

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – IASA
GRAD. CARLO MAGNO ANDRADE PAREDES**

**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE
GAMETOS EN LA F₁ DE CRUZAS DOBLES PARA
RESISTENCIA MÚLTIPLE A ENFERMEDADES EN
FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.). SANTA
CATALINA, INIAP, 2006.**

CAROLINA VICTORIA TRUJILLO FLORES

INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
AGROPECUARIO

SANGOLQUÍ – ECUADOR
2007

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE GAMETOS EN LA F₁
DE CRUZAS DOBLES PARA RESISTENCIA MÚLTIPLE A ENFERMEDADES
EN FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.). SANTA CATALINA, INIAP, 2006.

CAROLINA VICTORIA TRUJILLO FLORES

REVISADO Y APROBADO:

Crnl. Esp. Ing. Ronald Runruil
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Ing. Agr. M.C. Eduardo Peralta
DIRECTOR INVESTIGACIÓN

Ing. Agr. M. Sc. Abraham Oleas
CODIRECTOR INVESTIGACIÓN

Ing. Agr. M. Sc. Gabriel Suárez
BIOMETRISTA

CERTIFICO QUE ESTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN ORIGINAL
(ELECTROMAGNÉTICAMENTE) E IMPRESO EN DOS EJEMPLARES.

Abg. Carlos A. Orozco B.
SECRETARIO ACADEMICO

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE GAMETOS EN LA F₁
DE CRUZAS DOBLES PARA RESISTENCIA MÚLTIPLE A ENFERMEDADES
EN FRÉJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.). INIAP, 2006.

CAROLINA VICTORIA TRUJILLO FLORES

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE
CALIFICACIÓN DE INFORME TÉCNICO

	CALIFICACIÓN	FECHA
Ing. Agr. M. Sc. Eduardo Peralta DIRECTOR INVESTIGACIÓN	_____	_____
Ing. M. Sc. Abraham Oleas CODIRECTOR INVESTIGACIÓN	_____	_____

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN ESTA
SECRETARIA.

Abg. Carlos A. Orozco B.
SECRETARIO ACADEMICO

RESUMEN

El presente estudio tuvo como primer objetivo la evaluación de poblaciones F₁ de fréjol común mediante inoculaciones secuenciadas de *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* y *P. griseola* para identificar individuos con resistencia múltiple. Adicionalmente, un segundo objetivo fue la estandarización de una metodología de inoculación secuenciada. Finalmente, el marcador molecular SAE19 fue evaluado. Este marcador está ligado al gen de resistencia para roya, *Ur-11*. Un total de 83 individuos fueron seleccionados por presentar resistencia múltiple a las enfermedades bajo estudio. La secuencia de inoculación, que no causó interacción entre las especies de patógenos, fue *C. lindemuthianum-U. appendiculatus-P. griseola*, siendo esta seleccionada para formar parte de la rutina de evaluación del Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos del INIAP. El marcador SCAR no fue aplicable a las poblaciones bajo estudio, debido a que los progenitores no presentaron polimorfismos asociados a la resistencia y susceptibilidad.

ABSTRACT

The present research had as first objective the evaluation of a F₁ common bean population, through sequenced inoculations of *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* and *P. griseola* to identify genotypes with multiple resistances. Additionally, a second objective was the standardization of sequenced inoculation methodology. Finally, the molecular marker SAE19 was evaluated. This marker is linked to the resistance gene *Ur-11* for rust. A total of 83 genotypes were selected for having multiple resistances to the diseases under study. The inoculation sequence that did not make interaction among pathogens was *C. lindemuthianum-U. appendiculatus-P. griseola*, this one was selected to be part of Legume and Andean Grains National Program- INIAP evaluation routine. The SCAR marker was not able to applied on the populations under study, due to the parental genotypes did not harbor polymorphism linked to resistance and susceptibility.

Ing. Agr. M.C. Eduardo Peralta
DIRECTOR INVESTIGACIÓN

Ing. Agr. M. Sc. Abraham Oleas
CODIRECTOR INVESTIGACIÓN

CERTIFICACIÓN

Certificado que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Señorita
CAROLINA VICTORIA TRUJILLO FLORES
Como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Fecha

Ing. Agr. M.C. EDUARDO PERALTA
DIRECTOR

Ing. Agr. M. Sc. ABRAHAM OLEAS
CODIRECTOR

Ing. Agr. M. Sc. GABRIEL SUÁREZ
BIOMETRISTA

Ing. Agr. M.C. Eduardo Peralta
DIRECTOR INVESTIGACIÓN

Ing. Agr. M. Sc. Abraham Oleas
CODIRECTOR INVESTIGACIÓN

CERTIFICACIÓN

Certificado que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Señorita
CAROLINA VICTORIA TRUJILLO FLORES
Como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Fecha

Ing. Agr. M.C. EDUARDO PERALTA
DIRECTOR

Ing. Agr. M. Sc. ABRAHAM OLEAS
CODIRECTOR

Ing. Agr. M. Sc. GABRIEL SUÁREZ
BIOMETRISTA

AUTORIZACIÓN

Todo el contenido del presente trabajo, así como los cuadros, tablas y demás resultados obtenidos, podrán ser utilizados o reproducidos en la página Web de la ESPE.

Carolina Victoria Trujillo Flores

DEDICATORIA

A las tres mujeres más importantes de
mi vida: mi madre, mi hermana y mi hija
quienes con su amor y apoyo incondicional
son el motor que impulsan mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fuerza para culminar este proyecto.

A mis abuelitos Oswaldo y Victoria, mis tías Silvana, Sandra y Mónica, mis primas Mariela y María José, por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de este período y por su gran amor que me ha motivado en mi carrera estudiantil.

Al Ingeniero Eduardo Peralta, líder del Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA), del INIAP, por haberme concedido la valiosa oportunidad de aprender y realizar este trabajo.

Al Ingeniero Ángel Murillo y al Agrónomo José Pinzón, por sus enseñanzas, confianza, guía, apoyo y cariño durante la realización del proyecto de investigación.

Al Ingeniero Esteban Falconí, por haber sido una importante guía, maestro, soporte y amigo durante toda la realización de este trabajo.

A todo el equipo del PRONALEG-GA, Paola Estrella, Cristian Subía, Fabián Vargas, Marco Rivera, Nelson Mazón y María Antonieta Batallas por su ayuda, apoyo y amistad.

Al equipo del Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF) del INIAP, por su ayuda y sincera amistad.

A mis maestros de la Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA, por sus enseñanzas, su apoyo y ayuda durante mis estudios.

A mis queridos amigos, quienes con su cariño, paciencia y solidaridad fueron un gran soporte en muchos acontecimientos importantes de mi vida.

A todos quienes directa o indirectamente colaboraron con la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 El cultivo de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	4
3.1.1 Importancia del cultivo.....	5
3.1.2 Importancia social.....	6
3.1.3 Importancia nutricional.....	6
3.2 Enfermedades de importancia económica.....	7
3.2.1 Antracnosis.....	8
3.2.1.1 Etiología.....	8
3.2.1.2 Epidemiología.....	9
3.2.1.3 Sintomatología.....	9
3.2.1.4 Antracnosis en Ecuador.....	10
3.2.1.5 Control.....	10
3.2.1.5.1 Control químico.....	10
3.2.1.5.2 Control cultural.....	11
3.2.1.5.3 Control genético.....	11
3.2.2 Roya.....	13
3.2.2.1 Etiología.....	13
3.2.2.2 Epidemiología.....	13
3.2.2.3 El proceso de infección por Uredósporas.....	14
3.2.2.4 Sintomatología.....	14
3.2.2.5 Roya en Ecuador.....	14
3.2.2.6 Control.....	15
3.2.2.6.1 Control cultural.....	15
3.2.2.6.2 Control químico.....	15
3.2.2.6.3 Control genético.....	15
3.2.3 Mancha angular de la hoja.....	17

3.2.3.1 Etiología.....	17
3.2.3.2 Epidemiología.....	17
3.2.3.3 Sintomatología.....	18
3.2.3.4 Control.....	18
3.2.3.4.1 Control cultural.....	18
3.2.3.4.2 Control químico.....	19
3.2.3.4.3 Control genético.....	19
3.3 Mejoramiento genético de fréjol común.....	21
3.4 Métodos de mejoramiento.....	22
3.4.1 Mejoramiento por introducción y selección.....	22
3.4.2 Mejoramiento por hibridación.....	23
3.4.2.1 Variabilidad genética.....	24
3.4.2.2 Habilidad combinatoria y evaluación de rendimiento en generaciones Tempranas.....	24
3.4.2.3 Heredabilidad de las características.....	24
3.5 Métodos de selección.....	25
3.5.1 Métodos de selección simple sin cruzamiento.....	25
3.5.1.1 Selección masal.....	25
3.5.1.2 Selección individual: planta a línea o parcela.....	25
3.5.1.3 Selección estratificada.....	26
3.5.2 Métodos de selección con cruzamiento.....	26
3.5.2.1 Método masal con cruzamiento: cruzamientos compuestos.....	26
3.5.2.2 Método genealógico.....	26
3.5.2.3 Método de descendiente de semilla única.....	26
3.5.2.4 Métodos mixtos.....	27
3.5.2.5 Método de selección de gametos usando marcadores dominantes y codominantes durante la hibridación y desarrollo de F ₁ proveniente de cruza múltiples.....	27
3.5.2.5.1 Fuentes de genes de resistencia.....	29
3.5.2.5.2 La selección de resistencia.....	30
3.6 Mejoramiento asistido por marcadores moleculares en fréjol.....	31
3.6.1 Marcadores moleculares.....	32
3.6.2 Gen de resistencia a roya <i>Ur-11</i>	33
3.6.3 Marcador SCAR ligado al gen de resistencia a roya del fréjol común.....	34

4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1	Ubicación.....	36
4.2	Material vegetativo y manejo de plántulas.....	37
4.3	Siembra en invernadero.....	38
4.3.1	Materiales.....	38
4.3.2	Metodología.....	39
4.4	Evaluación de los métodos de inoculación.....	39
4.4.1	Inoculación de enfermedades.....	39
4.4.2	Inoculación de antracnosis.....	39
4.4.2.1	Materiales.....	39
4.4.2.2	Metodología.....	40
4.4.2.2.1	Preparación del inóculo.....	40
4.4.2.2.2	Inoculación en invernadero.....	40
4.4.2.2.3	Evaluación de antracnosis en plántulas.....	41
4.4.3	Inoculación de roya.....	41
4.4.3.1	Materiales.....	41
4.4.3.2	Metodología.....	42
4.4.3.3	Evaluación.....	43
4.4.4	Inoculación de mancha angular.....	43
4.4.4.1	Materiales.....	43
4.4.4.2	Metodología.....	44
4.4.4.2.1	Preparación del inóculo.....	44
4.4.4.2.2	Inoculación.....	44
4.4.4.2.3	Evaluación.....	44
4.4.5	Inoculación secuenciada.....	45
4.5	Amplificación del marcador SCAR SAE19 ligado al gen de resistencia a roya, <i>Ur-11</i>	45
4.5.1	Metodología.....	45
4.5.2	Materiales.....	46
4.5.2.1	Extracción de ADN.....	45
4.5.2.2	Cuantificación de ADN.....	46
4.5.2.3	Dilución de ADN.....	47
4.5.2.4	Amplificación de ADN.....	47

5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
6	CONCLUSIONES.....	67
7	RECOMENDACIONES.....	69
8	BIBLIOGRAFÍA.....	71

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 4.1 Grupo de testigos o padres de las cruzas múltiples.....	37
Cuadro 4.2 Grupo de segregantes F ₂ Cruzas simples.....	37
Cuadro 4.3 Poblaciones F ₁ de cruzas dobles.....	38
Cuadro 4.4 Progenitores de las cruzas dobles y características.....	38
Cuadro 5.1 Evaluación de progenitores a secuencia de inoculación antracnosis/roya, roya/antracnosis e inoculaciones individuales de roya y antracnosis bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.....	49
Cuadro 5.2 Evaluación de resistencia a antracnosis (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>) de poblaciones de cruzas simples de fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.....	53
Cuadro 5.3 Evaluación de resistencia a roya (<i>Uromyces appendiculatus</i>) de genotipos resistentes a <i>C. lindemuthianum</i> , provenientes de cruzas simples de fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.....	54
Cuadro 5.4 Evaluación de resistencia individual y múltiple a antracnosis (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>), roya (<i>Uromyces appendiculatus</i>) y mancha angular (<i>Phaeoisariopsis griseola</i>) de poblaciones de cruzas dobles de fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.....	57
Cuadro 5.5 Reacción del set de diferenciales a la raza inoculada de antracnosis, bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.....	59
Cuadro 5.6 Reacción del set de diferenciales de roya a la raza inoculada, bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.....	60
Cuadro 5.7 Ocurrencia del SCAR SAE19 en genotipos andinos y mesoamericanos de fréjol común, Santa Catalina, INIAP, 2006.....	65

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 3.1 Razas de <i>Colletotichum lindemuthianum</i> identificadas en Ecuador.....	10
Tabla 3.2 Fuentes de resistencia a antracnosis en diferentes tipos de grano de fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	12
Tabla 3.3 Fuentes de genes de resistencia a <i>Uromyces appendiculatus</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	16
Tabla 3.4 Fuentes de genes de resistencia para <i>Phaeoisariopsis griseola</i> en diferentes tipos de grano de fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	20
Tabla 3.5. Genes mayores de resistencia (R) en fréjol común.....	30
Tabla 3.6. Genes de resistencia en Fréjol común con marcadores estrechamente ligados.....	31
Tabla 3.7. Genes de resistencia a roya y su efectividad.....	34
Tabla 5.1. Ocurrencia del RAPD OAE19 ₈₉₀ en fréjol común.....	64

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 5.1 Genotipos progenitores susceptibles a <i>C. lindemuthianum</i>	50
Fotografía 5.2 Genotipos progenitores susceptibles a <i>U. appendiculatus</i>	50
Fotografía 5.3 Genotipos resistentes y susceptibles a <i>C. lindemuthianum</i> , provenientes de cruzas simples.....	52
Fotografía 5.4 Puntos blancos previos a la formación de pústulas de roya en un genotipo susceptible de cruzas simples... ..	53
Fotografía 5.5 Genotipos susceptibles y resistentes a <i>U. appendiculatus</i> , provenientes de cruzas dobles.....	57
Fotografía 5.6 Genotipos resistentes y susceptibles a <i>C. lindemuthianum</i> , provenientes de cruzas dobles.....	58
Fotografía 5.7 Síntomas de roya y antracnosis en genotipos provenientes de cruzas dobles.....	59
Fotografía 5.8 Reacción del set de genotipos diferenciales a la raza de <i>C. lindemuthianum</i> inoculada.....	60
Fotografía 5.9 Visualización de la amplificación del SCAR SAE19 en genotipos progenitores de fréjol común.....	66

1. INTRODUCCIÓN

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de mayor producción a nivel mundial. El cultivo de fréjol ocupa el tercer lugar en superficie sembrada superado únicamente por la soya (*Glycine max* L. Merr) y maní (*Arachis hipogea* L.) (Singh, 1999). Esta leguminosa es cultivada en los cinco continentes (FAO, 1998) y por la amplia distribución en diferentes ambientes es afectado por una diversidad de problemas de producción de naturaleza abiótica y biótica (Singh, 1999). En el Ecuador, el fréjol común es considerado la leguminosa para consumo humano directo más importante, no solamente por la superficie cultivada, sino también por ser un cultivo que garantiza la “Seguridad y Soberanía Alimentaria” de miles de familias de pequeños productores y consumidores. La producción de fréjol en Ecuador es una de las principales actividades económicas realizadas en los valles de las provincias de Carchi, Imbabura y Loja. De la misma manera, es un cultivo de importancia en las estribaciones de cordillera de las provincias de Imbabura, Chimborazo y Bolívar. La superficie cultivada en Ecuador supera las 120 000 ha por año (INEC, 2002), las cuales están ubicadas principalmente en la región Sierra (90%) (Peralta *et al.*, 1995). En esta amplia área de cultivo, varios problemas de producción han sido identificados; sin embargo, el principal problema que afecta al cultivo en Ecuador son las enfermedades foliares causadas por hongos y bacterias (Murillo *et al.*, 2005).

Considerando los problemas de producción, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador ha generado y liberado variedades mejoradas de fréjol con características superiores de calidad de semilla y rendimiento, junto con resistencia genética a una enfermedad de importancia para determinadas áreas de producción (Peralta *et al.*, 1996). Sin embargo, hasta el momento no existe una variedad mejorada que posea resistencia genética simultánea para las principales enfermedades de fréjol que ocurren en el país.

En condiciones normales de cultivo, más de una enfermedad infecta al fréjol en un ciclo de producción. De esta manera, si la nueva variedad presenta resistencia a una enfermedad solamente, el aporte de ésta no será significativo. El agricultor deberá

controlar otras enfermedades a las que el cultivar es susceptible. Esto implica que las características de variedad mejorada de fréjol no influyen o influyen parcialmente en la reducción de costos de producción, porque éstas no resultan en una disminución o eliminación de aplicaciones de fungicidas; tampoco contribuyen en la preservación del medioambiente y de la salud del agricultor porque continuará el uso de productos tóxicos.

Una limitante importante identificada para la generación de nuevas variedades de fréjol con características superiores a las existentes, que mejoren el sistema de producción de este cultivo, es el largo tiempo que toma el proceso de generación, evaluación y selección de genotipos. La “selección directa” de genotipos con resistencia a enfermedades exige que las condiciones climáticas sean adecuadas para el desarrollo del patógeno y que el agente causal de la enfermedad esté presente. Si las condiciones climáticas no son adecuadas y el inóculo del patógeno no se encuentra en la presión adecuada, los individuos verdaderamente resistentes no serán diferenciados de los susceptibles. Como resultado de la falta de condiciones de selección adecuadas, la resistencia estará enmascarada. Por tal motivo, es necesario el desarrollo de nuevos métodos de selección indirecta que garanticen una evaluación confiable, rápida y de un alto número de individuos. Basados en estos antecedentes, el Programa Nacional de leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA) del INIAP ha planteado los siguientes objetivos en esta investigación:

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Comprobar la efectividad del método de selección de gametos en la primera generación F_1 de cruzamientos dobles para conseguir resistencia múltiple a las enfermedades conocidas como roya, antracnosis, mancha angular.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Establecer la metodología más eficiente de inoculación artificial escalonada de patógenos de la roya, antracnosis y mancha angular bajo invernadero.
2. Evaluar y seleccionar plantas F_1 que combinen resistencia al mayor número de enfermedades.
3. Seleccionar plantas con genes de resistencia *Ur-11* de roya, mediante marcadores moleculares.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 EL CULTIVO DE FRÉJOL

3.1.1 Importancia del cultivo

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.), por la superficie cultivada, es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial, superado solamente por la soya (*Glycine max* L. Merr) y el maní (*Arachis hipogea* L.) (Singh, 1999). El área estimada de cosecha de fréjol en el mundo es de 14 300 000 ha (FAO, 1998). Esta leguminosa está ampliamente distribuida en todos los continentes y ocupa más del 90% de las áreas de producción del género *Phaseolus* en el mundo (Singh, 1999). El fréjol es la leguminosa alimenticia más importante en los países en vías de desarrollo (Latinoamérica y África) y en Norteamérica, donde cerca de un millón de toneladas son producidas anualmente (FAO, 1982-84; Pachico, 1989). La producción de fréjol en Ecuador es una de las principales actividades económicas realizada en los valles de las provincias de Carchi, Imbabura y Loja, al igual que en el Noroccidente de la provincia de Pichincha, las estribaciones de cordillera como Intag (Imbabura), Pallatanga (Chimborazo), Chillanes (Bolívar) (Peralta *et al.*, 1998). De acuerdo a los datos obtenidos en el Censo Agropecuario realizado por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2002), en Ecuador son sembradas más de 120 000 ha con fréjol (24 379 ha en monocultivo y 97 212 ha en asociación con maíz) de 1 302 393 ha ocupadas con cultivos. El rendimiento promedio registrado en el país es de 0.43 t/ha de grano seco y 0.11 t/ha cuando está asociado con maíz; mientras que, el rendimiento de grano tierno registrado en el país es de 1.07 t/ha en monocultivo y 0.27 t/ha asociado con maíz (INEC, 2002).

3.1.2 Importancia social

Los principales productores de fréjol, en países de Latinoamérica y África, son pequeños agricultores cuyas áreas de cultivo son menores a 1 ha. La producción está fundamentalmente destinada para autoconsumo y venta en mercados locales (Pachico, 1989). Esto demuestra la importancia económica, nutricional y social del cultivo para los agricultores de bajos recursos, debida a los ingresos financieros que provee la venta

de la producción, así como por contribuir a la seguridad alimentaria de la población de estas zonas. El consumo *per capita* de fréjol puede variar de país a país o de región a región dentro de un mismo país. El estatus social y económico de las familias también influye en las preferencias de consumo (Singh, 1989). Frecuentemente, el consumo de fréjol es mayor en familias de bajos ingresos que viven en zonas rurales y urbanas. En Latinoamérica, el mayor consumo *per capita* se registra en Brasil y México con más de 13 kilogramos por año. En países de África Central y Oriental (Ruanda y Burundi) el consumo por persona es mayor a 40 kg/ha (FAO, 2005). En Ecuador, el consumo de fréjol por persona es de 4 kg/año (FAO, 2005), un valor relativamente bajo si se lo compara con otros países de Latinoamérica. Sin embargo, el consumo por persona al año puede superar los 40 kg en las zonas de mayor producción de fréjol del país, como sucede en los valles del Chota y Mira (PRONALEG-GA, 2004).

3.1.3 Importancia nutricional

El fréjol es considerado como un alimento nutritivo por su contenido de proteína (18-25%), fibra (18%), grasa (1.7%), carbohidratos (61.4%), vitaminas y minerales (Gálvez, 1991; Bennink, 2005). Adicionalmente, esta leguminosa posee cualidades nutraceuticas. Estudios han demostrado que el consumo regular de fréjol contribuye a reducir el colesterol en las arterias, prevenir el cáncer de colón, mantener niveles adecuados de glucosa en la sangre (Bennink, 2005) y complementa con los cereales una dieta balanceada en proteínas y aminoácidos esenciales (Gálvez, 1991; Terán *et al*, 2000).

Una importante contribución del fréjol en la población de bajos recursos económicos, es la cantidad de proteína de calidad que aporta a la alimentación diaria de este sector de la población (Singh, 1999). El fréjol constituye un alimento que reemplaza a la ingesta de proteína animal (Bennick, 2005). La importancia del fréjol en la alimentación es dada además por el costo del mismo comparado con otros alimentos de origen animal (huevos, carne).

3.2 ENFERMEDADES DE IMPORTANCIA ECONÓMICA

El rendimiento promedio de fréjol registrado en Ecuador es excesivamente bajo, 430 kg/ha en monocultivo y 110 kg/ha cuando está asociado con maíz (INEC, 2002), frente al rendimiento potencial del cultivo que sobrepasa los 2 000 kg/ha (Sanders, J y Schwartz, H. 1980). En Ecuador, los bajos rendimientos han sido asociados a enfermedades foliares y a estreses abióticos como sequía y baja fertilidad de suelos. Sin embargo, las enfermedades foliares son las responsables de las mayores pérdidas de producción en las áreas más importantes de cultivo del país. Las principales enfermedades que atacan al cultivo de fréjol en Ecuador son: roya (*Uromyces appendiculatus*), antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) (Murillo *et al.*, 2005). La roya, bajo las condiciones adecuadas para el desarrollo del patógeno, puede ocasionar una reducción en rendimiento superior al 50% (CIAT, 1989), mientras que las pérdidas ocasionadas por la antracnosis pueden superar el 70% en variedades susceptibles cuando la humedad ambiental es alta (Peralta *et al.*, 1998; Ochoa *et al.*, 1999). En cuanto a la mancha angular, las pérdidas en rendimiento pueden llegar al 70% en la ausencia de un control adecuado de la enfermedad (W. C. de Jesús Júnior *et al.*, 2003). En los últimos años, la mancha angular se ha convertido un problema de importancia en Ecuador, ya que la enfermedad ha sido identificada en extensas áreas de cultivo en los principales sitios de producción de las provincias de Imbabura y Carchi con pérdidas que alcanzan el 50% en rendimiento (Murillo, 2006).

Las enfermedades anteriormente mencionadas, excepto por roya, también afectan a la calidad de semilla y vaina. La infección de antracnosis, mancha angular y bacteriosis ocurre no solamente en el follaje, sino también en la vaina y en la semilla mostrando síntomas característicos que afectan la calidad del producto.

Las enfermedades que afectan al cultivo de fréjol en Ecuador, al igual que en el resto de los países que explotan esta leguminosa, tienen una amplia adaptación a los sitios de producción y normalmente ocurren simultáneamente en un lote de cultivo. Consecuentemente, la resistencia a una sola enfermedad en un cultivar no evita que los

productores prescindan de la aplicación de pesticidas, ya que otros patógenos podrían infectar al cultivo a los cuales el cultivar en cuestión es susceptible. Por tal motivo, uno de los principales objetivos que actualmente persiguen los programas de mejoramiento es la obtención de variedades de fréjol que posean resistencia a varias enfermedades simultáneamente ya sea total o parcial. El uso de variedades resistentes constituye una estrategia eficiente en el manejo integrado de enfermedades (Young y Kelly, 1996; Alzate-Marín *et al.*, 1996; Terán, 2000), ya que la reducción en la aplicación de pesticidas implica una reducción del costo de producción, disminución de riesgo de intoxicación crónica y aguda a quienes los aplican y preservación del medio ambiente.

3.2.1 ANTRACNOSIS:

El agente causal de la antracnosis en fréjol es *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.). Esta es la enfermedad más importante del fréjol en el mundo, por su poder devastador y por causar la pérdida total de producción en variedades susceptibles; esto también sucede cuando se ha sembrado semilla contaminada en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. Las mayores pérdidas se registran en zonas templadas y subtropicales. Al infectarse tempranamente las plantas, la pérdida de rendimiento es más significativa (CIAT, 1998).

3.2.1.1 Etiología:

3.2.1.1.1 Estado imperfecto: en vainas, tallos, hojas y ramas, pueden existir acérvulos que a su vez producen conidias. Estos pueden estar intra y subepidérmicamente, cambiando la estructura de la pared celular y la epidermis del hospedero. Los acérvulos contienen masas de esporas, color salmón pálido, unicelulares, uninucleadas y poseen una zona bien definida, semejante a una vacuola, esta se ubica cerca del centro. El patógeno crece, en forma óptima a 22.5°C (en condiciones de laboratorio) (CIAT, 1998).

3.2.1.2 Epidemiología:

Colletotrichum lindemuthianum, puede sobrevivir en la semilla (por lo menos dos años) y restos de cosecha. La viabilidad del hongo en semilla y vaina, depende de las condiciones ambientales, en especial la humedad. Se ha demostrado que puede sobrevivir, en semilla y vaina, por lo menos cinco años, cuando estas fueron secadas al aire y conservadas a 4°C o en tejidos infectados, que se dejaron en el campo, pero dentro de bolsas de poliuretano, para evitar el contacto con el agua (CIAT, 1998).

Como se describió, la temperatura y humedad son determinantes en la infección y en la aparición de síntomas. La infección se da entre 13-26°C, con un óptimo de 17°C-24°C fuera del rango 7-33°C, se retarda o inhibe el desarrollo del patógeno y por ende la infección.

Una humedad superior al 92%, produce la germinación de conidias, incubación y esporulación. Cuando existe precipitaciones moderadas, acompañadas de vientos, salpicaduras de lluvia, la diseminación es altamente favorecida, a distancias cortas y de esta manera se pueden desarrollar epidemias severas de antracnosis (CIAT, 1998).

3.2.1.3 Sintomatología:

Los síntomas se pueden manifestar en cualquier parte de la planta. Al inicio, aparecen en las hojas cotiledonales, como lesiones pardas oscuras a negras pequeñas, desde aquí conidias e hifas son transportadas por lluvia o viento al hipocótilo.

La infección está presente en tejidos de color herrumbroso. Progresivamente estas manchas crecen a lo largo y se asemejan a un “ojo”. Provocan la pudrición de la joven planta, en tallos más viejos, esta lesión puede medir 5-7 mm de longitud (CIAT, 1998).

En forma general, las lesiones aparecen primero en los pecíolos y envés de las hojas, también en las nervaduras, estas tienen forma de manchas angulares pequeñas, de color ladrillo a púrpura, que posteriormente se oscurecen; también pueden aparecer lesiones en las nervaduras del haz. En las lesiones del pecíolo y de las nervaduras más largas, se puede producir la esporulación, convirtiéndose en una fuente de inóculo secundario (CIAT, 1989).

3.2.1.4 Antracnosis en Ecuador:

En el Ecuador han sido identificadas diferentes razas de antracnosis (Tabla. 3.1), de estas los aislamientos más virulentos fueron encontrados en la provincia de Pichincha e Imbabura (Falconí, 2002).

Tabla 3.1. Razas de *Colletotrichum lindemuthianum* identificadas en Ecuador.

Razas de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
0
1
2
4
5
6
15
65
128
129
131
133
1153
1409

(PROFRIZA-INIAP, 1994; Falconí, 2002)

3.2.1.5 Control

3.2.1.5.1 Control químico:

La aplicación de fungicidas puede prevenir o reducir la infección de antracnosis, si estos son aplicados en las etapas iniciales de la infección (CIAT, 1981). Para las condiciones existentes de cultivo en el país se ha probado con éxito el uso de Bavistin (Carbendazin), 200cc/200 l de agua (Peralta *et al.*, 1998).

3.2.1.5.2 Control cultural:

El uso de semilla libre de patógeno no es práctica como método único de control, porque en los residuos de cosecha existe mucho inóculo. Una alternativa sugerida es la rotación de cultivos con maíz u otros cereales, no hospederos del patógeno.

El rotar cultivos, por lo menos dos años (CIAT, 1998), permite que los residuos de cosecha infectada por *Colletotrichum lindemuthianum*, se descompongan, eliminando una posible fuente de inóculo (Pastor-Corrales *et al.*, 1994 citado por Falconí, 2002).

3.2.1.5.3 Control genético:

El desarrollo de variedades con resistencia a antracnosis, constituye una herramienta muy importante y económica, dentro de un plan de manejo integrado del cultivo de fréjol. Genotipos donadores de genes de resistencia han sido identificados, para ser usados como fuente de resistencia en programas de hibridación para mejoramiento genético de fréjol en la obtención de nuevas líneas y posteriores variedades comerciales.

Estas fuentes son:

Tabla 3.2 Fuentes de resistencia a antracnosis en diferentes tipos de grano de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Genotipo	Color/tipo de semilla	Genes de resistencia
Jaguar, Phantom	9/negro	<i>Co-1, Co-2</i>
Newport	1/blanco	<i>Co-1, Co-2</i>
Bayacora, Mestizo, USPT-ANT-1	2M/pinto	<i>Co-4²</i>
	1/Great northern	
	7/rojo mexicano	
Catrachita	6/rojo pequeño	??
	5/rosado	
	2R/cranberry	
PC-50	6M/rojo moteado	??
Red Hawk	6K/rojo oscuro	<i>Co-1, Co-2</i>
	1/snap	
G 2333	Rojo pequeño	<i>Co-7, Co-4², Co-5</i>
G 2338	Negro pequeño	
PI 181996	6/Negro	??
VAX 2	/Crema	??

(Bean Improvement Cooperative, 2005; PRONALEG-GA, 2005).

3.2.2 ROYA:

La roya del fréjol es provocada por *Uromyces appendiculatus*. La enfermedad esta ampliamente distribuida alrededor del mundo, siendo una de las causas de problemas de producción; las pérdidas en rendimiento son aún más graves, cuando la infección ocurre durante periodo de prefloración y floración, llegando a estimarse pérdidas en alrededor del 18-28% en el rendimiento (CIAT, 1998).

3.2.2.1 Etiología:

Uromyces appendiculatus, es un hongo que pertenece a la subdivisión Basidiomycotina, es un parásito obligado. Su ciclo de vida, autoico macrocíclico, se completa totalmente en el fréjol. Las teliósporas pasan por un periodo de latencia y germinan para producir basidio y basidiósporas infectantes, que producen picnidios en el hospedero. Por fertilizaciones cruzadas entre las picniósporas se produce un ecidio, que desarrolla ecidiósporas, que causan infección y pústulas. Los uredos igualmente desarrollan uredósporas, provocándose infecciones sucesivas en la mayor parte del crecimiento de la planta.

Las formas de esporas más frecuentes son la uredóspora (espora vegetativa o de verano) y la telióspora (espora latente o de invierno) (CIAT, 1998).

3.2.2.2 Epidemiología:

Las uredósporas necesitan periodos prolongados de humedad (superior al 95%) y de temperaturas moderadas (17-27°C), para producir infección. Además existen otros factores que inciden de manera directa en la infección, estos son la duración del periodo y la intensidad de la luz. La producción y distribución de uredósporas varían con la humedad y temperatura. Existe un aumento en la producción, cuando las plantas infectadas se someten a periodos de humedad alta (CIAT, 1998).

Las uredósporas sobreviven alrededor de 60 días, cuando se someten a condiciones de campo. Las uredósporas y teliósporas hibernan en restos del cultivo y tutores de maderas usados para el fréjol trepador; son transportados por el viento a grandes distancias. Los restos de cultivo son la fuente de inóculo inicial o secundario, cuando la forma de siembra es escalonada pues existe tejido susceptible y condiciones favorables para la proliferación del hongo. Se ha demostrado, también que cuando el fréjol se asocia con maíz la incidencia de roya es mayor que cuando es sembrado en monocultivo; esto puede deberse a que el fréjol presenta resistencia inducida, debido a una infección incompleta (CIAT, 1998).

3.2.2.3 El proceso de infección por Uredósporas:

Las uredósporas de *Uromyces appendiculatus* presentan un inhibidor de la germinación, que es eliminado cuando las mismas son lavadas con agua.

La fisiología y bioquímica del hospedero son afectadas por los procesos de infección y esporulación; así la respiración aumenta y la fotosíntesis disminuye. Al inicio, en el tejido infectado se produce un aumento de azúcares reductores, sucrosa, almidón y aminoácidos libres; algunas enzimas aumentan su actividad (CIAT, 1998).

3.2.2.4 Sintomatología:

El hongo causante de la roya, infecta hojas, vainas, rara vez tallos y ramas. La infección inicial puede ocurrir en el haz o envés de la hoja; sin embargo los primeros síntomas son visibles en el envés, en forma de manchas pequeñas, blancas y más o menos protuberantes, alrededor de cinco a seis días de la inoculación. Estas manchas se agrandan y forman pústulas de color rojizo pardo que rompen epidermis después de dos días. *Uromyces appendiculatus* no se transmite por semilla (CIAT, 1998).

3.2.2.5 Roya en Ecuador:

La mayoría de variedades de fréjol en Ecuador son susceptibles a algunas o a todas las 17 razas de *Uromyces appendiculatus* previamente identificadas en las zonas de producción (Ochoa *et al.*, 1999). Las pérdidas en rendimiento, observadas en infecciones severas en variedades susceptibles, son mayores al 46% (Peralta *et al.*, 1998; Ochoa *et al.*, 1999).

Las razas de roya identificadas en Ecuador son: 0:20, 0:24, 2:24, 0:28, 2:28, 0:29, 0:30, 0:61 (Paucar *et al.*, 2005).

3.2.2.6 Control

3.2.2.6.1 Control cultural:

Las estrategias de control cultural para roya incluyen la rotación de cultivos, aireación del suelo del cultivo, la eliminación de residuos y el uso de variedades resistentes (CIAT, 1980).

3.2.2.6.2 Control químico:

Los controles químicos incluyen el uso de productos azufrados en espolvoreo directo a las plantas o como Caldo Bordeless. Las aplicaciones de Plantvax (Oxicarboxin) y Anvil (Hexaconazol) como medida curativa, es recomendado. (Peralta *et al.*, 1998)

3.2.2.6.3 Control genético:

La alternativa más viable y ecológica, en el control de *U. appendiculatus*, es la obtención y uso de variedades resistentes. Para el proceso de mejoramiento genético de fréjol para resistencia a roya, varios genotipos han sido estudiados y seleccionados como fuente de genes de resistencia. Estos genotipos son:

Tabla 3.3 Fuentes de genes de resistencia a *Uromyces appendiculatus* en *Phaseolus vulgaris* L.

Genotipo	Tipo/color de grano	Genes de resistencia
Ouro negro	9/negro	<i>Ur-Ouro Negro</i>
Belmidak-RMR-10-12	1/blanco, tipo panamito	<i>Ur-4, Ur-11</i>
Beldakmi-RMR-19-23	2M/pinto	<i>Ur-3, Ur-4, Ur-6 y Ur-11</i>
Belmineb-RMR-9-13	1/great northern	<i>Ur-3, Ur-6 y Ur-11</i>
Belneb-RR-1	1/great northern	<i>Ur-5, Ur-6 y Ur-7</i>
Merlot	7/rojo mexicano	<i>Ur-3</i>
	6/rojo pequeño	
Rosada nativa	5/rosado	<i>Ur-5</i>
	2R/cranberry	
PC-50	6M/rojo moteado	<i>Ur-9, Ur-12</i>
	6K/rojo oscuro	
Beldade-RGMR-4-6	1/tipo vainita	<i>Ur-3+, Ur-4</i>
Je.Ma	6M/rojo moteado	???
Vax 2		???
G 916	6M/rojo moteado	???

(Bean Improvement Cooperative, 2005; PRONALEG-GA, 2005).

3.2.3 MANCHA ANGULAR DE LA HOJA:

La mancha angular del fréjol, causada por *Phaeoisariopsis griseola* Sacc, es una enfermedad importante, pues ocasiona pérdidas en el rendimiento bastante altas, llegando incluso al 80%. Este hongo tiene varios hospederos, como son: Fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.), fréjol lima (*Phaseolus lunatus* L.), arveja (*Pisum sativum* L.) y aún no confirmado la soya (CIAT, 1994).

3.2.3.1 Etiología:

El hongo llega a producir de ocho a cuarenta conidióforos, que se unen para formar un sinema columnar oscuro, poco compacto, que soporta los conidiósporas. Al acercarse la madurez y fructificación, los conidióforos tienden a separarse. Las conidias son grises, cilíndricas o fusiformes, algo curvadas (CIAT, 1994).

3.2.3.2 Epidemiología:

Este hongo fitopatógeno infecta tejidos foliares, después de nueve días de la infección, se desarrollan lesiones necróticas intracelulares. Después de nueve a doce días, empiezan a desarrollarse estroma en la cavidad subestomática y se puede producir la esporulación durante periodos (24-48 horas) de continua humedad (Cardona-Álvarez, *et al.*, 1956, citado por CIAT, 1998).

La humedad, es uno de los factores determinantes en el apareamiento de epidemias de Mancha Angular (MA), así como es necesario para que se produzca una infección, se forme el sinema y se desarrolle la esporulación. En condiciones secas, se pueden formar estroma, ocurrir la liberación de esporas, así como la difusión y desarrollo de la enfermedad (Cardona-Álvarez, *et al.*, 1956 citado por CIAT, 1998).

El inóculo primario está constituido por la semilla y de manera general el patógeno está asociado con el hilo en la testa. Con el transcurso del tiempo, la viabilidad de *P. griseola* disminuye. Varios autores coinciden en que la semilla es una fuente menor de inóculo primario, pues es necesaria alta humedad para la transmisión de la enfermedad (CIAT, 1998).

Se considera que la mayor fuente de inóculo primario en el campo, son los residuos de cosecha infectados por el hongo. Cuando las condiciones ambientales son favorables, se diseminan las esporas que se producen sobre el suelo (CIAT, 1998).

3.2.3.3 Sintomatología:

Los síntomas de la mancha angular, son visibles en toda la planta. Seis días después de la inoculación, aparecen lesiones en las hojas, estas son las más comunes. Estas se presentan en hojas primarias, pero no tan abundantes en el follaje posterior, hasta el comienzo de la formación de vainas (Pastor-Corrales y Schwartz, 1994).

Al inicio, las lesiones son grises o pardas, pueden o no rodearse de un halo clorótico, con márgenes definidos; posteriormente, alrededor de nueve días, aumentan de tamaño, se unen y causan necrosis parcial, amarillamiento y las hojas pueden caer prematuramente. El tamaño de la lesión está inversamente relacionado con el número de lesiones por hoja y por foliolo (CIAT, 1998).

La forma en que se diseminan las conidias es a través de corrientes de aire y salpicaduras de lluvia (Pastor-Corrales y Schwartz, 1994).

3.2.3.4 Control:

3.2.3.4.1 Control cultural:

Los métodos de control cultural aplicados a los cultivos de fréjol para contrarrestar la mancha angular, son:

- Rotación de cultivos: cuando existe una infección alta, la rotación de cultivos debe incluir especies no hospedantes hasta por dos años, debido a la capacidad del patógeno para sobrevivir un periodo de tiempo similar, de esta manera se elimina el inóculo primario (CIAT, 1982).
- Eliminación de residuos de cosecha: la eliminación de restos vegetales puede ser por quema de los mismos o incorporándolos al suelo mediante una arada profunda.
- Uso de semilla libre del patógeno: al transmitirse el hongo a través de la semilla, es recomendable la cosecha de la misma de campos libres de la enfermedad (CIAT, 1982).
- Uso de variedades resistentes: esta medida es la alternativa más importante de control, pues no se producen pérdidas económicas a causa de la disminución de rendimientos (CIAT, 1982).

3.2.3.4.2 Control químico:

El uso de fungicidas es una práctica complementaria al control cultural (CIAT, 1982). El PRONALEG-GA (2006) recomienda el uso de Clorotalonil (700 cc/ha) y Propineb (600 kg/ha) como preventivos y como supresivo el Benomil en una dosis de 250 cc/ha.

3.2.3.4.3 Control genético:

Para el desarrollo de nuevos cultivares con resistencia a mancha angular, varios genotipos han sido identificados como donadores de genes de resistencia, para el mejoramiento genético de fréjol común. Estos genotipos son:

Tabla 3.4 Fuentes de genes de resistencia para *Phaeoisariopsis griseola* en diferentes tipos de grano de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Genotipo	Tipo/Color de grano	Genes de resistencia
Ouro negro	9/negro	Resistencia a 8 patotipos de <i>P. griseola</i> . SCARM02 es el marcador ligado al gen <i>Phg-ON</i> .
Cornell 49-242		<i>Phg-2</i> confiere resistencia parcial al patotipo 31:17. Dos marcadores RAPD, OPN 02 _{890c} y OPE 04 _{650c} , están ligados en fase de repulsión a 3.2 y 12.5 cM, respectivamente. SN02, es el marcador SCAR ligado a <i>Pgh-2</i>
G 10474	1/blanco 2M/pinto 1/Great northern 7/rojo mexicano 6/rojo pequeño	Resistencia al patotipo 63:63, conferido por un solo gen dominante.
AND 277	5/rosado 2R/cranberry 3/amarillo andino 6M/rojo moteado 6K/rojo oscuro 1/tipo vainita	Jalo EEP 558 y ESAL 550. El marcador SSR PV-actc 001 está ligado en fase de acoplamiento a un alelo de resistencia. <i>Phg-1</i> confiere resistencia al patotipo 63:23. SH13 es el marcador SCAR ligado.
CAL 143 G 916 México 54 Vax 2		

(Bean Improvement Cooperative, 2005; PRONALEG-GA, 2005).

3.3 MEJORAMIENTO GENÉTICO DE FRÉJOL

El Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA), del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ha liberado variedades comerciales con resistencia completa a una sola enfermedad y resistencia intermedia a otras, como INIAP-418 “Je.Ma” para roya (Peralta *et al.*, 1996), INIAP-414 “Yunguilla” (Lépiz *et al.*, 1993; Peralta *et al.*, 2004) para antracnosis y resistencia intermedia a roya, consecuentemente, los agricultores ecuatorianos no disponen de variedades de fréjol con resistencia a varias enfermedades de importancia en las mayores zonas de producción. La mayoría de variedades con incremento en rendimiento, calidad de la semilla y resistencia a factores individuales han sido obtenidas a través del fitomejoramiento convencional, el cual requiere la evaluación de un alto número de poblaciones e individuos segregantes dentro de estas poblaciones (Beebe y Pastor-Corrales, 1991; Kornegay y Cardona, 1991; Cáceres y Morales, 1985; Morales y Singh, 1993; Singh y Muñoz, 1997; Terán, 2000). Estos métodos de mejoramiento y selección conllevan años de investigación. El tiempo aproximado para la obtención de una nueva y superior variedad de fréjol ha sido estimado en aproximadamente seis años (Singh *et al.*, 1998).

Sin embargo, es necesario desarrollar y usar nuevas metodologías que contribuyan a la eficiencia de la selección, como es el método de selección de gametos, que reducen el tiempo del proceso de mejoramiento, obteniéndose en periodos más cortos nuevos padres donantes o familias promisorias para determinados caracteres. (Singh, 1997; Terán *et al.*, 2002). Adicionalmente, los progresos en la metodología genética proporcionan un gran número de procedimientos moleculares cuyas aplicaciones, de manera más o menos directa, incrementan la eficiencia de los métodos tradicionales de fitomejoramiento (Pañeda, 2005). El uso de marcadores moleculares ha permitido el desarrollo de mapas genéticos, el análisis de genes y genomas, identificación varietal y la selección asistida por marcadores moleculares (MAS). Los marcadores moleculares más utilizados, en el caso de fréjol son los RAPD y SCAR disponibles para antracnosis, bacteriosis, roya, mosaico común, mosaico dorado, mancha angular, *apion* (Adam-Blandom *et al.*, 1994; Kelly y Miklas, 1998; Singh, 1997; Terán, 2000).

3.4 MÉTODOS DE MEJORAMIENTO DE FRÉJOL

3.4.1 Mejoramiento por introducción y selección:

La introducción es la importación de material genético, es considerado como un método de mejoramiento porque el estudio sistemático de los materiales importados puede producir los mismos beneficios que pueden ser logrados con métodos de mejoramiento convencionales. Para los programas de mejoramiento es económico y aconsejable evaluar variedades y líneas avanzadas provenientes de otros programas porque es probable encontrar en estos materiales la base para aislar genotipos superiores mediante selecciones masales o individuales. Las introducciones también son utilizadas como reservorio de germoplasma para trabajos de hibridación (Voyses y López, 1986).

El proceso de introducción y selección de nuevas variedades consta de las siguientes fases:

Identificación de fuentes de germoplasma: es fundamental que los materiales a seleccionar respondan a los objetivos que se planteó inicialmente el fitomejorador, para realizar determinados proyectos.

Ensayos de observación o preliminares: en los que se comprueba si los materiales estudiados, cumplen con las necesidades específicas de las regiones en las cuales se trabaja.

Ensayos de rendimiento: este tipo de ensayos se realizan para determinar la superioridad de los materiales que se han probado con respecto al testigo sobresaliente local.

Ensayos de adaptación: en estos ensayos se evalúa el comportamiento de las posibles variedades con respecto al testigo.

Ensayos en fincas: esta fase permite encontrar las ventajas que tienen las nuevas variedades con respecto a las locales.

Registro de la variedad: una vez demostrada las características de las variedades a los agricultores en cuanto a sus ventajas sobre variedades tradicionales, se procede al registro del nuevo material para su lanzamiento y posterior uso a nivel de fincas productoras de fréjol (Voyses y López, 1986).

3.4.2 Mejoramiento por hibridación:

Después de la selección y purificación de los mejores materiales de fréjol introducidos, el siguiente paso para el mejoramiento de *P. vulgaris* fue combinar las características sobresalientes de las mejores variedades por hibridación. La obtención de variedades mejoradas es el principal objetivo de los programas de fitomejoramiento, cuya eficiencia se basa en la selección cuidadosa de progenitores (Machado et al., 2002). Mediante el mejoramiento por hibridación se han obtenido logros mayores en el campo de la mejora genética de plantas (Kelly, 2005). Muchas variedades de origen híbrido son claramente superiores a sus variedades progenitoras en una o más de esas características importantes (Poehlman, 1965).

El tipo de reproducción sexual del fréjol común, por autofecundación, permite crear variabilidad para seleccionar después. Esto se puede lograr mediante cruzamientos intra e ínter específicos, por emasculación, castrando el parental femenino y polinizando después con el polen del parental masculino o por polinización sin emasculación (Kelly, 2005). Esta operación es efectiva por el tipo y tamaño de flor de esta leguminosa, aunque depende también de las condiciones climáticas (más efectiva en invernadero que en campo) y de la técnica de hibridación usada (más efectiva sin emasculación que con emasculación) (Singh, 1991). En fréjol el tipo de variedad más conveniente sería un genotipo homocigótico que sería obtenido tras generaciones sucesivas de autofecundación, utilizando la hibridación sólo en las primeras etapas del programa de mejoramiento (Kelly, 2005).

Para el desarrollo de líneas experimentales mediante hibridación, son considerados los siguientes puntos:

- Identificación de los defectos de cultivares comerciales, determinación de objetivos y prioridades del mejoramiento.
- Búsqueda, evaluación e identificación de genes deseables (padres donantes).

- Recombinación de los genes deseables de padres donantes con los de cultivares comerciales o creación de variabilidad genética deseable mediante hibridación “Poblaciones híbridas segregantes”.
- Identificación de los genotipos recombinantes deseables, su selección y purificación como líneas experimentales (manejo de poblaciones híbridas) (Singh, 1991).

3.4.2.1 Variabilidad genética:

La variabilidad genética es producida por dos procesos principales: meiosis y unión al azar de gametos femeninos y masculinos. En la meiosis ocurre el apareamiento de cromosomas homólogos, en el que un miembro de cada par es aportado por el padre y la madre. Además, el rango de combinaciones genéticas puede aumentar por el número de parentales usados, las combinaciones entre los progenitores, el número de yemas florales polinizadas y por la estrategia de mejoramiento (Singh, 1991).

3.4.2.2 Habilidad combinatoria y evaluación de rendimiento en generaciones tempranas:

El conocimiento de las habilidades combinatorias de los padres contribuye a evitar la generación de híbridos y genotipos recombinantes pobres. No todos los cruces realizados producen buenos genotipos, por lo que es importante identificar cruces promisorios desde generaciones tempranas, ya que a partir de estos genotipos podrán, eventualmente, ser obtenidas líneas superiores. La evaluación de individuos puede empezar desde F_1 y los cruces F_1 y F_2 pueden ser descartados sin duda (Singh, 1991).

3.4.2.3 Heredabilidad de las características:

La mayoría de características morfológicas, hábito de crecimiento, resistencia a antracnosis y al virus de mosaico común de fréjol, tienen una alta heredabilidad y por lo tanto pueden ser seleccionadas desde generaciones tempranas. La resistencia a

bacteriosis, mancha angular, madurez y tamaño de semilla son consideradas características de heredabilidad moderadamente alta, por lo tanto los sistemas de evaluación debe ser establecidos de tal manera que pueda discriminarse los buenos de los malos genotipos (Singh, 1991).

3.5 METODOS DE SELECCIÓN:

3.5.1 Métodos de selección simple sin cruzamiento:

3.5.1.1 Selección masal:

Es un procedimiento que elige los mejores individuos cuyas semillas, mezcladas serán la generación siguiente, repitiendo el proceso por varias generaciones. Se consigue una población constituida aún por varios genotipos, aunque si son seleccionados genotipos con meticulosidad, se podrá conseguir a los mejores de la población de partida, que normalmente es una raza o variedad local en manos de agricultores. (Cubero, 1999).

3.5.1.2 Selección individual: planta a línea o parcela:

Es un procedimiento en el cual se elige un cierto número de individuos de acuerdo con el carácter buscado, número que puede ser elevado en caracteres de baja heredabilidad o muy pequeños para caracteres cualitativos o de alta heredabilidad. Los descendientes son sembrados separadamente, se eligen las mejores líneas, desechando el resto. Las líneas seleccionadas se siembran el año siguiente en surcos o parcelas pequeñas y se repite la selección de las mejores. Así se prosigue durante varias generaciones, cambiando criterios de selección subjetiva por criterios objetivos, estos es disponer en el campo de selección de dos repeticiones, para disminuir la influencia del ambiente. Al final del proceso, con algunas líneas puras, se realizan pruebas estadísticas para decidir con cual de ellas debe iniciarse el proceso de registro. (Cubero, 1999).

3.5.1.3 Selección estratificada:

Es un diseño que disminuye el efecto del ambiente, esto se realiza dividiendo el lote de siembra y escogiendo semillas de las distintas zonas, estas semillas serán la fuente de siembra de la siguiente generación. (Cubero, 1999).

3.5.2 Métodos de selección con cruzamiento:

3.5.2.1 Método masal con cruzamiento: cruzamientos compuestos:

En este procedimiento, tras los cruzamientos pertinentes la homocigosis se alcanza de manera natural, multiplicándolos durante un número adecuado de generaciones. Durante las generaciones de multiplicación se realiza selección negativa, eliminando individuos no deseables. Al disponer de la suficiente cantidad de semilla, se puede multiplicar en diferentes ambientes, permitiendo selección natural y diferentes combinaciones génicas para cada lugar de multiplicación. A partir del tercer y cuarto año, se realizan selecciones de planta a parcela, sin esperar a la homocigosis máxima que se producirá algunas generaciones más tarde. (Cubero, 1999).

3.5.2.2 Método genealógico:

El método genealógico se caracteriza por seguir un control riguroso de los descendientes de cada planta F_2 , sea simple o compuesta. A partir de esta generación y a lo largo de varias generaciones, se eligen a los mejores individuos dentro de los mejores F_3 (selección combinada intra e interfamiliar), luego los mejores individuos de cada generación sucesiva. Al escoger las mejores familias, es indispensable registrar la genealogía, repitiendo el proceso hasta la filial que se considere oportuna. Se continúa así hasta llegar a la homocigosis. (Cubero, 1999).

3.5.2.3 Método de descendiente de semilla única (sdd: “single seed descendent”)

A partir de un cruzamiento se toma una sola semilla de cada planta de F_2 , que producirá una planta F_3 , de la que se vuelve a tomar una sola semilla y así sucesivamente hasta obtener tantas líneas que se multiplican y evalúan para llegar a obtener una variedad y no solamente una línea pura. (Cubero, 1999).

3.5.2.4 Métodos mixtos:

Constituye un intermedio entre el método genealógico y masal, con la posibilidad de crear variantes de acuerdo a los objetivos del programa. El más común consiste en obtener F_2 y cosechar planta a planta eliminando las defectuosas, se siembra la F_3 individualmente y cosechando nasalmente cada una de ellas. Este procedimiento permite seleccionar entre filiales y realizar entre las elegidas una selección planta a línea en esa generación o la siguiente, realizar ensayos comparativos antes de seleccionar de planta a línea y permite también distribuir las plantas en ambientes diferentes en ensayos comparativos. (Cubero, 1999).

3.5.2.5 Método de selección de gametos usando marcadores dominantes y codominantes durante la hibridación y desarrollo de F_1 proveniente de cruza múltiple:

El ideal sería realizar una selección gametofítica (sobre el gametofito) y así permitir la fertilización sólo de los gametos masculinos y femeninos que portan los alelos deseados. Por el momento esto no es posible (Montes-R y White, 1996 citado por Asensio *et al.*, 2001), pero el método de “Selección de Gametos” nos permite al menos aumentar la frecuencia de los alelos deseados durante la realización de un cruzamiento múltiple o justo después de haberlo realizado (Singh, 1994). Para ello hay que hacer las polinizaciones planta a planta para asegurar una adecuada representación de los alelos favorables presentes en cada F_1 y la contribución genética de cada parental, en cada uno de los pasos de un cruzamiento múltiple. Es necesario hacer un gran número de polinizaciones (Asensio *et al.*, 2001).

Así, en el desarrollo de cruzamientos simples es necesario asegurar al menos 30 semillas, en cruzamientos dobles 75 semillas, y al menos 150 en cruzamientos múltiples, que aseguren un número adecuado de plantas F_1 seleccionadas para continuar la selección en generaciones siguientes y desarrollar líneas promisorias (Singh, 1999 citado por Asensio *et al.*, 2001). Además, generalmente no es aconsejable usar más de 6 parentales en un cruzamiento y asegurar una contribución genética por lo menos del 10% de cada parental usado en un cruzamiento final. (Asensio *et al.*, 2001).

Cuando se hacen cruzamientos múltiples, existe la posibilidad de evaluar y seleccionar caracteres dominantes y codominantes presentes en los híbridos F_1 que son heterogámicos y por tanto heterogéneos (Asensio *et al.*, 2001).

Esta selección puede realizarse directamente o bien mediante marcadores morfológicos, bioquímicos o basados en el ADN, permitiéndonos seleccionar las plantas portadoras de los alelos deseados para utilizarlas como parental masculino en el cruzamiento con una variedad comercial que se pretende mejorar, cruzamiento que a su vez puede ser seleccionado en F_1 (Singh, 1994, 1998 citado por Asensio *et al.*, 2001).

Este proceso permite una acumulación de los alelos deseados rápidamente, y reduce el tamaño de la población en las generaciones segregantes siguientes, ahorrando así tiempo y recursos en la selección de varios caracteres al mismo tiempo (Asensio *et al.*, 2001).

Las plantas F_1 seleccionadas son recogidas individualmente y sembradas planta línea para desarrollar familias F_2 derivadas de F_1 (familias $F_{1:2}$). Una selección familiar e individual dentro de familias en generaciones tempranas (F_2 , F_3 y F_4) es parte importante de este método. Asimismo es necesario seleccionar por el mayor número de caracteres posible en cada una de las generaciones siguientes (Asensio *et al.*, 2001).

La semilla F_5 recogida de plantas F_4 se evaluará para caracteres comerciales descartando aquellas que no posean las características adecuadas, y se sembrarán

espaciadas en el campo bajo una presión adecuada de selección por resistencia a enfermedades (Asensio *et al.*, 2001). Las plantas F₅ seleccionadas se cosecharán individualmente para realizar pruebas de progenie en las generaciones siguientes. Estas líneas promisorias de mejora deberán ser evaluadas posteriormente por su adaptación, rendimiento, calidad, etc., en diferentes ambientes para identificar aquellas que puedan ser liberadas como nuevas variedades. (Asensio *et al.*, 2001).

3.5.25.1 Fuentes de genes de resistencia

Según Cubero (1999), si se considera la coexistencia de hospederos y patógenos en los centros de origen de los primeros, es posible que en estos se encontrarán genes de resistencia a enfermedades endémicas. Si tal coexistencia es efectiva, sistemas de resistencia tanto en la especie cultivada como en sus especies emparentadas podrán ser encontradas (Asensio *et al.*, 2001).

Diversos trabajos han propuesto una correlación entre diversidad genética de patógenos causantes de determinadas enfermedades en fréjol común, como la roya (Stavely, 1982), la mancha angular (Guzmán *et al.*, 1995) o la antracnosis (Balardin *et al.*, 1997) y los dos centros de domesticación de *Phaseolus vulgaris* (andino y mesoamericano). Cada uno de estos dos orígenes ha evolucionado de forma independiente, dando lugar a dos grupos de germoplasma o acervos genéticos con diferencias morfológicas, agronómicas y moleculares (Singh *et al.*, 1991).

En estos patógenos, los aislados obtenidos a partir de variedades andinas conforman un grupo homogéneo a nivel genético, que se diferencia del grupo de aislados mesoamericanos (Ragagnin *et al.*, 2003). A su vez, el grupo de aislados andinos muestra una mayor patogenicidad sobre el germoplasma de origen andino, mientras que el grupo de aislados mesoamericanos muestra una mayor patogenicidad sobre el germoplasma mesoamericano. Este elevado grado de especialización sugiere que los aislados andinos y mesoamericanos habrían evolucionado, junto a su correspondiente germoplasma, en procesos evolutivos independientes (Asensio *et al.*, 2001).

La generación de nuevas variedades resistentes ha sido posible gracias al aprovechamiento de genes disponibles en las varias colecciones de germoplasma. Existe una gran variedad de genes reportados que confieren la resistencia para enfermedades como: antracnosis, roya, mancha angular, bacteriosis y virus del mosaico común (Tabla 3.5). Existen muchos ejemplos en donde varios genes de resistencia a varias enfermedades han sido agrupados en un solo genotipo de fréjol (Pastor-Corrales, 2003).

Tabla 3.5. Genes mayores de resistencia (R) en fréjol común.

Genes R	Germoplasma fuente	Pool genético	Enfermedad
<i>Co-1</i>	MDRK	Andino	Antracnosis
<i>Co-2</i>	Cornell 49-242	Mesoamericano	Antracnosis
<i>Co-4²</i>	Sel 1308; G2333	Mesoamericano	Antracnosis
<i>Co-5</i>	TU; G2333; Sel 1360	Mesoamericano	Antracnosis
<i>Co-6</i>	Catrachita; AB 136	Mesoamericano	Antracnosis
<i>I</i>	Seafarer; Montcalm	Mesoamericano Andino	Virus del mosaico común
<i>bc-3</i>	B85009 MCM 3031 MCR 2205 MCR 2205	Mesoamericano Mesoamericano Andino Andino	Virus del mosaico común
<i>bgm-1</i>	Garrapato A 429	Mesoamericano	Virus del mosaico dorado
<i>Mp-1</i>	BAT 477	Mesoamericano	Macrophomina
<i>Mp-2</i>	BAT 477	Mesoamericano	Macrophomina
<i>Ur-3</i>	NEP-II	Mesoamericano	Roya
<i>Ur-4</i>	Early Gallatin	Andino	Roya
<i>Ur-5</i>	México 309 B-190	Mesoamericano	Roya
<i>Ur-9</i>	PC 50	Andino	Roya
<i>Ur-11</i>	PI 181996	Mesoamericano	Roya

Singh, 1999

3.5.2.5.2 La selección de la resistencia

Para realizar la selección de resistencia es fundamental disponer de un método de inoculación artificial preciso, eficiente y reproducible (Zaiter y Coyne, 1984 citado

por Asensio *et al.*, 2001) y si la inoculación se lleva a cabo en condiciones controladas (cámara de crecimiento o invernadero), debe predecirse adecuadamente el comportamiento de esos mismos genotipos en campo (Webster *et al.*, 1980 citado por Asensio *et al.*, 2001).

Además del método de inoculación, es necesario utilizar una escala adecuada de evaluación de acuerdo a lo que se pretenda seleccionar, severidad o tipo de lesiones, y que permita incluir o descartar genotipos acordes a los objetivos planteados inicialmente en la investigación. Este sistema de evaluación deberá ir acorde a los genes responsables de la resistencia a los patógenos en estudio; en el caso de genes mayores, las escalas que corresponderían a una selección rigurosa, en la escala de uno al nueve, solamente incluye a genotipos que tengan puntuaciones del uno al tres, descartándose el resto de calificaciones.

3.6 MEJORAMIENTO GENÉTICO ASISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES

El mejoramiento asistido por Marcadores Moleculares (MAS, por sus siglas en inglés), es un medio que permite aumentar la eficiencia de la selección, pues se puede acceder a una selección temprana y reducir el tamaño de las poblaciones durante el estudio (Staub, J. *et al* 1996).

La efectividad de cualquier procedimiento de mejoramiento genético asistido, dependerá de la precisión de la clasificación fenotípica de la expresión de la característica y del grado de ligamiento entre los marcadores y las características de interés. Aunque la efectividad del MAS puede incrementar la ganancia de la selección, comparando con la selección fenotípica, la utilidad de los marcadores en los programas de mejoramiento vegetal será determinada por la información de los costos por unidad (Edwards, 1994 citado por Staub, 1996).

La utilización de marcadores moleculares en los proyectos de mejora genética, se basa en el concepto de ligamiento genético: se considera que dos loci se encuentran ligados cuando tienden a transmitirse de forma conjunta, debido a la proximidad con que están ubicados en el mismo cromosoma. Si un locus fácilmente identificable (marcador) y un gen de interés están estrechamente ligados, los individuos de una segregación portadores del marcador serán portadores del correspondiente alelo del gen de interés con una elevada probabilidad. En términos generales un marcador podrá utilizarse para la identificación y selección del genotipo con alta fiabilidad, si está ligado a una distancia menor de 5 cM (Kelly *et al.*, 1995).

3.6.1 Marcadores moleculares

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. Los marcadores moleculares pueden ser regiones del ADN codificantes (exones) o no codificantes (intrones). Los marcadores moleculares comenzaron a ser usados en plantas a inicios de los ochenta cuando fueron desarrollados los RFLPs. Posteriormente se han desarrollado varios tipos de marcadores basados en la técnica PCR, descrita en 1985, como los RAPDs, los microsatélites y AFLPs (Ángel, 1992).

Para facilitar la identificación de marcadores ligados y mapear poblaciones se han desarrollado algunos métodos, los cuales incluyen líneas isogénicas cercanas y análisis de segregación en masa. Los marcadores identificados a través de estos métodos han sido usados por mejoradores para incorporar nuevos genes de resistencia o combinar genes de diferentes fuentes, especialmente en casos donde las técnicas de screening normal son laboriosas y caras. Para mejorar la reproducibilidad de RAPDs previamente identificados, primers asociados a alelos específicos y/o regiones amplificadas de secuencia caracterizada SCARs derivados de las correspondientes bandas RAPDs se han convertido en la base para la selección indirecta de características de importancia económica en fréjol común (Kelly y Miklas, 1998 citado por Singh, 2000).

Tabla 3.6. Genes de resistencia en Fréjol común con marcadores estrechamente ligados.

Gen	Enfermedad	Gen	Enfermedad
<i>Co-1</i>	Antracnosis	<i>Mp-1</i>	Macrophomina
<i>Co-2</i>	Antracnosis	<i>Mp-2</i>	Macrophomina
<i>Co-4</i>	Antracnosis	<i>Ur-3</i>	Roya
<i>Co-4²</i>	Antracnosis	<i>Ur-4</i>	Roya
<i>Co-5</i>	Antracnosis	<i>Ur-5</i>	Roya
<i>Co-6</i>	Antracnosis	<i>Ur-9</i>	Roya
<i>I</i>	BCMV	<i>Ur-11</i>	Roya
<i>bc-1²</i>	BCMV	<i>bgm-1</i>	BGMV
<i>bc-3</i>	BCMV	<i>Phg-1</i>	Mancha angular
		<i>Phg-2</i>	Mancha angular

(Kelly, 2003)

3.6.2 Gen de resistencia a roya *Ur-11*:

El gen *Ur-11* fue identificado en PI 181996 (Johnson *et al.*, 1995). Este gen fue efectivo contra todas las razas de roya identificadas en ese tiempo. Este gen fue rápidamente introducido a muchos tipos de fréjol. El gen es epistático a genes, cuya resistencia a diferentes razas de roya no es completa (resistente del 40 al 60% de razas) (Kelly, 2003).

Tabla 3.7 . Genes de resistencia a roya y su efectividad.

Genotipo	Efectividad	Fenotipo
<i>Ur-4</i>	R a 23/55 razas	necrosis grandes
<i>Ur-11</i>	R a 55/55 razas	necrosis pequeñas
<i>Ur-11/Ur-4</i>	R a 55/55 razas	necrosis pequeñas

(Kelly, 2003)

3.6.3 Marcador SCAR ligado al gen de resistencia a roya del fréjol común

El genotipo guatemalteco de fréjol negro, PI 181996, es resistente a todas las razas norteamericanas conocidas del hongo de la roya de fréjol *Uromyces appendiculatus* (Johnson *et al.*, 1995).

En fréjol común la resistencia a roya es controlada por genes dominantes (Stavely, 1984; Lunnan Finke *et al.*, 1986; Stavely y Pastor-Corrales, 1989, citados por Johnson *et al.*, 1995). La piramidación de resistencia monogénica ha sido propuesta como la forma más estable y económica de proveer control a las enfermedades en las plantas de cultivo.

Marcadores moleculares, como los RAPDs (random amplified polymorphic DNAs), puede ser usado para selección indirecta de progenie con genes de resistencia piramidados (Haley *et al.*, 1993). Sin embargo la selección asistida por marcadores moleculares es limitada por la necesidad de un fuerte ligamiento entre la resistencia y los *loci* marcadores. El protocolo simple de RAPDs junto con el uso de líneas casi-isogénicas (NILs: near isogenic lines), análisis de mezcla de segregantes o juntas proveen la oportunidad de la identificación rápida de marcadores moleculares estrechamente ligados a genes de resistencia (Johnson *et al.*, 1995).

Para la identificación del gen *Ur-11*, fueron usados dos marcadores RAPDs: OAC20₄₅₉ en fase de acoplamiento y el OAE19₈₉₀ en fase de repulsión (Johnson *et al.*, 1995). Estos marcadores fueron usados para diferenciar genotipos resistentes a roya homocigóticos y heterocigóticos en una población segregante retocruzada. El resultado fue que el marcador que mejor información proveía y del cual se pudo derivar el SCAR fue el OAE19₈₉₀.

El gen *Ur-11* observado en BelMiDak RR-3 fue considerado como una fuente de resistencia importante para roya en Brasil (Queiroz *et al.*, 2004). Este marcador fue inicialmente validado por Oliveira, *et al* (2002), en la población derivada de las cruzas Rudá (susceptible) x BelMiDak RR-3 (resistente). En este trabajo se obtuvo el SCAR derivado del RAPD primer OPAE19. La banda de interés se encontró a 890 pb. Este

marcador se encuentra ligado al gen de resistencia en fase de repulsión (i.g. dos genes ligados y en heterocigosis dispuestos como Ab / aB , Griffiths *et al.*, 1999).

Para determinar la distancia genética entre el marcador y el gen de resistencia, se realizaron análisis de segregación, con poblaciones F_2 generadas de la cruce del genotipo resistente (BelMiDak RR3) por el genotipo susceptible local (Rudá), los cuales determinaron que se encuentra a 1.0cM (Queiroz *et al.*, 2004).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN:

La investigación tuvo lugar en los invernaderos y laboratorios del PRONALEG-GA Y DENAREF de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, ubicada en la parroquia Cutuglagua del cantón Mejía, provincia de Pichincha.

Altitud: 3050 m.s.n.m

Latitud: 00°22'15"S

Longitud: 78°33'14"O

4.1.1 Condiciones agro-climáticas:

Temperatura media anual: 14.4 °C

Precipitación media anual: 1489 mm

Humedad relativa: 72 %

4.2 MATERIAL VEGETATIVO Y MANEJO DE PLÁNTULAS:

Los materiales vegetales escogidos se detallan a continuación:

Cuadro 4.1. Grupo de testigos o padres de las cruzas múltiples.

Genotipo	Color	Antracnosis	Roya	Origen
BelDakMi RMR9	Pinto	-	por determ.	EE.UU.
BelMiNeb RMR3	Pinto	-	por determ.	EE.UU.
Catrachita	Rojo	-	-	HONDURAS
Concepción	Rojo moteado	+/-	+/-	INIAP-ECUADOR
G 916	Rojo moteado	por determ.	+	CIAT
G 2333	Rojo	+/-	-	CIAT
Je.Ma	Rojo moteado	-	+	INIAP-ECUADOR
MAR 3		-	+	CIAT
Paragachi	Rojo moteado	+	+	CIAT
PI 181996		-	-	GUATEMALA
RSG	Rojo	+	+	EE.UU.
VAX 2		-	+/-	EE.UU.
Yunguilla	rojo moteado	+/-	-	INIAP-ECUADOR

(+) Pastor-Corrales, 2003

(*) PRONALEG-GA, 2004

Cuadro 4.2. Grupo de segregantes F₂. Cruzas simples

Cruzas simples
Mantequilla/PI 181996
Concepción/PI 181996
Yunguilla/BelDakMi RR9
G 916/ BelMiNeb RMR3

En la población de la cruz G916/BelMiNeb RMR3 fue registrada solamente la reacción de los individuos a roya, ya que ninguno de los progenitores tiene resistencia a antracnosis, por que lo únicamente fue evaluada la respuesta de los genotipos a roya debido a que BelMiNeb RMR3 tiene dos genes de resistencia a roya (*Ur-4* y *Ur-11*).

Cuadro 4.3. Poblaciones F₁ de cruzas dobles.

Cruza recíproca:	G196/Concepción//Yunguilla/BelDakMi RMR9 Yunguilla/BelDakMi RMR9//G196/Concepción.
Cruza recíproca:	G196/BelMiNeb RMR3//Concepción/PI 181996 Concepción/P I 181996//G196/BelMiNeb RMR3

En este estudio el número de semillas de las 4 poblaciones fue bajo, debido a que en el mes de Diciembre del año 2005, hubieron una serie de heladas en la Granja Experimental Tumbaco, lugar donde se encontraban las plantas. Las plantas fueron muy afectadas y la cosecha fue reducida, debido a los daños que tuvieron las vainas.

Cuadro 4.4. Progenitores de las cruzas dobles y características.

Progenitor	Característica	Gen
G 916	Resistencia Mancha angular	
Yunguilla	Resistencia antracnosis	
PI 181996	Resistencia antracnosis y roya	<i>Ur-11</i> (roya)
BelDakMi RR9*	Resistencia roya y virus del mosaico común	<i>Ur-11/Ur-6</i> (roya) I (BCMV)
BelMiNeb RMR3*	Resistencia roya y virus del mosaico común	<i>Ur-11/Ur-4</i> (roya) I/ <i>bc-3</i> (BCMV)
Concepción	Grano comercial	

*Pastor-Corrales, 2003.

4.3 Siembra en invernadero:

4.3.1 Materiales:

- Sustrato estéril CIP (40% tierra negra, 40% humus y 20% de pomina).
- Semillas de fréjol
- Vasos de plástico
- Macetas plásticas de 10 cm de diámetro
- Agua

4.3.2 Metodología:

Tres semillas de cada población (genotipos progenitores, cruzas simples y cruzas dobles), fueron sembradas en los vasos de plástico y macetas con el sustrato bajo condiciones de capacidad de campo (c.c).

Las plántulas fueron mantenidas en el invernadero, aisladas de patógenos, exceso de temperatura o cualquier agente que altere el normal desarrollo es éstas.

La inoculación de las enfermedades fue iniciada cuando el 100% de la población presentó las hojas primarias desplegadas.

4.4 Evaluación de los métodos de inoculación:

4.4.1 Inoculación de enfermedades:

Para determinar la secuencia más adecuada de inoculación, el primer grupo de plántulas se dividió en cuatro subgrupos como se indica a continuación:

- Subgrupo 1: inoculación de roya.
- Subgrupo 2: inoculación de antracnosis.
- Subgrupo 3: inoculación de roya, luego inoculación de antracnosis.
- Subgrupo 4: inoculación de antracnosis, luego inoculación de roya.

Cada subgrupo tuvo 3 repeticiones de cada variedad.

4.4.2 INOCULACIÓN DE ANTRACNOSIS

4.4.2.1 Materiales:

- Cajas petri
- Parafilm
- Matraces
- Vasos de precipitación
- Microscopio
- Probetas
- Espátula
- Cámara de Neubauer

- Bomba de vacío
- Atomizador
- Cámara de humedad
- Bandejas plásticas 0.45x0.20 m
- Papel absorbente
- Tween 80
- Medio de cultivo (Marthurs).
- Inóculo.

4.4.2.2 Metodología:

4.4.2.2.1 Preparación del inóculo: Para la preparación del inóculo, se utilizó la metodología propuesta por Falconí (2002):

- Incremento de *Colletrotrichum lindemuthianum* de una raza simple sobre medio de cultivo Marthurs.
- Cosecha del inóculo
- Estandarización de la concentración del inóculo ($0.8 - 1.2 \times 10^6$ conidias/cm³).
- Se agregó una a dos gotas de Tween 80 por litro de inóculo.

4.4.2.2.2 Inoculación en invernadero:

1. Preparación de materiales
2. Calibración del tamaño de gota
3. Aspersión en plántulas (en hoja primaria) en haz, envés, tallos.
4. Colocación en cámara húmeda
5. Encendido del humidificador luego de 3 horas, por tres días
6. Retirar y colocar en invernadero
7. Evaluación a 8 – 10 días después de inoculación.

(Falconí, 2002).

4.4.2.2.3 Evaluación de antracnosis en plántulas:

La evaluación de síntomas fue realizada ocho a doce días después de la inoculación, siguiendo la escala de severidad de uno a nueve:

1. plantas sin síntomas visibles.
2. pocas lesiones pequeñas aisladas en la nervadura principal en la superficie más baja de la hoja.
3. lesiones pequeñas más frecuentes en la nervadura principal en la superficie más baja de la hoja.
4. lesiones en la nervadura y ocasionalmente en las nervaduras secundarias de la hoja.
5. muchas lesiones pequeñas diseminadas en la nervadura y secundarias.
6. muchas lesiones pequeñas similares a las de grado 5 en la parte baja y superior de la hoja, tallo y pecíolo.
7. lesiones largas diseminadas sobre toda la hoja, pecíolo y tallo.
8. muchas lesiones largas unidas acompañadas por tejido necrosado y manchas cloróticas o caída de hojas, crecimiento de planta reducido y muchas lesiones en pecíolos y tallos.
9. severamente enfermas o plantas muertas.

(Alzate-Marín *et al.*, 1996)

4.4.3 INOCULACIÓN DE ROYA

La aspersión de inóculo de roya fue aplicada en la hoja unifoliada del primer grupo y en la primera hoja trifoliada del segundo y tercer grupo, con la raza 0.61, aislada de genotipos andinos en una concentración de 30000 uredósporas/ml, aspergeando la hoja tanto por el haz como por el envés, luego las plantas se colocaron en cámara húmeda durante 18 horas a una temperatura entre 22 y 24°C y una humedad superior al 90%.

4.4.3.1 Materiales:

- Inóculo de Roya
- Agua destilada esterilizada.
- Microscopio
- Tween 80
- Bomba de vacío.
- Micro aspersor

- Fundas plásticas.
- Matraces Erlenmeyer.
- Probetas.
- Vasos de precipitación.
- Espátula.
- Cámara de Neubauer.
- Bandejas plásticas 0.45 x 0.20 m
- Papel absorbente.
- Papel aluminio.

4.4.3.2 Metodología:

Inoculación: El inóculo se preparó con las esporas colectadas de Red Small Garden; este es un genotipo susceptible en el que se mantienen los diferentes aislamientos de *Uromyces appendiculatus*. En este estudio, la raza 0.61 fue utilizada, por tener un mayor espectro de virulencia (Paucar *et al.*, 2005). Las esporas colectadas fueron suspendidas en agua destilada; para obtener una mayor dispersión de las uredóporas en la solución, se agregó una gota de “Tween 80”, por cada litro de suspensión (CIAT, 1980).

Para preparar el inóculo con la concentración recomendada de 30000 esporas/ml, fue necesaria la utilización de un hemacitómetro (CIAT, 1980).

El inóculo fue aplicado por el envés de las hojas, con una bomba neumática. Las plántulas inoculadas permanecieron en cámara húmeda por 18 horas, a 100% de humedad relativa; después fueron llevadas al invernadero a una temperatura de 22 a 28°C y humedad relativa del 30 a 45%.

4.4.3. Evaluación:

La evaluación se realizó doce días después, siguiendo la escala numérica propuesta por Stavely (1983), de acuerdo al número y tamaño de lesiones que se presenta:

GRADO	DEFINICIÓN
1	Inmune, no tiene síntomas visibles
2	Manchas necróticas o cloróticas, sin esporulación y menor que 0.3 mm de diámetro.
2+	Manchas necróticas o cloróticas, sin esporulación y 0.3-1.0 mm de diámetro.
2++	Manchas necróticas o cloróticas, sin esporulación y 1.0-3.0 mm de diámetro.
2+++	Manchas necróticas o cloróticas, sin esporulación y menor que 3.0 mm de diámetro.
3	Uredósporas menores a 0.3 mm de diámetro
4	Uredósporas 0.3-0.5 mm de diámetro
5	Uredósporas 0.5-0.8 mm de diámetro
6	Uredósporas mayores a 0.8 mm de diámetro.

4.4.4 INOCULACIÓN DE MANCHA ANGULAR:

4.4.4.1 Materiales:

- Cajas petri
- Parafilm
- Vasos de precipitación.
- Matraces
- Vasos de precipitación
- Microscopio.
- Probetas.
- Espátula.
- Cámara de Neubauer.
- Bomba de vacío.
- Atomizador.
- Cámara de humedad.

- Bandejas plásticas 0.45x0.20 m
- Papel absorbente.
- Tween 80.
- Jugo de vegetales V-8
- Carbonato de Calcio
- Agar
- Agua destilada
- Inóculo.

4.4.4.2 Metodología:

4.4.4.2.1 Preparación del inóculo:

Las conidias se extrajeron del cultivo adicionando agua destilada y la suspensión se recoge en un recipiente. Luego la concentración se determinó a través de un hemacitómetro, la solución se diluyó hasta conseguir la concentración de 2×10^4 conidias/ml (CIAT, 1994).

4.4.4.2.2 Inoculación:

La inoculación se realizó por aspersión con una bomba. La aspersión se dirigió al haz y envés del tercer trifolio. Las plantas se incubaron posteriormente por cuatro días en condiciones de alta humedad y temperatura de baja a moderada. Luego se mantuvo alta humedad y temperatura hasta el apareamiento de síntomas, dieciocho a veintitrés días después de la inoculación (CIAT, 1994).

4.4.4.2.3 Evaluación:

La evaluación de síntomas se realizó veintitrés días después de la inoculación, según la escala de severidad de uno al nueve propuesta por CIAT (1994):

1. Plantas sin síntomas.
3. Plantas con 5 al 10% de área foliar con lesiones.
5. Plantas con el 20% o más, de área foliar infectada y esporulada.
7. Plantas con el 60% o más de área foliar con lesiones y esporulación asociada con clorosis y necrosis.

9. 90% del área foliar con lesiones frecuentemente asociada con defoliación temprana y muerte de la planta.

Plantas con calificación igual y menor a 3 fueron consideradas como plantas resistentes.

4.4.5 INOCULACIÓN SECUENCIADA:

Después de haber probado la mejor secuencia de inoculación, se inoculó las enfermedades con la metodología anteriormente descrita en el siguiente orden.

1. Antracnosis: aplicación en hojas primarias.
2. Roya: aplicación en primera hoja trifoliada.
3. Mancha angular: aplicación en tercera hoja trifoliada.

4.5 AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR SCAR SAE19 LIGADO AL GEN DE RESISTENCIA A ROYA, *Ur-11*.

De las plantas que presentaron resistencia y susceptibilidad a roya se extrajeron muestras de ADN para confirmar la presencia y ausencia del gen de resistencia *Ur-11*.

4.5.1 Metodología:

- Extracción de ADN de trifolios (extracción de tejido fresco).
- Cuantificación de ADN para uniformizar la concentración de las muestras.
- Dilución de las muestras de ADN a una concentración de 10 ng/ul.
- Amplificación de ADN.
- Electroforesis.
- Foto documentación.

(Colombo, 1998 modificado por Piedra, 2005, citado por Erazo, 2005).

4.5.2 Materiales:

4.5.2.1 Extracción de ADN:

- Buffer de extracción
- Solución madre (100 ml):
 - Tris (hidroximetil amino metano) HCl pH 8.0 5 ml.
 - NaCl 5M 20ml.
 - EDTA (etilen diamino tetra acético) 0.5 M pH 8.0 4ml.
 - Agua destilada estéril 70ml.
 - PVP (poli vinil pirrolidona) 1g.
 - CTAB (hexadecil trimacil bromuro de amonio) 1g.

- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Mortero y pistilo
- Tubos de microcentrifuga.
- Guantes de látex
- Balanza
- Refrigerador 4° C
- Congelador -20° C
- Papel toalla
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) “CIA”
- B mercaptoetanol.
- Etanol 100%.
- Tips.
- Baño María
- TE. (Tris +EDTA).
- Estufa
- ARNasa

4.5.2.2 Cuantificación de ADN:

- Agarosa

- Bromuro de etidio
- TAE 1X
- Cámara de electroforesis.
- Fuente de poder.
- Marcador de talla: Low mass ladder
- Tips
- Equipo de foto documentación

4.5.2.3 Dilución de ADN:

- Agua destilada ultra pura
- Tartrazina + Agua destilada ultra pura

4.5.2.4 Amplificación de ADN:

- Termociclador
- Agua ultra pura estéril
- Buffer de PCR
- $MgCl_2$.
- Primer mix
- dNTP Mix (bases)
- Taq polimerasa
- ADN diluido (10ng/ul)
- Micropipetas
- Tips
- Hileras de PCR
- Aceite mineral.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer ensayo fue realizado con el objetivo de conocer la reacción a roya y antracnosis de los genotipos progenitores de las poblaciones de fréjol bajo estudio, y para determinar si existe algún tipo de interacción entre los dos patógenos cuando la inoculación es secuenciada. En este sentido, los progenitores (Cuadro 5.1) fueron inoculados en las siguientes secuencias: roya-antracnosis y antracnosis-roya. En general, no se observó diferencia alguna en la reacción mostrada por los genotipos progenitores al inocular los patógenos por separado o en forma secuenciada. El único genotipo que mostró una reacción diferente al ser inoculado de manera escalonada fue el genotipo Concepción. La reacción a antracnosis de Concepción al ser inoculado por separado fue de resistencia intermedia (reacción 4, según escala de severidad de uno al nueve; Alzate-Marín *et al.*, 1996), mientras que en la inoculación escalonada la reacción fue de susceptibilidad (reacción 7), independientemente del orden de inoculación. Posiblemente, la razón responde a una concentración de inóculo insuficiente o a que el tiempo y las condiciones de incubación no fueron adecuados bajo invernadero. La posibilidad de que exista interacción entre *U. appendiculatus* y *C. lindemuthianum* al ser inoculados de manera escalonada quedaría descartada, ya que el genotipo mostró una reacción de susceptibilidad cuando fue inoculado con *C. lindemuthianum* en primer lugar y con *U. appendiculatus* posteriormente. La reacción de susceptibilidad (reacción 7) a antracnosis fue registrada días antes de ser inoculado con *U. appendiculatus*.

En el caso del genotipo G916 (Cuadro 5.1), solamente fue registrada la reacción a antracnosis en la cual obtuvo una calificación de nueve después de ser inoculado escalonadamente antracnosis-roya. La razón para no registrar la reacción a roya es porque las plántulas del genotipo G916 fueron totalmente afectadas por el patógeno causante de la antracnosis. Los genotipos Paragachi y RSG, testigos susceptibles para antracnosis y roya, respectivamente fueron empleados para confirmar la efectividad de la inoculación como controles positivos. La reacción de estos genotipos fue de compatibilidad (susceptibilidad), indicando que la inoculación fue exitosa (Cuadro 5.1).

En la evaluación de progenitores, genotipos como Yunguilla mostraron reacción de incompatibilidad (resistencia) al patógeno causante de antracnosis. Je.Ma,

Mar 3, Vax 2, Catrachita, Beldakmi RR9 y Belmineb RMR 3 fueron resistentes a roya. PI181996 y G2333 mostraron incompatibilidad a los dos patógenos (Cuadro 5.1). Debido a que los genotipos que fueron altamente susceptibles a antracnosis murieron a causa de la enfermedad (Foto. 5.1), se determinó que la mejor secuencia de inoculación sería antracnosis primero y roya después (antracnosis-roya), ya que el número de individuos para la evaluación de roya es menor, después de que la antracnosis disminuye el número de individuos de la población.

Cuadro 5.1 Evaluación de progenitores a secuencia de inoculación antracnosis/roya, roya/antracnosis e inoculaciones individuales de roya y antracnosis bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.

Genotipo	Calificación según escala de evaluación*					
	Roya	Ant ⁺	Roya-Ant		Ant-Roya	
Yunguilla	4	1	5	1	1	4
Concepción	4	4	4	7	7	4
G 916	4	8	3	7	9	-
PI 181996	1	1	1	1	1	1
BelDakMi RR9	2	9	3	9	7	3
BelMiNeb RMR3	3	9	3	7	7	4
Mar 3	1	9	1	7	7	3
Vax 2	1	7	2	7	7	3
G 2333	1	1	2	1	1	2
Catrachita	1	7	1	7	7	1
Je.Ma	1	7	1	6	7	3
Paragachi (ts ant.)	5	9	5	9	9	-
Red Small Garden (ts roya)	6	9	6	9	9	-

* Escala de evaluación para antracnosis, de severidad de uno a nueve (Alzate-Marín *et al*, 1996).

Escala de evaluación numérica para roya, propuesta por Stavely (1983) de acuerdo al número y tamaño de lesiones que se presenta.

+ = antracnosis

(ts ant) = testigo susceptible a antracnosis.

(ts roya) = testigo susceptible a roya.



Figura 5.1. Genotipos progenitores susceptibles a *C. lindemuthianum*.



Figura 5.2. Genotipos progenitores susceptibles a *U. appendiculatus*.

Luego de la identificación de la mejor secuencia de inoculación, el siguiente estudio consistió en la evaluación de resistencia a antracnosis y roya de las poblaciones F_2 provenientes de cruza simples: (Concepción/PI 181996, Mantequilla/PI 181996 y Yunguilla/Beldakmi RR 9), excepto la población G 916/Belmineb RMR 3, la cual fue evaluada únicamente para resistencia a roya. En la población G 916/Belmineb RMR 3, fueron observados cinco individuos con síntomas de enanismo causado por la incompatibilidad genética entre la recombinación de pool genético andino y mesoamericano. La secuencia de inoculación usada en estas poblaciones fue antracnosis-roya. Para la evaluación, fueron empleadas las razas 453 de *C. lindemuthianum* y 0:61 de *U. appendiculatus*. Los individuos susceptibles con

reacciones de 7 a 9 a antracnosis fueron eliminados y los resistentes fueron inoculados con roya.

En la población Concepción/PI 181996 se encontró el mayor número de individuos resistentes a antracnosis, 34 individuos de un total de 40 plántulas evaluadas, que corresponde al 85%, como se observa en el Cuadro 5.2. Además presentó el mayor número de individuos, 33 plántulas, con resistencia a roya que corresponde al 99%. La relación de individuos resistentes - susceptibles fue de 5:1, lo que demuestra que al menos un gen mayor de resistencia a roya y a antracnosis están involucrados en la reacción observada. Al final de las evaluaciones, en esta población fueron identificados 33 individuos con resistencia a antracnosis y roya (Cuadro 5.3). Los genes mayores provenientes de PI 181996, que confieren resistencia a antracnosis y roya pueden ser la causa de la relación de 5:1 observada. El o los genes de resistencia a antracnosis del PI 181996 aún no están identificados, para roya posee el gen mayor de resistencia *Ur-11* (Johnson *et al.*, 1995).

Un total de 53 plántulas de la población Mantequilla/PI 181996 fueron inoculadas con *C. lindemuthianum*, 21 genotipos (40%) fueron resistentes a antracnosis (Cuadro 6). Seguidamente, estas plantas fueron inoculadas con *U. appendiculatus* y se observó que de los 21 genotipos resistentes a antracnosis, nueve fueron susceptibles a roya (43%) y 12 resistentes (57%). Con esta evaluación fue comprobada la efectividad del gen de resistencia a roya *Ur-11*, presente en PI 181996 (Cuadro 5.3).

En la población Yunguilla/BelDakMi RR9, fueron identificados 27 individuos resistentes (55%) a antracnosis (*C. lindemuthianum*) y 22 individuos susceptibles (45%) (Cuadro 5.2). Los 27 individuos fueron inoculados con roya (*U. appendiculatus*) 16 fueron resistentes y 11 susceptibles (Cuadro 5.3). En ambas evaluaciones se obtuvo una relación similar de 1:1. Un total de 16 genotipos (32%) de esta población, fueron resistentes a antracnosis y roya (Cuadro 5.3).

La población G916/BelMiNeb RMR3, solamente fue evaluada para reacción a roya, 22 individuos fueron resistentes y 16 susceptibles (Cuadro 5.3).

La mayor cantidad de individuos resistentes a roya fueron observados en las cruzas cuyo progenitor fue PI181996 poseedor del gen mayor *Ur-11*, el cual es efectivo para las razas de roya identificadas en Ecuador. La raza de roya 0:61 (*U. appendiculatus*) utilizada tiene el espectro de virulencia más amplio (Paucar *et al.*, 2005), como se observa en el Cuadro 5.6, infecta a los genotipos diferenciales Early Gallatin (*Ur-4*) y Golden Gate Wax (*Ur-6*) (Steadman *et al.*, 2002b). En las poblaciones cuyos progenitores son BelDakMi RR9 y BelMiNeb RMR3, no se encontró alto número individuos resistentes a roya, pues es probable que los individuos hayan segregado el *Ur-4* y *Ur-6* que no son efectivos para la resistencia a esta raza (Paucar *et al.*, 2005).

En este estudio se evaluó la respuesta a antracnosis (*C. Indemuthianum*) y roya (*U. appendiculatus*) de los genotipos progenitores: Yunguilla, Concepción, PI 181996, G 916, BelDakMi RR9 y BelMiNeb RMR3, lo que permitió establecer la respuesta esperada a los patógenos y confirmar la reacción obtenida de la población F₂. Además, la respuesta de los genotipos susceptibles a cada enfermedad, confirmó la eficiencia de la inoculación.



Fotografía 5.3. Genotipos resistentes y susceptibles a *C. lindemuthianum*, provenientes de cruzas simples.



Foto 5.4 Puntos blancos previos a la formación de pústulas de roya en un genotipo susceptible de cruza simples.

Cuadro 5.2. Evaluación de resistencia a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) de poblaciones de cruza simples de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.), bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.

Genotipo	Evaluación según escala de evaluación*		
	Total plantas evaluadas	Plántulas susceptibles	Plántulas resistentes
Concepción x PI 181996	40	6	34
Mantequilla X PI 181996	53	21	32
Yunguilla x BelDakMi RR 9	49	22	27
Concepción	4	4	0
Mantequilla	4	4	0
PI 181996	4	0	4
Yunguilla	4	0	4
BelMiNeb RMR3	4	4	0
BelDakMi RR 9	4	4	0
G916	4	4	0
Paragachi (ts)	4	4	0

* Escala de evaluación para antracnosis, de severidad de uno a nueve (Alzate-Marín *et al.*, 1996).

ts = testigo susceptible a antracnosis.

Cuadro 5.3. Evaluación de resistencia a roya (*Uromyces appendiculatus*) de genotipos resistentes a *C. lindemuthianum*, provenientes de cruzas simples de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.), bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.

Genotipo	Evaluación según escala de evaluación*		
	Total plantas evaluadas	Plántulas susceptibles	Plántulas resistentes
Concepción x PI 181996	34	1	33
Mantequilla X PI 181996	32	9	12
Yunguilla x BelDakMi RR 9	27	11	16
G916 x BelMiNeb RMR 3	38	16	22
Concepción	4	4	0
Mantequilla	4	4	0
PI 181996	4	4	0
Yunguilla	4	4	0
BelMiNeb RMR3	4	0	4
BelDakMi RR 9	4	0	4
G916	4	0	4
Red Small Garden (ts)	4	4	

* Escala de evaluación numérica para roya, propuesta por Stavely (1983) de acuerdo al número y tamaño de lesiones que se presenta; ts= testigo susceptible a roya.

El tercer estudio consistió en la evaluación de poblaciones F₁ provenientes de cruzas dobles para resistencia múltiple a enfermedades, mediante inoculación secuenciada antracnosis-roya-mancha angular. Estas poblaciones fueron: Concepción/PI181996//G619/BelMiNeb RMR3, 916/Concepción//Yunguilla/BelDakMi RR9, G916/BelMiNeb RMR3//Concepción/PI 181996 y Yunguilla/BelDakMiRR9//G916/Concepción (cuadro 5.4). Se realizaron dos tipos de evaluaciones, la primera corresponde a la reacción individual de cada genotipo a cada uno de los patógenos (roya, antracnosis y mancha angular) bajo inoculación secuenciada y, una segunda evaluación se registró la reacción de cada genotipo a las tres enfermedades de forma simultánea.

La población G916/BelMineb RMR3//Concepción/PI 181996 presentó 54 plantas resistentes a antracnosis y 38 susceptibles que corresponden al 57 % y 43%, respectivamente. La reacción a roya (*U. appendiculatus*) fue de 73 individuos resistentes y 19 individuos susceptibles, que corresponden al 79% y 21%, respectivamente (Cuadro 5.4). En la evaluación de resistencia a mancha angular, no se observó síntomas claros de la enfermedad que permitan discriminar a los genotipos susceptibles de los resistentes, sin embargo, la mayoría de individuos inoculados fueron

calificados con resistencia intermedia 4 (en la escala de severidad de uno a nueve). Finalmente, con respecto a la resistencia múltiple, 34 individuos de 92 plantas evaluadas presentaron resistencia a roya, antracnosis y mancha angular (Cuadro 5.4).

En la población Concepción/PI 181996//G916/Belmineb RMR3 proveniente de la cruce recíproca de la anterior, fueron evaluadas 80 plántulas y se registró 40 individuos resistentes (50%) y 40 susceptibles (50%) a antracnosis (*C. lindemuthianum*), que corresponde a una relación 1:1. Con respecto a roya, 33 individuos fueron resistentes (66%) y 16 susceptibles (34%). En la evaluación de resistencia a *P. griseola*, fueron identificados 18 individuos resistentes (69%) y 8 individuos susceptibles (31%). Finalmente en esta población, se obtuvieron 33 individuos resistentes a las enfermedades antracnosis y roya y un total de 18 individuos resistentes a *C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* y *P. griseola* (Cuadro 5.4).

En la población G916/Concepción//Yunguilla/Beldakmi RR9 fueron evaluados 32 individuos para reacción a antracnosis (*C. lindemuthianum*), de los cuales 18 individuos fueron resistentes y 14 susceptibles que corresponde al 56% y 44%, respectivamente (Cuadro 5.4). En la evaluación de resistencia a roya (*U. appendiculatus*), se identificaron 28 individuos resistentes (88%) y 4 susceptibles (12%). En la evaluación de mancha angular (*P. griseola*), los síntomas fueron de resistencia intermedia (reacción 4) en todas las plantas evaluadas. 18 individuos presentaron resistencia intermedia. Al final, en esta población se obtuvieron 18 individuos con resistencia simultánea y múltiple a tres enfermedades: antracnosis, roya y mancha angular (Cuadro 5.4).

En la población Yunguilla/Beldakmi RR9//G916/Concepción provenientes de la cruce recíproca fueron evaluados un total de 43 plántulas para reacción a antracnosis (*C. lindemuthianum*). 22 individuos presentaron resistencia y 21 fueron susceptibles que corresponde al 51% y 49%, respectivamente. Con respecto a la evaluación de resistencia a roya (*U. appendiculatus*), se obtuvieron 21 individuos resistentes (53%) y 19 susceptibles (47%). Finalmente, en la evaluación de resistencia a mancha angular (*P. griseola*), se obtuvieron reacciones de resistencia intermedia (reacción 4) similar que a la población anterior (recíproca). 13 individuos presentaron reacciones este tipo de

resistencia. finalmente, 13 individuos fueron resistentes a los tres patógenos (*C. lindemuthianum*, *U. appendiculatus* y *P. griseola*) causantes de las enfermedades de antracnosis, roya y mancha angular respectivamente (Cuadro 5.4).

Es importante señalar, que el número total de plántulas evaluadas fue bajo debido a las heladas que ocurrieron en la Granja Experimental Tumbaco, en las etapas de formación y llenado de vaina, donde mucha semilla. Según Singh (1991), el número mínimo de individuos de una población F1 provenientes de una cruce doble debe ser de 150, con el fin de analizar frecuencias genéticas de genotipos resistentes y susceptibles.

Las evaluaciones de resistencia de los progenitores permitieron confirmar las reacciones a cada patógeno, por las que fueron seleccionados como donadores de genes de resistencia. Los genotipos Yunguilla y PI 181996 fueron resistentes a *C. lindemuthianum*, el tipo de reacción registrada de ambos progenitores fue de inmunidad (reacción 1). Los genotipos PI 181996, BelDakMi RR-9 y BelMiNeb RMR-3 fueron resistentes a *U. appendiculatus*. Finalmente, el genotipo G916 fue resistente (reacción 1) al aislamiento de *P. griseola* (Cuadro 5.4).

Los testigos susceptibles a cada enfermedad, confirmaron el adecuado manejo del patógeno, así como un correcto procedimiento de inoculación. El testigo susceptible a antracnosis, Paragachi, tuvo una reacción de nueve en la escala de severidad (1 a 9) a este patógeno. Red Small Garden, testigo susceptible a roya, registro una reacción de 6 en la escala de evaluación de tipo de reacción (1 a 6). En los testigos susceptibles a *P. griseola*, Cocacho y Bola Pallatanga, se registraron reacciones de 7 y 9 de susceptibilidad en la escala de severidad (1 a 9) (Cuadro 5.4).

Cuadro 5.4. Evaluación de resistencia individual y múltiple a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), roya (*Uromyces appendiculatus*) y mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) de poblaciones de cruzas dobles de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.), bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP 2006.

Genotipos	TP ⁺	Calificación según escala de evaluación*							
		Antracnosis		Roya		Mancha angular		ant+roy	ant+roy+m.a
		R	S	R	S	R	S	R	R
Concepción/PI 181996//G916/BelMiNeb RMR-3	80	40	40	33	16	18	8	33	18
G 916/BelMiNeb RMR-3//Concepción/PI 181996	92	54	38	73	19	34	6	40	34
G 916/Concepción//Yunguilla/BelDakMi RR-9	32	18	14	28	4	18	0	18	18
Yunguilla/BelDakMi RR-9//G 916/Concepción	43	22	21	21	19	13	0	13	13
Yunguilla	4	4	0						
Concepción	4	0	4						
G916	4					4	0		
PI 181996	4	4	0	4	0				
BelMiNeb RMR-3	4			4	0				
BelDakMi RR-9	4			4	0				
Paragachi (ts ant)	4	0	4						
Red Small Garden (ts roya)	4			0	4				
Bola Pallatanga (ts roya, m.a)	4					0	4		
Cocacho (ts m.a)	4					0	4		

* Escala de evaluación para antracnosis, de severidad de uno a nueve (Alzate-Marín *et al.*, 1996).

Escala de evaluación numérica para roya, propuesta por Stavely (1983) de acuerdo al número y tamaño de lesiones que se presenta. Escala de evaluación de severidad de uno al nueve, para mancha angular (CIAT, 1989).

+ Total plantas evaluadas. ts= testigo susceptible. ant= antracnosis; m.a= mancha angular



Fotografía 5.5. Genotipos susceptibles y resistentes a *U. appendiculatus*, provenientes de cruzas dobles.



Fotografía 5.6 Genotipos resistentes y susceptibles a *C. lindemuthianum*, provenientes de cruces dobles.



Fotografía 5.7. Síntomas de roya y antracnosis en genotipos provenientes de cruces dobles.

El set de diferenciales de roya y antracnosis que están conformados por 12 genotipos, seis genotipos del pool andino y seis genotipos del pool mesoamericano, fueron inoculados para confirmar la raza de los patógenos usados en las evaluaciones. La raza de antracnosis (*C. lindemuthianum*) que fue utilizada en las evaluaciones de resistencia al patógeno fue la 453, la misma que fue inoculada en los genotipos diferenciales. Es una raza de amplio espectro de virulencia debido a que quiebra la resistencia de genes del pool andino *Co-11* y *Co-1*³ y del pool mesoamericano *Co-3*, *Co-4* y *Co-4*³ (Cuadro 5.5). Sin embargo, la mayoría de genes del pool andino mostraron resistencia a este aislamiento, lo que valida la utilidad de estos genes en

programas de mejoramiento de resistencia a antracnosis. Además, el genotipo Yunguilla mostró resistencia a este aislamiento de *C. Lindemuthianum* confirmando que es un buen donador de genes de resistencia a antracnosis.

Cuadro 5.5 Reacción del set de diferenciales a la raza inoculada de antracnosis, bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.

<u>Diferenciales</u>	<u>Genes</u>	<u>Valor binario⁺</u>	<u>Reacción*</u>
1 Michelite	Co-11	1	+
2 MDRK	Co-1	2	-
3 Perry marrow	Co-1 ³	4	+
4 Cornell 49242	Co-2	8	-
5 Widusa	Co-1 ⁵	16	-
6 Kaboon	Co-1 ²	32	-
7 México 222	Co-3	64	+
8 PI 207262	Co-4 ³	128	+
9 To	Co-4	256	+
10 Tu	Co-5	512	-
11 AB 136	Co-6, Co-8	1024	-
12 G 2333	Co-7, Co-4 ² , Co-5	2048	-

* + = compatibilidad; - = incompatibilidad.
+ = raza inoculada de antracnosis 453.



Fotografía 5.7 Reacción del set de genotipos diferenciales a la raza de *C. lindemuthianum* inoculada.

La raza de roya que se inoculó en las evaluaciones fue 0:61, es la más compleja (mayor espectro de virulencia) de todos los aislamientos con los que cuenta el PRONALEG-GA. (Paucar *et al.*, 2005). Esta raza fue inoculada en el set de 12 genotipos diferenciales. Ninguno de los diferenciales correspondientes al pool mesoamericano fueron compatibles (susceptibles) a este aislamiento de roya, estos genes de resistencia son *Ur-3*, *Ur-3+*, *Ur-5*, *Ur-7* *Ur-cnc1*, *Ur-cnc2* y el *Ur-11*. Los genes: *Ur-4*, *Ur-9*, *Ur-12* y *Ur-6* y los genes desconocidos de Montcam y PI 260418 presentes en los diferenciales andinos fueron compatibles (susceptibles) con la raza 0:61, solamente el gen *Ur-13* presente en el diferencial ocho (Redlands pionner) fue incompatible (resistente) (Cuadro 5.6).

Cuadro 5.6. Reacción del set de diferenciales de roya a la raza inoculada, bajo invernadero, Santa Catalina, INIAP, 2006.

<u>Diferenciales</u>	<u>Genes</u>	<u>Valor binario</u>	<u>Reacción*</u>
1 Great Northern 1140	Ur-7	1	-
2 Aurora	Ur-3	2	-
3 México 309	Ur-5	4	-
4 México 235	Ur-3+	8	-
5 CNC	Ur-cnc1, Ur-cnc2	16	-
6 PI 181996	Ur-11	32	-
7 Early Gallatin	Ur-4	1	+
8 Redlands Pionner	Ur-13	2	-
9 Montcalm	Ur-¿	4	+
10 PC 50	Ur-9, Ur-12	8	+
11 Golden Gate Wax	Ur-6	16	+
12 PI 260418	Ur-¿	32	+

+ = compatibilidad; - = incompatibilidad

5.2 Amplificación de los marcadores SCARs: “SAE19” para el gen *Ur-11* de resistencia a roya.

El marcador SAE19 fue probado en 10 ocasiones distintas para determinar la utilidad y replicabilidad de este para el Programa de Mejoramiento genético. El marcador fue evaluado en un grupo de genotipos de fréjol, los cuales son empleados por el PRONALEG-GA como padres recurrentes, que no poseen el gen de resistencia a roya; de la misma manera, el marcador fue evaluado en algunos genotipos que pertenecen al germoplasma andino y que han presentado reacciones de susceptibilidad a aislamientos de roya. Adicionalmente, el marcador SAE19 también fue evaluado en genotipos del germoplasma mesoamericano, en los que se conoce la presencia o ausencia del gen *Ur-11* para confirmar la correcta evaluación.

Ninguno de los materiales andinos (Cuadro 5.7) y susceptibles mesoamericanos amplificaron la banda, excepto el genotipo BelDakMi RMR16, el cual fue el único material que amplificó en todas las ocasiones. Esto puede deberse a una recombinación en este material, entre el gen y el marcador no homólogo de tamaño similar (Johnson *et al.*, 1995). Una vez confirmado que ninguno de los materiales recurrentes amplifica la banda, se descartó la utilidad del marcador para nuestras cruzas, ya que el programa de mejoramiento genético se orienta a recuperar las características de grano comercial de estos materiales.

La amplificación del marcador no fue aplicada en las poblaciones provenientes de las cruzas simples y dobles, debido a que ninguno de los progenitores resistentes a roya como: PI181996, BelMiNeb RMR3 y BelDakMi RR9 involucrados en estas poblaciones, proporcionó resultados satisfactorios. De acuerdo a Johnson (1995), se debe realizar un screening preliminar de los progenitores con el fin de verificar la utilidad de este marcador en una población derivada de los mismos.

De acuerdo a Johnson (1995), para definir la utilidad, distribución y grado de recombinación entre el RAPD del que se derivó el SCAR y la resistencia de PI 181996, fueron investigadas un grupo de muestras de genotipos de fréjol común andino, centroamericano y algunos materiales en los que fue introducida la resistencia de PI

181996. Ninguno de los genotipos andinos amplificó la banda de ausencia (Tabla 5.1), algunos materiales con resistencia derivada de PI 181996, amplificaron la ausencia y presencia del alelo de resistencia. Otros materiales, incluyendo genotipos mesoamericanos, no amplificaron ni el RAPD OAC20₄₉₀ en fase de acoplamiento, ni el RAPD OAE19₈₉₀ en fase de repulsión. Johnson *et al* (1995), además sugiere que la amplificación de las dos bandas en un mismo material, puede deberse a que las secuencias observadas en materiales susceptibles son homólogos a los del RAPD OAC20₄₉₀; esto fue observado en materiales mesoamericanos pero no sucede lo mismo en materiales andinos. Los autores sugieren además que el uso de estos marcadores dependerá de la orientación del marcador con el alelo de resistencia y el tipo de población bajo análisis; además sugiere que, el uso de los marcadores será más útil cuando se introduce la resistencia de PI 181996 en germoplasma de fréjol que no tenga la banda en fase de acoplamiento, y sí en fase de repulsión. Bajo estos criterios, se deben realizar pruebas preliminares de amplificación de los progenitores para desarrollar poblaciones específicamente con genotipos progenitores que amplifiquen la banda, solamente así se podría determinar si la progenie posee o no la banda. El genotipo BelMiDak RR·3 fue probado por Johnson (1995) en el desarrollo del RAPD OAE19₈₉₀ y amplificó la banda de ausencia y presencia de la resistencia de PI 181996. y en el RAPD OAE19₈₉₀ y la distancia de recombinación fue determinada en más de 6cM (Johnson *et al.*, 1995). Por otro lado, Queiroz (2003), estandarizó el protocolo del SCAR SAE19 en una población cuyo progenitor susceptible era mesoamericano y el progenitor resistente era BelMiDak RR3. En este caso, la distancia de recombinación del RAPD OAE19₈₉₀ y el SCAR SAE19 fue de 1cM (Queiroz *et al*, 2003). Esto sugiere que no todos los materiales pueden amplificar, en especial los de origen andino. Finalmente, Johnson explica que la especificidad del pool genético entre la fase de acoplamiento y repulsión de marcadores previamente identificados merece especial atención, ya que los mismos pueden tener una aplicación limitada de acuerdo al tipo de material usado en las cruzas de los programas de fitomejoramiento del fréjol.

De acuerdo a Queiroz (2003), en el estudio de conversión de RAPD a SCAR, se puede establecer una distancia de recombinación específica para cada población generada en la que se introdujo la resistencia de PI 181996. Esto fue determinado en la población Rudá/BelMidak RR3. el genotipo Ruda es susceptible a roya, tipo

mesoamericano, del cual fue clonado la banda RAPD para derivar el SCAR; BelMiDak RR3 es el genotipo en el que se introdujo el gen de resistencia *Ur-11* del PI 181996 y que amplificó con los dos RAPDs (OAE19₈₉₀ y el OAC20₄₉₀) ligado al gen de resistencia *Ur-11*.

Similarmente, la ausencia de amplificación en genotipos andinos sucede con el gen de resistencia a roya *Ur-4*, cuyo origen es andino, sin embargo cuando se generan poblaciones con resistencia a roya con este gen, solamente genotipos mesoamericanos amplifican el SCAR ligado al *Ur-4* (Miklas *et al.*, 1993). Es probable que la recombinación del gen que se genera en los genotipos derivados de cruza de progenitores andinos y mesoamericanos, con progenitor recurrente mesoamericano, sea homólogo al fragmento del marcador ligado al gen (Johnson *et al.*, 1995).

Tabla 5.1. Ocurrencia del RAPD OAE19₈₉₀ en fréjol común.

Tipo^a	OAE19₈₉₀	Tipo^a	OAE19₈₉₀
Fréjol arriñonado (A)	-	Fréjol negro (MA)	
3M-152	-	B 85003	-
CDRK	-	B-190	+
CELRK	-	La Vega	+
Linden	-	XAN 176	-
Montcalm	-		
Royal Red	-		
Plant Introduction (A)		Plant Introduction (MA)	
PI 151385	-	PI 181996	-
PI 151388	-	PI 195369	-
		PI 195376	-
		PI 201486	-
		PI 311159	-
		PI 451895	-
Fréjol vainita (A+MA)		Fréjol rojo (MA)	
*Beljersey RR-14	+	8437-95	-
*Beljersey RR-15	-	DOR 346	+
*Beljersey RR-16	+	Ecuador 299	-
*Beljersey RR-17	-		
Eagle	-		
Early Gallatin	-		
Sprite	-		
Fréjol crema moteado (MA)		Fréjol rojo pequeño (MA)	
Arapaho	-	*Belmidak RR-1	-
Bill Z	-	*Belmidak RR-2	-
ND 88-065-42	+	*Belmidak RR-3	+
Othello	+	*Belmidak RR-4	+
P 90521	+	*Belmidak RR-5	-
PX-057	-	*Belmidak RR-6	-
*2-2186	+	C 20	+
*3-4510	+	NX-040	+
3-4537	-	Mayflower	+
Beldakmi RR-1	-	Sanilac	+
*Beldakmi RR-2	-	Schooner	+
*Beldakmi RR-3	-	Seafarer	-
*Beldakmi RR-4	-	Arroyo Loro	+

^a A=Andino, MA=Mesoamericano, RR=Resistente a roya

+ = presente, - = ausente; * = germoplasma dentro del cual fue introducida la resistencia de PI 181996

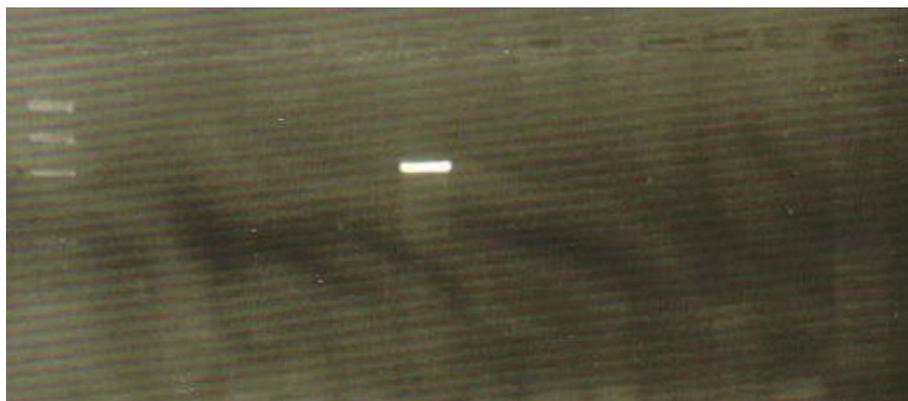
Cuadro 5.7. Ocurrencia del SCAR SAE19 en genotipos andinos y mesoamericanos de fréjol común, Santa Catalina, INIAP, 2006.

Genotipo	SAE19	Genotipo	SAE19
Paragachi (A**)	-	Yunguilla (A)	-
Concepción (A)	-	G 916 (A)	-
Beldakmi RR-9 (MA)	-	Belmineb RMR-3 (MA)	-
RSG* (MA)	-	PI 181996 ⁺ (MA)	-
Cocacho (A)	-	Beldakmi RMR-16 ^a (MA)	+
Beldakmi RR-5 (MA)	-	Mantequilla/PI 181996 p4 (A+MA)	-
Concepción/PI 181996 p4 (A+MA)	-	Yunguilla/Beldakmi RR-9 p4 (A+MA)	-
G 916/Belmineb RMR-3 p2 (A+MA)	-	Aurora (MA)	-
México 309 (MA)	-	México 235 (MA)	-
Compuesto Negro Chimaltenango (CNC) (MA)	-	Je.Ma (A)	-

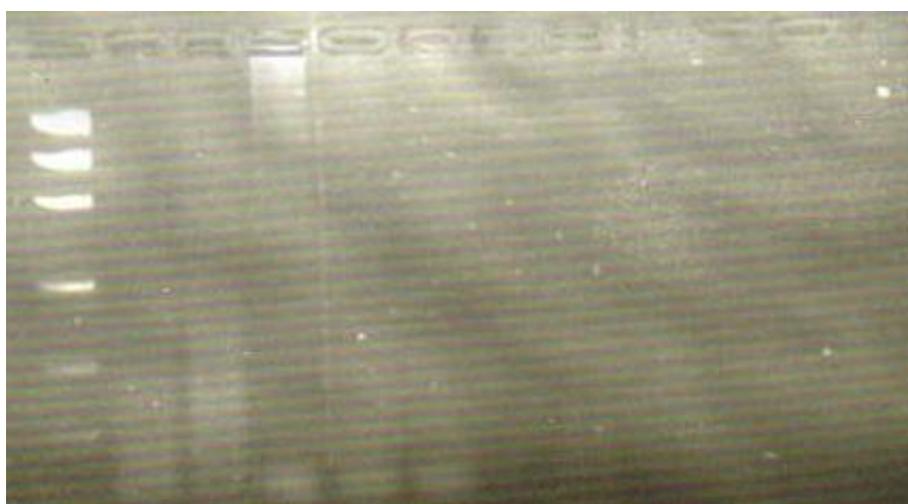
* = testigo positivo amplificación, ⁺ = testigo negativo amplificación, ^a = único genotipo con banda.

+ = presencia, - = ausencia.

**= A= andino, MS= mesoamericano



LML 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



LML 14 15 16 17 18

1	Aurora	10	Je.Ma
2	México 309	11	Cocacho
3	México 235	12	BelDakmi RR9
4	CNC	13	G 916
5	RSG	14	BelMiNeb RMR3
6	BelDakMi RMR16	15	BelDakMi RR5
7	PI181996	16	Concepción
8	Paragachi	17	Mantequilla
9	Yunguilla	18	Control sin ADN

LML Low mass lader

Fotografía 5.8. Visualización de la amplificación del marcador SAE19 progenitores

6. CONCLUSIONES

El objetivo de este estudio fue el de comprobar la efectividad del método de selección de gametos en la primera generación F_1 de cruzamientos dobles para conseguir resistencia múltiple a las enfermedades roya, antracnosis, mancha angular y virus del mosaico común, asistido por marcadores moleculares y las siguientes conclusiones fueron obtenidas:

La secuencia antracnosis-roya-mancha angular es la mejor forma de evaluar resistencia múltiple, ya que cada patógeno es inoculado en diferentes estados fenológicos de la planta; antracnosis en etapa de hoja primaria, roya a la presencia del primer trifolio y mancha angular al despliegue completo del tercer trifolio, descartándose así que las reacciones de resistencia a los patógenos se deba a protección cruzada que ocurre en el fréjol al ser infectado inicialmente por un patógeno, debido al periodo de tiempo que ocurre entre cada inoculación.

Los genes de resistencia para antracnosis y roya, procedentes de los progenitores, permitieron la selección clara de genotipos resistentes y susceptibles. Esto no sucedió con mancha angular, debido a que los genes de resistencia no son conocidos y estos provienen de un solo progenitor, G916, además es probable que al ser el único donador, la contribución genética a la progenie sea muy baja, por lo que se obtuvieron síntomas de resistencia intermedia.

La ventaja que brinda el inocular antracnosis inicialmente es que, por la velocidad y severidad de la infección, las plántulas susceptibles pueden ser eliminadas

de forma temprana y, de esta manera, reducir el número de plántulas para la siguiente evaluación.

Un grupo de genotipos derivados de las cruzas dobles presentaron resistencia múltiple a las tres enfermedades. Estos genotipos heredaron los genes que confieren la resistencia a estas enfermedades de los padres donantes.

El marcador SCAR `SAE19', para el gen de resistencia a roya, *Ur-11*, no es aplicable para la selección de genotipos de fréjol común de origen andino. La razón responde a que ninguno de los progenitores evaluados, de las poblaciones bajo estudio, que presentan una reacción de susceptibilidad a roya, amplificaron la banda que indica susceptibilidad al patógeno causante de roya.

7. RECOMENDACIONES

Para los individuos seleccionados como resistentes para las tres enfermedades, se recomienda evaluar la segregación de los genes que confieren resistencia, en generaciones avanzadas, para confirmar la inclusión de la resistencia múltiple en un genotipo homocigótico.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se recomienda hacer una evaluación de los patógenos sobre genotipos susceptibles a los mismos, para evaluar el comportamiento de los mismos en las inoculaciones artificiales realizadas en invernadero. Esto debido a, que las condiciones ambientales retardan los periodos de incubación y latencia de los patógenos, haciendo que el número de evaluaciones de síntomas aumente con el fin de confirmar las reacciones a las enfermedades. Además, las condiciones ambientales pueden suprimir la acción infectiva de los patógenos si no se llegan a obtener parámetros ambientales óptimos para el desarrollo y multiplicación de los hongos fitopatógenos.

Para eliminar posibles falsos positivos en una población F_2 pueden realizarse evaluaciones para dos patógenos en este caso antracnosis y roya, y en la siguiente generación, podría realizarse la evaluación de resistencia a otra enfermedad, como mancha angular, en campo, pues las condiciones que se presentan allí son las necesarias para el desarrollo de la enfermedad, además es probable que exista una suficiente presión de inóculo natural o se podría realizar una inoculación del aislamiento del patógeno en campo.

Cuando las poblaciones obtenidas por hibridación entre genotipos mesoamericanos y andinos son evaluadas mediante marcadores moleculares, se recomienda realizar evaluaciones preliminares con genotipos probados, en lo posible en el desarrollo de los marcadores, sobre todo cuando el gen de interés es de origen mesoamericano, ya que existe la posibilidad de que los marcadores no sean aplicables a diferentes tipos de poblaciones dependiendo del pool genético de los progenitores.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adam-Blandom, A; Seignac, M; Bennerot, H y Dron, M. 1994. A genetic map of common bean to localize specific resistance gene against anthracnose. *Genome* 37: p.915-924
- Alzate-Marin, A; Baía, GS; Júnior, TJP; Carvalho, GA; Barros, EG; Moreira, MA. 1997. "Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB 136". *Plant Disease* 81(9): 996-998.
- Asensio, V. Asensio, M. López R. 2001. "Resistencia múltiple a enfermedades de judías en Castilla y León". ITA de Castilla y León. p 1-9.
- Baladin, R. Jarosz, A y Kelly. J. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology* 87(12): 1184-1191.
- Beebe, S; Pastor-Corrales, M. 1991. Breeding for disease resistance. *In* Eds A van Schoonhoven; O. Voysest. *Common Beans: Research for Crop improvement* C.A.B. Int., Wallingford, UK y CIAT, Cali, CO. p. 561-617.
- Bennink, M. 2005. Eat beans for good health. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. p 1-5.
- Bean Improvement Cooperative (BIC). 2005. Rust. Consultado el 4 de diciembre de 2006. Se lo encuentra en www.css.msu.edu/bic.
- Bean Improvement Cooperative (BIC). 2005. Angular leaf spot. Consultado el 24 de octubre de 2006. Se lo encuentra en www.css.msu.edu/bic
- Bean Improvement Cooperative (BIC). 2005. Anthracnose. Consultado el 28 de agosto de 2005. se lo encuentra en www.css.msu.edu/bic

- Cáceres, O; Morales, F. 1985. Incorporación de genes de resistencia dominante y recesiva a cepas del virus del mosaico común en dos variedades comerciales de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.). Acta Agr. 35(4):7-20.
- Carvalho, G. Paula, T. Alzate-Marín, L. Nietsche, S. Barros, E y Moreira, M. 1998. Heranca da resistencia da linhagem AND-277 de feijoeiro-comun a raca 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificacao de marcador RAPD ligado ao gene de resistencia. Fitopatología Brasileña. 23: 482-485.
- CIAT (Centro de Investigación de Agricultura Tropical, CO). 1980. La roya del fríjol y su control. Eds. H. Schwartz; F. Correa; P. Guzmán. Cali, CO. p. 22-26.
- CIAT (Centro de Investigación de Agricultura Tropical, CO). 1981. La antracnosis del fríjol y su control. Eds. H. Schwartz; M. Pastor-Corrales; F. Correa. Cali, CO. p.24-29
- CIAT (Centro de Investigación de Agricultura Tropical, CO). 1994. La mancha angular del fríjol y su control. Eds. H. Schwartz; M. Pastor-Corrales; F. Correa. Cali, CO. p.27
- CIAT (Centro de Investigación de Agricultura Tropical, CO). 1998. Bean production problems in the tropics. 2 ed. Eds. Schwartz, H; Pastor- Corrales, M. Cali, CO. 726p.
- Claros, G. 2006. Marcadores moleculares: Qué son, como se obtienen y para qué valen?. Málaga, España. Consultado el 01 de marzo del 2006. Se lo encuentra en www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc431/markers/opbs.okstate.edu/Melchor/MG/MG01.html.
- Cubero, J. 1999. "Introducción a la mejora genética vegetal". Ediciones Mundi-Prensa. Madrid – España. P.p: 96 – 112.

Eraza, N. 2006. “Evaluación de 214 líneas fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) para resistencia a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), mediante selección asistida por marcadores moleculares con fines de mejoramiento genético”. Informe del proyecto de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agropecuario, Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA, Escuela Politécnica del Ejército ESPE

Johnson, E. Miklas P. Stavely, J y Martínez-Cuadrado J. 1995 Coupling and repulsion of PI 181996 rust resistance in common bean . Theoretical and applied genetics. 90: 659-664.

Falconí, E. 2002. “Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. – Magn.) Scrib., en el Ecuador y evaluación de la resistencia de 25 genotipos del germplasma de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) del INIAP. Santa Catalina – Pichincha. Tesis Ing. Agr. Quito, EC. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 57p.

FAO (Food and Agricultural Organization). 1982. Key statistics of food and agriculture. Consultado el 01 de diciembre de 2006. Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/toptrade/trade.asp?lang=EN>

FAO (Food and Agricultural Organization). 1984. World crop and livestock statistics. Consultado el 1 de diciembre de 2006. Disponible en : <http://www.fao.org/statistics/historical/Default.aspx>.

FAO (Food and Agricultural Organization)1998. Census of agriculture. Consultado el 10 de diciembre de 2006. Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/census/wcares/default.asp>

FAO (Food and Agricultural Organization).2005. WORLD CROP AND LIVESTOCK STATISTICS 1948-85. Consultado el 15 de diciembre de 2006. Disponible en <http://www.fao.org/es/ess/historical/Default.aspx>.

- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, EC). 2002. III Censo Nacional Agropecuario. Resultados nacionales y provinciales. Quito, EC. p.66-72.
- INIAP. Santa Catalina – Pichincha. Tesis Ing Agr. Quito, EC. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 57p.
- Gálvez, G. 1991. Manual de recetas culinarias de frijol. CIAT- PROFRIZA (Programa de frijol del CIAT para la zona andina). Pp iv-v.
- Girffiths, A. Gelbart, W. Miller, J. Lewontin, R. 1999. Genética moderna. Mc Graw Hill Editores. Madrid – España. 615p.
- Guzmán, P. Gilberston, R. Nodari, W. Johnson, W. Temple, S. Mandala, D. Mkandawire, A. Gepts, P. 1995. Characterization of variability in the fungus *Pheoisariopsis griseola* suggest coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology* 85(5): 600-607.
- Kelly, J.D; Miklas, P.N. 1998. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular Breeding* 4:1-11.
- Kelly, J.D. 2005. Mejora y genética vegetal. Michigan State University. Michigan, EU. s.p.
- Kornegay, J; Cardona, C. 1991. Breeding for insect resistance in beans. *In* Eds. A van Schoonhoven; O. Voysest. *Common Beans: Research for Crop improvement* C.A.B. Int., Wallingford, UK y CIAT, Cali, CO. p. 619-648.
- Lépiz, R; Minchala, L; Jiménez,R y Villacis, M. 1993. INIAP 414 “Yunguilla”. Plegable No 134.
- Miklas, P; Stavely, J; Kelly, J. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theoretical Applied Genetics* 85:985-993.

- Miklas, P. 2005. DNA markers (SCARS) linked with disease resistance traits in bean (*Phaseolus vulgaris*). Consultado el 23 de octubre de 2006. Disponible en <http://www.css.msu.edu/bic/pdf/SCAR%20Markers.pdf> y en <http://www.usda.prosser.wsu.edu/miklas/Scartable3.pdf>
- Montes-R, C y White, J. 1996. "Effect of selection for pollen grain size on various traits in common bean. *Euphytica* 90(1): 59-63.
- Morales, F; Singh, P. 1993. Breeding for resistance to bean golden mosaic virus in an interracial population of *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica* 67:59-63.
- Murillo, A. Falconí, E. Mazón, N. Peralta, E. 2005. Resistance sources for rust, angular leaf spot and common bacterial blight in common bean for Ecuador. Annual report of the Bean Improvement Cooperative 2005. p 229-230.
- _____. Paucar, B. Falconí, E. Peralta, E. 2004. Virulence Spectrum of *Uromyces appendiculatus* Populations in Northern Ecuador during 2003 and 2004.
- _____. 2006. Método de selección por gametos y variedades mejoradas. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA) del INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias). Estación Experimental Santa Catalina. Comunicación personal.
- Navarrete-Maya, R. et al; 1999. Multiple disease resistance in bean genotypes from a core collection (CIAT) grown in central Mexico.
- Ochoa, J., E. Cruz, and A. Murillo. 1999. Resistencia parcial y pérdidas de rendimiento de variedades de fréjol arbustivo de Ecuador. 3er Taller de PREDUZA en Resistencia Duradera en cultivos alto-andinos en Zona Andina. Cochabamba – Bolivia. pp 74-86.

- Pachico, D. 1989. Trends in world common bean production. Ed S. Singh. Bean productions problems in the tropics. p 1—8.
- Pañeda, A. 2005. Desarrollo de herramientas moleculares para la localización de genes de interés en la mejora genética de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Doctorado. Oviedo-ES. Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional. 188p.
- Pastor-Corrales, M. A. 2003. Sources, genes for resistance, and pedigrees of 52 rust and mosaic resistant dry bean germplasm lines released by the USDA Beltsville Bean Project in collaboration with Michigan, Nebraska and North Dakota Agricultural Experiment Stations. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. 46: 235-241.
- Paucar, B. Murillo, A. Falconí, E. Peralta, E. 2005. Pathogenic Variability of *Uromyces appendiculatus* in Northern Bean Production Areas in Ecuador.
- Peralta, E; Pinzón, J; Vásquez, J; Lépiz, R. 1992. “El fréjol arbustivo en Imbabura: Sugerencias para su cultivo”. Quito, EC. PROTECA (Programa Tecnológico Agropecuario, EC)/ INIAP. 24p.
- _____. 1995. Las leguminosas de grano comestible en el Ecuador y el aporte del Programa Nacional de Leguminosas del INIAP. INIAP-PROFIZA. In: RELEZA(5 Junio 5 al 9 de 1995. Ibarra, EC). Ibarra, EC. p. 1-3.
- _____; Murillo, A y Pinzón, J. 1997. Fréjol, su importancia económica, ecológica y social y la oferta tecnológica del Programa Nacional de Leguminosas. In Ed. D, Danial. Primer Taller de Predusa (Proyecto de Resistencia Duradera en Cultivos Altos de la Zona Andina). Quito, Ecuador. p. 5-7.
- _____; Murillo, A; Caicedo, C; Pinzón, J; Rivera, M. 1998. Manual agrícola de leguminosas, cultivos y costos de producción”. Quito, EC. INIAP/ PROFIZA/CRSP-U. Minnesota. p. 8-11.

- _____ ; Murillo, A; Pinzón, J. 1998. El aporte genético de las leguminosas de grano comestible. Reunión de Leguminosas de Grano de la Zona Andina. (RELEZA VI) (4, Santa Cruz, BO). Santa Cruz, BO. p. 17 – 18.
- _____ ; Murillo, A. Pinzón, J. Lépiz, R. Ortega, A. 1996. INIAP – 418 JE.MA. Plegable divulgativo 160.
- _____ ; Mazón, N. Murillo, A. Pinzón, J. CIAL Cuenca del Río Mira. 2004. INIAP 414 Yunguilla. Plegable 253.
- Poehlman, J. 1965. Mejoramiento genético de las cosechas. Editorial Limusa-Wiley. México D.F-México. p 249-250.
- PROFRIZA (Proyecto de fríjol del CIAT para la zona andina). 1994. Control integrado de antracnosis y ascoquita CIA. Informe Segunda Fase 1991 – 1993. Documento de trabajo 141. p. 37.
- PRONALEG-GA (Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos). 2005. Informe anual 2004: Actividades en fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.). Quito – Ecuador.
- PRONALEG-GA (Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos). 2006. Informe anual 2005: Actividades en fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.). Quito – Ecuador.
- PRONALEG-GA (Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos). 2006. Taller de enfermedades en fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Ibarra - Ecuador. Ficha de enfermedades: Mancha angular.
- Queiroz, V. Sousa, C. Oliveira, T. Sanglar. D. Ragagnin, V, Barros, E y Moreira M. 2003. SCAR marker linked to the common bean rust resistance gene *Ur-11*. Annual report of the Bean Improvement Cooperative 2003. pp 271-272.

- Sanders, J y Schwartz, H. 1980. Bean production and pest constraints in Latin America. Eds. H Schwartz y G Gálvez. Bean production problems. p 3
- Schwartz, H. Brick, M. Nuland, D y Franc, G. 1996. Dry bean production and pest management. Regional bulletin 562A. p 72-76.
- Singh, S. Gepts, P. Debouck, D. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Economic Botany. 45(3): 379-396.
- _____. 1991. Conceptos básicos para el mejoramiento por hibridación. Fríjol: investigación y producción. Eds. M López. F Fernández. A Schoonhoven. p. 109-126.
- _____. 1994. Gamete selection for simultaneous improvement of multiple traits in common bean. Crops Science. 34 (2): 352-355.
- _____, S; Muñoz, C. 1997. Resistance to common bacterial blight among phaseolus species and common bean improvement. Crop Sciences 39:80-89.
- _____. 1998. "Uso de marcadores y selección de gametos para el mejoramiento simultáneo de caracteres múltiples de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.). Agronomía Mesoamericana 9: 1-9.
- _____. Cardona, C. Morales, F. Pastor-Corrales, M y Voysest, O. 1998. "Gamete selection for upright Carioca bean with resistance to five disease and a leafhopper. Crop Science 38: 666-672.
- _____. 1999. "Integrated genetic improvement. *In*: Common bean improvement in the twenty-first century. Singh, S. ed. Khrwer Academic Publishers. Dordrecht, p 1-24; 98-99.

- Ragagnin, V. Arruda, D. Oliveira, T. Moreira, M. Barros, E. 2003. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose and angular leaf spot to cultivar Perola assisted by molecular markers. Annual report of the Bean Improvement Cooperative 2003. p 156-160.
- Staub, J. 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding.
- Stavely, J. 1983. The modified Cobb scale for estimating bean rust intensity. *Phytopathology*, 74:1334-1339
- Stavely, J; Pastor- Corrales, M. 1989. Rust. *In* Eds. Schwartz, H y Pastor- Corrales, M . Bean production problems in the tropics. CIAT (Centro de Investigación de Agricultura Tropical, CO). Cali, CO. p.159-194.
- _____. 1982. Pathogenic specialization in *Uromyces phaseoli* in the United States and rust resistance in beans. *Plant Disease* 68: 95-99.
- Steadman, J.R., M.A. Pastor-Corrales and J.S. Beaver. 2002b. An overview of the 3rd bean rust and 2nd bean common bacterial blight international workshops, March 4-8, 2002, Pietermaritzburg, South Africa. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. 45:120-124.
- Terán, H. 2000. Efectividad del método de selección por gametos en la F1 de cruces múltiples para resistencia a enfermedades en fríjol común, *Phaseolus vulgaris* L. Tesis Ing. Agrop. Cali, CO. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 85 p.
- Voyset, O y López, M. 1986. Mejoramiento genético por introducción y selección. CIAT, CO. Cali, CO. 27p.
- Voyset, O. 2000. Mejoramiento genético del fríjol. CIAT, CO. Cali, CO. 74p.

- W. C. de Jesus Junior, F. X. R. do Vale, R. R. Coelho, B. Hau, L. Zambolim, L. C. Costa y A. Bergamin Filho. 2005. Effects of Angular Leaf Spot and Rust on Yield Loss of *Phaseolus vulgaris*. Annual report of the Bean Improvement Cooperative. 251p.
- Young, R; Kelly. J. 1996. Characterization of the genetic resistance to *Colletrotichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. Plant Disease 80 (6): 650-654.
- Young, R.A., Melotto, M., Nodari, R.O. y Kelly, J.D. 1998. Marker assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in common bean cultivar, G 2333. Theoretical and applied genetics. 96: 87-94.

