

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**SELECCIÓN DE LÍNEAS DE FRÉJOL ARBUSTIVO
(*Phaseolus vulgaris* L.) CON RESISTENCIA A SEQUÍA Y
PUDRICIÓN DE RÁIZ MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES
Y MÉTODOS CONVENCIONALES.**

Previa a la obtención de grado académico o título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

PRISILA ALEXANDRA CASTRO MORENO

SANGOLQUÍ, 9 DE JUNIO DEL 2010

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Prisila Alexandra Castro Moreno

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIA ACADÉMICA

Dra. Vanessa Andrade

Sangolquí, 9 de junio de 2010

CERTIFICACIÓN

CERTIFICO QUE EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN SU TOTALIDAD POR LA SRTA. PRISILA ALEXANDRA CASTRO MORENO COMO REQUERIMIENTO PARCIAL A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

SANGOLQUÍ, 9 DE JUNIO DE 2010

Dra. Karina Proaño
DIRECTORA

Dra. Patricia Jiménez
CODIRECTORA

REVISADO POR

Abg. Vanessa Andrade
SECRETARIA ACADEMICA

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “Selección de líneas de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) con resistencia a sequía y pudrición de raíz mediante técnicas moleculares y métodos convencionales”, realizado por la egresada Prisila Alexandra Castro Moreno, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, financiado el proyecto FRÉJOL-SEQUÍA-SENACYT (21000535018), se deja en libertad de la autora y del INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf.). Se autoriza a Prisila Alexandra Castro Moreno que lo entregue al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinados de la Carrera.

Sangolquí, 9 de Junio de 2010

Ing. Rafael Vargas

COORDINADOR DE CARRERA

Ing. Eduardo Peralta

CODIRECTOR (INIAP)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, PRISILA ALEXANDRA CASTRO MORENO

DECLARO QUE:

La tesis de grado titulada “SELECCIÓN DE LÍNEAS DE FRÉJOL ARBUSTIVO (*Phaseolus vulgaris* L.) CON RESISTENCIA A SEQUÍA Y PUDRICIÓN DE RAÍZ MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES Y MÉTODOS CONVENCIONALES”, ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 9 de junio de 2010

PRISILA ALEXANDRA CASTRO MORENO

AUTORIZACIÓN

TODO EL CONTENIDO DEL PRESENTE TRABAJO, ASÍ COMO LOS CUATROS, TABLAS Y DEMÁS RESULTADOS OBTENIDOS, PODRÁN SER UTILIZADOS O REPORDUCIDOS EN LA PÁGINA WEB DE LA ESPE

PRISILA ALEXANDRA CASTRO MORENO

DEDICATORIA

Dedico todo el esfuerzo de este trabajo a los tres seres que más amo en este mundo y que son los más importantes de mi vida; a mi padre Luis Miguel, a mi madre Sandra y a mi hermana Sharon. Son ustedes tres los principales autores de la persona que soy hoy en día, han sido la motivación para no decaer y terminar lo que inicie. A ustedes tres que durante años han sido mi familia, mis confidentes y mis amigos al mismo tiempo, les dedico esta investigación por la confianza desmedida que tienen en mí, por su apoyo constante y por haber compartido las preocupaciones y las alegrías no solo dentro de la carrera más bien durante toda la vida.

Prisila A. Castro Moreno

AGRADECIMIENTO

“La verdadera enseñanza no es aquella que infunde nociones bien definidas si no la que capacita para que cada uno se forme por sí mismo buenas nociones.”

J. M. de Gerando

Ante todo quiero agradecer a Dios por darme la vida y permitirme compartir junto a personas visionarias, alturistas y bondadosas que he tenido el placer de conocer.

Agradezco a todas las personas que indistintamente en el tiempo me apoyaron y orientaron en la realización de esta investigación.

A mi querida universidad ESPE, que permitió formarme como profesional y fue mi segunda casa durante cinco años de carrera, donde tuve la oportunidad de conocer a excelentes tutores y compartir momentos inolvidables con mis compañeras y amigas.

A todos los docentes y personal que integran la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, en especial a mi directora de tesis la Dra. Karina Proaño y mi codirectora la Dra. Patricia Jiménez por su cautelosa dirección, oportunos consejos y apoyo en la realización del presente trabajo.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, por permitirme realizar la presente investigación en su prestigiosa institución.

Al departamento de Leguminosas y Granos Andinos del INIAP dentro del cual agradezco muy atentamente al director el Ing. Eduardo Peralta y al codirector el Ing. Angel Murillo así como a todo su equipo de trabajo por darme el apoyo necesario, compartir su conocimiento y convertirse en buenos amigos.

Al Ing. Esteban Falconi, al Ing. Alfredo Dávila, al Ing. Diego Rodriguez por ser excelentes tutores, compartir sus conocimientos y ayudarme a lo largo de la investigación tanto en campo como en el laboratorio.

A la Ing. Paola Estrella, al Ing. Christian Segovia y al Ing. Nelson Mason por todo su apoyo en la elaboración de la tesis.

A la Ing. Anita Davila, a la Ing. Mishell Cardenas y a la Sra. Maria Batallas por ser compañeras y amigas dentro del departamento.

Al Departamento de Biotecnología del INIAP, en especial al Dr. Eduardo Morillo por permitir realizar la investigación molecular dentro de sus laboratorios.

A mis compañeras y amigas del Departamento de Biotecnología; Paty, Gaby, Anita, Carolina y Diego por su ayuda en el laboratorio.

A mis amigas, que en un inicio fueron compañeras de aula y terminaron siendo mis confidentes de vida; Katy M., Adriana R., Paola E., Diana G., Andy P., María V. y Johana E. por toda la historia que tenemos juntas.

A mi amiga Estefanía S. por ser la principal gestora en que haga la tesis en el INIAP y más aun por sus consejos y ayuda constante.

A una amiga que se transformo en mi hermana y se ha ganado mi cariño incondicional Analia Urgilez mi conciencia, gracias por toda tu ayuda, apoyo y motivación desmedida tanto dentro de esta investigación como en mi vida.

A todos mis amigos y familia este logró es tan suyo como mío, porque me acompañaron en cada paso desde el inicio de la carrera hasta el final de esta investigación; compartiendo buenos y malos momentos, sacrificios y alegrías. A todos ustedes solo me queda decir muchas gracias.

Prisila A. Castro Moreno

INDICE

A. Legalización de Firmas.....	II
B. Certificación de Autoría.....	III
C. Certificación de INIAP.....	IV
D. Declaración de Responsabilidad.....	V
E. Autorización de Publicación.....	VI
F. Dedicatoria.....	VII
G. Agradecimiento.....	VIII
H. Lista de Tablas.....	XIII
I. Lista de Cuadros	XIV
J. Lista de Figuras	XVI
K. Resumen.....	XVII
L. Abstrac	XVIII
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1 Formulación del problema.....	19
1.2 Justificación.....	21
1.3 Objetivos.....	22
1.4 Descripción del Fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	23
1.4.1 Origen y Distribución de <i>Phaseolus vulgaris L.</i>	23
1.4.2 Descripción Botánica de <i>Phaseolus vulgaris L.</i>	24
1.4.3 Importancia de <i>Phaseolus vulgaris L.</i> en el Ecuador y el Mundo.....	25
1.5 Factores que afectan al cultivo de fréjol.....	28
1.5.1 Pudrición seca de raíz por <i>Fusarium solani</i>	29
1.5.1.1 Etiología y Epidemiología.....	30
1.5.1.2 Sintomatología.....	30
1.5.1.3 Fuentes de resistencia a <i>Fusarium solani</i>	30
1.5.1.4 Controles tradicionales de prevención.....	31
1.5.1.5 Controles químicos de prevención.....	31
1.5.2 Estrés hídrico.....	32
1.5.2.1 Mecanismo de Escape.....	33
1.5.2.2 Mecanismo de Evasión.....	33

1.5.2.3 Mecanismo de Tolerancia.....	33
1.5.2.4 Fuentes de Resistencia.....	33
1.6 Técnicas convencionales de mejoramiento.....	34
1.7 Técnicas moleculares de mejoramiento.....	36
1.7.1 Marcadores Moleculares.....	37
1.7.2 RAPDs (DNA Polimórfico Amplificado al Azar).....	39
1.7.3 Selección asistida por marcadores moleculares (MAS).....	41
1.8 Caracteres Cuantitativos.....	42
1.9 Análisis de QTLs (Loci de Caracteres Cuantitativos).....	43
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
2.1 Ubicación geográfica.....	45
2.2 Evaluación de líneas resistentes a <i>Fusarium solani</i> por método convencional.....	45
2.2.1 Material vegetal.....	45
2.2.2 Aislamiento de <i>Fusarium solani</i>	46
2.2.3 Evaluación de Incidencia de Infección.....	47
2.2.4 Análisis estadístico.....	48
2.3 Evaluación de líneas resistentes a sequía por método convencional.....	48
2.3.1 Material vegetal.....	48
2.3.2 Condiciones de siembra y controles durante el ensayo.....	49
2.3.3 Variables evaluadas.....	51
2.3.4 Análisis Estadístico.....	52
2.4 Evaluación de líneas resistentes a <i>Fusarium solani</i> y a sequía por medio de marcadores moleculares.....	52
2.4.1 Recolección de muestras.....	52
2.4.2 Extracción y Cuantificación del ADN.....	53
2.4.3 Amplificación de marcadores RAPDs.....	53
2.4.4 Selección de individuos dentro de las poblaciones F_2	55
2.4.5 Análisis de bandas.....	55
3. RESULTADOS.....	56
3.1 Evaluación de líneas resistentes a <i>Fusarium solani</i> por método convencional.....	56
3.2 Evaluación de líneas resistentes a sequía por método convencional.....	61

3.3 Evaluación de líneas resistentes a <i>Fusarium solani</i> por medio de marcadores moleculares.....	63
3.4 Evaluación de líneas resistentes a sequía por medio de marcadores moleculares.....	71
4. DISCUSIONES.....	74
4.1 Evaluación de líneas resistentes a <i>Fusarium solani</i> por medio de método convencional y de marcadores moleculares.....	74
4.2 Evaluación de líneas resistentes a sequía por medio de método convencional y de marcadores moleculares.....	78
5. CONCLUSIONES.....	82
6. RECOMENDACIONES.....	85
7. BIBLIOGRAFÍA.....	86
8. ANEXOS.....	92

Lista de Tablas

Tabla 1. Características de los Germoplasmas del fréjol (CIAT, 1989).	24
Tabla 2. Tipos de hábitos de crecimiento del fréjol y sus características (FENALCE, 2007 & Voysest, 2000).....	25
Tabla 3. Superficie de producción de fréjol común en Ecuador (Peralta et al, 2007)	26
Tabla 4. Variedades de fréjol sembradas en los valles del Chota y Mira durante el 2005 (Fuente: Subía et al., 2007)	27
Tabla 5. Contribución nutricional del fréjol para un consumo de 15 kg per capita (Adaptada de Pennington y Young (1990) y Robinson (1987)).	28
Tabla 6. Marcadores RAPDs para resistencia a <i>F. solani</i> , Santa Catalina, 2009.	40
Tabla 7. Marcadores RAPDs para resistencia a estrés hídrico, Santa Catalina, 2009.	40
Tabla 8. Líneas de fréjol utilizadas para evaluar resistencia a <i>F. solani</i> , Santa Catalina, 2009.	46
Tabla 9. Líneas de fréjol para evaluar resistencia a sequía, Santa Catalina 2009.	49
Tabla 10. Marcadores moleculares RAPDs empleados relacionados con la resistencia a <i>Fusarium solani</i> (flanqueantes) y a la resistencia a sequía (independientes), Santa Catalina 2009.	54
Tabla 11. Receta para 1 Rx (Murillo, 2002).	54
Tabla 12. Análisis de variancia para 18 líneas de fréjol para la resistencia a <i>F.</i> <i>solani</i> , Santa Catalina 2009.....	56
Tabla 13. Clasificación de las medias de tres repeticiones según la escala de evaluación de resistencia a <i>F. solani</i> de CIAT 2000 de líneas de fréjol, Santa Catalina, 2009.	57
Tabla 14. Medias del rendimiento (g de semilla/planta) de cada bloque del ensayo para resistencia a sequia en la Granja Experimental Tumbaco, 2009.	67
Tabla 15. Análisis de varianza del peso de semilla en gramos por planta para 16 líneas de fréjol F6 combinando los dos tratamientos, Tumbaco 2009.	68

Tabla 16. Análisis de varianza del rendimiento de 16 líneas para dos tratamientos, Tumbaco 2009.....	69
Tabla 17. Medias de rendimiento en gramos por planta de 16 líneas de fréjol F ₆ bajo dos tratamientos para la evaluación de resistencia a estrés hídrico, Tumbaco 2009.	70

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Características de los Germoplasmas del fréjol (CIAT, 1989).	24
Cuadro 2. Tipos de hábitos de crecimiento del fréjol y sus características (FENALCE, 2007 & Voysest, 2000)	25
Cuadro 3. Superficie de producción de fréjol común en Ecuador (Peralta et al, 2007).....	26
Cuadro 4. Variedades de fréjol sembradas en los valles del Chota y Mira durante el 2005 (Fuente: Subía et al., 2007)	27
Cuadro 5. Contribución nutricional del fréjol para un consumo de 15 kg per capita (Adaptada de Pennington y Young (1990) y Robinson (1987).	28

Lista de Figuras

Figura 1. Delimitación de bloques y parcelas para la siembra bajo, Granja Experimental Tumbaco 2008.....	50
Figura 2. Frecuencia de riegos aplicados en el ensayo para resistencia a estrés hídrico desde la siembra hasta el día 92 a la siembra, Santa Catalina, 2009.	50
Figura 3. Raíces de la línea CO3104 infectada.....	58
Figura 4. Raíces de la línea Imbabello infectada.....	59
Figura 5. Raíces de la línea NSL.....	59
Figura 6. Raíces de la línea NBP infectada.....	60
Figura 7. Raíces de la línea CO3108 infectada.....	60
Figura 8. Visualización de la amplificación de cuatro marcadores moleculares RAPDS para resistencia a <i>F. solani</i> a) marcador AL20 ₈₅₀ b) marcador O12 ₈₀₀ c) marcador G8 ₁₄₀₀ d) marcador S19 _{1000/1100} , Santa Catalina 2009..	62
Figura 9. Datos de temperatura en grados centígrados registrados en el ensayo para resistencia a estrés hídrico desde la siembra hasta el día 92 a la siembra, Santa Catalina 2009.	63
Figura 10. Datos de dos tensiómetros en centibares registrados en el ensayo para resistencia a estrés hídrico desde la siembra hasta el día 92 a la siembra, Santa Catalina, 2009.	64
Figura 11. Bloque 2 del tratamiento bajo estrés, Tumbaco 2008.	64
Figura 12. Bloque 4 del tratamiento sin	65
Figura 13. Síntomas de amarillamiento y	65
Figura 14. Surco del bloque 4 del tratamiento.....	66
Figura 15. Plagas presentes en las hojas de fréjol en.....	66
Figura 16. Amplificación de nueve marcadores RAPDs a) marcador OA04 ₅₆₀ b) marcador OA08 ₇₈₀ c) marcador OAB18 ₆₅₀ d) marcador OF01 ₅₂₀ e) marcador OH19 ₆₉₀ f) marcador OH18 ₇₁₀ g) marcador OZ08 ₇₅₀ h) marcador OX18 ₉₈₀ i) marcador OX11 ₆₈₀ , Santa Catalina 2009.....	72

RESUMEN

Se realizaron dos ensayos para evaluar morfo-agronómicamente la resistencia a *F. solani* y la resistencia a estrés hídrico. Así como se realizó un ensayo en laboratorio para la evaluación de los marcadores RAPDs para cada resistencia, con el objetivo de corroborar los datos obtenidos en campo con los datos obtenidos en laboratorio. La evaluación de la resistencia a *F. solani* mediante el método morfo-agronómicos se realizó en el invernadero de Santa Catalina de INIAP. Se inoculó el patógeno por inmersión (2×10^6 conidias/ml) a dieciocho líneas de fréjol de tipo cranberry (14 IBLs, dos controles y dos padres de la cruce) a los 20 días de sembradas. La evaluación se realizó a los 60 días de la inoculación, valorando de 1 a 9 (escala de CIAT, 1999) según el estado de infección de la raíz. Se clasificó a los genotipos de acuerdo a su resistencia a *F. solani* en tres grupos teniendo líneas de fréjol: resistentes, moderadas y susceptibles. Se encontró que la línea CO3108 fue la más resistente y su contraparte la línea CO3104 se consideró como la más susceptible del ensayo. La evaluación de la resistencia a sequía por método morfo-agronómico para las dieciséis líneas de fréjol se realizó en la Granja Experimental Tumbaco del INIAP. Se sembraron las líneas de fréjol bajo una cubierta controlando el ingreso de agua y aplicando dos tratamientos: bajo estrés (frecuencia de riego cada 15 días) y sin estrés (frecuencia de riego cada 5 días). Una vez finalizado el ciclo, se cosechó el material vegetal y evaluó el rendimiento (g de semilla/planta) de cada línea de fréjol. Se clasificó a los genotipos con la aplicación de la media geométrica, obteniendo dos grupos: líneas resistentes (valores sobre la media geométrica) y líneas de fréjol susceptibles (rendimiento bajo la media geométrica). Se encontró que la línea A1P20 fue la más resistente y su contraparte la línea Concepción se consideró como la más susceptible del ensayo. La evaluación con marcadores moleculares para las dos resistencias se realizó con cuatro marcadores RAPDs de tipo flanqueante para la resistencia a *F. solani* y nueve marcadores RAPDs relacionados a genotipos resistentes y susceptibles para la resistencia a sequía. En los dos casos; los marcadores RAPDs empleados en el presente estudio presentaron polimorfismo insuficiente para diferenciar genotipos susceptibles de genotipos resistentes.

ABSTRACT

Two trials were conducted to evaluate morpho-agronomical resistance to *F. solani* and resistance to water stress. As a trial was conducted in the laboratory for evaluation of RAPD markers for each resistance; with the purpose of confirming the field data, with data from the lab. The evaluation of resistance to *F. solani* by morpho-agronomic method was performed in the greenhouse at Station Santa Catalina of INIAP. The pathogen was inoculated by immersion (2×10^6 conidia / ml) to eighteen lines of type cranberry beans (14 IBLs, two controls and two parents of the cross) at 20 days of sowing. The evaluation was performed 60 days after inoculation, which value was from 1 to 9 (scale of CIAT, 1999) as the infection status of the root. Genotypes were classified according to their resistance to *F. solani* in three groups having bean lines: strong, moderate and susceptible. It was found that line CO3108 was the most resistant, and the line CO3104 counterpart was considered the most susceptible of the test. The evaluation of drought resistance morpho-agronomic method for sixteen lines of beans was conducted in the Experimental Farm INIAP Tumbaco. Lines beans were sown under a cover, controlling the entry of water and applying two treatments under stress (frequency of watering every 15 days) and stress (frequency of watering every five days). Once the cycle had finished, the plant material was harvested and then evaluated by the yield (g of seed / plant) of each line of beans. Genotypes were classified with the application of the geometric mean, getting two groups: resistant lines (values above the geometric mean) and susceptible bean lines (values under the geometric mean). It was found that the line A1P20 was the most resistant and its counterpart the line Conception was considered the most susceptible of the test. The assessment with molecular markers for both resistance (resistance to *F. solani* and resistance to water stress) was performed with four flanking RAPDs markers for resistance to *F. solani* and nine RAPDs markers linked to resistant and susceptible genotypes for resistance to drought. In both cases, the RAPD markers used in this study showed insufficient polymorphism to differentiate susceptible genotypes of resistant genotypes.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La explotación agrícola de fréjol en el Ecuador está distribuida a lo largo del callejón interandino. El cultivo de fréjol enfrenta varios problemas, dentro de los cuales se identifican dos como principales: el estrés hídrico (sequía) y la pudrición de raíz por *Fusarium solani*. Se han identificado genotipos resistentes pero sin las características de interés comercial necesarias para su explotación, por esta razón el INIAP ha iniciado el desarrollo de poblaciones de líneas endogámicas retrocruzadas (IBLs) las cuales requieren ser evaluadas.

El proceso de desarrollo y evaluación de líneas de fréjol con resistencia a estrés hídrico y pudrición de raíz resulta complejo, por el tiempo empleado en cada evaluación. Los programas de mejoramiento para evaluar tanto la resistencia a sequía como la resistencia a *F. solani* realizan varios ensayos en campo con poblaciones extensas y teniendo que completar el ciclo de vida de la planta (90 días para *Phaseolus vulgaris*). Por lo tanto se requieren varios ciclos de cultivo con poblaciones de alto número de individuos para llegar a generaciones genotípicamente estables y que porten las características deseadas. Adicionalmente que el método convencional de evaluación para *F. solani* es destructivo puesto que las plantas deben ser extraídas para evaluar su raíz.

El método convencional utiliza como fuente de información y selección al fenotipo, por lo tanto los mejoradores se enfrentan a que estas características de resistencia al ser de carácter cuantitativo sean controladas por un extenso número de genes que pueden o no verse reflejados en el fenotipo directamente y que son afectados por el medio ambiente.

Consecuentemente, es necesario el desarrollo de técnicas que permitan simplificar el proceso, aumentar la confiabilidad de selección y acortar el tiempo de obtención de líneas mejoradas. Dentro de las técnicas modernas de selección, el uso de marcadores moleculares es una herramienta muy útil que

debe ser evaluada para las condiciones propias de cada programa de mejoramiento. Actualmente, programas internacionales de investigación han desarrollado una serie de marcadores moleculares, producto de Análisis de QTLs, que pueden ser validados para ser empleados en el Ecuador.

El presente trabajo procura evaluar y seleccionar a través de métodos convencionales las líneas resistentes a sequía y pudrición de raíz individualmente, esperando que esta información sea corroborada con los análisis de marcadores moleculares RAPDs, los cuales son específicos para cada característica de resistencia. Al final de la investigación se podrá presentar resultados de la selección de una o varias líneas portadoras de la resistencia a sequía o a *F. solani*, así como también proveer información de utilidad y aplicabilidad de marcadores moleculares como herramientas en la selección asistida en el Ecuador.

1.2 Justificación

En el Ecuador, el fréjol está considerado como un componente importante de la seguridad y soberanía alimentaria (Peralta *et al.*, 2007), siendo de vital importancia para la población urbana y rural del país, debido a que en zonas de escasos recursos económicos las proteínas de esta leguminosa reemplazan a la proteína animal (Subía *et al.*, 2007). Los cultivares de esta leguminosa encontrados a lo largo del callejón interandino enfrentan dos problemas importantes: la sequía y la pudrición de raíz por *F. solani*. En el país se estima que más del 60% de las zonas de producción sufren en diferente grado de estrés hídrico durante determinado momento del cultivo (Singh *et al.*, 1991). En cuanto a la pudrición de raíz, se ha determinado que en el Ecuador el patógeno de mayor incidencia es *F. solani*, sin embargo, el resto de patógenos que conforman el complejo de agentes causantes de pudriciones de raíz está ampliamente distribuido (Falconí *et al.*, 2005). Existen varias estrategias desarrolladas por el hombre para el control y atenuación de los efectos de estos problemas, pero es el control genético la estrategia más recomendada y viable tomando en cuenta que el cultivo de fréjol común es explotado mayormente por pequeños agricultores con limitados recursos económicos. Dentro del germoplasma de fréjol común, varios genotipos han sido identificados como fuentes de resistencia a estrés hídrico y a la pudrición de raíz, por poseer genes de interés y que pueden ser transferidos a cultivares ecuatorianos. Desafortunadamente, las fuentes de resistencia a las que se refieren los resultados de las investigaciones previas, no presentan características comerciales y, por lo tanto, no son aceptadas en los mercados locales. De la misma manera la hibridación simple, al cruzar fuentes de resistencia a sequía y cultivares comerciales de fréjol de Ecuador, no resulta en poblaciones con fenotipos deseados. Por esta razón, el INIAP ha iniciado el desarrollo de poblaciones de líneas endogámicas retrocruzadas (IBLs) las cuales requieren ser evaluadas para seleccionar las que presenten resistencia a estrés hídrico y a la pudrición de raíz junto con características comerciales, para una eventual entrega a los agricultores ecuatorianos.

Los métodos convencionales utilizados por los mejoradores enfrentan varias dificultades que incluyen el manejo de poblaciones extensas, tiempo de

evaluación y los métodos destructivos, problemas que podrían solucionarse al utilizar las herramientas biotecnológicas como los marcadores moleculares. Se han empleado estos marcadores en investigaciones previas como es el caso de la identificación de QTLs (Loci de Caracteres Cuantitativos) de resistencia para sequía y *F. solani* por medio de marcadores moleculares RAPDs (DNA polimórfico Amplificado al Azar), realizados por Schneider *et al.*, en 1997 y por Román B. & Kelly J. en el 2005 respectivamente. A diferencia del método convencional los marcadores moleculares no se ven influenciados por el medio ambiente, pueden ser aplicados en cualquier momento del desarrollo de la planta y no utilizan al fenotipo como base y criterio de selección, lo que permitiría reducir el número de individuos utilizados en la evaluación en una generación temprana, disminuir los ciclos de evaluación para obtener individuos portadores de la resistencia genéticamente estable y evitar la evaluación destructiva de los individuos.

1.3Objetivos

Objetivo General

Seleccionar líneas de fréjol arbustivo con resistencia a sequía y pudriciones de raíz mediante el uso de marcadores moleculares y métodos convencionales.

Objetivos Específicos

Validar la utilidad de los marcadores moleculares para seleccionar las líneas resistentes a sequía y pudrición.

Comparar la eficiencia del método convencional de selección con el uso de marcadores moleculares.

1.4 Descripción del Fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.), también conocido como frijol, habichuela o poroto, es la leguminosa de mayor distribución en el mundo, siendo cultivada en todos los continentes, a excepción del Antártico. El fréjol es considerado como uno de los cultivos más antiguos de América (Pañeda, 2005) y es consumido alrededor del mundo en forma de grano maduro (seco), inmaduro o en forma de hortaliza. La especie es muy diversa en términos de variabilidad morfológica y genética; así como en la adaptación al medioambiente, siendo cultivado en un rango altitudinal muy amplio, que se extiende desde el nivel del mar hasta los 3.000 m.s.n.m. Adicionalmente, el fréjol es cultivado bajo varios sistemas de siembra (unicultivo, asociado, relevo o intercalado) y es consumido de formas muy diversas (Broughton *et al.*, 2003). Por todo lo señalado, el fréjol es una de las leguminosas más importantes en el mundo.

1.4.1 Origen y Distribución de *Phaseolus vulgaris* L.

Las áreas de domesticación del fréjol común está comprendida entre el Norte de México y Noroeste de Argentina (Gepts & Bliss, 1985; Singh *et al.*, 1991^a). Las diferentes variedades actuales de fréjol son el producto de la evolución, selección y domesticación de las formas silvestres originarias de América remontándose a 7 000 o 10 000 años atrás. La domesticación produjo significativas permutaciones a nivel morfológico entre las especies silvestres y las cultivadas, de tal forma que, los dos grupos (domesticados y silvestres) pueden ser considerados muy distantes el uno del otro (Pañeda, 2005).

Por las características morfológicas y moleculares que presentan las variedades locales de fréjol que son cultivadas en América, los investigadores han logrado distinguir dos centros de domesticación: el Mesoamericano y el Andino (Cuadro 1). La explicación de la gran divergencia entre el germoplasmas de los distintos centros de domesticación puede deberse a la existencia de un paralelismo entre la variación genética y la distribución

geográfica de los cultivares de *P. vulgaris*, producido por el aislamiento espacial de las masas subcontinentales de América y el tipo de reproducción autógena del fréjol que impide el movimiento de genes y termina en la diferenciación de las poblaciones (Pañeda, 2005).

Tabla 1. Características de los Germoplasmas del fréjol (CIAT, 1989).

Germoplasma	Centro de domesticación	Razas	Características	Faseolina
Mesoamericano	México, América central y el norte de Suramérica hacia Brasil	Jalisco Durango Mesoamericano	Semillas pequeñas bractéolas grandes y ovaladas	A o B
Andino	Área comprendida en los países de cordillera Andina	Chile Nueva Granada Perú	Semilla grande bractéolas pequeñas y triangulares	T, H, y C

1.4.2 Descripción Botánica de *Phaseolus vulgaris* L.

El fréjol común es una especie dicotiledónea anual de reproducción autógena. Los genotipos de fréjol poseen un tallo principal que puede presentar una arquitectura erecta, semi-postrada o postrada con pigmentación verde, rojizo o púrpura (Voysesst, 2000). Contiene un número variable de ramas que pueden terminar en una inflorescencia o en un trifolio. Las hojas de fréjol son simples o compuestas, mientras que la flor papilionácea presenta un cáliz gamosépalo y dos bractéolas en su base de color verde y ovoide que persisten hasta poco después de la floración. Las vainas pueden ser planas o cilíndricas y alcanzar una longitud promedio entre 9 y 16 cm, éstas están compuestas por dos valvas que contienen a las semillas dispuestas en forma alterna (FENALCE, 2007). Las semillas de fréjol varían ampliamente con respecto al color, tamaño y forma. En cuanto al color de la semilla, los colores más comunes son: blanco, amarillo, beige, café, rojo, negro o combinaciones entre algunos de ellos. El tamaño de la semilla varía desde pocos milímetros en

especies silvestres hasta más de 20 mm en algunas especies domesticadas. Finalmente, la forma de la semilla puede ser cilíndrica, arriñonada, esférica u ovalada. Todas las características varían en su conjugación y dependen del tipo de germoplasma (Voyssest, 2000). Las plantas de fréjol pueden agruparse en cuatro tipos, de acuerdo con el hábito de crecimiento, como se detalla a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de hábitos de crecimiento del fréjol y sus características (FENALCE, 2007 & Voyssest, 2000)

Tipo	Habito	Características
Tipo I	Crecimiento determinado arbustivo	La altura de las plantas es de 30 a 50 cm, el tallo principal y las ramas laterales terminan en una inflorescencia, con una etapa de floración rápida y la madurez de las vainas de forma concentrada.
Tipo II	Crecimiento indeterminado arbustivo	El crecimiento erecto de los tallos no se detiene luego de ocurrida la floración, son plantas con bajo número de ramas y el tallo principal normalmente desarrolla una guía de escaso crecimiento.
Tipo III	Crecimiento indeterminado postrado	Presenta un hábito postrado o semipostrado, con un importante sistema de ramificación y aptitud trepadora a partir de las guías. La etapa de floración es más prolongada y la madurez de sus vainas es menos concentrada.
Tipo IV	Crecimiento indeterminado trepador	El tallo principal puede tener de 20 a 30 nudos y llega a medir 2 o más metros de altura. La floración es prolongada, pudiendo presentarse vainas casi secas en la parte basal de la planta, mientras en la parte alta continúa la floración

1.4.3 Importancia de *Phaseolus vulgaris* L. en el Ecuador y el Mundo

El fréjol común es cultivado en alrededor de 23 millones de hectáreas, con una producción aproximada de 21 millones de toneladas por año, lo que ha ubicado a esta especie en el tercer lugar por superficie cultivada a nivel

mundial entre las leguminosas, y en primer lugar en cuanto a las leguminosa de consumo humano directo. Adicionalmente, presenta una gran relevancia por su contenido nutricional y aporte en la economía de los pequeños y grandes agricultores. La producción y consumo de fréjol está fundamentalmente concentrado en países en vías de desarrollo sin embargo, un porcentaje significativo de la producción mundial se lo realiza en países desarrollados. En los países en vías de desarrollo, el fréjol contribuye con más del diez por ciento del requerimiento proteico diario de la población y con más del cinco por ciento del aporte energético de los alimentos, lo que representa un porcentaje significativo de la contribución de los alimentos. En Latinoamérica el consumo medio de esta leguminosa por persona por año no supera los 18 kg, mientras que en diferentes regiones africanas puede superar fácilmente los 60 kg /persona/año (Broughton *et al.*, 2003).

Dentro de Ecuador, el fréjol está considerado como componente de la seguridad y soberanía alimentaria, debido a su aporte nutricional rico en proteínas, carbohidratos, hierro, fósforo, zinc y fibra, en comparación con otros alimentos de alto consumo (Peralta *et al.*, 2007). Adicionalmente, tiene vital importancia para la población urbana y rural de Ecuador, puesto que en zonas de escasos recursos económicos, las proteínas de esta leguminosa reemplazan a la proteína animal (Subía *et al.*, 2007). La explotación agrícola del fréjol en el Ecuador está distribuida a lo largo de casi todo el callejón interandino (Cuadro 3), con variedades de tipo trepador en asociación con el maíz y los de tipo arbustivo presentes en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Bolívar, Cañar, Azua y Loja (Peralta *et al.*, 2007).

Tabla 3. Superficie de producción de fréjol común en Ecuador (Peralta et al, 2007)

Tipo de Fréjol	Hectáreas sembradas	Hectáreas cosechadas	Perdida	Porcentaje
Voluble	97 000	82 000	15 000	15.4 %
Arbustivo	24 000	22 000	2000	8.3 %

Las clases comerciales de fréjol de mayor producción en el Valle del Chota

y Mira son las de semilla de color rojo moteado y púrpura moteado (64%), que son exportadas al mercado colombiano principalmente (Subía *et al.*, 2007), seguidas por otras clases comerciales de semilla de color blanco (13.6%), amarillo (10.6%), rojo (6.1%), rosado moteado (1.5%) y negro (0.8%) que son cultivadas para el consumo interno (Cuadro 4).

Tabla 4. Variedades de fréjol sembradas en los valles del Chota y Mira durante el 2005
(Fuente: Subía *et al.*, 2007)

Color de Grano	Variedad		%
	Calima	Selva	
Rojo Moteado	Paragachi*	Concepción	
Morado Moteado	Cargabello	Cargabello	
	Toa*	Yunguilla	
Blanco	De leche	Fanesquero	
	Panamito		
Amarillo	Canario Chota*	Canario	10.6
	Matahambre		
Rojo	Capulí	Rojo	6.1
	Guiador		
Rosado Moteado	Uribe		1.5
Negro	Negro		0.8

Dentro del campo nutricional el fréjol contiene varias sustancias que forman parte de los requerimientos básicos de la nutrición humana (Cuadro 5), dentro de las más importantes encontramos a las proteínas (20-25 %) y vitaminas, como la biotina (Broughton *et al.*, 2003), ácido fólico (Martínez *et al.*, 2002). Adicionalmente es una fuente de micronutrientes como hierro, fósforo, magnesio, manganeso, zinc, cobre y calcio.

Tabla 5. Contribución nutricional del fréjol para un consumo de 15 kg per capita (Adaptada de Pennington y Young (1990) y Robinson (1987)).

Nutriente	Contenido en 125 g	Requerimiento (mg) para un Hombre adulto	% requerido por adulto por Porción
Sodio	0 mg	2200	0
Potasio	475 mg	3900	12
Calcio	65 mg	800	8
Fósforo	161 mg	800	20
Magnesio	56 mg	350	16
Hierro	2,78 mg	10	27
Zinc	1,24 mg	15	8
Cobre	0.307 mg	2.5	12
Manganeso	0.668 mg	3.75	18
Selenio	0.002 mg	0.05-0.2	1-4
Proteína	8.5 g	69 g	12

1.5 Factores que afectan al cultivo de fréjol

Al igual que todos los cultivos, el fréjol enfrenta problemas de carácter biótico y abiótico que perturban el desarrollo normal y la producción potencial del cultivo. En cuanto a problemas de carácter biótico, las enfermedades del follaje y pudriciones de raíz causadas por hongos son las más importantes, mientras que, dentro de los problemas de carácter abiótico el más importante en Ecuador es el estrés hídrico (Subía *et al.*, 2007).

Las enfermedades de fréjol causadas por hongos son las más comunes en Ecuador. Dependiendo el área de la planta a la que afectan se pueden clasificar como: enfermedades foliares dentro de los cuales se encuentra la roya causada por *Uromyces appendiculatus*, caracterizada por la aparición de pequeños puntos blancos, en el envés de la hoja que crecen hasta formar póstulas de color café con halo amarillo liberando esporas. La infección secundaria se da en vainas, tallos y ramas, los vectores de infección son las herramientas agrícolas, insectos y animales. Otra enfermedad foliar es la Antracnosis producida por *Colletotrichum lilndemuthianum* la cual es otra

enfermedad foliar que ataca a cualquier parte de la planta, ocasiona lesiones necróticas, chancros de forma redondas y pueden ser profundas. Su diseminación se da por semillas, gotas de agua de lluvia de planta a planta, insectos, y prácticas agrícolas (Peralta *et al.*, 2007)

Existen enfermedades de raíz como por ejemplo la causada por *Fusarium oxysporum*, que inicia con el amarillamiento de las hojas, hasta el marchitamiento y muerte de la planta. La forma de infección se produce por movimiento de suelo infectado, tejido infectado, agua de riego y semilla contaminada. Otra enfermedad de raíz son las agallas en la misma producida por *Meloidogyne spp*, que retrasa el crecimiento, produce amarillamiento, y la formación de agallas en las raíces primarias y secundarias lo que finalmente reduce el rendimiento. Dentro de este grupo también se encuentran la pudrición seca de raíz producida por el hongo *Fusarium solani* iniciando con la aparición de lesiones rojizas angostas longitudinales en la raíz primaria, la infección puede ocurrir por el movimiento de suelo infectado, tejido infectado, agua de riego y semilla contaminada (Peralta *et al.*, 2007).

1.5.1 Pudrición seca de raíz por *Fusarium solani*

Dentro de los problemas que afectan a la raíz del fréjol, la pudrición seca causada por el hongo *Fusarium solani* es la más extendida en el mundo. Este problema es muy frecuente en Brasil, Colombia, Perú, Ecuador, Chile Venezuela, Costa Rica y México, así como en países africanos como Kenia, Ruanda y Malawi. *Fusarium solani* infecta a la planta debilitándola, impidiendo el desarrollo total, produciendo la caída prematura de las hojas y amarillamiento del follaje por disminución de clorofila. La severidad de la infección depende de factores externos, como humedad, textura, compactación y temperatura del suelo (CIAT, 1990). Las pérdidas en rendimiento, bajo condiciones severas de infección, pueden alcanzar hasta el 53%, según la variedad sembrada.

1.5.1.1 Etiología y Epidemiología

Fusarium solani es un hongo saprófito facultativo, que presenta un color típico amarillento con pigmentos rojos en medio estándar PDA. Puede identificarse bajo el microscopio por sus macroconidias, microconidias, clamidósporas y microconidióforos. Tiene la capacidad de penetrar directamente los tejidos del fréjol o introducirse por heridas o aperturas naturales. El crecimiento óptimo del patógeno en medio de cultivo ocurre entre los 29°C y 32 °C, pero una alta severidad de la infección en planta sucede desde los 22 °C a 32 °C (CIAT, 1990). Prevalce en forma asociada a fragmentos de tejido del hospedero o en partículas de la materia orgánica (CIAT, 1989). Otra forma de sobrevivencia del hongo sucede por la colonización de cultivos no hospederos sin causar daños, o también, al formar clamidósporas que pueden permanecer latentes en el suelo por largos periodos (CIAT, 1990).

1.5.1.2 Sintomatología

Fusarium solani afecta al hipocótilo y raíz de la planta de fréjol desarrollando lesiones o betas rojizas que llegan a unirse y cambian a un color café según avanza la infección, extendiéndose hasta la superficie (Acosta *et al.*, 2006). Así, las raíces primarias y secundarias mueren adheridas a la raíz principal como residuos secos, mientras que, la parte inferior del tallo se vuelve medulosa o hueca. El marchitamiento poco pronunciado del follaje evidencia la infección, así como un crecimiento retardado y amarillamiento y caída prematura de las hojas (CIAT, 2006). Como reacción a la infección, la planta emite raíces adventicias para remplazar a las raíces afectadas.

1.5.1.3 Fuentes de resistencia a *Fusarium solani*

Dentro del germoplasma de *P. vulgaris* se ha reportado un gran número de genotipos que presentan distintos niveles de resistencia a la pudrición seca de

la raíz. Las fuentes más conocidas y empleadas en fitomejoramiento son: Jamapa, Porrillo 1, Black Turtle Soup, N.Y.211412, Gloria, Pinto U.I.114, Chimbolo, Bico de Ouro, ICA Tui, Porrillo Sintético, Cornell 49-242, Honduras 46 y Early Gallatin. La mayoría de estas fuentes de resistencia pertenecen al Acervo Mesoamericano y que, como característica común, poseen semilla pequeña (< 20g/100 semillas). Esta característica complica el proceso de mejoramiento para los cultivares Andinos de semilla grande (> 40g/100 semillas), pues las poblaciones que son producto de las cruzas entre estos dos acervos presentan semilla de tamaño intermedio, por lo cual siempre se requerirá de retrocruzas para recuperar el tamaño deseado para cultivares comerciales andinos (CIAT, 1989).

1.5.1.4 Métodos tradicionales de prevención

El prevenir la infección puede conseguirse al implementar prácticas culturales que incluyen: rotación por periodos largos con cultivos no hospederos como maíz y hortalizas, realizar prácticas de drenaje, disminuir la densidad de población en la siembra, desinfección de semilla e incremento de la tasa de carbono-nitrógeno para reducir la actividad del patógeno (BPA, 2006; CIAT, 1989).

1.5.1.5 Métodos químicos de prevención

Los dos métodos de prevención química son la desinfección de semilla y de suelo. La desinfección de semilla se la realiza al recubrir la testa con cualquiera de los siguientes productos: NABAM, FORMALDEHIDO, TIRAM, PCNB, BENOMIL (CIAT, 1989). Mientras que, la desinfección del suelo puede ser realizada mediante la aplicación, en forma "DRENCH", productos Carbendazim (BAVISTIN®), Benomil o PCNB (TERRACLOR®) en concentraciones muy bajas. Sin embargo, esta práctica resulta muy complicada y poco recomendada, ya que los agricultores realizan siembras manuales sin protección. La prevención de la infección de pudriciones de raíz, a través de la

aplicación de productos químicos, en estado de plántula resulta poco eficiente, porque ninguno de estos productos tiene un movimiento descendente en el sistema vascular. Lamentablemente este tipo de control afectan gravemente al ecosistema y son poco efectivos puesto que no benefician a las raíces laterales (BPA, 2006).

1.5.2 Estrés hídrico

El estrés hídrico, producido por la falta de agua disponible en el suelo, afecta en mayor o menor grado a las plantas de fréjol dependiendo del nivel de resistencia del cultivar. Los cultivares adaptados son producto de la evolución y selección del más apto por el mismo ambiente, de tal forma que, sólo los mejores genotipos sobreviven. La resistencia de un cultivar a la sequía puede definirse como la capacidad de este cultivar para producir mayor cantidad de semilla y biomasa en comparación de otros cultivares que presentan menor rendimiento bajo condiciones limitadas de humedad del suelo (Falconí, 2005). Así, las plantas resistentes a estrés hídrico han desarrollado tres tipos de estrategias para mejorar su desempeño en ambientes de sequía: escape, evasión y tolerancia.

1.5.2.1 Mecanismo de Escape

Los cultivares que, como estrategia de resistencia a sequía, emplean mecanismos de escape se caracterizan por presentar una germinación rápida después de la época de lluvia, un crecimiento acelerado, floración temprana y producción de semilla antes de la época de sequía, lo que permite a las plantas completar su ciclo de vida en un periodo corto de tiempo, aprovechando el agua disponible en el medio. Desafortunadamente, los genotipos precoces se caracterizan por no presentar altos rendimientos potenciales. Sin embargo, bajo estos casos algunos investigadores recomiendan incrementar la densidad de siembra, para así compensar la producción de semilla (Falconí, 2005).

1.5.2.2 Mecanismo de Evasión

La segunda estrategia, la evasión, consiste en la maximización del uso de agua o minimizar su pérdida, para lo cual los genotipos resistentes producen una raíz central profunda, tienen una regulación de la transpiración por los estomas, hojas pequeñas, movimientos paraheliotrópicos de las hojas y cutícula gruesas. Dentro de todas las características mencionadas, la más importante es el enraizamiento profundo. Sin embargo, es posible que el gasto de energía de la planta para desarrollar las raíces profundas sea alto y por consiguiente, la planta podría sacrificar la producción suficiente de semilla (Falconí, 2005).

1.5.2.3 Mecanismo de Tolerancia

Los mecanismos de tolerancia confieren a la planta la capacidad de mantener su actividad metabólica bajo niveles insuficientes de agua, para lo cual, desarrolla diferentes características que incluyen producción aminoácidos capaces de mantener la integridad de las proteínas y membrana celular, como la prolina, lisina y glicina. Otra propiedad es la regulación osmótica que permite la absorción y retención de agua al mantener una concentración interna de sales mayor que la externa, de tal forma que el agua ingresa pero no sale a través de las membranas celulares de la raíz. La ventaja de la estrategia de tolerancia radica en que no existe evidencia de pérdida de rendimiento en los cultivos de fréjol (Falconí, 2005).

1.5.2.4 Fuentes de Resistencia

Varios estudios han demostraron la presencia de adaptaciones para la resistencia a sequía en las razas de fréjol Durango y Mesoamericana que han sido empleados para el desarrollo de líneas de fréjol resistente. Lamentablemente los métodos de selección tradicional son muy extensos con respecto al tiempo, por lo cual algunos grupos de investigadores han propuesto

o están recurriendo al uso de herramientas moleculares para la selección indirecta de líneas de fréjol, u otras especies, que presenten resistencia al estrés hídrico (Falconí, 2005).

1.6 Técnicas convencionales de mejoramiento

El funcionamiento de un sistema de mejoramiento está basado en la diversidad de germoplasma, incluyendo individuos con mayor o menor nivel de adaptación a las condiciones locales, variedades con características específicas, productos de operaciones diseñadas para mejorar la base genética y productos de experimentos de mutaciones inducidas. Una vez ubicadas las líneas con características de interés se realizan cruzas, generando una recombinación en la progenie y esperando tener individuos que presenten el rasgo de interés heredado por el padre portador. Obtenida la progenie recombinante, el mejorador realiza una selección diferencial eligiendo el material que permanece para el siguiente ciclo y el que es desechado, hasta llegar a un material totalmente purificado e identificado como portador de los rasgos de interés en sucesivos ciclos de reproducción (autofecundación).

Las pruebas para la selección son realizadas en un ambiente específico donde pueden medirse los rasgos del material recombinante (Simmonds, 1981). Así, los caracteres de interés pueden presentar alta o baja heredabilidad de tal forma que el ambiente afecte en una pequeña proporción, o enmascare los rasgos de interés respectivamente. El material homocigoto seleccionado como portador final es integrado a un programa con las comunidades agrícolas para estudiar el grado de aceptación tanto por la población como para probar la adaptación al ambiente local y por último se decide si es un material útil para ser liberado en el área. Los métodos para generar poblaciones mejoradas incluyen:

- **Descendiente de semilla única:** un método empleado por los mejoradores para introducir genes de interés en líneas mejoradas y consiste

en que una vez que las plantas de F1 producto de un cruce ha generado semilla, elegir una semilla por planta y sembrarla, luego realizar el mismo proceso durante varias generaciones hasta conseguir una población genéticamente estable (CBS, 2007). Las ventajas que presenta este método incluyen: reducir el tiempo a dos años para alcanzar altos niveles de homocigosis, que el éxito de las cruzas puede monitorearse y ajustar la presión de selección a la población y por último existe mayor oportunidad de elegir la característica deseada antes de que las líneas estén desarrolladas.

- **Método de Pedigrí:** posibilita la selección de caracteres de tipo oligogénicos (controlados por varios genes), se basa en que en cada generación seleccionar los mejores individuos presentes en cada familia y luego sembrar los descendientes en “una planta por surco” (CIAT, 2003).

- **Método de selección de Gametos:** permite incrementar la frecuencia de los alelos deseados durante el cruzamiento múltiple o justo después de haberlo realizado (Singh *et al.*, 1991). El método consiste en realizar polinizaciones planta a planta asegurando la presencia de los alelos favorables en F1 y la contribución de cada parental.

- **Método de Selección masal:** se eligen los mejores individuos de una población y colectan sus semillas que son mezcladas y sembradas nuevamente, repitiendo la selección, así sucesivamente. Obteniendo una población con los mejores genotipos (Cubero, 1999).

- **Líneas endogámicas recombinantes, (Recombinant Inbred Lines, RILs):** Proviene de una cruce simple, cuya progenie es autopolinizada sucesivamente por lo menos 8 generaciones, hasta alcanzar un elevado nivel

de homocigosis. A partir de la F2, las futuras generaciones avanzan por el método de descendencia de semilla única. De esta manera, se cuenta con una población conformada por varias líneas homocigóticas que combinan las características de los dos padres.

- **Líneas endogámicas Retrocruzadas - Inbred backcross lines (IBLs):** requiere el mismo proceso de autofecundación de las RILS, pero no se limita únicamente a una cruce simple, sino que requiere, al menos, dos retro-cruzas hacia padre recurrente de las características comerciales antes del proceso de autofecundación.

Estos métodos utilizan a la expresión fenotípica como única fuente de información de la variabilidad existente, siendo el fenotipo el objetivo y criterio de selección. Los programas de mejoramiento analizan algunas variables que dependen del objetivo que se desea alcanzar, para una línea mejorada, dentro de estas variables se incluyen; el rendimiento, la biomasa generada, caracteres de cantidad, caracteres en base a calidad, entre otras.

1.7 Técnicas moleculares de mejoramiento

A diferencia de los métodos convencionales para el mejoramiento de variedades que utilizan al fenotipo como criterio de información y selección, las técnicas moleculares permiten valorar el potencial genético de las plantas por medio de marcadores moleculares que son utilizados para la selección de caracteres agronómicos (Rodríguez *et al.*, 2002). Los métodos moleculares permiten relacionar el genotipo con la característica buscada a través del empleo de marcadores moleculares (MM), accediendo a la identificación de secciones de la secuencia del genoma, un loci determinado, que codifica para alguna característica de interés en diferentes grados (Anderson, 1998).

1.7.1 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares (MM) representan las diferencias genéticas entre organismos de una misma especie o entre especies, las cuales actúan como señales ubicadas cerca de los genes de interés de tal forma que no afectan al fenotipo. Existen tres tipos de marcadores moleculares: a) marcadores morfológicos también denominados marcadores visibles, que son caracteres fenotípicos (forma, tamaño, pigmentación de flor, semillas, entre otros); b) los marcadores bioquímicos que utilizan isoenzimas y se detectan por electroforesis o tinciones específicas, y d) los marcadores de ADN que revelan sitios de variación en la secuencia del ADN (Collar, 2005).

El número de marcadores morfológicos como de los bioquímicos es reducido y se ven altamente influenciados por factores ambientales así como por el estadio del desarrollo de las plantas. Al contrario, los marcadores moleculares o de ADN son abundantes, selectivamente neutrales ya que están generalmente ubicados en regiones no codificantes del ADN, y no se ven afectados por el medio ambiente o estadio de desarrollo de la planta (Winter & Kahl, 1995).

Los marcadores de ADN pueden clasificarse por su capacidad de discriminación en polimórficos si son capaces de discriminar entre genotipos o caso contrario se denominan monomórficos. Los MM polimórficos pueden ser de carácter dominante si tienen dos alelos o codominantes si presentan varios alelos permitiendo la diferenciación entre individuos homocigotos y heterocigotos. Los marcadores de ADN también se pueden clasificar en dos categorías según la técnica en la que se basen: marcadores detectados por hibridación o los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo visualizados mediante una electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio o plata, o a su vez por medio de pruebas radioactivas o colorimétricas (Cornide, 2002).

Los marcadores detectados por hibridación agrupan a todas las técnicas que emplean una sonda para la detección del marcador (Velasco, 2005). Las

sondas son fragmentos de ADN o ARN que contiene el código complementario para una secuencia específica del genoma, por lo tanto es necesario el previo conocimiento de la secuencia a detectar. En este grupo están los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) , los minisatélites (Cornide, 2002), número variable de repeticiones en tandem (VNTR) y ADNShips (Oligonucleotide arrays) (Velasco, 2005)

Otros marcadores se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) técnica descubierta por Kary Mullis en 1985, por medio de la cual se puede realizar la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN a partir de secuencias de oligonucleotidos (Pañeda, 2005). La técnica consta de tres etapas: Desnaturalización del ADN a 95 C; acoplamiento del cebador a la cadena complementaria a una temperatura específica para cada cebador, y la extensión de la nueva cadena por medio de la enzima Taq ADN polimerasa . Las técnicas basadas en la PCR difieren entre sí en la longitud y secuencia de los cebadores empleados, condiciones de la PCR y en el método de separación y la detección de los fragmentos (Cornide, 2002).

La introducción de esta tecnología permitió nuevas posibilidades para la detección del polimorfismo genético que puede identificarse debido a que la variación en la secuencia del genoma altera los sitios de reconocimiento del primer. Los marcadores de PCR emplean primers de secuencia arbitraria, semiarbitraria o específica. La selección de la técnica dependerá del objetivo trazado. Las técnicas moleculares brindan información a diferentes niveles, todas tienen sus limitaciones y su aplicación se determina en gran medida por la disponibilidad de los recursos necesarios para ejecutar un sistema de marcadores moleculares. Sin embargo, tiene como beneficios que permite la generación de grandes números de marcadores, su manejo no es técnicamente difícil y utiliza mínimas cantidades de material.

1.7.2 RAPDs (DNA polimórfico amplificado al Azar)

Los RAPDs son marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método que permite amplificar aleatoriamente fragmentos de ADN con base en deca-nucleótidos de secuencia arbitraria, generando un polimorfismo dominante conocido como RAPD (Kelly *et al.*, 1994). La amplificación al azar de ADN utilizando oligonucleótidos de diez pares de bases y temperaturas de hibridación bajas, permite la múltiple hibridación del oligonucleótido en el genoma, resultando en un elevado número de fragmentos de amplificación (Pañeda, 2005). Los marcadores RAPDs son capaces de hibridar cientos de sitios en el ADN pero no todas las hibridaciones resultaran en la amplificación del fragmento, puesto que el marcador debe acoplarse simultáneamente a dos sitios en cadenas opuestas del ADN y cercanos entre sí a una distancia máxima de 2 kb (Cornide, 2002). La metodología de los RAPDs tiende a producir marcadores dominantes, que se heredan de manera mendeliana (Williams *et al.*, 1990). La inmensa mayoría de marcadores ligados a diferentes genes de interés en *P. vulgaris* L. están englobado dentro de este grupo (Pañeda, 2005).

La metodología para la obtención de marcadores RAPDs es la más utilizada en programas de mejora genética asistida por marcadores moleculares, debido a que la obtención de este tipo de marcador es rápida, fácil y con un alto grado de polimorfismo (Pañeda, 2005). Adicionalmente las ventajas que presentan son múltiples como no necesita conocer la secuencia genética del ADN que se va a amplificar, requerir poca cantidad de ADN el cual no precisa ser de alta pureza y es relativamente bajo costo en comparación con otros tipos de marcadores (Dorado *et al.*, 2005).

De acuerdo a Román B. & Kelly J. en el 2005 en su estudio del mapeo de QTLs relacionados a la resistencia a *F. solani*, reportaron un grupo de marcadores RAPDs de tipo flanqueante, es decir que el QTL relacionado a la resistencia a *F. solani* se encuentra entre los dos marcadores. Dentro de su reporte fueron cuatro los marcadores que estaban relacionados con la mayor variación fenotípica para la resistencia a *F. solani* y que el padre donante del

alelo es el donador de resistencia en la cruce con material comercial ecuatoriano (Tabla 1).

Tabla 6. Marcadores RAPDs para resistencia a *F. solani*, Santa Catalina, 2009.

Marcadores Flanqueantes	Padre del alelo	donante
<i>AL20</i> ₈₅₀ – <i>G8</i> ₁₄₀₀	NSL	
<i>O12</i> ₈₀₀ – <i>AL20</i> ₈₅₀	NSL	
<i>S19</i> ₁₀₀₀ – <i>S19</i> ₁₁₀₀	CO97407	

Schneider *et al.*, 1997 en su estudio de selección asistida por marcadores moleculares para la resistencia a estrés hídrico reporto la existencia de dos grupos de MM: aquellos relacionados con fenotipos de alto rendimiento y los restantes relacionados con fenotipos de bajo rendimiento (Tabla 2).

Tabla 7. Marcadores RAPDs para resistencia a estrés hídrico, Santa Catalina, 2009.

MARCADORES	RELACION CON FENOTIPOS
<i>OAB18</i> ₆₅₀	ALTO RENDIMIENTO
<i>OH18</i> ₇₁₀	
<i>OF01</i> ₅₂₀	
<i>OZ08</i> ₇₅₀	
<i>OA08</i> ₇₈₀	
<i>OH19</i> ₆₉₀	BAJO RENDIMIENTO
<i>OA04</i> ₅₆₀	
<i>OX11</i> ₆₈₀	
<i>OX18</i> ₉₈₀	

1.7.3 Selección asistida por marcadores moleculares (MAS)

Un sistema de selección asistida por marcadores moleculares se define como tal si está basado parcialmente en información genética, lo que puede conseguirse a través de la aplicación de marcadores moleculares (Ansín, 2002). La aplicación de MAS permite que los programas de mejoramiento sean más efectivos al presentar varias ventajas, como lo es el no destruir al individuo portador y poder realizar la selección en generaciones tempranas de alta segregación (F_2), resultando en una población muy enriquecida en los alelos deseados. El seleccionar individuos en la F_2 reduce el número de individuos que avanzan en cada ciclo de selección, por lo tanto los siguientes ensayos serán de menor tamaño (Brothers *et al.*, 1997), volviéndose una selección más eficiente, disminuyendo costos y tiempo.

Adicionalmente, el MAS puede potencializarse cuando la característica presenta baja heredabilidad siendo ejemplo de este el caso la resistencia a la pudrición seca causada por *F. solani* o la resistencia a la sequía (Anderson, 1998). Sin embargo, para poder aplicar la selección asistida por marcadores moleculares es necesario tener previamente un mapeo de alta resolución y la validación de los marcadores a aplicarse. El mapeo de alta resolución puede ser en caso el mapeo de QTLs, que generaría un mapa de ligamiento que cubra todos los cromosomas para identificar marcadores que identifiquen los QTLs que controlan la característica de interés. La validación de los marcadores implica en sí verificar la eficacia del marcador molecular para predecir un fenotipo, en otras palabras evaluar si el marcador sirve o no para el MAS, puesto que varios estudios advierten que los marcadores ligados a un QTL específico pueden o no ser aplicados en otro ambiente o grupo genético tal es el caso reportado por Yu *et al.*, 2000 en un QTL relacionado con el rendimiento del cultivo. Para que el marcador sea efectivo debe ser polimórfico en distintas poblaciones derivadas de un amplio rango de distintos genotipos parentales (Corrales, 2005).

1.8 Caracteres Cuantitativos

La primera investigación realizada en la herencia sobre los caracteres cuantitativos se llevó a cabo por genetistas agrícolas, debido a que muchas características agronómicas como el rendimiento y la resistencia a enfermedades son caracteres cuantitativos que los programas de mejoramiento buscan incorporar en los cultivos (Collar, 2005). Al ser de carácter cuantitativo se les puede asignar un valor cuantitativo; que al ser analizado en una población segregante presentará una distribución continua, es decir que los fenotipos se expresaran como una curva a forma de campana como en una distribución normal (Hartl *et al.*, 2009). El comportamiento continuo es producto de la acción combinada de múltiples genes segregantes y de los factores ambientales (Asíns, 2002), por lo que también son conocidos como caracteres complejos, multifactoriales (Hartl *et al.*, 2009), poligenéticos o multivariados (Collar, 2005). Adicionalmente la expresión de los caracteres cuantitativos depende de los efectos aditivos, dominantes o epistáticos que pueden contribuir al fenotipo de un carácter cuantitativo, donde generalmente las interacciones aditivas son las más importantes en su expresión (Hartl *et al.*, 2009).

Estos caracteres están controlados por múltiples genes, donde cada par de ellos segrega de acuerdo a las Leyes de Mendel y se ven influenciados por factores ambientales en grado variable. La consecuencia de los efectos ambientales es que la distribución de la frecuencia fenotípica se asimila aún más a una distribución normal, tomando en cuenta que el efecto primario del ambiente es el de cambiar el valor para un genotipo en particular. Los factores ambientales incluyen los efectos de fertilizantes, el riego y la densidad de plantas cultivadas (Hartl *et al.*, 2009).

Los caracteres cuantitativos experimentan una herencia compleja (Hartl *et al.*, 2009), lo que dificulta su detección por métodos convencionales pero que pueden ser aseguibles por los moleculares. Las regiones del genoma que

contienen genes que codifican para una característica cuantitativa se denominan poligenes, loci de caracteres cuantitativos o QTLs (Collar, 2005).

1.9 Análisis de QTLs (Loci de Caracteres Cuantitativos)

El *locus* de un gen que afecta un carácter cuantitativo se le denomina en inglés “quantitative trait locus”(locus para un carácter cuantitativo) y se le conoce por la sigla QTL. Estos no pueden identificarse en genealogías porque sus efectos individuales están enmascarados por efectos de los otros genes que influyen la característica y por los efectos ambientales. Pero si son detectados, están genéticamente ligados a marcadores polimórficos de ADN (Hartl et al., 2009).

El análisis de QTLs se realiza por medio del mapeo de QTLs, es un método molecular que permite relacionar un loci específico a una característica cuantitativa, mediante el análisis conjunto de la segregación genotípica para los marcadores y los valores fenotípicos de los individuos (Collar, 2005). La ubicación de los QTL en el genoma es importante para su manipulación en programas de mejoramiento, y para poder clonarlos y estudiarlos de manera que permitan identificar sus funciones (Hartl *et al.*, 2009). Los QTL son difíciles de identificar debido a la ausencia de una segregación genotípica discreta observable y a que los efectos genotípicos de cada gen asociado con un carácter son relativamente pequeños. El análisis de QTL implica la selección y el cruzamiento de líneas parentales que difieren en uno o más caracteres cuantitativos y el análisis de la segregación de la descendencia para relacionar cada QTL con un marcador de ADN conocido, o intervalo de marcadores (Asíns *et al.*, 2003). Las técnicas que generalmente se usan para el mapeo de QTLs son los RAPDs (DNA polimórfico Amplificado al Azar) o los AFLPs ya que pueden generar un alto número de marcadores a partir de una sola preparación de ADN (Collar, 2005). Luego se llevan a cabo estudios estadísticos con el fin de identificar qué marcadores de ADN están asociados con el carácter complejo, de manera que sus genotipos están siempre asociados por efectos

fenotípicos que interesan. Estos marcadores de ADN identifican regiones del genoma que contienen uno o más QTL con efectos importantes sobre el carácter cuantitativo. Por lo tanto los marcadores pueden utilizarse para estudiar la segregación de regiones importantes en programas de mejoramiento (Hartl *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación geográfica

El presente estudio fue llevado a cabo en los invernaderos de PRONALEG-GA y en los laboratorios de PRONALEG-GA y BIOTECNOLOGIA de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) y en campo en la Granja Experimental Tumbaco (GET). El estudio comprende la validación de los marcadores moleculares en dos poblaciones y el uso de los mismos para selección de plantas de fréjol con resistencia a sequía y/o pudriciones de raíz en dos poblaciones F₂.

La Estación Experimental Santa Catalina (EESC) se encuentra ubicada en la provincia de Pichincha de Cantón Mejía de la Parroquia Cutuglagua a una altitud de 3058 m con una temperatura promedio anual de 11.08° y una humedad relativa del 76% (Trujillo, 2006)

La Granja Experimental Tumbaco (GET) se encuentra en la Provincia de Pichincha en el Cantón Quito en la Parroquia de Tumbaco, a una altitud de 2450 m con una temperatura anual media de 16.2 °C, máxima de 23.1 °C y mínima de 6.5 °C. Con una humedad relativa de 75.2% y una precipitación anual de 950 mm / año (Estrella, 2002).

2.2 Evaluación de líneas resistentes a *Fusarium solani* por método convencional

2.2.1 Material vegetal

Un total de dieciocho líneas de fréjol (Tabla 3) fueron utilizadas para la selección de los marcadores de resistencia a *F. solani*, dentro de las cuales se

incluyeron: 13 IBLs con posible resistencia, dos líneas de fréjol correspondientes a los padres de la cruza y tres líneas de fréjol como controles: un resistente y un susceptible.

Tabla 8. Líneas de fréjol utilizadas para evaluar resistencia a *F. solani*, Santa Catalina, 2009.

No.	Líneas	Característica	Cruza
1	INIAP-4 (Imbabello)	Control susceptible	
2	NLS (Negro San Luis)	Control resistente	Padre donador
3	C97407	Control susceptible	Padre recurrente
4	Negro bola Pallatanga	Control resistente	
5	CO3129	Posible resistencia	C97407*2/NSL
6	CO3123	Posible resistencia	C97407*2/NSL
7	CO3122	Posible resistencia	C97407*2/NSL
8	CO3119	Posible resistencia	C97407*2/NSL
9	CO3108	Posible resistencia	C97407*2/NSL
10	CO3104	Posible resistencia	C97407*2/NSL
11	CO3148	Posible resistencia	C97407*2/NSL
12	CO3131	Posible resistencia	C97407*2/NSL
13	CO3110	Posible resistencia	C97407*2/NSL
14	CO3157	Posible resistencia	C97407*2/NSL
15	CO3156	Posible resistencia	C97407*2/NSL
16	CO3164	Posible resistencia	C97407*2/NSL
17	CO3158	Posible resistencia	C97407*2/NSL
18	CO3160	Posible resistencia	C97407*2/NSL

La selección de líneas resistentes para pudrición por *F. solani* se realizó en los individuos F_2 de INIAP-424 Concepción*2/L88-63, donde el padre recurrente fue INIAP-424 y el donante de la resistencia fue L88-63 según previos estudios. Para lo cual fueron sembradas 100 semillas de la F_2 en estudio y 28 semillas de cada línea de control (L88-63 y INIAP-424)

2.2.2 Aislamiento e inoculación de *Fusarium solani*

Se realizó una colecta de raíces en un área infectada con *F. solani* de la

Granja Experimental Tumbaco de INIAP, las cuales fueron identificadas por rasgos de infección del patógeno (betas rojizas en la superficie de la raíz). Se realizó un lavado con agua estéril y un proceso de desinfección con cloro (1,5%) seguido de tres lavados con agua estéril, para cortar una sección de la raíz con el patógeno y sembrarla en medio PDA, el cual se colocó durante 5 días en incubación a 25 °C, el aislamiento fue verificado por medio de observación bajo el microscopio. Consecuentemente se realizó un incremento de *F. solani* por medio de la técnica de siembra de célula única en medio PDA, dejando por 5 días en incubación a 25 °C hasta obtener el inóculo y a partir de la misma se realizaron los incrementos necesarios para la inoculación en medio PDA bajo las mismas condiciones de incubación.

Se preparó un inóculo a partir de los cultivos de *F. solani* realizados en PDA (Potato Agar Dextrosa). El método de inoculación por inmersión se aplicó a las plantas veinte días después de sembradas, para lo cual las plantas fueron retiradas del sustrato, lavando sus raíces y sumergiéndolas en el inóculo (solución de *F. solani* 2×10^6 conidias/ml) durante 5 minutos, y replantadas en sustrato estéril.

Durante el transcurso del ensayo para resistencia a *F. solani* desde su inoculación, se registraron los datos de temperatura que se maneja en el invernadero.

2.2.3 Evaluación de Incidencia de Infección

Las diecinueve líneas de fréjol inoculadas con *F. solani* fueron evaluadas en la incidencia de la infección 60 días después de sembradas, para correlacionar los resultados de laboratorio con los de campo. La evaluación de la infección consistió en extraer la planta sin dañarla, liberando a la raíz del sustrato, para luego ser lavada con agua eliminando todo resto de tierra y registrar la incidencia de la infección de acuerdo a una escala numérica de incidencia; 1 para plantas no afectadas y 5 para rasgos severos de infección (Anexo 1).

2.2.4 Análisis estadístico

Para el ensayo de resistencia a *F. solani* Los datos obtenidos después de la valoración según la escala del CIAT de grado de infección fueron promediados y se realizó un análisis de varianza al 0,05 de confianza.

2.3 Evaluación de líneas resistentes a sequía por método convencional

Para la selección de los marcadores moleculares RAPDs para resistencia a sequía, la siembra se realizó en la Granja Experimental Tumbaco durante el ciclo 2008 B, fueron sembradas un total de 16 líneas de fréjol (Cuadro 8) en un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones para el tratamiento de estrés hídrico y dos repeticiones sin estrés por línea, dentro de un campo protegido por una cubierta para controlar el ingreso de agua por precipitación. Se ubicaron dos tensiómetros, uno en el interior terreno cubierto y otro fuera y adicionalmente se instaló un termómetro para registrar los datos respectivos. La distribución del ensayo se detalla en el Anexo 6. Para la selección de material resistente se realizó la siembra en terreno abierto sin cubierta

2.3.1 Material vegetal

Para la evaluación de líneas resistentes a sequía en GET Tumbaco se emplearon un total de dieciocho líneas de fréjol (Tabla 4) que incluyen a: 12 IBLs de fréjol posibles portadoras de resistencia a sequía, 2 líneas de fréjol correspondientes a los padres de las cruces y dos líneas de fréjol como controles: una resistente y una susceptible.

Tabla 9. Líneas de fréjol para evaluar resistencia a sequía, Santa Catalina 2009.

Líneas	Característica	Cruza
INIAP -425 (Fanesquero)	Control susceptible	Padre Recurrente
INIAP -430 (Portilla)	Control resistente	Resistente
INIAP -424 (Concepción)	Líneas comerciales	Padre Recurrente
INIAP -420 (C. Chota)	Líneas comerciales	Resistente
A1P6	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
A1P11	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
A1P15	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
A1P20	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
A1P44	Posible resistencia	Cocacho*2/L88-63
C1P22	Posible resistencia	Cocacho*2/L88-63
C1P23	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
DP11	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
DP15	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
DP16	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
DP18	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
DP19	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651

La selección de individuos resistentes a sequía se realizó sobre la población F_2 producto de la cruce INIAP-422 Blanco Belén 2*/NSL, donde el padre donador es NLS (Negro San Luis) y el padre recurrente con el cual se realizaron dos retrocruzas fue INIAP-422 (Blanco Belén). Para lo cual fueron sembradas 100 semillas de la F_2 en estudio y 28 semillas de cada una de las 2 líneas de control (NLS y INIAP-422).

2.3.2 Condiciones de siembra y controles durante el ensayo

El terreno fue arado, rastrado y surcado con un espacio de 0.6 metros entre surcos. Se realizó el replanteo del ensayo en campo, para luego delimitar las parcelas (Figura 1) y por último sembrar una semilla por golpe, cada diez centímetros.

Cada parcela consistió de cuatro surcos de cuatro metros de largo. Se realizó un control manual de malezas, un mes después de la siembra



Figura 1. Delimitación de bloques y parcelas para la siembra bajo, Granja Experimental Tumbaco 2008.

Se aplicaron riegos con una frecuencia de 3 días a la siembra durante 27 días para todo el ensayo, y luego se diferenciaron los bloques sometidos a estrés con una frecuencia de riego cada 15 días (Figura 2).

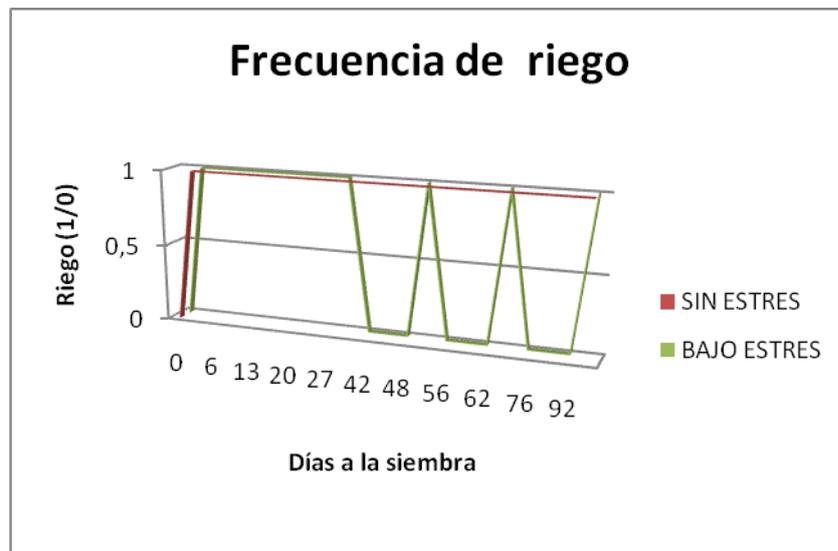


Figura 2. Frecuencia de riegos aplicados en el ensayo para resistencia a estrés hídrico desde la siembra hasta el día 92 a la siembra, Santa Catalina, 2009.

Durante el transcurso del ensayo para resistencia a sequía hasta el día 92 a

la siembra, se registraron los datos en centibares de los dos tensiómetros ubicados fuera y dentro de la cubierta (Figura 2), así como los datos de temperatura bajo la cubierta.

Una vez que las plantas completaron el ciclo se procedió a cosechar cada línea lo que se realizó arrancando las plantas de la unidad experimental donde se sembraron las variedades en estudio y eliminando las plantas de los extremos de cada surco para evitar el efecto de borde. Las plantas cosechadas fueron contabilizadas y depositadas en un saco con la correspondiente etiqueta para su posterior trilla y evaluación. La trilla se realizó a mano para evitar daños en el grano, posteriormente el grano fue limpiado de impurezas y colocado en fundas de papel etiquetadas, para luego proceder a la toma de datos requeridos.

2.3.3 Variables evaluadas

El ensayo de rendimiento en campo fue llevado a cabo para correlacionar los resultados de laboratorio. Comprende la evaluación de las siguientes variables:

- Vigor: visualmente se evaluó cada unidad experimental en el grado de vigor que presentaron las plantas según la escala 1-9 (Anexo 2) del CIAT (1991).
- Carga: visualmente se evaluó cada unidad experimental en el grado de carga que presentaron las plantas según la escala 1-9 (Anexo 3) del CIAT (1991).
- Rendimiento (g / parcela): Se determinó el peso en gramos de grano seco obtenido las plantas de la unidad experimental neta.
- Número de vainas / planta: Se determinó contabilizando las vainas con grano de la parcela neta y dividiendo para el número de plantas de la parcela neta.
- Semillas / por vaina: Se determinó contabilizando las semillas de la

parcela neta y dividiendo para el número de vainas de la parcela neta.

2.3.4 Análisis Estadístico

Para el ensayo de resistencia a estrés hídrico se llevo a cabo dos análisis de varianza del rendimiento por planta al 0,05 de confianza, tomando por separado a los tratamientos aplicados y uno en total del ensayo.

Adicionalmente se calculó la media geométrica (MG) para determinar posibles resistentes y susceptibles debido a que la formula relaciona el rendimiento obtenido con y sin estrés, según la fórmula reportada por Castañón 2000:

$$MG = \sqrt{R_s * R_r}$$

R_s = rendimiento promedio del individuo bajo estrés hídrico

R_r = rendimiento promedio del individuo sin estrés hídrico.

2.4 Evaluación de líneas resistentes a *Fusarium solani* y a sequía por medio de marcadores moleculares

2.4.1 Recolección de muestras

Una vez que las plantas de fréjol desarrollaron el segundo trifolio se procedió a colectarlo, tanto para las 17 líneas de fréjol evaluadas para resistencia a estrés hídrico y como para las 18 líneas de fréjol evaluadas para resistencia a *F. solani*, en tubos *ependorf* previamente etiquetados conteniendo 100 *ul* de solución buffer y se colocaron en hielo hasta llegar al laboratorio de Biotecnología para ser procesadas.

2.4.2 Extracción y Cuantificación del ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de Colombo (1998) modificado por Erazo (2006). Según el cual se maceró los trifolios colocando un poco de meta bisulfito de sodio y 650 µl de buffer de extracción caliente se agitó y colocó 12 µl de β mercaptoetanol , seguido por un vórtex y una incubación a 65 °C durante una hora, agitando cada 15 minutos. Paso siguiente fue centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo y se aforó a 1 ml con el buffer de extracción. Se adicionó 1ml de CIA y se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm.

El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo sin topar la interface y se aforo con el buffer de extracción a 1 ml. Se repite este último paso y con el último sobrenandante se le añade 1 ml de etanol 100%, realizando una leve agitación hasta se formen hilos blancos, se colocó en la refrigeradora durante 15 minutos, luego se centrifugó por 2 minutos a 13000 rpm y se desecha el sobrenadante. Los tubos se colocan en la estufa a 37° C hasta que se evapore todo el etanol. Por último se diluye el pellet en TE (100ul) a baño maría a 65°C. Para la eliminación de ARNasa se colocó 3 µl de ARNasa en cada tubo, se dio un vórtex , un punto de centrifuga y luego se incubó por una hora a 37°C.

La cuantificación se realizó por comparación visual de intensidad de bandas con un marcador de peso Low mass leader (Invitrogen), por electroforesis en geles de agarosa (1,5%). La dilución de ADN cuantificado se realizó con agua estéril a una concentración estándar de 2,5 ng/µl.

2.4.3 Amplificación de marcadores RAPDs

Para la amplificación de los marcadores RAPDs para la resistencia a pudrición seca de raíz por *F. solani* (Tabla 5) y los marcadores moleculares RAPDs para la resistencia a sequía (Tabla 6) se empleó la técnica de amplificación descrita por Miklas *et al.*, (1993) modificado por Haley *et al.*, (1994a) y empleada por Shneider *et al.*, (1997).

Tabla 10. Marcadores moleculares RAPDs empleados relacionados con la resistencia a *F. solani* (flanqueantes) y a la resistencia a sequía (independientes), Santa Catalina 2009.

Marcadores Flanqueantes	Marcadores independientes
<i>AL20</i> ₈₅₀ – <i>G8</i> ₁₄₀₀	<i>OH19</i> ₆₉₀ <i>OA08</i> ₇₈₀
<i>O12</i> ₈₀₀ – <i>AL20</i> ₈₅₀	<i>OAB18</i> ₆₅₀ <i>OZ08</i> ₇₅₀
<i>S19</i> ₁₀₀₀ – <i>S19</i> ₁₁₀₀	<i>OF01</i> ₅₂₀ <i>OA04</i> ₅₆₀
	<i>OH18</i> ₇₁₀ <i>OX11</i> ₆₈₀
	<i>OX18</i> ₉₈₀

Se dispensó en cada pocillo de la hilera la 1,25 ul de la muestra de ADN correspondiente, manteniendo en hielo las muestras mientras se preparó el mix que se detalla en la tabla 11.

Tabla 11. Receta para 1 Rx (Murillo, 2002).

Reactivo	Cantidad
5X PCR buffer	2.2 ul
dNTP`s (10 mM)	0.4 ul
Primers (20mM)	0.4 ul
Taq polimerasa	0.13 ul
5 u/ul	
Agua	2.3 ul
Total	5.43 ul

Luego se dispensó en cada pocillo de la hilera 5 ul del mix preparado, y se añadió 10 ul de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra. Las muestras fueron amplificadas en el termociclador con el siguiente programa; 34 ciclos de; 1 min a 94 ° C, seguido por 1 min a 35 ° C y 2 min a 72 ° C. A

continuación de 34 ciclos de; 1 min a 94 ° C, 1 min a 40 ° C y 5 min a 72 ° C (Shneider *et al.*, 1997).

2.4.4 Selección de individuos dentro de las poblaciones F_2

Las muestras fueron colectadas y procesadas de la misma manera que para la selección de los marcadores RAPDs en la fase I, sin embargo solo se realizo la extracción y cuantificación de ADN.

2.4.5 Análisis de bandas

El software “LENGTH” se utilizó para medir el tamaño de las bandas, el análisis es de tipo cualitativo basado en la presencia (1) o ausencia (0) de las bandas de los correspondientes marcadores, otorgando una calificación promedio a partir de las repeticiones.

En el caso de la validación de marcadores los resultados de campo se compararon con la presencia o ausencia de bandas, seleccionando así los marcadores funcionales que identificaron a las líneas de fréjol resistentes y susceptibles.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Evaluación de líneas resistentes a *Fusarium solani* por método convencional

En la evaluación de las 18 líneas de fréjol, con tres repeticiones realizada en el invernadero, es importante señalar que el tiempo tan prolongado para la evaluación (60 días según la escala del CIAT, Anexo 3) después de la inoculación fue por causa de la temperatura. Esta variable es un agente significativo en el desarrollo de la infección, tomando en cuenta que *F. solani* tiene un rango de temperatura óptimo para infectar a la planta de 22°C a 32°C (CIAT, 1990).

Luego de los 60 días de retraso, se encontró una incidencia de infección total en las tres repeticiones de cada una de las 18 líneas de fréjol inoculadas. La incidencia de infección se determinó por el grado de resistencia que presentó cada línea. Los datos fueron procesados para realizar el análisis de variancia como se puede observar en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de variancia para 18 líneas de fréjol para la resistencia a *F. solani*, Santa Catalina 2009.

F de V	gl	SC	F	P
Total	49	49	5,95	0,0001**
Error	54,6	32	5,95	0,0001**
Líneas	172,6	17		
CV	23,68			
Media	5,55			

El análisis de variancia mostró un alto grado de significancia (0,001**) para los valores de infección obtenidos, lo que demuestra que existe diferencia estadística en la respuesta de los genotipos ante el patógeno. Mientras que el valor del coeficiente de variación (Cv) de 23,68% refleja una dispersión en los

datos con respecto a la media posiblemente por las condiciones ambientales manejadas dentro del invernadero.

El alto grado de significancia encontrado para los valores de infección de cada línea evaluada permitió que se realice una clasificación de los genotipos evaluados de acuerdo al grado de resistencia que presentaron ante *F. solani*, de tal forma que las 18 líneas se distribuyeron como resistentes, moderadas y susceptibles (Tabla 13).

Tabla 13. Clasificación de las medias de tres repeticiones según la escala de evaluación de resistencia a *F. solani* de CIAT 2000 de líneas de fréjol, Santa Catalina, 2009.

Resistencia	Línea	Media
Susceptibles	CO3104	7,7
	CO3160	7,6
	CO3122	7,5
	CO3156	6,8
	CO3123	6,7
Moderados	CO3164	6,0
	C97407	5,5
	CO3110	5,5
	CO3148	5,2
	CO3157	5,1
	Imbabello	4,9
	CO3131	4,8
	CO3129	4,4
	CO3158	4,1
	CO3119	4,1
Resistentes	Negro	
	Ptga.	3,3
	NLS	2,8
	CO3108	2,2

Como se puede observar en la tabla 13 todos los genotipos evaluados presentaron infección al ser inoculados por *F. solani* pero diferenciados por el grado de resistencia al mismo, a excepción del control negativo que presentó un valor de cero (no se muestra valor) por no haber sido inoculado por el

patógeno. El grupo de genotipos susceptibles (con valor de infección desde 7,7 hasta 6,7) presentó características de infección con una reducción severa del sistema radical, y con más del 60 % de los tejidos del hipocótilo y de la raíz afectados por pudrición.

En la Figura 3 se muestra la línea CO3104 de fréjol, la más susceptible de todo el ensayo. Se puede observar el necrosamiento total del hipocótilo y un escaso sistema radical, adicionalmente el momento del análisis se comprobó que su contextura se ablandó por efecto de la pudrición.



Figura 3. Raíces de la línea CO3104 infectada por *F. solani*, Santa Catalina 2009.

El grupo de resistencia moderada (valor de infección desde 4,1 hasta 6) presentó el 50% de los tejidos del hipocótilo y de la raíz cubiertos con lesiones que se combinan con ablandamiento, pudrición y reducción considerable del sistema radical. Dentro de este grupo se encuentra al control susceptible Imbabello con valor de infección 4,9 (Tabla 13) con síntomas de necrosamiento y reducción del sistema radicular, con raíces adventicias como se puede apreciar en la Figura 4.



Figura 4. Raíces de la línea Imbabello infectada por *F. solani*, Santa Catalina 2009.

El grupo de líneas resistentes (valores de infección desde 3,3 hasta 2,2) presentaron características leves de infección que incluyen; decoloración ligera, pocas necróticas o con un 10% aproximadamente de los tejidos del hipocótilo y de la raíz cubiertos con lesiones. Estas características de infección las mostró el padre donante de la resistencia la línea NSL (valor de infección 2,8) como pueden observarse en las Figura 5.



Figura 5. Raíces de la línea NSL infectada por *F. solani*, Santa Catalina 2009.

El control resistente Negro Pallatanga (valor de infección 3,3) puede observarse en la Figura 6 con un sistema radicular poco afectado, sin emergencia de raíces adventicias, ni lesiones necróticas.



Figura 6. Raíces de la línea NBP infectada por *F. solani*, Santa Catalina 2009.

Por último dentro de este grupo se ubico al genotipo más resistente del ensayo, la línea CO3108 (valor de infección 2,2) como se observa en la figura 7 su sistema radical esta entero y no existe necrosamiento, y es uno de los genotipos donde se presentaron nódulos radiculares.



Figura 7. Raíces de la línea CO3108 infectada por *F. solani*, Santa Catalina, 2009.

3.2 Evaluación de líneas resistentes a *Fusarium solani* por medio de marcadores moleculares

La evaluación de las líneas resistentes a *F. solani* por el método molecular se realizó con cuatro marcadores RAPDs flanqueantes (Tabla 15) reportados por Román B. & Kelly J. en el 2005. Las amplificaciones se efectuaron de manera independiente para cada marcador y después se empataron los resultados. Las bandas obtenidas se midieron con el programa length para determinar la distancia exacta en pares de bases, dando el valor de 1 a la presencia de la banda y el valor de 0 a la ausencia de la misma. Todos los marcadores empleados fueron amplificados dos veces para verificar los resultados obtenidos. Con los datos obtenidos se elaboró una matriz simplificada de todos los marcadores como se observa en la Figura 8.

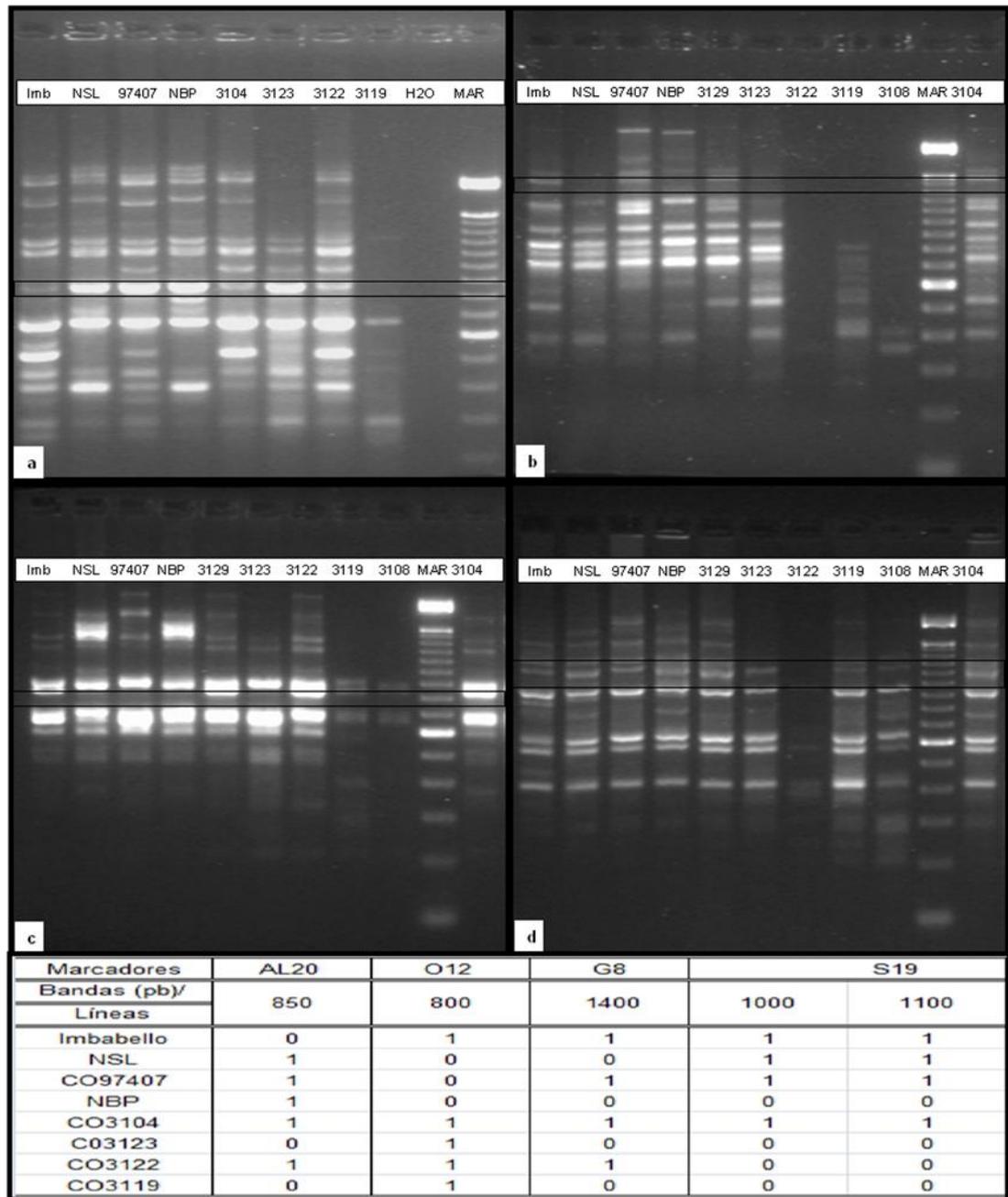


Figura 8. Visualización de la amplificación de cuatro marcadores moleculares RAPDS para resistencia a *F. solani* a) marcador $AL20_{850}$ b) marcador $O12_{800}$ c) marcador $G8_{1400}$ d) marcador $S19_{1000/1100}$, Santa Catalina 2009.

El primer marcador analizado fue AL20 que presentó bandas a 850 pb en los controles resistentes (NSL y NBP), susceptible (CO97407) y en las líneas CO3104 y CO3122 como se puede observar en la figura 8a.

El marcador O12 presentó bandas a 800 pb para el control susceptible (Imbabello) y para cuatro líneas (CO3104, CO3123, CO3122, CO3119) tal como se detalla en la figura 8b. Mientras que el marcador G8 presentó bandas a 1400 pb para los dos controles susceptibles (Imbabello y CO97407) y en dos líneas (CO3104 y CO3122) como se puede observar con el valor de 1 en la tabla de la figura 8. Por último el marcador S19 presentó bandas a 1000 pb y 1100 pb para los controles susceptibles (Imbabello y CO97407), para el control resistente (NSL) y para la línea CO3104.

3.3 Evaluación de líneas resistentes a sequía por método convencional

El ensayo para resistencia a estrés hídrico se llevó a cabo en la Granja Experimental Tumbaco bajo una cubierta que permitió controlar el ingreso de agua de lluvia, estableciendo dos tratamientos: a) bajo estrés hídrico (bloque 1 y 2) y b) sin estrés hídrico (bloques 3 y 4), diferenciados por la variación en la frecuencia de riego que se aplicó a los bloques. Los valores medios de temperatura registrados demostraron que el experimento se llevó a cabo a una temperatura mínima de 13 °C y una máxima de 34 °C (Figura 9), en comparación a la temperatura mínima anual de 6,5 °C y máxima de 23,1 °C de la Granja Experimental Tumbaco, demostrando que el ensayo no solo sufrió un estrés hídrico por regulación en la frecuencia del riego de agua sino también con un aumento en la temperatura.

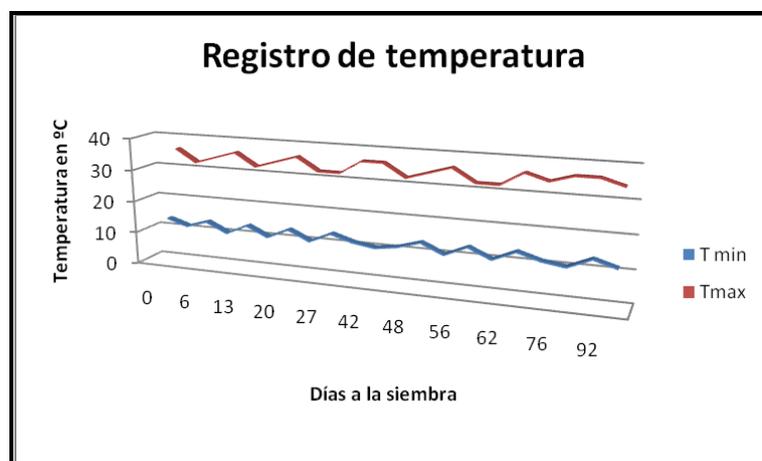


Figura 9. Datos de temperatura en grados centígrados registrados en el ensayo para resistencia a estrés hídrico desde la siembra hasta el día 92 a la siembra, Santa Catalina 2009.

El registro de los tensiómetros ubicados tanto fuera como dentro de la cubierta (Figura 10), mostraron un valor medio externo a la cubierta de 19 cb y un valor medio bajo cubierta de 32,5 cb lo que demuestra que las plantas estuvieron sometidas a un estrés hídrico.

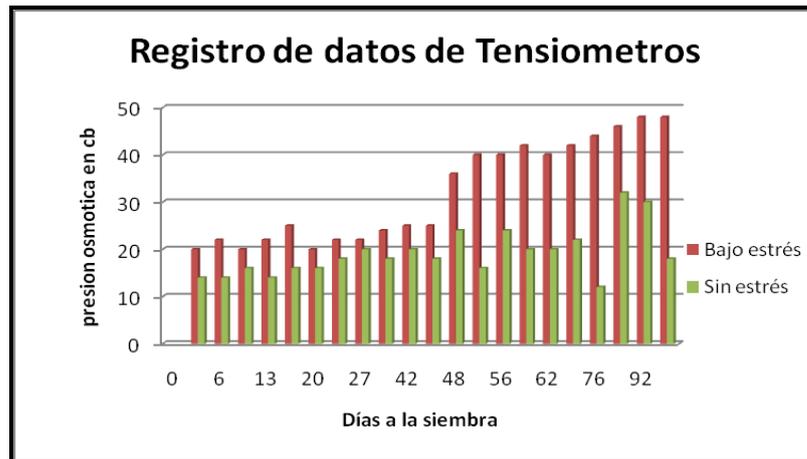


Figura 10. Datos de dos tensiómetros en centibares registrados en el ensayo para resistencia a estrés hídrico desde la siembra hasta el día 92 a la siembra, Santa Catalina, 2009.

Los bloques 1 y 2 del tratamiento bajo estrés hídrico (Fig 11) presentaron en mayor grado síntomas de estrés hídrico lo que se evidencia en ciertas unidades experimentales (surcos) con individuos de menor tamaño, con follaje amarillo y pocas hojas.



Figura 11. Bloque 2 del tratamiento bajo estrés, Tumbaco 2008.

En cambio, en la Figura 12 se observa que el bloque 4 no presento los surcos con amarillamiento y posee surcos totalmente verdes.



Figura 12. Bloque 4 del tratamiento sin estrés bajo cubierta, Tumbaco 2008.

Las plantas ante el incremento de temperatura respondieron con movimientos paleotrópicos, y defoliación de hojas para minimizar la pérdida de agua como se puede observar en la figura 13.



Figura 13. Síntomas de amarillamiento y defoliación en el tratamiento bajo estrés Tumbaco 2008.

Los bloques sin estrés presentaron menor grado de defoliación y poco índice de amarillamiento pero también realizaron movimientos paleotropicos de sus hojas para evitar la pérdida de agua como se observa en la figura 14.



Figura 14. Surco del bloque 4 del tratamiento sin estrés Tumbaco 2008.

En el transcurso del ensayo se observó una infección por plagas que generalmente se presentan en ambientes secos: antracnosis y oídio (Figura 15). Los bloques del tratamiento bajo estrés presentaron con mayor incidencia.

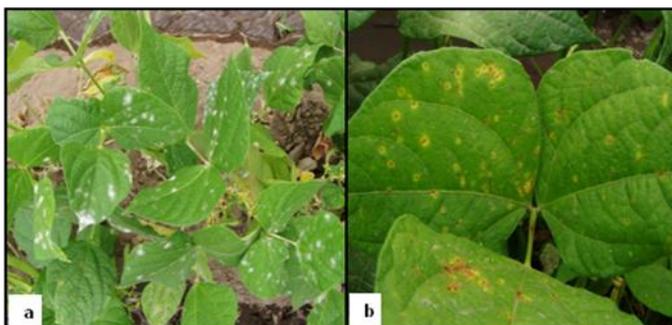


Figura 85. Plagas presentes en las hojas de fréjol en el ensayo de para resistencia a sequía: a) oídio y b) antracnosis

Terminado el ciclo de siembra, el material fue cosechado, trillado, pesado y procesado para obtener el rendimiento por planta (gramos de semilla/planta) para cada genotipo y bloque del experimento. Con estos datos se realizó tres análisis de varianza para el rendimiento por planta. El primer análisis de varianza tomó en cuenta las repeticiones (4 bloques totales) del diseño. En este análisis se encontró que existe diferencia significativa entre los bloques evaluados lo que generó tres grados de significancia como se puede ver en la Tabla 14.

Tabla 14. Medias del rendimiento (g de semilla/planta) de cada bloque del ensayo para resistencia a sequia en la Granja Experimental Tumbaco, 2009.

Bloque	MEDIAS	# de líneas	GRADOS
1	3,2	16	A
2	5,03	16	B
3	5,42	16	B
4	6,84	16	C
			C

El primer grado de diferenciación corresponde al bloque 1 (tratamiento bajo estrés), con una media de 3,2 g de semilla/planta. Este valor es la media más baja del ensayo, posiblemente se deba a la ubicación del bloque en el ensayo. El bloque 2 y el bloque 3 presentaron el mismo grado de significación con una media de 5,03 y de 5,42 g de semilla/planta respectivamente, posiblemente este resultados se deba al reflejo de una filtración de agua subterránea debido a la ubicación de los bloques para el riego. El bloque 4 con una media de 6,84 g de semilla/planta está dentro del grupo “c” de significancia con el bloque 3 posiblemente a que los dos bloques son del mismo tratamiento sin estrés.

El segundo análisis de varianza (Tabla 15) evidencia que existe una alta significancia para los 4 bloques del ensayo (0,002**), lo que sugiere que existe variación por efecto de los tratamientos. La alta significancia (0,0417**) en las líneas nos indica que los genotipos presentan distinta respuesta a los tratamientos que se emplearon. El alto coeficiente de variación (Cv de 37,95) indica que los datos están dispersos con respecto a la media esto puede ser efecto de los tratamientos y de las condiciones a las que se sometió al experimento total.

Tabla 15. Análisis de varianza del peso de semilla en gramos por planta para 16 líneas de fréjol F6 combinando los dos tratamientos, Tumbaco 2009.

F de V	GL	SC	P
Total	63	440,85	
Bloque	3	107,71	0,0002**
Líneas	31	223,63	0,0417*
Error	29	109,52	
CV		37,95	
\bar{x} (gramos/planta)		5,12024722	

El tercer análisis de varianza (Tabla 16) para el rendimiento (g de semilla/planta) se realizó independiente para cada tratamiento. Se encontró diferencia significativa para las repeticiones (bloques) tanto para el tratamiento bajo estrés como para el tratamiento sin estrés. En el tratamiento sin estrés se evidenció una alta significancia para las líneas (0,0033**) demostrando que los genotipos respondieron de manera distinta ante el tratamiento. La Tabla 16 nos indica los valores de los coeficientes de variación: de 55,8% para el tratamiento bajo estrés dando a entender que existe una dispersión alta en los datos obtenidos de la media y lo que puede explicarse por a la ubicación de los bloques en el ensayo, como se manifestó en el primer análisis de varianza realizado sobre los bloques. Y un coeficiente de variación de 24,59 % para el tratamiento esta dentro del rango aceptable para los ensayos en campo, diciendo así que no existe una dispersión de los datos de la media.

Tabla 16. Análisis de varianza del rendimiento de 16 líneas para dos tratamientos, Tumbaco 2009.

F de V	GL	TRATAMIENTO			
		BAJO ESTRÉS		SIN ESTRÉS	
		SC	P	SC	P
Total	31	175,78		200,33	
Repetición	1	26,87	0,0393*	16,09	0,0177*
Líneas	15	69,83	0,5936	150,21	0,0033**
Error	15	79,08		34,02	
CV		55,8		24,59	
\bar{x} (gramos/planta)		4,11		6,13	

Tomando en cuenta los resultados del análisis de los ADEVAS realizados se procedió a clasificar a los genotipos. Se utilizó la fórmula de la media geométrica; $MG = \sqrt{R_s * R_r}$ (Castañón, 2000), que permitió relacionar el rendimiento de cada genotipo bajo los dos tratamientos (con y sin estrés) para compararlo con la media geométrica general (MG) que diferencia dos grupos: a) líneas con un rendimiento sobre la media y b) líneas con un rendimiento bajo la media. El punto de clasificación, la media geométrica general con una valor de 5,05 (Tabla 13), nos muestra el primer grupo de líneas sobre la media, donde se destacó la línea A1P20 con una MG de 8,41, lo que quiere decir que este individuo presentó la menor afección bajo estrés demostrando un rendimiento similar al que exhibe bajo el tratamiento sin estrés. Dentro de este grupo en orden descendente se hallan las líneas; DP15, A1P15, DP18, A1P11, DP19 y el control C. chota (Tabla 13) las que posiblemente presentan un nivel más alto de adaptación y respuesta a condiciones de estrés hídrico.

Tabla 17. Medias de rendimiento en gramos por planta de 16 líneas de fréjol F₆ bajo dos tratamientos para la evaluación de resistencia a estrés hídrico, Tumbaco 2009.

LÍNEAS	\bar{x} SIN RIEGO	\bar{x} CON RIEGO	MG
A1P20	3,83	4,4	8,41
DP15	2,59	5,61	6,81
A1P15	1,07	4,57	6,19
Chota	4,64	8,17	6,16
DP18	2,31	5,94	6,04
A1P11	4,54	7,13	5,69
DP19	5,09	7,54	5,54
A1P44	7,22	9,79	4,42
C1P22	3,62	5,41	4,13
Fanesquero	3,7	4,61	4,1
C1P23	5,37	2,98	4
DP11	3,68	4,03	3,85
Portilla	4,04	11,49	3,81
A1P6	2,84	4,46	3,7
DP16	6,12	5,96	3,56
Concepción	5,17	5,93	2,21
MA	4,11	6,13	
MG	5,02		

Las líneas con un rendimiento menor a la media (bajo 5.02) incluyen a las líneas DP16, A1P6, Portilla, DP11, C1P23, Fanesquero, C1P22 Y A1P44 con su respectivo valor según la Tabla 13. Y dentro de este grupo se encuentra el control susceptible Concepción con una MG de 2,4 siendo la línea más susceptible dentro de este ensayo.

3.4 Evaluación de líneas resistentes a sequía por medio de marcadores moleculares

La evaluación de las líneas resistentes a sequía por el método molecular se realizó con nueve marcadores RAPDs (Tabla 15) reportados por Schneider *et al.*, en 1997. Las bandas obtenidas se midieron con el programa length para

determinar la distancia exacta en pares de bases, se procedió a asignar con cero a la ausencia de banda y con uno a la presencia de las mismas. Los datos obtenidos se resumen en la Figura 16 donde se observa la amplificación de los nueve marcadores con los controles resistentes (Portilla, C. Chota y L8863) y susceptibles (Fanesquero y Concepcion) así como la matriz obtenida al final del ensayo. Todos los marcadores empleados fueron amplificados dos veces para verificar los resultados obtenidos.

Los marcadores OAB18, OH18, OF01, OZ08 y OA08 se reportaron por estar relacionados con líneas con alto rendimiento según Schneider *et al.*, 1997. Dentro de este grupo los marcadores OAB08, OF01 y OZ08 presentaron bandas tanto en los controles susceptibles: Fanesquero y Concepción como para en los controles resistentes: Portilla y C. Chota y para el padre donante de la resistencia (L8863), como se puede observar en la Figura 16.

Para el marcador OH18O se observó la ausencia de bandas en todos los controles resistentes y susceptibles como en el padre donante del alelo resistente (L8863). El marcador OAB18 presentó una banda solo para el control susceptible Fanesquero y para el padre donante de la resistencia (L8863) así como para varias líneas de control.

Schneider *et al.*, 1997 reporta un segundo grupo de marcadores OH19, OA04, OX11, OX18 relacionados con líneas de bajo rendimiento. En el presente estudio de este grupo de marcadores OA04, OH19 Y X11 obtuvieron bandas tanto en los controles resistentes (Portilla y C. chota) como en los controles susceptibles (Fanesquero y Concepción). Mientras que el marcador OX18 no presentó bandas en ninguno de los controles pero si en el padre donante de la resistencia (L8863).

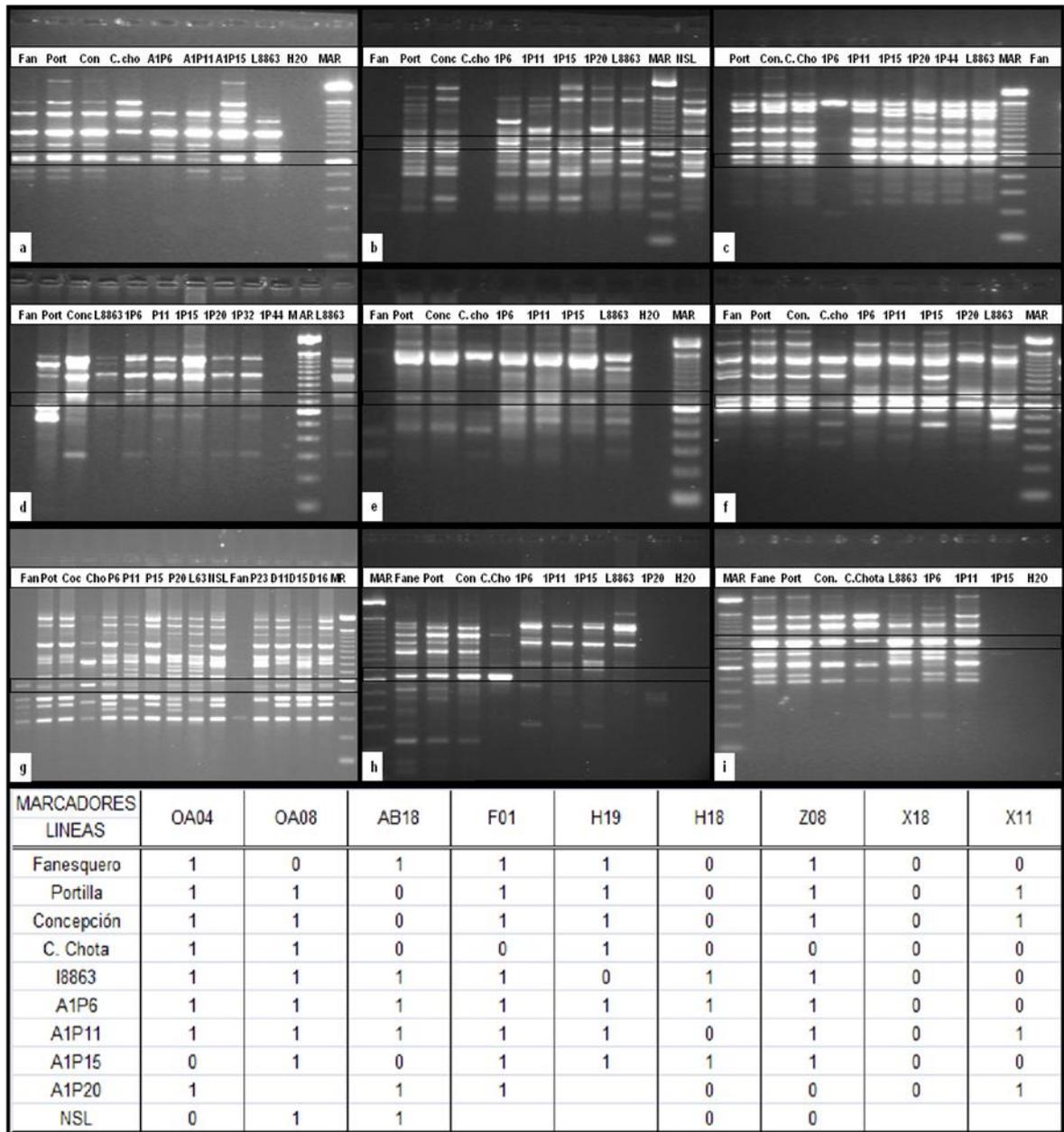


Figura 16. Amplificación de nueve marcadores RAPDs a) marcador $OA_{04_{560}}$ con 18 muestras y un negativo. b) marcador $OA_{08_{780}}$ con 8 muestras y un negativo. c) marcador $OAB_{18_{650}}$ con 8 muestras y un negativo. d) marcador $OF_{01_{520}}$ con 18 muestras y un negativo. e) marcador $OH_{19_{690}}$ con 18 muestras y un negativo. f) marcador $OH_{18_{710}}$ con 18 muestras y un negativo. g) marcador $OZ_{08_{750}}$ con 18 muestras y un negativo. h) marcador $OX_{18_{980}}$ con 18 muestras y un negativo. i) marcador $OX_{11_{680}}$ con 18 muestras y un negativo.

CAPÍTULO 4: DISCUSIONES

4.1 Evaluación de líneas resistentes a *Fusarium solani* por medio de método convencional y de marcadores moleculares.

El objetivo del presente ensayo fue evaluar el grado de resistencia de 18 líneas de fréjol a *F. solani* por el método convencional y corroborar el resultado con los marcadores moleculares RAPDs. Tomando como base los estudios realizados por Roman & Kelly en el 2005 y por INIAP en el 2007. Para lo cual se evaluaron dos líneas parentales NSL padre donante y C97407 madre recurrente, 14 genotipos producto de la cruce en F₅ (IBL), un control resistente Negro Pallatanga y un control susceptible Imbabello.

Durante el ensayo por el método convencional tanto las plantas de fréjol como la propagación de la infección de *F. solani* presentaron un desarrollo tardío, por lo que se tuvo que evaluar 60 días después de la inoculación con el patógeno. Este dato contrarresta con investigaciones realizadas por CIAT (2000), Román & Kelly (2005) o de Shneider (2001) que emplearon un protocolo de inoculación similar pero evaluaron las plantas después de 15 días de la inoculación. El retardo observado tanto en el desarrollo de la planta como en la propagación de la infección podría explicarse por la temperatura registrada durante el ensayo. El promedio de la temperatura mínima fue de 11°C y de la temperatura máxima de 25°C durante el ensayo. El factor temperatura podrían haber provocado el retardo en el desarrollo de la infección debido a que se ha reportado que ha temperaturas menores a 18 °C se retarda el desarrollo de las plantas de fréjol. Posiblemente la baja temperatura retardó el desarrollo de la infección ya que el rango óptimo para que *F. solani* infecte a *P. vulgaris* va de 22°C a 32°C (CIAT, 1990). Sin embargo, el desarrollo de la infección presentó los síntomas normales producidos por *Fusarium solani* que se evidenciaron con la presencia de estrías longitudinales rojizas en el hipocótilo y en la raíz primaria de las plántulas, a medida que progresó la infección, todo el sistema radical se cubrió de lesiones café rojizas superficiales

y en ocasiones se presentaron fisuras tal como lo describió Abawi, en su reporte en 1989.

Se encontró una incidencia total de la infección en las 18 líneas evaluadas y distinta penetrancia del patógeno de acuerdo a la resistencia del genotipo. Tomando en cuenta que la resistencia de una planta ante un patógeno es la habilidad de la planta (hospedero) para detener el crecimiento del patógeno a través de un mecanismo genético. El hospedero retarda o suprime la invasión de sus tejidos por parte del patógeno (Tapiero A. 1999). Así los 18 genotipos de fréjol fueron valorados de acuerdo a la escala del CIAT (1990) y clasificados de acuerdo a su grado de resistencia ante la infección del patógeno en tres grupos como: resistentes, de resistencia moderada y susceptibles.

Los genotipos clasificados como resistentes CO3108, NLS, Negro Pallatanga, presentaron valores de infección de 2.2 a 3.3 según la escala CIAT. Estos genotipos mostraron en la evaluación de la infección un sistema radicular poco afectado, decoloración ligera y pocas lesiones. INIAP en el 2007 reportó a las líneas NSL (padre donante) y Negro Pallatanga (control) como genotipos resistentes. Mientras que la línea de fréjol CO3108 fue reportada como un genotipo susceptible. Este resultado deberá comprobarse puesto que el presente estudio demostró que CO3108 es un genotipo poco estable en su expresión ante el patógeno. Y podemos decir que las líneas NSL y Negro Pallatanga son efectivas para un programa de mejoramiento o como controles resistentes para futuras investigaciones.

Los genotipos de resistencia moderada CO3119, CO3158, CO3129, CO3131, Imbabello, CO3157, CO3148, CO3110, C97407, CO3164 y CO3156 presentaron valores de infección de 4.5 a 6.8. Al momento de ser evaluadas estas líneas mostraron el 50% de los tejidos del hipocótilo y de la raíz cubiertos con lesiones; que se combinan con ablandamiento, pudrición y reducción del sistema radical tal como lo describe la escala de evaluación del CIAT (2000). No existe un reporte previo sobre las líneas CO3158, CO3157, CO3164 y CO3156 por lo cual la clasificación de esta investigación es una base de datos para próximos estudios de resistencia para *F. solani*. INIAP (2007) reportó a las líneas CO3131, CO3148, CO3119 e Imbabello como susceptibles, mientras

que las líneas CO3129 y CO3110 se reportaron como resistentes. La línea CO97407 la madre recurrente de la crucea fue reportada como un genotipo susceptible por Aviles y por INIAP sin embargo al relacionarla con un marcador para un QTL de resistencia se concluyó que esta línea presentaría cierto grado de resistencia ante el patógeno. La conclusión de Aviles apoyaría a decir en la presente investigación que las líneas pertenecientes al grupo de resistencia moderada presentan cierto grado de resistencia ante el patógeno.

El grupo de líneas susceptibles CO3123, CO3156, CO3122, CO3160 y CO3104 presentaron valores de infección de 6,7 a 7,7 según la escala del CIAT (2000). Estas líneas el momento de ser evaluadas presentaron una reducción severa del sistema radical, con más del 75 % de los tejidos del hipocótilo y de la raíz afectados por estados avanzados de pudrición, con un necrosamiento y ablandamiento del tejido radicular. Las líneas CO3160, CO3123 y CO3156 no han sido anteriormente reportadas siendo la presente investigación una fuente de información para futuras investigaciones. INIAP en el 2007 reporta el genotipo CO3122 como susceptible confirmando el resultado. Sin embargo la línea CO3104 fue reportada como un genotipo resistente y en el presente ensayo se encontró como el genotipo más susceptible ante la infección de *F. solani*. Este resultado indicaría que este genotipo es poco estable en su expresión ante el ataque de *F. solani* por lo que sería recomendable realizar más ensayos para medir su variabilidad expresión para la resistencia ante el patógeno.

De manera general la variabilidad de respuesta de los genotipos ante la infección de *F. solani* obtenida en el presente estudio en comparación a ensayos anteriores se podría explicar por la complejidad de la característica cuantitativa. Ya que la resistencia a *F. solani* es una característica cuantitativa, es el resultado de la expresión aditiva de múltiples genes y del efecto del medio ambiente sobre estos (Asíns, 2002 y Hartl *et al.*, 2009). Por lo tanto, la variabilidad de respuesta de las líneas ante *F. solani* podría atribuirse al factor ambiente. Siendo que la cepa de *F. solani* empleada en este estudio no es la misma a la utilizada previamente y este podría ser un factor diferencial sobre la respuesta de resistencia. Esto ha sido reportado por Navarrete y Acosta

(1999) al estudiar la reacción de las variedades de frejol común ante *Fusarium* en México, donde experimentaron una variación en el grado de severidad en los genotipos entre y dentro de los ensayos efectuados en distintas fechas en el mismo sitio. Estos investigadores atribuyeron la variación de respuesta a la complejidad de la resistencia y sugiere la falta de homogeneidad genética de los genotipos, sobre todo de las variedades criollas que pertenecen al acervo Mesoamericano. Adicionalmente señalan la existencia de diferentes razas de *Fusarium* en el sitio de evaluación lo que habría condicionado la variación en el grado de severidad y respuesta de los genotipos.

Además en el presente estudio se observó que los materiales resistentes se ubicaron cuatro puntos más abajo que los materiales susceptibles en la escala CIAT (2000). Schneider (2000) obtuvo un rango parecido, de la misma manera que Roman y Kelly (2005). Esta diferencia en la escala apoya al hecho de que los genotipos resistentes tienen una reducción sustancial en la penetrancia de la infección (Roman & Kelly 2005). Adicional a esto es importante destacar que CO3108, el genotipo más resistente del ensayo sobrepasó la resistencia del padre donante (NSL) y CO3104 el genotipo más susceptible del ensayo sobrepasó el valor de susceptibilidad de la madre recurrente (CO97407). Estos genotipos que obtuvieron valores extremos en la distribución de la resistencia, demuestran el comportamiento de una característica cuantitativa, en una distribución normal (Hartl *et al.*, 2009). Este efecto también fue experimentado en el ensayo realizado por Román & Kelly en el 2005.

La clasificación realizada en el presente estudio por el método convencional debía ser apoyada a través de los resultados de los marcadores moleculares RAPDs. Para lo cual se emplearon cuatro marcadores RAPDs: AL20₈₅₀, G8₈₅₀, O12₈₀₀ y S19_{1000/1100}, marcadores de tipo flanqueante que permiten identificar genotipos que porten posibles QTLs de resistencia ante *F. solani* así como lo reportan Shneider (2001) y de Roman & Kelly (2005). Estos marcadores se reportaron de acuerdo al alelo de la línea donante teniendo así AL20₈₅₀ - G8₈₅₀ y O12₈₀₀ - AL20₈₅₀ marcadores cuyo alelo donante de la resistencia pertenece a NSL. Y el marcador S19₁₀₀₀ - S19₁₁₀₀ cuyo alelo donante de la resistencia de

pertenece a CO97407. Para el presente estudio se tomo como base del análisis, la relación del marcador con el padre donante del alelo resistente para determinar si el marcador era suficientemente polimórfico para distinguir entre genotipos resistentes y susceptibles. Los marcadores AL20₈₅₀ y S19_{1000/1100} en el presente estudio tuvieron bandas esperadas en las líneas donantes del alelo pero también se obtuvieron bandas en los controles contrarios a la resistencia. Los marcadores G8₈₅₀ y O12₈₀ no presentaron bandas en las líneas donantes del alelo de resistencia. En el análisis individual de estos marcadores podemos decir que no presentan el polimorfismo necesario para ser considerados como una herramienta molecular discriminante, debido a que no permiten diferenciar genotipos resistentes de susceptibles.

Así podemos decir que la clasificación de genotipos resistentes de susceptibles fue factible por medio del método convencional (evaluación de la raíz de las líneas inoculadas con *F. solani*) debido a que los cuatro marcadores moleculares empleados en el presente estudio no presentan suficiente polimorfismo para discriminar genotipos resistentes de genotipos susceptibles. Respaldados por los datos obtenidos podemos decir que es necesario la evaluación de nuevos marcadores para ser implementados en un MAS como herramientas de selección.

4.2 Evaluación de líneas resistentes a sequía por medio de método convencional y de marcadores moleculares.

El objetivo del presente ensayo fue evaluar el grado de resistencia a sequía de 16 líneas de fréjol por el método convencional y corroborar el resultado con los marcadores moleculares RAPDS. Siendo las 18 líneas de fréjol: dos parentales recurrentes Fanesquero y Concepción, dos controles resistentes Portilla y Chota y 14 líneas progenies F₅ (IBL). Para la evaluación convencional se reprodujo un ambiente de sequia sembrando las líneas de fréjol bajo una cubierta plástica. Se aplico dos tratamientos: el tratamiento bajo estrés con una frecuencia de riego cada 15 días (bloques 1 y 2) y el tratamiento sin estrés con una frecuencia de riego cada 5 días (bloques 3 y 4).

Todo el ensayo fue sometido a cierto grado de estrés, debido a que la cubierta concentró mayor cantidad de calor que el ambiente normal. La concentración de calor se confirmó por la temperatura interna registrada durante el ensayo; la temperatura mínima de 13 °C y la temperatura máxima de 34 °C en comparación la temperatura mínima anual de 6,5 °C y máxima de 23,1 °C del ambiente normal en Tumbaco. El estrés hídrico experimentado en todo el ensayo se comprobó también mediante el registro los datos de los tensiómetros externos a la cubierta de 19 cb y bajo cubierta de 32,5 cb. El registro de los tensiómetros nos permite decir que la diferencia en la tensión superficial del agua refleja que en el exterior existía mayor cantidad de agua disponible para las plantas que dentro del ensayo.

La diferencia de los tratamientos se comprobó por medio del análisis estadístico del rendimiento (g de semilla/planta) realizado para cada bloque y genotipo; obteniendo alta significancia para los bloques ($p = 0,0417^*$) y las líneas ($p= 0,0002^{**}$). La alta significancia para las líneas nos permite decir que existe diferente respuesta de los genotipos ante el déficit hídrico, reflejado en el rendimiento. Se utilizó la fórmula de la media geométrica (Castañón, 2000) para clasificar a los genotipos de acuerdo a sus resistencia. Esta fórmula relaciona el rendimiento experimentado bajo estrés con el rendimiento del tratamiento sin estrés, obteniendo así dos grupos: genotipos resistentes (con valores de rendimiento sobre la media geométrica) y los genotipos susceptibles (con valores de rendimiento bajo la media geométrica). Esta clasificación refleja el concepto de la resistencia de un cultivar a la sequía, definido como la capacidad de la planta para producir mayor cantidad de semilla y biomasa bajo condiciones limitadas de humedad del suelo (Falconí, 2005).

Los genotipos resistentes DP19, A1P11, DP18, Chota, A1P15, DP15, A1P20 fueron las líneas de fréjol que en el presente estudio no disminuyeron su rendimiento de manera drástica por el déficit hídrico, esto quiere decir que estas líneas de fréjol produjeron similar cantidad de grano en el tratamiento con estrés como en el tratamiento sin estrés. A diferencia de los genotipos susceptibles Concepción, DP16, A1P6, Portilla, DP11, C1P23, Fanesquero, C1P22 y A1P44 que se vieron altamente afectadas por el déficit hídrico que se

reflejo en una reducción en el rendimiento de grano, siendo el efecto contrario al antes expresado. Adicionalmente hay que señalar que el genotipo más resistente en el presente ensayo fue la línea A1P20 con un valor de media geométrica de 8,41. Y la línea Concepción (control susceptible) es el genotipo más afectado por el tratamiento de estrés con un valor de media geometría de 2,4. Los dos valores extremos del experimento demuestran que los genotipos responden de manera distinta ante el estrés hídrico, siendo así que A1P20 presenta una mejor adaptación al déficit hídrico, con un rendimiento similar al que exhibe bajo el tratamiento sin estrés. Así posiblemente la línea A1P20 puede ser un candidato para una cruce para incrementar la resistencia ante el estrés hídrico de una variedad ecuatoriana comercial. Pero también cabe destacar que tanto la línea resistente A1P20 como la línea más susceptible Concepción del presente ensayo pueden ser utilizadas como controles en investigaciones futuras.

La clasificación realizada por el método convencional se debió respaldar con el método molecular, para el cual se utilizaron dos grupos de marcadores: a) los marcadores *OAB18₆₅₀* *OH18₇₁₀* *OF01₅₂₀* *OZ08₇₅₀* *OA08₇₈₀* relacionados a genotipos de alto rendimiento bajo estrés hídrico y b) *OH19₆₉₀* *OA04₅₆₀* *OX11₆₈₀* *OX18₉₈₀* relacionados a genotipos de bajo rendimiento bajo estrés hídrico. En el presente estudio los marcadores *OA08₇₈₀* , *OZ08₇₅₀* *OA04₅₆₀* *OAB18₆₅₀* *OF01₅₂₀* presentaron bandas tanto en los controles positivos como en los controles negativos. Los marcadores *OH18₇₁₀*, *OX18₉₈₀* no presentan banda en ningún control resistente o susceptible. Y los marcadores *OH19₆₉₀* y *OX11₆₈₀* presentaron bandas en los controles resistentes siendo marcadores RAPDS relacionados al grupo de genotipos susceptibles.

Para explicar el resultado obtenido en el presente estudio se cita a Shneider (2001) que trabajo con dos poblaciones distintas en varios años, aplicando el mismo grupo de marcadores moleculares y no encontró ningún marcador asociado con una característica de rendimiento en todas las locaciones y años en que realizó los experimentos. Shneider concluyó que la variación de resultados se debió a la influencia ambiental, algo típico de una característica

cuantitativa como es el estrés hídrico (Hartl *et al.*, 2009). Shneider también concluyó que la aplicación de los marcadores moleculares RAPDs para un MAS (sistema de selección por marcadores moleculares) debe ser no solo específico para una población sino también para un ambiente particular. Esto apoya al objetivo de la presente investigación que era probar la utilidad de los nueve marcadores moleculares dentro del ambiente Ecuatoriano para las 16 líneas de fréjol. Indistintamente del grupo al que pertenecían los marcadores RAPDs según la clasificación de Shneider (2001) en la presente investigación los nueve marcadores moleculares RAPDs no presentan el polimorfismo suficiente para ser considerados como posibles herramientas moleculares que distingan un genotipo resistente de uno susceptible. Al reportar estos marcadores como poco polimórficos se da pauta a la realización de nuevas investigaciones con nuevos marcadores moleculares RAPDs que sirvan como herramientas de selección para los programas de mejoramiento.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

En el ensayo por el método convencional para la resistencia a *Fusarium solani* en invernadero se comprobó que la temperatura registrada (mínima 11°C y máxima 25°C) afectó al crecimiento de las plantas de fréjol y al desarrollo de la infección en las plantas. Puesto que el rango óptimo para que *F. solani* infecte a *P. vulgaris* va de 22°C a 32°C (CIAT, 1990) y que a temperaturas menores a 18 °C se retarda el desarrollo de las plantas de fréjol. Pese al retardo en el desarrollo de la infección se observaron todos los síntomas reportados según la escala CIAT (2000) de *F. solani* en la raíz de las 18 líneas de fréjol evaluadas.

La incidencia de la infección fue total en las 18 líneas de fréjol y la penetrancia del patógeno fue distinta de acuerdo a la resistencia de cada genotipo. Así por el método convencional se clasificó a los 18 genotipos por su grado de resistencia en: resistentes moderados y susceptibles. La línea CO3108 fue la más resistente y su contraparte la línea CO3104 se consideró como la más susceptible.

Se observó una segregación transgresiva de los genotipos CO3108 y CO3104 que sobrepasaron los valores de resistencia y susceptibilidad del padre resistente NSL y de la madre recurrente CO97407 respectivamente, reflejando un comportamiento de una característica cuantitativa.

Se comprobó que los marcadores AL20₈₅₀ - G8₈₅₀, O12₈₀₀ - AL20₈₅₀, S19₁₀₀₀ - S19₁₁₀₀ son poco polimórficos y no pueden emplearse como criterio de selección para diferenciar un genotipo resistente de uno susceptible. Por lo que la clasificación de los genotipos se realizó mediante el método morfo-agronómicos.

En el ensayo por método convencional para la resistencia a estrés hídrico, se evidenció que la concentración de calor provocada por la cubierta empleada causó que todo el ensayo estuviera sometido a cierto grado de estrés en comparación con el ambiente normal de la Granja Experimental Tumbaco. Este

efecto se comprobó con la comparación de la temperatura y de la tensión superficial del agua dentro y fuera de la cubierta.

Se demostró que la aplicación de los dos tratamientos: 1) bajo estrés con una frecuencia de riego cada 15 días y 2) sin estrés con una frecuencia de riego cada 5 días. Los dos tratamientos produjeron una respuesta de las líneas de fréjol diferente, reflejada en su rendimiento (g de semilla/planta). Comprobándose en el análisis estadístico con un valor de p de 0,0002** para los bloques y con un valor de p de 0,0417* para los genotipos, estos valores estadísticos reflejó la diferencia en el rendimiento del grano de cada genotipo en respuesta al déficit hídrico.

Se realizó la clasificación de los genotipos aplicando la fórmula de la media geométrica, fórmula que permite relacionar el rendimiento de cada genotipo bajo de estrés hídrico y sin estrés hídrico. La media geométrica general del ensayo fue de 5,05; es el punto de división entre los genotipos resistentes con valores sobre la media geométrica y los genotipos susceptibles con valores bajo la media geométrica.

Se encontró que los genotipos resistentes DP19, A1P11, DP18, Chota, A1P15, DP15, A1P20 no disminuyeron su rendimiento de manera drástica por el déficit hídrico, estas líneas de fréjol produjeron similar cantidad de grano en el tratamiento con estrés como en el tratamiento sin estrés. Mientras que los genotipos susceptibles Concepción, DP16, A1P6, Portilla, DP11, C1P23, Fanesquero, C1P22 y A1P44 fueron altamente afectadas por el déficit hídrico que se reflejó en una reducción en el rendimiento de grano, en otras palabras estos genotipos produjeron menor cantidad de grano bajo condiciones de estrés que sin el déficit hídrico.

Se observó que la línea más resistente del ensayo fue A1P20 con un valor de media geométrica de 8,41. Mientras que la línea Concepción es el genotipo más afectado por el tratamiento de estrés con un valor de media geométrica de 2,4. Los dos valores extremos de estas líneas demuestran que los genotipos responden de manera distinta ante el estrés hídrico, siendo así que A1P20

presenta una mejor adaptación al déficit hídrico, con un rendimiento similar al que exhibe bajo el tratamiento sin estrés.

Se comprobó que los marcadores *OAB18₆₅₀* *OH18₇₁₀* *OF01₅₂₀* *OZ08₇₅₀* *OA08₇₈₀* relacionados a genotipos de alto rendimiento bajo estrés hídrico y los marcadores *OH19₆₉₀* *OA04₅₆₀* *OX11₆₈₀* *OX18₉₈₀* relacionados a genotipos de bajo rendimiento bajo estrés hídrico no pueden ser utilizados como herramientas moleculares para un sistema de selección asistida por marcadores moleculares (MAS). El polimorfismo que presentaron estos marcadores es insuficiente para poder distinguir un genotipo resistente de un genotipo susceptible.

Se concluyó en el presente estudio tanto para la resistencia a *F. solani* como para la resistencia a estrés hídrico que los métodos morfo-agronómicos son los que permitieron diferenciar a los genotipos resistentes de susceptibles, al contrario del uso de marcadores moleculares. Así es posible decir que es necesario realizar nuevas investigaciones con mayor número de marcadores moleculares para las líneas de fréjol desarrolladas en el Ecuador, tanto para el caso resistencia a *F. solani* como para estrés hídrico. De esta manera se encontrarán marcadores moleculares que puedan implementarse a un sistema de selección asistida por marcadores moleculares.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

Se debería realizar pruebas de inoculación con distintas cepas de *Fusarium solani* recolectadas en diversos áreas del país para evaluar la penetrancia de infección en los genotipos de fréjol.

Se podría diseñar un ensayo para estrés hídrico en distintas aéreas de cultivo del país comparando el rendimiento (g/parcela) de una población diseñada para la resistencia a sequía. Así se podría observar cual es el factor ambiental que influye en la expresión de la resistencia de la sequía variando su rendimiento.

Es importante realizar un ensayo para resistencia a sequía controlando la cantidad de agua de riego que ingresa al ensayo, de tal forma que se pueda determinar cuánta agua es utilizada por las plantas y cuanto pierden las mismas por transpiración.

Se debería efectuar un mapeo de QTLs con líneas de fréjol desarrolladas en el Ecuador tanto para la resistencia a *F. solani* como para estrés hídrico, de tal forma que se encuentren marcadores propios de los individuos donadores de resistencia en el país.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Anderson, J.A. 2000. Marker-assisted selection of disease resistance genes in wheat. M.M. Kohli and M. Francis (eds). Application of biotechnologies to wheat breeding. p. 71–84.

Acosta J., Cabral M., González F., Fraire S. Pons J., Rodríguez R., Sánchez B., Simpson J., 2006. *Fusarium lateritium*: New pathogen of bean roots in Mexico. Agricultura Técnica en México. 32(3): 251-257.

Asíns M., Carbonell E., Perez P. 2003. Optimización del análisis de QTLs (Quantitative trait loci) en poblaciones de líneas recombinantes puras (RILs) IX Conferencia Española de Biometría. p. 21-23 Consultado 10 sep. 2009. Disponible en <http://www.udc.es/dep/mate/biometria2003/Archivos/ag60.pdf>

Beattie, A. Larsen, J., Michaels, T., Pauls P. 2003. NRC Canada Mapping quantitative trait loci for a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ideotype . Genome 46: 411–422.

Brothers M., James, D., Schneider K. 1997. Marker-Assisted Selection to Improve Drought Resistance in Common Bean. Crop Science 37:51-60

Broughton W., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus spp.*) – model food legumes, FAO. Plant and Soil. 252: 55–128.

BPA (Buenas prácticas agrícolas). 2006. Producción de fréjol voluble; Manejo fitosanitario. (En línea). Colombia. Consultado el 7 oct. 2009. Disponible en: <http://64.233.167.104/search?q=cache:jQJHMAzsgRoJ:ftp://ftp.fao.org/docrep/p/fao/010/a1359s/a1359s04.pdf+pudricion+radical+F.+solani+frijol&hl=es&ct=clnk&cd=4&gl=e>

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de Frijol. Aart van Schoonhoven y Marcial A. Pastor-Corrales (comps.) Cali, Colombia. p. 56.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1989. Bean production problems in the tropics. 2nd ed. Schwartz, H. F. and Pastor-Corrales, M.A. (eds). Cali, Colombia. p.726.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. 35: 12-15.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2003. Fitomejoramiento participativo de sorgo mediante la selección pedigrí ficha método e fitomejoramiento participativo. (en línea). Colombia. Consultado el 17 de oct. 2009. Disponible en <http://Selectionparticipative.cirad.fr>

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2006. Progreso en la Investigación y Producción del frejol común (*Phaseolus vulgaris L.*) Pudriciones radicales de frijol y su control 55: 15-17, 33.

Collard Y., Jahufer M., Brouwer J., Pang1 K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142: 169–196.

Cubero, J. 1999. “Introducción a la mejora genética vegetal”. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid – España. p. 96–112.

Dorado G., Rallo P., Hernandez P., Gimenes M.J., Benites Y., Diaz I. 2005. Desarrollo de marcadores moleculares y herramientas genómicas para la trazabilidad, identificación y mejora del olivo, la aceituna y el aceite de oliva. I Congreso del Cultivo del Olivo. p. 539-550.

Estrella P. 2002. Evaluación de cuatro líneas de fréjol arbustivo *Phaseolus vulgaris* L. de grano negro pajo tres formulas de fertilización química en Tumbaco-Pichincha. Tesis Ing. Agr. Sangolquí. Escuela Politécnica del Ejército. 121 p.

Falconí E. 2005. Identification of drought resistance in large seeded common bean genotypes. Tesis Msc. Michigan. Michigan University. p. 154.

FENALCE (Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas). 2007. Leguminosas: Frejol (*Phaseolus vulgaris*) (en línea). Bogota, C. Consultado 6 de Ago. 2009. Disponible en <http://fenalce.net>

Gepts P., Bliss F. 1985. F_1 hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germoplasm. *Hered.* 76: 447–450.

Hartl D., Jones E. 2009. Genetics: Cap 18: Complex Traits. Jones and Bartlett (eds). 7 ed. EEUU. 860 p.

Kelly J., Afanado L., Haley S., Miklas P. 1994. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. *Agronomía Mesoamericana*. 5:1-7.

Martinez B., Ibanez M., Rincon F. 2002. Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. 52(3):219-231. (En línea). Consultado el 14 jun. 2009. Disponible en <http://www.scielo.org.ve/scielo>.

Miklas, P., Stavely J., Kelly J. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85:745-749.

Narváes L. 2003. Métodos de Selección . INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). Nicaragua. (en línea) consultado el 18 de jul. 2009. Disponible en <http://agr.unne.edu.ar/fao/Nica-ppt/Narvaez-SELECCIoN.pdf>

Navarrete A., & Acosta P. 1999. Reaccion del frijol común a la pudrición radical por *Fusarium* spp. *Agronomía mesoamericana* 10(1): 37-46.

Pañeda A. 2005. Desarrollo de herramientas moleculares para la localización de genes de interés en la mejora genética de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis Msc. Universidad de Oviedo. España. 188 p.

Yah C., EV. 1998. Crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp. iniciadas a partir de flores inmaduras. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 77 p.

Pennington J. & Young B. 1990a Sodium, potassium, calcium, phosphorus and magnesium in foods from the United States total diet study. *J. Food Comp. Anal.* 3, 145–165.

Peralta, E., Murillo, E. Falconi, N. Mazon y J. Pinzón. 2007. Manual de Campo para el reconocimiento y control de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ecuador. Publicación Miscelánea No. 136. Programa de leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador, 33p.

Ramírez L., Egaña B. 2003. Guía de conceptos de genética cuantitativa. (en línea). Consultado el 17 de sep. 2009. Disponible en <http://www.unavarra.es/genmic/genetica%20y%20mejora/genetica%20cuantitativa/GENETICA-CUANTITATIVA.htm>

Robinson D. 1987. Food; biochemistry and nutritional value. Longman Scientific and Technical Press. Essex, UK. p 23-25.

Roman, B., Snap, S., Kelly, D., 2003. Assessing root traits associates with root rot resistance in common bean. *Crop Science* 56: 196-207.

Schneider K., Brothers M., Kelly J., 1997. Marker assisted selection to improve drought resistance in common bean. *Crop Science* 37:51-60.

SICA (Servicio de información y censo agropecuario) 2007. III censo. Tablas num: 3, 20, 21 (en línea) Ecuador. Consultado el 15 oct. 2009. Disponible en <http://www.sica.gov.ec/censo/docs/nacionales/tabla20.htm>

Singh S., Gutiérrez A., Molina A., Urrea C., Gepts P. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Sci* 31: 23-29.

Simmonds N. 1981. Principles of crop improvement. 2 ed. Editorial LONGMAN. EEUU. Cap 1-2.

Subia, C., Peralta, E., Falconi, E., Pinzon, J., Mooney, D., Swinton S. 2007.

Diagnostico sobre el cultivo de fréjol arbustivo y el uso de pesticidas en el sistema de producción, en los valles del Chota y Mira. Provincias Imbabura y Carchi, Ecuador. 2000-2005. Publicación miscelánea No. 138. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos, INIAP. Quito, Ecuador 55p.

Taperito A. 1999. Durable resistance for plant diseases. Colombia. *ORPOICA* 5(1):25-29

Trujillo C. 2006. 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. 97 p.

Velasco R. 2005. Marcadores Moleculares y la extracción de ADN. Mexico. *Ciencias Agropecuarias*. 3(1):45-49.

Voysest O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999 .CIAT. 32:195.

Misle E. & Norero A. 2001. Comportamiento térmico del suelo bajo cubiertas plásticas y el efecto de diferentes tipos de láminas. Mexico .*Agricultura Técnica*. 61 (4):56-62

Martínez C. & Moreno U. 1992. Expresiones fisiológicas de resistencia a la sequia en dos variedades de papa sometidas a estrés hídrico en condiciones de campo. R. Bras. Fisiol. Veg. 4(1):33-38

ANEXOS

ANEXO N°1

Escala de evaluación Visual de Pudrición Radical según CIAT 1987.

Escala	Síntomas
0-1	No existen síntomas visibles de la enfermedad
2-3	Decoloración ligera, ya sea sin lesiones necróticas o con un 10% aproximadamente de los tejidos del hipocótilo y de la raíz cubiertos con lesiones.
4-5	Aproximadamente 25% de los tejidos del hipocótilo y de la raíz están cubiertos con lesiones, pero los tejidos se conservan firmes y hay poco deterioro del sistema radical. Pueden observarse síntomas de decoloración fuerte.
6-7	Aproximadamente 50% de los tejidos del hipocótilo y de la raíz están cubiertos con lesiones que se combinan con ablandamiento, pudrición y reducción considerable del sistema radical.
8-9	Aproximadamente 75% o más de los tejidos de hipocótilo y de la raíz están afectados por estados avanzados de pudrición, en combinación con una reducción severa del sistema radical

ANEXO N°2

Sistema Estándar para la Evaluación de Adaptación (vigor) del germoplasma de fréjol utilizada por CIAT 1991.

Escala	Adaptación (vigor)
1-3	Buena
4-6	Intermedia
7-9	Malo

ANEXO N°3

Sistema Estándar para la Evaluación de Adaptación (carga) del germoplasma de frejol utilizada por CIAT 1991.

Escala	Adaptación (carga)
1-3	Buena (número elevado de vainas por planta, vainas gruesas y largas, completo llenado de semillas por vaina, semillas grandes y gruesas).
4-6	Intermedia.
7-9	Malo (poca cantidad de vainas por planta, vainas pequeñas y delgadas, vainas sin completo llenado de todas sus semillas, semillas muy pequeñas y delgadas.)