tres razas caracterizadas en este estudio con los nueve patotipos identificados anteriormente por otros autores.



Figura 4. Razas patogénicas de *Phaeoisariopsis griseola* identificadas en Nicaragua en el año 2005.

Al comparar las razas de Nicaragua caracterizadas este año con las de Honduras por otros autores, se identificó la presencia de la raza 15-43 en los dos países, lo que representa nuevamente el parentesco de patotipos a nivel mesoamericano (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de patotipos de Honduras y Nicaragua de *Phaeoisariopsis griseola*.

Razas hondureñas identificadas anteriormente		Razas nicaragüenses (Proaño 2005)
7-43 ^{zyxw}	32-39 ^x	13-55
15-11 ^{zyw}	32-47 ^x	15-43
15-43^{zyw}	63-11 ^{zyx}	55-59
15-59 ^{zyw}	63-27 ^{zy}	
15-63 ^{zyxw}	63-31 ^{zyx}	
31-11 ^{zy}	63-43 ^{zy}	
31-27 ^{zyw}	63-47 ^{zyx}	
31-39 ^{zy}	63-51 ^{zy}	
31-47 ^{zyw}	63-59 ^{zy}	
31-63 ^{zyxw}	63-63 ^{zyx}	

^z Mahuku et al. (2002a)

^y PROFRIJOL (1999)

^x Mahuku et al. (2002b)

^w CIAT (1997)

Para el caso de Puerto Rico, los dos patotipos de *P. griseola* caracterizados en este estudio son nuevos (Figura 5), ya que no existió similitud con las seis razas identificadas anteriormente por otros autores. Cabe recalcar que existe una relación estrecha de baja virulencia entre todos los patotipos puertorriqueños observado en su nomenclatura binaria (espectro de virulencia).

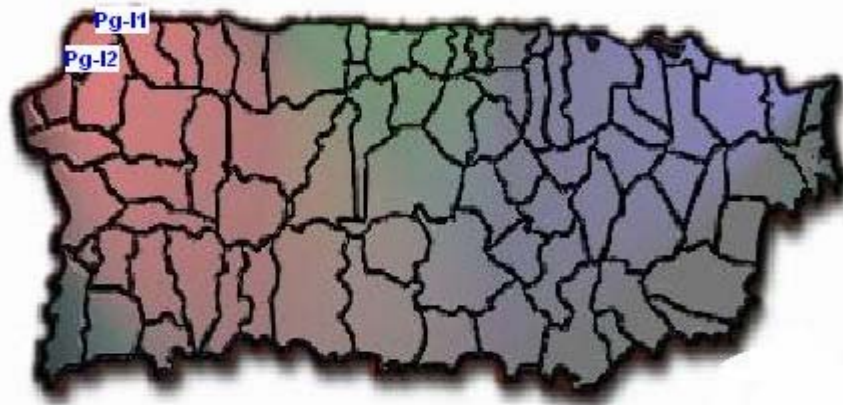


Figura 5. Razas patogénicas de *P. griseola* identificadas en Puerto Rico en el año 2005.

No se encontró ninguna relación entre las razas puertorriqueñas identificadas en este estudio con las de Nicaragua identificadas anteriormente, a excepción del leve parentesco entre la raza 31-38 con la 31-39 de Puerto Rico y Honduras ya identificadas, por lo que se asevera que la relación existente entre estos patotipos es más estrecha en los valores de reacción de los genotipos andinos que en los mesoamericanos, por lo que también se puede afirmar que existe un parentesco entre razas, ya no sólo a nivel Mesoamericano, sino también con El Caribe.

IMPLEMENTACIÓN DE LA SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES (SAM)

Optimización de protocolo para marcadores tipo SCAR

Se optimizó el marcador SCAR SH-13 mediante el uso de tres protocolos, en los cuales se redujo la cantidad de algunos reactivos, para mejorar la calidad de amplificación de las bandas.

Optimización de SCAR SH-13

El marcador SH-13 amplificó una banda a una altura de 520 pares de bases (Figura 6), con lo que se asevera la presencia del gen *Phg-1* en la variedad AND 277. Con el protocolo uno se observaron bandas muy difusas debido al uso del buffer 5X y dNTP's (4mM) con $MgCl_2$. Con los protocolos dos y tres se obtuvo una mejor resolución de las bandas, reemplazando el buffer anterior por el 10X Promega y dNTP's (4mM) sin $MgCl_2$. Finalmente el protocolo de la mezcla maestra escogido fue el tercero por claridad de banda. La disminución de la cantidad de agua no influyó significativamente en esta observación.

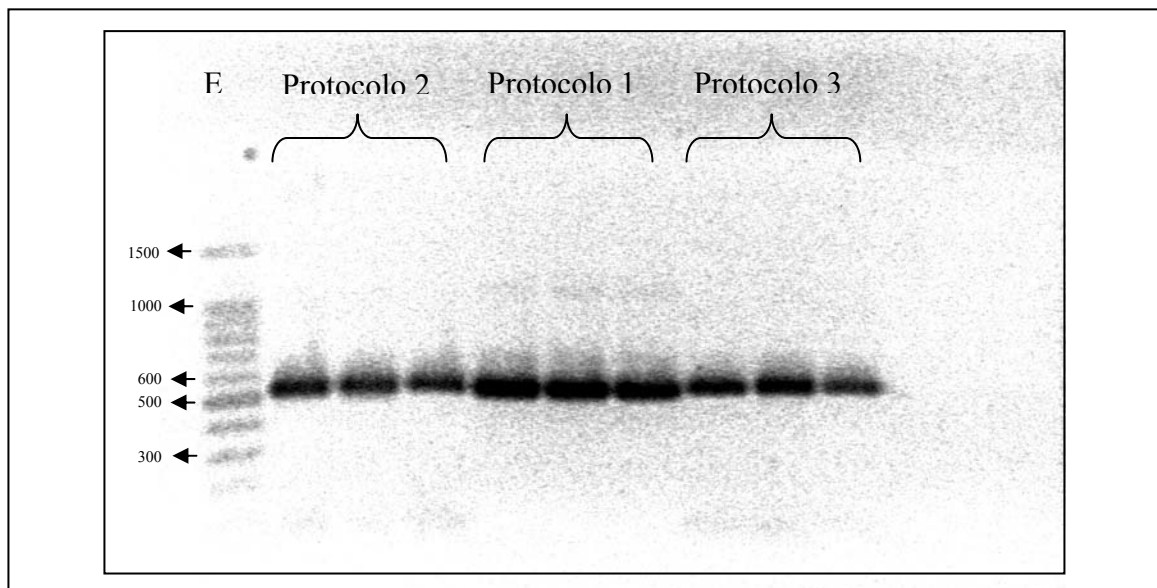


Figura 6. Optimización del SCAR SH-13 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2005.

EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE AMPLIFICACIÓN DEL SCAR SH-13

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en la evaluación del SCAR SH-13, permitió identificar un patrón de bandas similar en las 20 muestras sin degradación de ADN de las 48 recolectadas de la variedad AND 277, a una altura de 520 pares de bases, revelando la resistencia genotípica esperada para la mancha angular del frijol común (Figura 7). De acuerdo con el análisis Chi cuadrado, se definió que el marcador SH-13 se ajusta a la expresión de resistencia esperada ($P > 0.9$). De esta manera se afirma que los resultados observados no se deben al azar. La fórmula empleada fue $[(O-E)-(0.5)]^2/E$, obteniendo también un grado de libertad equivalente a 1.

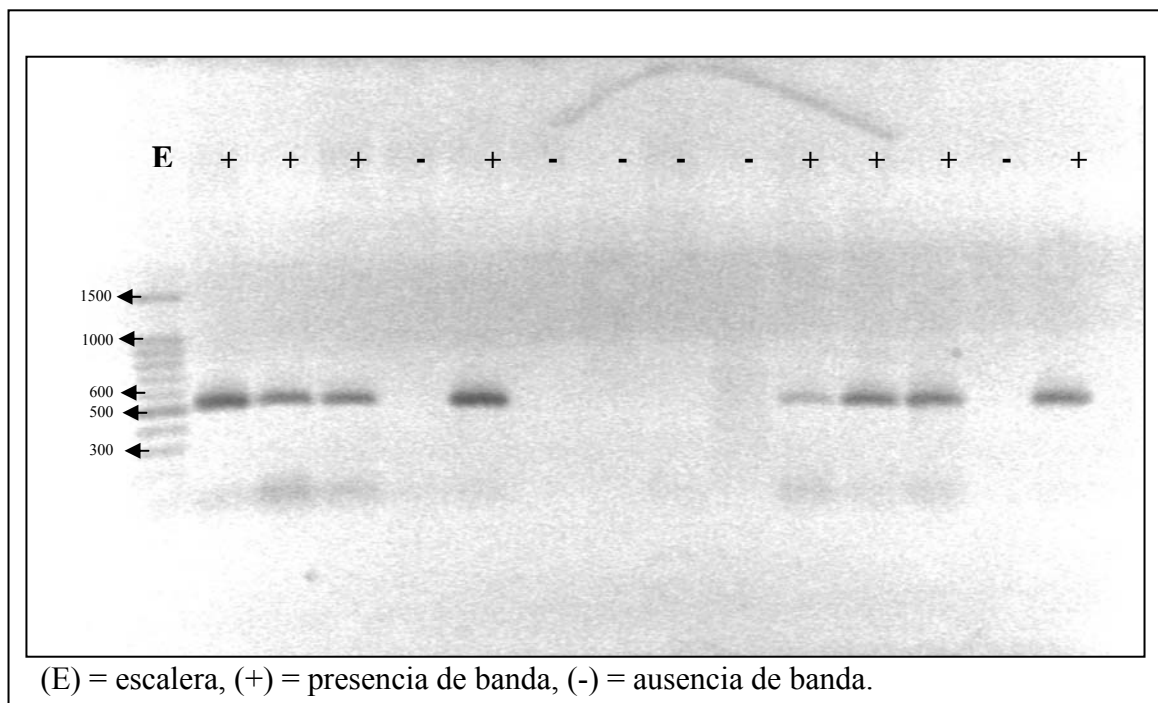


Figura 7. Patrón de amplificación de banda del SCAR SH-13.

CONCLUSIONES

La identificación de ocho razas diferentes a partir de igual número de aislamientos de *P. griseola* en muestras de frijol recolectadas en Honduras, Nicaragua y Puerto Rico, confirma la existencia de una gran variabilidad patogénica en estos países.

Los genotipos G5686, Mex 54 y BAT 332 fueron los diferenciales que presentaron mayor resistencia a las ocho razas evaluadas de *P. griseola*.

Comparando con estudios anteriores, se reafirma la poca virulencia en razas puertorriqueñas.

Está confirmada la hipótesis de la existencia de la raza 63-63 en Santa Bárbara, Honduras; ya que en observaciones anteriores en campos de frijol localizados en esa región existieron continuamente severidades e incidencias muy elevadas en materiales de frijol susceptible y moderadamente resistente.

El marcador SCAR SH-13 se optimizó a las condiciones del Laboratorio de Biodiversidad y Fitomejoramiento, con un excelente ajuste en la prueba de X^2 .

RECOMENDACIONES

Dar seguimiento a la caracterización de aislamientos de *P. griseola* de la región Centroamericana y de El Caribe para poder comprender cada vez mejor el comportamiento de las poblaciones del patógeno.

Utilizar los genotipos G5686 (andino), Mex 54 y BAT 332 (mesoamericanos) como progenitores en posteriores cruzas, para aumentar las fuentes de resistencia a la mancha angular del frijol.

Ampliar el SAM con un mayor número de marcadores SCAR, para la evaluación de la resistencia a la mancha angular del frijol común en la región.

BIBLIOGRAFÍA

Arroyo Terán, Fabián Andrés. 2004. Caracterización patogénica de *Phaeoisariopsis griseola* y estudio de la resistencia genética a la mancha angular del frijol en Honduras. Tesis Ing. Agr. EAP, Zamorano, Honduras. 20 p.

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

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Trad. por EDITEC. Ed. Mata, F.; Van Schoonhoven, A. y Pastor-Corrales, M. (comps.). CIAT. Cali, Colombia. 56 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1997. Bean Program Annual Report 1995. CIAT, Cali, Colombia. 412 p.

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

Mahuku, G. S.; Henriquez, M. A.; Muñoz, J. y Buruchara, R. A. 2002b. Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology* 92:580-589.

Mahuku, G. S.; Jara, C.; Cuasquer, J. B. y Castellanos, G. 2002a. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding of common bean. *Plant Pathology* 51:594-604.

Miklas, P.N. 2002. Marker assisted selection for disease resistance in common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 46:151-152.

Pastor-Corrales, M.; Jara, C. 1995. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol común en América Latina. *Fitopatología Colombiana.* 19:15-24.

PROFRIJOL (Programa Cooperativo Regional de Frijol para Centroamérica, México y El Caribe). 1999. Informe Técnico Anual-POA 1998-99. CIAT, Cali, Valle, Colombia.

Queiroz et al. 2004. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 47:237-238.

Rosas, J.C. 2003a. El Cultivo del Frijol Común en América Tropical. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 2da. Edición. Imprenta LitoCom, Tegucigalpa, Honduras, 57 p.

Rosas, J.C. 2003b. Recomendaciones para el Manejo Agronómico del Cultivo del Frijol. Programa de Investigaciones en Frijol, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Imprenta LitoCom, Tegucigalpa, Honduras. 33 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 Shree P. Singh y Oswaldo Voysest. Cali, Colombia, CIAT. p. 334-335.

Venegas Ferrín, Jorge Patricio. 2002. Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Ing. Agr. EAP, Zamorano, Honduras. 69 p.

Zeledón, Samanta. 2003. Identificación de la resistencia a razas específicas de *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común. Tesis Ing. Agr. EAP, Zamorano, Honduras. 17 p.

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización del patotipo 31-39 de *Phaeoisariopsis griseola*

Inoculación : 18 DDS	Aislamiento : Pg-19 – 1HND
Evaluación : 16/07/05 (14 DDI)	Descripción : 12 diferenciales, G06727 y
Ubicación : Casa de malla con microaspersión	Tío Canela-75

	Diferencial	Plantas/Severidad(1-9)						Valor binario	Reacción
		1	2	3	4	5	6		
ANDINOS	1 Don Timoteo	3	5	5	5	5	4	1	+
	2 G11796	5	4	3	5	5	4	2	+
	3 Bolón Bayo	5	2		7	5	9	4	+
	4 Montcalm	4	5	5	5	5	5	8	+
	5 Amendoin	5	3	3	5	9	8	16	+
	6 G5686	2	2	3	3	3	4	32	-
MESOAMERICANOS	7 Pan 72	9	7	3	5	5	5	1	+
	8 G2858	5	6	7	5	6	6	2	+
	9 Flor de Mayo	9	9	5			5	4	+
	10 Mex 54	2	2	1	1	1	2	8	-
	11 Bat 332	2	2	2	2	3	3	16	-
	12 Cornell 49242	9	7	6	6	6	4	32	+
T1 G06727 (R)	2	2	1	2	2	2			
T2 Tío Canela-75 (S)	6	7	6	9	9	3			

Raza: 31 - 39

Anexo 2. Caracterización del patotipo 31-51 de *Phaeoisariopsis griseola*

Inoculación : 18 DDS		Aislamiento : Pg-P							
Evaluación : 14/07/05 (14 DDI)		Descripción : 12 diferenciales, G06727 y							
Ubicación : Casa de malla con microaspersión		Tío Canela-75							
	Diferencial	Plantas/Severidad(1-9)						Valor binario	Reacción
		1	2	3	4	5	6		
ANDINOS	1 Don Timoteo		6	5	4	3	5	1	+
	2 G11796	9	8	3	6	6	8	2	+
	3 Bolón Bayo	6	6	6	5	3	3	4	+
	4 Montcalm	3	6	5	6	5	2	8	+
	5 Amendoin	3	2	5	5	5	5	16	+
	6 G5686	2	3	1	1	2	3	32	-
MESOAMERICANOS	7 Pan 72	9	3	7	5	5	5	1	+
	8 G2858	5	2	4	7	6	6	2	+
	9 Flor de Mayo	1	2		2	1	1	4	-
	10 Mex 54	2	3	3	2	1	1	8	-
	11 Bat 332	9	8	9	9	9	9	16	+
	12 Cornell 49242	8	9	8	7	7	5	32	+
T1	G06727 (R)	2	2	2	2	3	6		
T2	Tío Canela-75 (S)	6	8	7	9	5	6		
								Raza:	31 - 51

Anexo 3. Caracterización del patotipo 63-63 de *Phaeoisariopsis griseola*

Inoculación : 18 DDS		Aislamiento : Pg-Sb							
Evaluación : 21/03/05 (14 DDI)		Descripción : 12 diferenciales, G06727 y							
Ubicación : Casa de malla con microaspersión		Tío Canela-75							
	Diferencial	Plantas/Severidad(1-9)						Valor binario	Reacción
		1	2	3	4	5	6		
ANDINOS	1 Don Timoteo	6	2					1	+
	2 G11796	5	7	5	2	6	6	2	+
	3 Bolón Bayo	6	5	6	4	6		4	+
	4 Montcalm	5	4		7	4	2	8	+
	5 Amendoin	9	8	6	9	9		16	+
	6 G5686	7	4	2	5	5	6	32	+
MESOAMERICANOS	7 Pan 72	1	5	2	5	6	6	1	+
	8 G2858	5	5	5	4	4	4	2	+
	9 Flor de Mayo	4	5		6			4	+
	10 Mex 54	4	6	5	5	5	5	8	+
	11 Bat 332	8	4		6	6	8	16	+
	12 Cornell 49242	6	6	5	6	5	6	32	+
T1	G06727 (R)	1	2	1	1	2	1		
T2	Tío Canela-75 (S)	5	7	7	6	6	7		
								Raza:	63-63

Anexo 4. Caracterización del patotipo 13-55 de *Phaeoisariopsis griseola*

Inoculación : 18 DDS	Aislamiento : Pg-E
Evaluación : 30/06/05 (14 DDI)	Descripción : 12 diferenciales, G06727 y
Ubicación : Casa de malla con microaspersión	Tío Canela-75

	Diferencial	Plantas/Severidad(1-9)						Valor binario	Reacción
		1	2	3	4	5	6		
ANDINOS	1 Don Timoteo	6	5	6	6	5	5	1	+
	2 G11796	5	3		3	3	2	2	-
	3 Bolón Bayo	4	6	3	6	5	3	4	+
	4 Montcalm	5	5	2	5	2	2	8	+
	5 Amendoin	2	3	6	3	4	2	16	-
	6 G5686	2	4	3	3	3	2	32	-
MESOAMERICANOS	7 Pan 72	5	4	3	6	5	5	1	+
	8 G2858	8	7	5	3	3	3	2	+
	9 Flor de Mayo	8	5	8	6	8		4	+
	10 Mex 54	3	2	2	2	2	2	8	-
	11 Bat 332	2	3	3	4	4	5	16	+
	12 Cornell 49242	8	5	3	5	3	5	32	+
T1	G06727 (R)	3	3	2	2	4	2		
T2	Tío Canela-75 (S)	6	5	5	9	8	7		

Raza: 13 - 55

Anexo 5. Caracterización del patotipo 15-43 de *Phaeoisariopsis griseola*

Inoculación : 18 DDS	Aislamiento : Pg-Pn
Evaluación : 30/06/05 (14 DDI)	Descripción : 12 diferenciales, G06727 y
Ubicación : Casa de malla con microaspersión	Tío Canela-75

	Diferencial	Plantas/Severidad(1-9)						Valor binario	Reacción
		1	2	3	4	5	6		
ANDINOS	1 Don Timoteo	5	4	5	6	5	3	1	+
	2 G11796	5	5	2	4	3		2	+
	3 Bolón Bayo	3	5	3	5	5	5	4	+
	4 Montcalm	6	2	6	4	4	3	8	+
	5 Amendoin	3	3	2	3	2	2	16	-
	6 G5686	2	2	2	2	2	3	32	-
MESOAMERICANOS	7 Pan 72	6	6		4	2	5	1	+
	8 G2858	5	6	5	3	3	4	2	+
	9 Flor de Mayo	2	2		2	2	2	4	-
	10 Mex 54	4	5	5	5	6	4	8	+
	11 Bat 332	2	3	4	2	2	2	16	-
	12 Cornell 49242	8	7	9	8	7	8	32	+
T1	G06727 (R)	2	2	1	1	3	4		
T2	Tío Canela-75 (S)	7	9	8	4	4	5		

Raza: 15 - 43

Anexo 6. Caracterización del patotipo 55-59 de *Phaeoisariopsis griseola*

Inoculación : 18 DDS	Aislamiento : Pg-SI
Evaluación : 30/06/05 (14 DDI)	Descripción : 12 diferenciales, G06727 y
Ubicación : Casa de malla con microaspersión	Tío Canela-75

	Diferencial	Plantas/Severidad(1-9)						Valor binario	Reacción
		1	2	3	4	5	6		
ANDINOS	1 Don Timoteo	6			6	5		1	+
	2 G11796	5	2		5	5		2	+
	3 Bolón Bayo	5	7	5	6	5	5	4	+
	4 Montcalm	3	2	2	2	5	5	8	-
	5 Amendoin	6	5	7	5	6	5	16	+
	6 G5686	2	4	4	5	5	5	32	+
MESOAMERICANOS	7 Pan 72	5	5		5	5	6	1	+
	8 G2858	5	5	6	7	7	6	2	+
	9 Flor de Mayo	2			1			4	-
	10 Mex 54	7	7	6	5	4	6	8	+
	11 Bat 332	7	6	5	5	5	5	16	+
	12 Cornell 49242	8	7	6	9	8	5	32	+
T1	G06727 (R)	2	2	1	2	3	2		
T2	Tío Canela-75 (S)	9	8	6	9	8	8		

Raza: 55-59

Anexo 7. Caracterización del patotipo 31-38 de *Phaeoisariopsis griseola*

Inoculación : 18 DDS	Aislamiento : Pg-I1
Evaluación : 5/08/05 (14 DDI)	Descripción : 12 diferenciales, G06727 y
Ubicación : Casa de malla con microaspersión	Tío Canela-75

	Diferencial	Plantas/Severidad(1-9)						Valor binario	Reacción
		1	2	3	4	5	6		
ANDINOS	1 Don Timoteo	8	8	7	7	8	8	1	+
	2 G11796	3	3	2	8	7	4	2	+
	3 Bolón Bayo	7	8	2	8	7	8	4	+
	4 Montcalm	5	5	7	7	5	5	8	+
	5 Amendoin	5	4	5	4	4	4	16	+
	6 G5686	3	2	2	1	2	3	32	-
MESOAMERICANOS	7 Pan 72							1	-
	8 G2858	5	5	5	5	7	8	2	+
	9 Flor de Mayo	7			8	8		4	+
	10 Mex 54	2	2	2	2	1	1	8	-
	11 Bat 332	2	2	1	3	2	2	16	-
	12 Cornell 49242	6	6	6	6	6	5	32	+
T1	G06727 (R)	1	1	1	2	1	1		
T2	Tío Canela-75 (S)	8	8	5	8	7	7		

Raza: 31-38

Anexo 8. Caracterización del patotipo 15-39 de *Phaeoisariopsis griseola*

Inoculación : 18 DDS		Aislamiento : Pg-I2							
Evaluación : 5/08/05 (14 DDI)		Descripción : 12 diferenciales, G06727 y Tío Canela-75							
Ubicación : Casa de malla con microaspersión									
	Diferencial	Plantas/Severidad(1-9)						Valor binario	Reacción
		1	2	3	4	5	6		
ANDINOS	1 Don Timoteo	5		5	7	7	2	1	+
	2 G11796	4	5	3	4	3		2	+
	3 Bolón Bayo	7	9	7	8	9	9	4	+
	4 Montcalm	8	5	4	8	9	5	8	+
	5 Amendoin	2	3	2	3	1	2	16	-
	6 G5686	2	3	4	6	3	2	32	-
MESOAMERICANOS	7 Pan 72	8						1	+
	8 G2858	8	9	6	8	5	6	2	+
	9 Flor de Mayo	9						4	+
	10 Mex 54	4	2	2	1	3	1	8	-
	11 Bat 332	2	1	2	4	4	2	16	-
	12 Cornell 49242	9	8	4	7	6	4	32	+
T1	G06727 (R)	2	2	1	2	2			
T2	Tío Canela-75 (S)	8	6	9	9	9	8		
								Raza:	15-39

Anexo 9. Perfil de programación del termociclador para el SCAR SH-13 (*Phg-1*)

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)
1	Desnaturalización	94	00:00:30
2	Acoplamiento	59	00:01:00
3	Elongación	72	00:01:00
4			34 veces al paso 1
5	Elongación	72	00:05:00
6	Conservación	4	00:00:00
7		FIN	