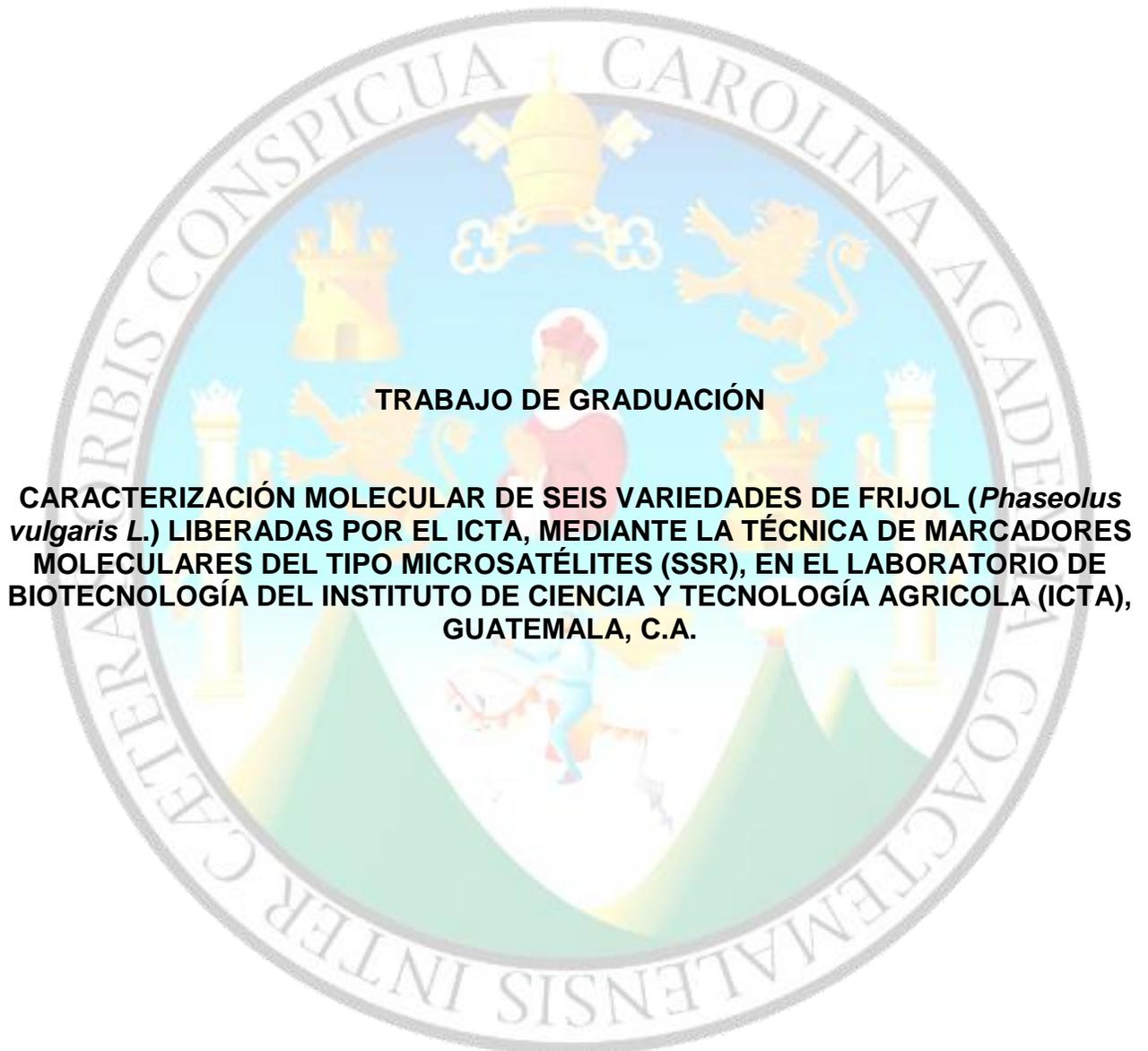


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ÁREA INTEGRADA



TRABAJO DE GRADUACIÓN

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIETADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A.

ALEX FERNANDO SOSA YUPE

GUATEMALA, SEPTIEMBRE 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ÁREA INTEGRADA

TRABAJO DE GRADUACIÓN

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIEDADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris L.*) LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A.

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

ALEX FERNANDO SOSA YUPE

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2018

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

RECTOR

Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO

VOCAL PRIMERO

VOCAL SEGUNDO

VOCAL TERCERO

VOCAL CUARTO

VOCAL QUINTO

SECRETARIO

Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López

Dr. Tomás Antonio Padilla Cámara

Ing. Agr. M.A. César Linneo García Contreras

Ing. Agr. M. Sc. Erberto Raúl Alfaro Ortiz

P. E. Carlos Waldemar De León Samayoa

P. Agr. Marvin Orlando Sicajau Pec

Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón

Guatemala, septiembre de 2018

Guatemala, septiembre de 2018

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de Graduación: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIEDADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A.” como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Alex Fernando Sosa Yupe

ACTO QUE DEDICO A:

DIOS

Por darme la vida, y los dones del conocimiento y la razón para descubrir su obra y describirla por medio de la ciencia, por hacerme obediente a su voluntad señor mío, por estar conmigo en todo momento, por estar presente cada vez que doy un paso en la vida, puesto que nada podríamos hacer sino es por su obra y voluntad y por sobre todo, por darme la enorme dicha de creer en ti.

Mis padres

Blanca Estela Yupe Centeno por ser mi apoyo en todo momento desde antes de nacer, tú me tuviste en tu vientre, me cuidaste con tu vida, e incluso me diste una fracción de ella, por nunca desprotegerme y siempre corregir mis pasos torpes en la vida y hacerme un hombre recto que todos los días piensa en el amor incondicional de su madre, Neri Randolpho Sosa Mejía, por tu apoyo incondicional y el más grande ejemplo de un hombre de trabajo arduo y de perseverancia, puesto que tú me enseñaste que nunca he de rendirme que por más veces que caiga en la vida, he de levantarme aunque eso me cueste cada vez más, los amo a ambos y les agradezco enormemente su sacrificio para hoy lograr esta meta, ¡lo logramos!

Mi hijo

Thiago Fernando Sosa Figueroa por enseñarme con toda la dulzura, inocencia, y felicidad del mundo el milagro de ser padre, por darme una razón inagotable para luchar día a día, tal como yo lo fui para mi padre, gracias por compartir este logro conmigo, pronto celebraremos los tuyos, te amo hijo mío, prometo estar allí para apoyarte.

Mi Esposa

Valeria María Figueroa de Sosa por tu amor incondicional, por haber emprendido junto a mí, la familia que siempre soñamos el uno al lado del otro, por haber estado allí cuando siempre te necesité, por nunca dejarme, y darme tu ayuda para levantarme cada vez que lo he necesitado, por ser mi primer y único amor, mi confidente, mi mejor amiga, te amo.

Mi hermano

Dr. José Alejandro Sosa Yupe, por tu apoyo en los momentos más difíciles para mí, por compartir conmigo mis mejores momentos y celebrarlos a mi lado, por ser un ejemplo de superación y compartir un lazo de sangre indeleble que nadie nunca podrá borrar

Mis abuelos

Felix Yupe Sían y Clementina Centeno de Yupe, por siempre estar para mí, por sus incansables cuidados en mi niñez, Fernando Sosa Vargas y Juana Antonia Mejía Sosa, por su ejemplo de superación y trabajo arduo para lograr las metas, a pesar de no haber compartido mucho tiempo a su lado su memoria siempre prevalecerá en mi mente y corazón.

Mis tíos

Mis tíos, Juan, Josefina, Irma, Verónica, Elsa, Consuelo, María, Juan Antonio y Roberto, infinitas gracias por su apoyo y consejos los cuales han sido de vital importancia para este logro en mi vida.

Mis primos

Juan Fernando, Roberto, Daniel, Gabriela, Josué, Karina, Fernanda, Karen, Jennifer, María José y Jimena con mucho cariño.

Mis amigos

Moisés y Edgardo por ser camaradas de incontables horas de estudio, por enfrentar los retos académicos como un equipo, acompañados de risas, estoy muy orgulloso de ser su amigo.

TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

A:

DIOS

Por darme la dicha de creer en ti, por levantarme y darme siempre una segunda oportunidad.

Mi familia

Son mi motor de todos los días, mi mayor motivación.

El pueblo de Guatemala

Por tu sed de profesionales en el campo agrícola.

AGRADECIMIENTOS A:

COLEGIO SAN JOSÉ DE LOS INFANTES Por contribuir en mi formación personal, moral, espiritual y científica, porque el hecho de llevar doscientos treinta años de tu historia sobre mis hombros, fue una motivación que me ayudo a superar cada una de las metas que me proponía.

FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA Y SUS PROFESORES Por todas sus enseñanzas, por desarrollar mi capacidad investigativa y por brindarme las herramientas para desarrollarme como un profesional a la altura de las exigencias del pueblo de Guatemala.

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS Y SU PERSONAL Por darme la oportunidad de realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología, por los conocimientos adquiridos en biología molecular por parte de sus profesionales, por la amabilidad de su equipo de trabajo y su cariño y apoyo hacia mi persona.

MIS ASESORES El Ing. Agr. M. Sc. Héctor Alfredo Sagastume Mena y el Ing. Agr. M. Sc. Luis Rodolfo Montes Osorio por su amistad, paciencia y dedicación al transmitirme su conocimiento y experiencia al momento de la realización del presente trabajo de graduación

MI SUPERVISOR El Ing. Agr. M. Sc. Fernando Rodríguez Bracamonte, por sus enseñanzas y exigencias, por su guía en el proceso de la realización de este trabajo de graduación.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Índice General	i
Índice de Cuadros	iv
Índice de Figuras	vi
Resumen	ix
CÁPITULO I: DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS.....	1
1.1 Presentación	3
1.2 Marco Referencial	4
1.3 Objetivos	8
1.3.1 Objetivo General	8
1.4 Metodología.....	8
1.4.1 Elaboración de un plan de diagnóstico.....	8
1.4.2 Reconocimiento y recopilación de la Información.	9
1.4.3 Análisis de la información.....	9
1.5 Resultados	9
1.5.1 Ajo.....	9
1.5.2 Alcachofa.....	11
1.5.3 Anturio	11
1.5.4 Arándano.....	13
1.5.5 Arroz	15
1.5.6 Banano	18
1.5.7 Bromelia	20
1.5.8 Cactus	22

Contenido	Página
1.5.9 Camote	24
1.5.10 Caña de Azúcar	26
1.5.11 Chamaedorea	26
1.5.12 Chipe.....	27
1.5.13 Cítricos.....	29
1.5.14 Coníferas	29
1.5.15 Espárrago	29
1.5.16 Frijol..	30
1.5.17 <i>Hoffmania sessilifolia</i> L.	34
1.5.18 Maíz	36
1.5.19 Malanga	37
1.5.20 Orquídeas.	37
1.5.21 Papa	39
1.5.22 Papaya.....	44
1.5.23 Patchouli	45
1.5.24 Piña	45
1.5.25 Piñon.....	46
1.5.26 Pitaya.....	47
1.5.27 Trigo	48
1.5.28 Uva	48
1.5.29 Vainilla	49
1.5.30 Xate	50
1.6 Conclusiones	51
1.7 Recomendaciones	52

Contenido	Página
1.8 Bibliografía	53
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIEDADES DE FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRICOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A.....	57
2.1 Presentación	58
2.2 Marco Teórico	61
2.2.1 Marco Conceptual	61
2.2.2 Marco Referencial	90
2.3 Objetivos	103
2.3.1 Objetivo General	103
2.3.2 Objetivos Específicos	103
2.4 Hipótesis.....	103
2.5 Metodología.....	104
2.5.1 Metodología experimental	104
2.6 Resultados y discusión.....	116
2.6.1 Extracción de ADN	116
2.6.2 Amplificación mediante PCR y visualización de microsatélites para caracterización molecular	118
2.6.3 Estadística descriptiva para los datos de marcadores moleculares	120
2.6.4 Análisis multivariado.....	126
2.6.5 Huella genética.....	132
2.7 Conclusiones.....	135
2.8 Recomendaciones.....	136

Contenido	Página
2.9 Bibliografía	137
CAPÍTULO III: SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS-ICTA-, BÁRCENA, VILLA NUEVA.	147
3.1 Presentación	148
3.1.1 Apoyo a las actividades diarias del laboratorio de biotecnología del ICTA	149
3.2 Anexos	162
3.2.1 Anexo I: Selección asistida con marcadores ligados a genes de resistencia a..... enfermedades en frijol	162
3.2.2 Bibliografía	181

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Producción desglosada de frijol, por regiones del planeta tierra.	62
Cuadro 2. Diferencias morfológicas entre frijol común domesticado de cada uno de los acervos genéticos.	68
Cuadro 3. Posibles combinaciones de comparación entre dos UBC'S para análisis de similaridad	85
Cuadro 4. Coeficientes de similaridad entre individuos, con su respectiva fórmula y autor	86
Cuadro 5. Métodos de aglomeración más empleados en las caracterizaciones de germoplasma.....	88
Cuadro 6. Linaje de la variedad ICTA Altense de frijol negro.....	98
Cuadro 7. Linaje de la variedad de frijol negro ICTA Hunapú.	99
Cuadro 8. Características de la variedad ICTA Petén	100
Cuadro 9. Características de la variedad ICTA Sayaxché	101

Contenido	Página
Cuadro 10. Microsatélites empleados en la caracterización molecular	105
Cuadro 11. Protocolo de extracción de ADN, propuesto por Bioteccon Diagnostics©.....	108
Cuadro 12. Cantidades e ingredientes empleados para la elaboración de un gel de poliacrilamida.....	112
Cuadro 13. Procedimiento para tinción de plata de fragmentos de ADN separados en geles de poliacrilamida.....	114
Cuadro 14. Razones A260 y A280 y concentraciones obtenidas en el proceso de extracción de ADN de las seis variedades de frijol evaluadas.....	116
Cuadro 15. Matriz de datos binarios, para análisis clúster de diversidad genética	120
Cuadro 16. Estadística descriptiva para los datos de marcadores moleculares	121
Cuadro 17. Estadística descriptiva para los microsatélites empleados en la caracterización molecular.	126
Cuadro 18. Datos de distancia calculados a partir del índice de similaridad de Dice en la seis variedades de frijol.	127
Cuadro 19. Fragmentos amplificados por los marcadores moleculares presentados en el cuadro 10 para las variedades de frijol ICTA Altense, ICTA Superchiva, ICTA Hunapú, ICTA Ligero, ICTA Petén e ICTA Sayaxché.....	133
Cuadro 20. Composición del medio basal MS, empleado en el laboratorio de Biotecnología.	150
Cuadro 21. Características del marcador molecular SCAR SBB14 para el gen Co-42.....	155
Cuadro 22. Características de los microsatélites altamente polimórficos.....	157
Cuadro 23. Tratamientos de irradiación en camote y papa.....	158
Cuadro 24. Marcadores moleculares tipo SCAR ligados a resistencia a enfermedades utilizados en frijol.	170
Cuadro 25. Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de los SCAR.	172
Cuadro 26. Programa del termociclador para la amplificación de los genes de resistencia a enfermedades utilizando primers tipo SCAR.	173

Contenido	Página
Cuadro 27. Resumen de los resultados obtenidos en 14 líneas avanzadas de frijol provenientes de Puerto Rico.....	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del cultivo de frijol común a nivel mundial	63
Figura 2. Fotografía de granos de frijol seco.....	64
Figura 3. Fotografía de vaina inmadura de frijol.....	64
Figura 4. Fotografía de granos verdes de frijol.	65
Figura 5. Distribución del frijol común silvestre en México.....	66
Figura 6. Lugares donde se han encontrado semillas de frijol domesticado en el continente americano.	67
Figura 7. Planta de frijol común ilustrada.....	70
Figura 8. Desarrollo inicial de la raíz del frijol común.	71
Figura 9. Raíz de Frijol con Nódulos.....	71
Figura 10. Tallo de frijol con sus partes señaladas.	72
Figura 11. Tipos de pubescencia presentes en el frijol común.	73
Figura 12. Tipos de hábitos de crecimiento del frijol común.	75
Figura 13. Tipos de hojas del frijol.	76
Figura 14. Partes de la flor del frijol.	77
Figura 15. Vaina de frijol con sus partes señaladas.....	78
Figura 16. Partes externas de la semilla de frijol	79
Figura 17. Partes internas de una semilla de frijol.	79
Figura 18. Fotografía satelital de la ubicación del estudio.	90
Figura 19. Líneas de frijol sembradas en invernadero	106
Figura 20. Líneas de frijol sembradas en invernadero en etapa de crecimiento vegetativo	106
Figura 21. Momento de la colección de tejido vegetal.	107
Figura 22. Kit de extracción de ADN.....	109

Contenido	Página
Figura 23. Termociclador empleado en el proceso de PCR.....	110
Figura 24. Sistema de electroforesis vertical empleado para la separación de fragmentos de ADN	113
Figura 25. ADN extraído de las variedades de frijol	117
Figura 26. Gel de poliacrilamida al 8 %, en este se muestran las bandas amplificadas por el marcador molecular pv.gccacc001 para seis variedades de frijol.....	119
Figura 27. Patrón molecular generado en hoja de cálculo electrónica, por los quince pares de cebadores, para las seis variedades de frijol en estudio, carriles del uno al seis, ICTA Altense, ICTA Superchiva, ICTA Hunapú, ICTA Ligerero, ICTA Petén e ICTA Sayaxché respectivamente	134
Figura 27. Medio de cultivo elaborado para propagación de camote in vitro.	151
Figura 28. Elaboración de medio de cultivo para propagación de plantas in vitro.....	151
Figura 29. Araña roja (<i>Tetranychus sp.</i>) en plantas de yuca (<i>Manihot esculenta</i>).....	153
Figura 30. Chinche Harinosa (<i>Pseudococcus sp.</i>) en plantas de Macal (<i>Xanthosoma sagittifolium</i>).	153
Figura 31. Daño en yuca provocado por Araña roja (<i>Tetranychus sp.</i>).....	154
Figura 32. Araña roja (<i>Tetranychus sp.</i>).....	154
Figura 33. Selecciones sembradas en el invernadero del laboratorio de Biotecnología. .	156
Figura 34. Selecciones de frijol después de la germinación en el invernadero del laboratorio de Biotecnología.	156
Figura 35. Microesquejes de papa irradiados.....	159
Figura 36. Establecimiento in vitro de explantes de geranio para propagación masiva. ..	160
Figura 37. Formación de plántulas generadas por explantes de geranio.....	161
Figura 38. Marcadores SR2 y SK14.....	174
Figura 39. Marcador SAE19.....	175
Figura 40. Marcadores SAE19 y SK14.....	175
Figura 41. Marcadores SK14 y SR2.....	175
Figura 42. Marcadores SR2 y SA14.....	175

Contenido	Página
Figura 43. Marcadores SA14 y SNO2.....	176
Figura 44. Marcadores SK14 y SAE19.	176
Figura 45. Marcador SAE19.....	176
Figura 46. Marcadores ROC11, SNO2, SH13, SAE19, SK14 y SR2, para las líneas 8, 12, 13 y 14.	177
Figura 47. Marcador SR2.....	177
Figura 48. Marcador SA14.....	177
Figura 49. Marcadores SAE19, SK14, SR2, ROC11 y SH13 en las líneas 8, 12, 13 y 14.....	178

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIEDADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA C.A.

RESUMEN

Guatemala es un país eminentemente agrícola, es por eso que sus autoridades de gobierno se han visto en la necesidad apuntando a su desarrollo de crear una institución enfocada en la ciencia y tecnología agrícolas, esta entidad es la encargada de desarrollar nuevas variedades e híbridos de distintos cultivos como es el caso del frijol, maíz, arroz, hortalizas y frutales, dentro de los principales programas de mejoramiento genético del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, es el programa de mejoramiento de frijol, puesto que la ingesta promedio por año por persona de frijol en Guatemala es de 20 kg, siendo el frijol la principal fuente de proteína en la dieta de los guatemaltecos, el programa es el encargado de generar variedades que cumplan con todas los caracteres requeridos por el agricultor guatemalteco, que incrementen sus rendimientos en la mayor medida posible, para agilizar estos procesos, el ICTA cuenta con disciplinas de apoyo, siendo una de estas la disciplina de biotecnología, el presente documento reúne, el diagnóstico, la investigación y los servicios realizados en el laboratorio de biotecnología del ICTA, el diagnóstico consistió en recopilar y presentar un resumen de investigaciones realizadas por el laboratorio desde su fundación en 1990 hasta la fecha, dando a conocer el aporte de este al agro guatemalteco, según el diagnóstico se han realizado más de “50” investigaciones, desde su fundación, en distintos cultivos como lo son ajo, alcachofa, anturio, arándano, arroz, bromelias, cactus, camote, caña de azúcar cítricos, chipe, coníferas, espárragos, frijol, especies endémicas, maíz, malanga, papa, papaya, piña, piñón, pitaya, trigo, uva, vainilla y xate.

La investigación consistió en una caracterización molecular de seis variedades de frijol liberadas por el ICTA, esta fue realizada mediante quince marcadores moleculares del tipo microsatélite (SSR), los fragmentos amplificados por estos fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 8 y 16% , a partir de los fragmentos amplificados fue construido un dendrograma utilizando el índice de similaridad de Dice y un método de aglomeración de UPGMA, a partir de este fueron separados dos grupos a un coeficiente de similitud de 0.59 en el primer grupo se encuentran las variedades ICTA Superchiva, ICTA Petén e ICTA Ligero con distancias calculadas a partir del índice de similaridad de Dice que van desde 0.16, hasta 0.48 y un segundo grupo donde se encuentran las variedades ICTA Hunapú, ICTA Altense e ICTA Sayaxché, con distancias que van desde 0.28 a 0.55; dentro de ambos grupos las variedades más similares entre sí, genéticamente son ICTA Petén e ICTA Ligero con una distancia de 0.16 y las variedades más distantes entre sí son ICTA Petén e ICTA Sayaxché con una distancia entre ellas de 0.60

Durante el EPS fueron realizados distintos servicios al laboratorio de biotecnología, siendo el más destacable el de selección asistida con marcadores ligados a genes de resistencia a enfermedades en frijol donde fueron seleccionadas 12 líneas de frijol avanzadas provenientes de Puerto Rico, según sus características de presencia de genes que le brindan resistencia a virus del mosaico común, virus del mosaico dorado , mancha angular y roya del frijol, con el fin de encontrar las mejores líneas a ser empleadas como parentales en el programa de mejoramiento genético del ICTA, también se brindo apoyo al laboratorio en sus actividades diarias, como preparación de medios de cultivo, darle manejo agronómico al invernadero de aclimatización de plántulas y en la realización de protocolos.



**CAPÍTULO I: DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS**

1.1 Presentación

El Laboratorio de Biotecnología, de Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas fue inaugurado en el año 1990, construido mediante el proyecto PROGETAPS (Proyecto de Generación y Transferencia de Tecnología y Producción de Semillas), ejecutado mediante un préstamo del Banco Interamericano de Desarrollo -BID-. El laboratorio fue equipado en un 90% por donaciones japonesas y por la Organización Internacional de Energía Atómica -OIEA-, el otro 10% fue brindado por la propia institución y otras donaciones por entidades nacionales.

El laboratorio fue diseñado principalmente, para la investigación, micropropagación masiva de plantas, capacitación de personal y conservación de plantas tanto *in vitro* y *ex vitro*, en apoyo de los programas de mejoramiento genético de plantas

En el año 2001, se implementó la parte de biología molecular, realizando distintos trabajos de esta disciplina, tales como la identificación de genes de interés para el desarrollo de nuevas variedades, caracterizaciones de variedades, con fines de registro, y determinar que tan emparentadas está una de otra. Este laboratorio al igual que el de cultivo de tejidos fue equipado por las mismas instituciones en la misma proporción.

El laboratorio cuenta con un equipo de trabajo de cinco personas, dos profesionales que velan por el funcionamiento del mismo, tanto en la parte de biología molecular como en cultivo de tejidos y tres operarios, que desarrollan distintas tareas.

El laboratorio posee dos partes principales, una parte de cultivo de tejidos, la cual se subdivide, en las áreas de lavado de cristalería, autoclaves, de cámaras de flujo laminar, cuartos de crecimiento, bodega de cristalería y de reactivos y la de invernaderos, donde se aclimatan las plantas, una segunda área de marcadores moleculares, que se divide en extracción de ADN y realización de PCR y de Electroforesis.

La misión del laboratorio es apoyar a los programas de mejoramiento de plantas a través de las actividades que realiza, nivel nacional, utilizando técnicas de biotecnología actuales.

El presente diagnóstico busca, recopilar los informes de las investigaciones realizadas, desde la fecha de su fundación, hasta el presente, ordenándolas por cultivo.

Para la realización de este diagnóstico fueron consultadas las bases de datos del centro de documentación del ICTA (CEDICTA), la Biblioteca de la Facultad de Agronomía de la USAC, la Biblioteca de CONCYT, se realizaron entrevistas a los directivos del laboratorio y revisados los archivos de las investigaciones que en este se realizan, al haber recopilado la información existente, se organizó según el cultivo y el año en que fueron desarrolladas, plasmándolas en el presente documento con el fin de registrar el aporte del laboratorio de biotecnología del ICTA a la sociedad guatemalteca.

En el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, se han realizado más de “50” investigaciones, desde su fundación, en los cultivos: ajo, alcachofa, anturio, arándano, arroz, bromelias, cactus, camote, caña de azúcar, cítricos, chipe, coníferas, espárragos, frijol, especies endémicas, maíz, malanga, papa, papaya, piña, piñón, pitaya, trigo, uva, vainilla y xate, principalmente en la búsqueda de protocolos de propagación *in vitro* con fines de encontrar medios de cultivo, explantes y relaciones de reguladores de crecimiento para obtener el mayor beneficio en la micropropagación de las especies listadas y en la parte de marcadores moleculares, se han realizado caracterizaciones moleculares con el fin de conocer la diversidad genética de variedades y accesiones del Instituto con fines de registro y mejoramiento genético en apoyo a los programas de mejoramiento genético del ICTA.

1.2 Marco Referencial

La Biotecnología se define como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010) Desde hace miles de años el hombre ha aplicado la biotecnología, por ejemplo, al momento de emplear levadura para producir pan, producir yogurt, cerveza, etc.

La Biotecnología Moderna, abarca distintas técnicas que apoyan e incrementan la eficiencia de la agricultura convencional, tales técnicas son cultivo de tejidos, marcadores moleculares y la ingeniería genética, de estas en el laboratorio solo se realizan dos, los marcadores moleculares y el cultivo de tejidos.

Las técnicas biotecnológicas en la agricultura se utilizan para desarrollar nuevas variedades por selección asistida de marcadores moleculares, propagación masiva de plantas, detección y diagnóstico certero de enfermedades, caracterizar molecularmente con fines de registro variedades vegetales, determinar la biodiversidad genética de una población de determinada especie, conservación *in vitro* de colecciones de plantas, transformación genética de plantas, síntesis de compuestos orgánicos, tales como bioplaguicidas, producción de líneas puras para el mejoramiento genético, todas estas técnicas, se engloban principalmente para auxiliar a la producción agrícola, específicamente en el fitomejoramiento, protección y nutrición vegetal.(Levitus et al., 2010).

Debido al desarrollo de la Biotecnología Moderna o también llamada Biotecnología de Cuarta Generación, la cual permite conocer las secuencias en las que se encuentran cada uno de los nucleótidos del ADN y como éstos se expresan para crear proteínas en el organismo, además de manipular las moléculas de ADN, esta tecnología se ha convertido en una disciplina controversial, la cual es capaz de solucionar grandes problemas para la sociedad, pero a la vez crear problemas, tan grandes como los que soluciona, ha generado grandes temores, y con ellos nuevas esperanzas en el futuro del mundo (Flórez, 2010).

La Biotecnología ofrece muchos aspectos positivos, entre estos ofrece una manera de satisfacer la demanda creciente de alimentos sin imponer una presión aún mayor sobre los escasos recursos naturales, mediante técnicas de biología molecular e ingeniería genética se ha permitido cultivar plantas de mejor calidad con altos rendimientos, sin dañar el medio ambiente, evitando el uso principalmente de insecticidas en cultivos destinados a alimentación (Flórez, 2010).

Esta promete contribuir a una agricultura sostenible, utilizando recursos más acordes con el ambiente, esto quiere decir que ayuda a satisfacer las necesidades actuales sin comprometer las futuras (Cuevas, 2003).

La Biotecnología agrícola ofrece varias posibilidades para incrementar la productividad, diversificación y producción, y al mismo tiempo desarrollar una agricultura más sostenible. Esta puede ser un instrumento efectivo contra el cambio climático, también puede ofrecer cultivos adaptados en suelos degradados por la erosión causada por un sistema agrícola intensivo (de la Riva, 2000).

En el Laboratorio de Biotecnología del ICTA se realizan análisis biotecnológicos que auxilian al mejoramiento y conservación vegetal, lo cual incide de manera directa en la población guatemalteca con variedades mejoradas, teniendo mejores rendimientos en el campo. Dichos análisis consisten en la selección asistida por marcadores moleculares, la caracterización con fines de registro de variedades liberadas por el ICTA, detección de transgénicos, la propagación masiva de plantas de interés para la Institución, así como también la conservación *in vitro* de cultivos de interés en Guatemala.

La biotecnología, así como genera soluciones y simplifica el proceso de la agricultura, también ha generado varias polémicas que opacan su uso, dentro de estos se incluyen la desconfianza que genera el consumo de alimentos transgénicos; la posibilidad de dar lugar a seres quiméricos, antinaturales perjudiciales, generar enfermedades que terminen con la humanidad, el hecho de alterar el medio ambiente de tal manera que ya no se pueda vivir en él (Muñoz, 2000).

Existen otros problemas, fuera del alcance científico, aquellos problemas generados por las grandes empresas transnacionales y los intereses financieros ligados al tema de los productos y servicios biotecnológicos, los cuales son los derechos de explotación, patentes sobre la vida, márgenes de ganancia desproporcionada, inequidad entre ventajas comerciales sobre ventajas humanitarias y ambientales, campañas de desinformación (Muñoz, 2000).

La biotecnología tiene la capacidad de hacer un cambio significativo en países en desarrollo, pero para eso es necesario una serie de pasos, de los cuales el primero sería, desarrollar variedades apropiadas, adaptadas a sus agroecosistemas específicos, que incrementen la producción y los ingresos, y así puedan ser adoptadas por los agricultores, las semillas de las variedades desarrolladas, deben de tener precios atractivos para los agricultores. Los agricultores deben tener un sistema de mercados de buen funcionamiento además para poder vender sus excedentes de producción.

A pesar de que las transnacionales venden semillas mejoradas en los países en desarrollo como es el caso de Guatemala, no hacen ningún esfuerzo por producir semillas desarrolladas específicamente para esos países, tal es el caso del altiplano guatemalteco. La investigación biotecnológica dirigida a países en desarrollo, los cuales aportan más del 95% de los agricultores del mundo en más del 65% de la tierra cultivable, representa no más del 10% de la investigación biotecnológica a nivel mundial (Herdt, 2006).

Para el año 2004 en Guatemala se encontraban 27 laboratorios vinculados o relacionados al uso de la Biotecnología, pertenecientes a 17 instituciones, de las cuales 4 son gubernamentales, entre ellas el ICTA (8 laboratorios), 8 privadas (10 laboratorios) y 5 académicas (9 laboratorios). El área empleada para Biotecnología en Guatemala era de 12,597 m², que contaba con 39 autoclaves, 52 cámaras de flujo laminar y 14 termocicladores, en cuanto al número de profesionales que se desempeñaba en esta área son 70 con licenciatura, 18 con maestría y 15 con doctorado (Orozco, 2004).

De los 27 laboratorios, 18 trabajan en el área de Cultivo de Tejidos, 13 con Marcadores moleculares y 2 con Ingeniería Genética. Existe una gran gama de disciplinas relacionadas con estos laboratorios, tanto de la rama vegetal, animal y humana, las primeras dos mencionadas con propósitos de mejoramiento genético y producción y la tercera con fines de prevención y trato de enfermedades. Algunos laboratorios poseen colecciones de especies/razas animales y vegetales, tanto vivos como preservados, 14 laboratorios indicaron que si tienen colecciones y de estos, 13 poseen bases de datos y 14 tienen conexiones a redes globales (Orozco, 2004).

Actualmente en el Laboratorio de Biotecnología, el cual realiza tanto cultivo de tejidos como marcadores moleculares, cuenta con dos termocicladores, uno para realizar análisis PCR por sus siglas en inglés, reacción en cadena de la polimerasa, (Polymerase chain reaction) punto final y el otro para PCR en tiempo final, el laboratorio de cultivo de tejidos cuenta con 5 autoclaves, 5 cámaras de flujo laminar, 2 cuartos de crecimiento, colecciones *in vitro* de papa, yuca, camote, malanga y macal.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Recopilar y presentar un resumen de las investigaciones realizadas por el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas de 1990 a. 2017 y dar a conocer el aporte de este laboratorio al agro guatemalteco.

1.4 Metodología

La metodología del presente diagnóstico consistió en una revisión bibliográfica de las investigaciones realizadas en el laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, en diferentes fuentes tales como el Centro de Documentación del ICTA (CEDICTA), las memorias de labores del ICTA, en informes finales de proyectos FODECYT y de voluntarios japoneses en los archivos del laboratorio.

1.4.1 Elaboración de un plan de diagnóstico.

La primera fase consistió en un plan de diagnóstico, donde se describió la metodología, los materiales y fechas para la realización del presente.

1.4.2 Reconocimiento y recopilación de la Información.

- Se realizaron entrevistas a los investigadores del laboratorio con el fin de conocer donde eran archivadas las investigaciones realizadas, es decir conocer las fuentes de información del presente diagnóstico.
- Fueron llevadas a cabo visitas al Centro de Documentación del ICTA (CEDICTA) con el fin de recopilar información sobre las memorias de labores anuales del ICTA e informes de investigaciones que allí se tienen.
- Se visitaron varios sitios web, entre ellos el sitio web del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas y el sitio del FODECYT esto para descargar los archivos correspondientes a cada uno de las investigaciones en ellos contenidas.

1.4.3 Análisis de la información

Se procedió a sistematizar y analizar la información obtenida mediante la redacción del diagnóstico, este proceso, resaltó las principales investigaciones realizadas en el laboratorio en los campos de cultivo de tejidos vegetales y marcadores moleculares. Las investigaciones recabadas fueron ordenadas según el cultivo y el año de realización, fueron detalladas colocando su título, año de publicación, autores y un resumen.

1.5 Resultados

1.5.1 Ajo

1.5.1.1 Identificación de la metodología de propagación in vitro de ajo (*Allium sativum* L.)

Año: 1996

Autores: Ing. Agr. Ken Okabe, Inga. Agra. Ruth Vítores e Ing. Agr. Marco Dardón S.

La Disciplina de Biotecnología desarrolló la metodología específica para la micropropagación de este cultivo (protocolo), para lo cual se efectuaron diferentes pruebas evaluando medios de cultivo en las fases de: iniciación, multiplicación y enraizamiento así como el endurecimiento de dichos materiales (adaptación).

Anteriormente se han realizado estudios preliminares acerca de este t3pico, en las cuales se planteo la evaluaci3n de distintas alternativas, para el desarrollo de las tres fases: iniciaci3n, multiplicaci3n y enraizamiento. Los resultados obtenidos son favorables para las primeras dos fases, pero no se logr3 identificar el procedimiento adecuado para la fase de enraizamiento, por lo que se obtuvieron plantas con brotaci3n bien diferenciada pero sin ra3z y con la presencia de callo en su parte basal. Para la soluci3n de este problema, se realizaron pruebas en el Laboratorio de Biotecnolog3a del ICTA que ofrecieron resultados satisfactorios al ser aplicadas dichas modificaciones a protocolos ya existentes de diversas fuentes, y al hacer combinaciones entre todos estos. Lo m3s resaltante de esta t3cnica aplicada en la planta de ajo es la eliminaci3n de nematodos.

Fueron encontrados los siguientes t3tulos de investigaciones realizadas en el cultivo de ajo, mas no el informe de estas, a continuaci3n se enuncia dichas investigaciones:

- Aplicaci3n de la t3cnica de termoterapia y cultivo de tejidos vegetales, para el establecimiento de un programa de producci3n de semilla certificada de ajo (*Allium sativum* L.). Informes T3cnicos del Laboratorio de Biotecnolog3a. Guatemala, 2004. Sin numeraci3n.
- Caracterizaci3n fenot3pica de muestras provenientes de las poblaciones de ajo cultivadas en Guatemala. Informes T3cnicos del Laboratorio de Biotecnolog3a. Guatemala, 2004. Sin numeraci3n.
- Estudio del efecto de tres retardadores de crecimiento sobre la regeneraci3n in vitro de tres genotipos de ajo (*Allium sativum* L.). Informes T3cnicos del Laboratorio de Biotecnolog3a. Guatemala, 2004. Sin numeraci3n.
- Estudio de la Variabilidad Gen3tica de las Poblaciones de Ajo Cultivadas en Guatemala y Formaci3n de un Banco de Germoplasma Representado con Fines de Mejoramiento Gen3tico. Informes T3cnicos del Laboratorio de Biotecnolog3a ICTA, Guatemala, 2003. Sin numeraci3n.

1.5.2 Alcachofa

1.5.2.1 Respuesta al cultivo in vitro de cuatro variedades de alcachofa (*Cynara scolymus* L.)

Año: 2002

Autores:

Ing. Agr. Mario Washington De León García

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

El cultivo de tejidos ha sido utilizado en la propagación de muchas especies con bastante éxito, ya sea para fines experimentales o comerciales. En alcachofa se han realizado algunos trabajos con variedades que no están presentes en el país, por lo cual se evaluaron tres protocolos, los cuales consistían en tres medios de cultivo diferentes para su fase de propagación, fueron el medio de Debergh, el de Ancora y el de Lauzer, para conocer cual producía los mejores resultados para las cuatro variedades que fueron sujeto de estudio. Se utilizó un diseño de bloques al azar con arreglo bifactorial de los tratamientos y se realizó una prueba de Duncan al 10% de significancia para las variables de respuesta: número de brotes por variedad, número de brotes por medio de cultivo y altura de brotes por variedad. El mejor medio de cultivo para la fase de propagación fue el utilizado por Debergh et al , con una media de 3.4 brotes por explante para las cuatro variedades. Las variedades Imerial Star, Dash III y Emerald fueron estadísticamente superiores a Green Globe en cuanto a número de brotes por variedad. Las variedades Imperial Star y Emerald, tuvieron brotes de mayor altura

1.5.3 Anturio

1.5.3.1 Enraizamiento in vitro de dos variedades de Anturio (*Anthurium andreanum* L.)

Año: 2002

Autores:

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

En Guatemala por su ubicación geográfica y su diversidad de zonas ecológicas, es posible producir el anturio para el mercado nacional y de Estados Unidos. Hasta hoy el anturio representa empleo y divisas, aunque en poca escala, contando con muy poca área sembrada en el país, distribuida en los departamentos de Retalhuleu y Guatemala. Las plantas ornamentales generan para el país más de 30,000 plazas, se calcula que la producción del anturio puede incrementar esta cantidad en un 25%. El anturio presenta considerables dificultades para su propagación por métodos convencionales tales como división o separación de brotes, esquejes apicales, por lo que se hace muy necesaria la evaluación de técnicas que puedan usarse como alternativas para su propagación eficiente debido a que este cultivo promete ser un buen generador de ingresos para Guatemala. La investigación planteó como objetivo la evaluación de siete tratamientos los cuales consistían en diferentes relaciones de reguladores de crecimiento en un medio de cultivo MS (Murashige & Skoog), que explante y desinfección (0.1 mg/l de AIA; 1 mg/l de ANA; 1mg/l de AIB; 0.01, 0.05 y 0.1 mg/l de 2,4-D y un testigo). Los resultados obtenidos en la investigación fueron los siguientes: a) utilizando 1 mg/l de AIB se mejora la producción de raíces (43%) de variedad roja, mientras que con la variedad rosada no se obtuvo buena respuesta con ningún tratamiento; b) no se obtuvo respuesta, para ningún tratamiento, en lo referente a mejorar la longitud de raíces, para ambas variedades.

1.5.3.2 Inducción de callo y regeneración in vitro de plantas a partir de segmentos de hoja de anturio (*Anthurium sp.*).

Año: 2001

Autores:

Ing. Agr. Hugo Morales

Ing. Agr. Héctor Sagastume

En la presente investigación se realizó la “inducción de callo y regeneración *in vitro* de plantas, a partir de segmentos de hoja de anturio (*Anthurium sp*)”. Se evaluaron dos medios nutritivos basales, dos combinaciones de auxinas y citocininas, en dos cultivares de anturio. Con el propósito de contribuir a generar una metodología adecuada para la rápida propagación de esta planta. La auxina utilizada fue el 2,4-D a concentraciones de 0.1 mg/l y 0.08 mg/l, y las citocininas utilizadas fueron el BA a concentración de 1.0 mg/l y la 2iP a concentración de 3.0 mg/l. La investigación se dividió en Fase I: Inducción de callos y Fase II: Producción de brotes y plantas. Las combinaciones de 0.1 gm/l de 2,4-D con 0.8 mg/l de BA y 0.08 mg/l de 2,4-D con 3.0 mg de 2iP en los medios Bourgin y Nitsch, y Pierik para cada cultivar, haciendo un total de 8 tratamientos. Con base a los resultados se estableció que utilizando combinaciones de auxinas y citocininas es posible obtener respuesta al cultivo de tejidos *in vitro* de la planta anturio, siendo el mejor tratamiento en las dos fases de la investigación el que contaba con el medio de Bourgin y Nitsch y las combinaciones de reguladores del crecimiento de 0.1 miligramos por litro de 2,4-D con 1-0 miligramos por litro de BA, con el cultivar rosado.

1.5.4 Arándano

1.5.4.1 Efecto de cinco niveles de isopentenil adenina (2iP), sobre la micropropagación de seis variedades de arándano (*Vaccinium ashei*).

Año: 2001

Autores:

Ing. Agr. Gustavo Adolfo Robles Spillari

Ing. Agr. Héctor Sagastume

En el laboratorio de Biotecnología del ICTA, con el objetivo de propagar *in vitro* el arándano se evaluó el efecto de 5 dosis de 2 isopentenil adenina (2iP), sobre la micropropagación en seis variedades de arándano, como explante fueron utilizados microesquejes de tallo cada uno con una yema axilar, en un medio nutritivo de Lyrene complementado con Phytigel® como agente gelificante.

Para la interpretación de los resultados se realizó un análisis de medias por medio de una prueba de “t” al 15%, en donde se evaluaron las concentraciones: de 2iP: 5, 10, 15, 20 y 25 mg/l, en 6 variedades de arándano: Woodard, Climax, Tifblue, Briteblue, Brightwell y Premier para las etapas de: iniciación. Para evaluar el efecto de los tratamientos se consideraron 4 variables de respuesta, número de brotes, longitud de brotes, número de entrenudos y longitud de entrenudos, tomando los datos a los 3 meses de la siembra y a los 2 meses del primer subcultivo.

Luego del análisis de los resultados se recomendó la dosis adecuada para cada una de las variedades por etapa, en la etapa de iniciación, para Climax y Tifblue se recomienda la dosis de 5 mg/l, para Briteblue 10 mg/l, Woodard 15 mg/l y para Brightwell y Premier 20 mg/l. Para la etapa de propagación se recomiendan las siguientes dosis: para la variedad Woodard 10 mg/l, variedades Briteblue y Tifblue 15 mg/l. Climax 20 mg/l, y para Brightwell 25 mg/l.

1.5.4.2 Micropropagación de tres variedades de arándano (*Vaccinium ashei* Readel)

Año: 2004

Autor:

Ing. Agr. Armando José Cutz Tax

La propagación convencional del arándano es ineficiente debido a que produce pocos hijos por planta madre, por lo que la producción de nuevas plantas requiere mucho tiempo. En Guatemala se han realizado algunas investigaciones preliminares tendientes, principalmente, al establecimiento *in vitro* del arándano utilizando brotes axilares como explantes, en esta investigación se utilizaron hojas y microesquejes como explantes iniciales y el regulador de crecimiento 2iP, en las variedades Woodard, Climax y Tifblue de interés de los productores.

Se utilizaron plantas provenientes del cultivo *in vitro* en el laboratorio de Biotecnología del ICTA en Bárcena, Villa Nueva. Se evaluaron 5 dosis de 2iP: 3, 4, 5, 6 y 7 mg/l, debido a que existían referencias de trabajos realizados en arándano tipo “ojo de conejo”

(*Vaccinium ashei* Readell) en otros países y en Guatemala, fueron realizados dos escenarios del experimento, en estos fueron empleados porciones de hoja y microestacas en un medio WPM (Woody Plant Media).

Entre las principales conclusiones del trabajo se pueden mencionar: a) la dosis de 0 mg/l de 2iP fue la que produjo mayor altura de planta. Mayor número de hojas y mayor número de entrenudos b) la dosis de 2iP que produjo mayor número de plantas regeneradas. Para la variedad Climax fue de 3 mg/l, a través de la propagación por hojas, con un promedio de 3.9 plantas c) la mayor tasa de propagación, en la variedad Climax, se obtuvo con la dosis de cinco mg/l, a través de la propagación por hojas, con una cantidad estimada de producción de 1,340,096 plantas anuales, propagando cada dos meses.

1.5.5 Arroz

1.5.5.1 Efecto de la cinetina, bencilaminopurina y ácido naflenacético, sobre la regeneración de plantas in vitro, a partir de tejido no diferenciado de arroz (*Oryza sativa* L.)

Año: 2001

Autor:

Ing. Agr. Willian Rolando Sánchez Pérez

Este trabajo de investigación desarrollado en el laboratorio de Biotecnología del ICTA, cuyos objetivos eran de determinar la combinación de reguladores de crecimiento que regenere la mayor cantidad de plantas verdes y el genotipo que presenta la mayor frecuencia de regeneración de plantas verdes. El medio de cultivo que se utilizó tanto para la inducción de callos, como para la regeneración de plantas, fue el MS, variando las concentraciones de reguladores de crecimiento, las cuales fueron: cinetina 0, 3, 4, 5 mg/l, BAP 0, 0.2, 1, 2 mg/l y ANA 0, 0.25, 0.5, 0.75 mg/l. en tres genotipos. Cada tratamiento se repitió 10 veces, haciendo un total de 570 unidades experimentales, la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de cultivo de 150 x 25 mm. Previo a una prueba de normalidad, los resultados presentados y su discusión se basaron en los promedios obtenidos de cada tratamiento y de su comparación a través de pruebas de "t"

de Student al 5% de significancia. Los resultados indican que para la variable porcentaje de regeneración de plantas verdes los mejores tratamientos fueron: 0.2 mg/l de BAP y 0.50 mg/l de ANA, con un promedio de 33.3%; 2 mg/l de BAP y 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 40%; 3 mg/l de CIN y 0.25 mg/l de ANA con un promedio de 36.7%; 0.2 mg/l de BAP y 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 33.3%; 2 mg/l de BAP y 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 30%; 4 mg/l de CIN y 0.25 mg/l de ANA con un promedio de 26.7% y 5mg/l de CIN y 0.75mg/l de ANA con un promedio de 26.7%.

De los tres genotipos evaluados, el que mejor respondió a la regeneración de plantas fue MPI-116 con un promedio de 40%, seguido de COLOMGUA que presentó 16.3% y por último LA-43 con 4.7%. Para los tratamientos agrupados por tipo de reguladores en el medio de cultivo, no se encontró diferencia entre utilizar la combinación CIN y ANA o BAP y ANA. Que presentaron 20.4 y 21.9% respectivamente de regeneración de plantas verdes. Mientras que para la variable número de brotes por callo, los mejores tratamientos estadísticamente fueron: 0.2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA con un promedio de 1.7 brotes; 0.2 mg/l de BAP y 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 1.6 brotes; 3 mg/l de CIN y 0.50 mg/l de ANA con un promedio de 1.5 brotes ; 3 mg/l de CIN y 0.25 mg/l de ANA con un promedio de 1.3 brotes; 5 mg/l de CIN y 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 1.0 brotes; 1 mg/l de BAP y 0.25 mg/l de ANA con un promedio de 1.0 brotes; 4 mg/l de CIN y 0.75 mg/l de ANA con un promedio de 0.7 brotes; 2 mg/l de BAP y 0.50 mg/l de ANA con un promedio de 0.7 brotes y 2 mg/l de BAP y 0.75mg/l de ANA con un promedio de 0.7 brotes. El número de brotes por callo resultó diferente para los genotipos evaluados, siendo MPI-116 el que presentó la mayor respuesta con 1.4 brotes, seguido de COLOMGUA que tuvo 0.6 y por último LA-43 con 0.2. Los tratamientos con base al tipo de citocinina, no se encontró diferencia entre utilizar la combinación CIN y ANA o BAP y ANA, mostrando un promedio de 0.7 y 0.8 brotes por callo, respectivamente; y para la variable altura de brotes, los tratamientos con diferentes niveles de reguladores de crecimiento y el testigo se presentó en un rango de 1.9 y 7.9 cm, sin embargo, la prueba de comparación de medias determinó que son iguales estadísticamente, lo mismo para los tres genotipos evaluados y las combinaciones CIN y ANA o BAP y ANA, lo que nos indica que los niveles de reguladores dentro del medio de cultivo evaluados en este trabajo, no ejercen influencia

sobre la altura de los brotes regenerados. Además, se realizó un análisis de regresión múltiple tipo superficie de respuesta, con el cual se predicen en forma separada GENOTIPO, CIN y ANA y GENOTIPO, BAP y ANA, los posibles rangos de reguladores del crecimiento para aumentar la respuesta de las variables medidas; de ello es que para el genotipo MPI-116, cuando se utilizó CIN y ANA en el medio de cultivo, predice que utilizando cantidades de 2.2 mg/l de CIN con 0.4 mg/l de ANA, se puede obtener como mínimo un 55% de plantas verdes, entre 1.6 y 1.8 brotes y entre 2.6 y 3.0 cm de altura por brote.

Cuando se utilizó BAP y ANA, predice que con cantidades menores de 0.3 mg/l de BAP y cantidades mayores de 0.7 mg/l de ANA se puede obtener como mínimo 60% de plantas verdes, 2.08 brotes y entre 2.4 y 2.6 cm de altura para cada brote, mientras que para el genotipo COLOMGUA, cuando se utilizó CIN y ANA en el medio de cultivo, predice que utilizando cantidades menores de 3.9 mg/l de CIN y cantidades menores de 0.25 mg/l de ANA, se puede obtener como mínimo 45% de plantas verdes, entre 1.6 y 1.4 brotes y 2.7 cm como mínimo de altura para cada brote. Cuando se utilizó BAP y ANA, predice que con cantidades menores de 3.3 de CIN y entre 0.4 y 0.65 mg/l de ANA, se puede obtener, como mínimo, un 9% de plantas verdes, entre 0.12 y 0.15 brotes y entre 0.5 y 0.6cm de altura para cada brote. Cuando de utilizó BAP y ANA, predice que con cantidades menores de 0.2 mg/l de BAP y cantidades que van entre 0.45 y 0.65 mg/l de ANA se puede obtener como mínimo 26% de plantas verdes, entre 0.75 y 0.88 brotes y entre 0.2 y 1.4cm de altura para cada brote.

1.5.5.2 Efecto de tres medios de inducción de callo y de 20 genotipos en la respuesta al cultivo de anteras de arroz (*Oryza sativa* L.).

Año: 2002

Autores:

Ing. Agr. Luis Molina

Ing. Agr. Héctor Sagastume

Se evaluó en tres medios de cultivo la respuesta al cultivo de anteras de 10 cultivares catalogados como superiores debido a su potencial de rendimiento, resistencia a enfermedades, tipo de planta y calidad de grano, así como de 10 híbridos F₁ provenientes del cruce entre los cultivares catalogados como superiores. De cada material se cultivó un mínimo de 1,350 y máximo de 9,700 anteras provenientes de las tres panojas centrales, distribuyéndolas en cada uno de los medios C; Chu y He 5 para la inducción de callo. Cada medio fue suplementado con 20g/l de sucrosa, 20g/l de maltosa, 20g/l de sorbitol, 1 mg/l de 2,4-D, 0.1 mg/l de zeatina, 0.07 mg/l de picloramo, 10 mg/l de AgNO₃ y 2 g/l de phytigel. Los callos formados fueron trasladados a los medios basales C, Chu y He 5 suplementados con sucrosa (3%) sorbitol 1%, ANA (0.5 mg/l), 6-BA (2mg/l) y solidificado con agar (0.7%).

Los genotipos que presentaron mayor respuesta androgenética fueron O-Turipama 7 y QRC-2 con 6.4 y 2.7% de inducción de callo, respectivamente. Los cultivares con mayor porcentaje de regeneración fueron QRC-3, IACUBA 24 con 23.3 y 19.1, respectivamente. Los medios de cultivo evaluados mostraron respuestas similares tanto para la inducción de callo, como para la regeneración de plantas. Se produjeron 24 líneas homocigotas DH provenientes de 3 híbridos y 4 cultivares.

1.5.6 Banano

1.5.6.1 Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre la propagación in vitro de tres clones de banano (*Musa acuminata* Colia.)

Año: 2000

Autor:

Ing. Agr. Dórian Estuardo Izaguirre Hernández

Cada clon fue evaluado en un experimento separado, con un diseño en bloques al azar, con cinco tratamientos, que fueron niveles de BAP: 3, 4, 5, 6 y 7 mg/l, cada uno con 10 repeticiones. El nivel estándar de BAP que se utiliza en la mayoría de laboratorios, a nivel mundial es de 5 mg/L, sin importar el clon. Cada unidad experimental la constituyó un

recipiente de cultivo tipo magenta, en el cual se sirvieron 50 ml de medio de cultivo MS. Para evaluar el efecto de los tratamientos se consideraron las variables de respuesta: número, altura y vigor de brotes, tomando datos cada 21 días, hasta subcultivar 3 veces el material.

El análisis de varianza practicado a los distintos tratamientos de BAP sobre el número, altura y vigor de brotes, en el clon Gran Enano, no presentaron diferencias significativas. Al hacer un análisis de regresión se encontró que los datos se ajustan a un modelo cuadrático entre niveles de BAP y número de brotes, con el cual se predice que el nivel óptimo de BAP es de 4.3 mg/l.

El análisis de varianza practicado a los distintos tratamientos de BAP sobre el número, altura y vigor de brotes, en el clon Williams, no presentaron diferencias significativas. Al hacer un análisis de regresión se encontró que los datos se ajustan a un modelo cuadrático entre niveles de BAP y número de brotes, con el cual se predice que el nivel óptimo de BAP es de 6.3 mg/l.

El análisis de varianza practicado a los distintos tratamientos de BAP sobre el número de brotes, en el clon Valery, no presentaron diferencias significativas. Al hacer un análisis de regresión se encontró que los datos se ajustan a un modelo cuadrático entre niveles de BAP y número de brotes, con el cual se predice que el nivel óptimo de BAP es de 5.6 mg/l.

El análisis de varianza practicado a los distintos tratamientos de BAP sobre la altura y vigor de brotes, en el clon Valery, presentaron diferencias significativas estableciendo que los mejores tratamientos de BAP sobre la altura y vigor de brotes fueron 3, 5 y 6; y 3, 5 y 4 mg/l respectivamente.

Se recomienda continuar con esta investigación en la línea de conocer la tasa de mutaciones que causan los diferentes niveles de BAP al final de 8 subcultivos y más allá, para los tres clones.

1.5.7 Bromelia

1.5.7.1 Cultivo in vitro de *Bromelia pinguin* L. (muta, piñuela).

Año: 2004

Autores:

Licda. Aura Suchini

Ing. Agr. Luis Molina

La muta o piñueal, *Bromelia pinguin* L. es una planta que habita la zona de vida bosque seco subtropical y bioma monte espinosos subtropical; se distribuye en América tropical y en las Antillas. Su fruto es una baya, ácida, aromática y comestible. La inflorescencia joven se llama muta. Es plantada como cerco en terrenos grandes o alrededor de viviendas, cuando es cultivada forma anchos y densos matorrales difíciles de penetrar por sus aceradas espinas. Las fibras de las hojas son largas, relativamente fuertes, y se usan para hacer tejidos, cordeles de pescar y mallas, se usa mucho contra parásitos intestinales, como diurético y antirreumático.

El valor comercial de esta planta está en la calidad de su fibra. La fruta es de fácil fermentación en la producción de vinagre y bebidas alcohólicas.

Debido a que no se contaba con material suficiente para implementar el estudio agronómico "Producción de Muta en Zonas Áridas del Oriente de Guatemala", se solicitó al Laboratorio de Biotecnología la propagación de dos variedades de muta, para la obtención de 5,000 plantas de cada variedad.

Se sembraron 14 meristemos apicales de cada variedad, obtenidos de plantas colectadas en de El Progreso, se utilizó el medio MS conteniendo 2 mg/l de ANA y 2 mg/l de BAP para la propagación *in vitro*. En 5 meses se logró la obtención de 5,000 plantas.

1.5.7.2 Propagación in vivo e in vitro de cinco especies del género *Tillandsia* en vías de extinción y de potencial uso sustentable

Año: 2011

Autores:

Ing. Agr. Héctor Sagastume

Ing. Bot. Uwe Martin Herbert Feldhoff Böhm

Licda. Aura Suchini.

El objetivo general del proyecto fue contribuir al desarrollo de metodologías que permitan la propagación de 5 especies de tillandsias en vías de extinción. Los objetivos específicos fueron: a) determinar el efecto del BAP sobre la propagación de una solución pulverizada de esta fitohormona, de 3 especies de tillandsias *in vivo*, a nivel invernadero, b) determinar el efecto del BAP sobre la propagación de 5 especies de tillandsias, a nivel laboratorio, en cultivo *in vitro*.

La metodología, consistió en evaluar 4 dosis de BAP aplicado de manera exógena pulverizado (0, 5, 10 y 15 mg/l) para la propagación *in vivo* de 3 especies de tillandsias. Al mismo tiempo se hizo una evaluación de propagación *in vitro*, como explantes fueron utilizadas plántulas germinadas *in vitro* en un medio MS a un tercio de su concentración total, utilizando 5 dosis de BAP (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l), en 5 especies de tillandsias.

En cuanto a la propagación *in vivo* para las especies *Tillandsia magnusiana*, *Tillandsia pruinosa* y *Tillandsia streptophylla* se considera que el mejor tratamiento fue 15mg/l de BAP, con él que se consiguió un mayor número de brotes después del corte de la planta madre.

Respecto a la propagación *in vitro* de las especies *Tillandsia pruinosa* y *Tillandsia streptophylla* el análisis de varianza del número de brotes desarrollados en estas especies indica que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos, para la *Tillandsia caput-medusae* la prueba de comparación de medias de Duncan indicó que los dos mejores tratamientos fueron cuando se aplicó 1.0 y 1.5 mg/l de BAP, con lo cual se obtienen 22.2 y 18.5 brotes por planta, para la especie *Tillandsia magnusiana* los mejores

tratamientos que inducen a la proliferación de brotes son utilizando 1.5 y 2.0 mg/l de BAP, cada uno con una media de 2 brotes producidos. En el caso de la *Tillandsia plagiotropica* todos los tratamientos superaron al testigo y que los dos mejores tratamientos fueron al utilizar 2.0 y 1.5 mg/l de BAP, produciendo 1.7 y 1.6 brotes, respectivamente.

Al finalizar la investigación se obtuvieron los siguientes resultados: a) Una metodología desarrollada para la propagación *in vivo* de tres especies de tillandsias en invernadero, b) una metodología desarrollada para la propagación *in vitro* de 5 especies de tillandsias a nivel de laboratorio de Biotecnología.

Fue encontrado el siguiente título de investigación realizado en bromelias, mas no el informe de esta, a continuación se enuncia dicha investigación:

- Propagación *in vitro* de muta (*Bromelia pinguin* L.). Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.

1.5.8 Cactus

1.5.8.1 Propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo (*Pilosocereus maxonii*).

Año: 2005

Autores:

Ing. José Sandoval

Ing. Agr. Luis Molina

Ing. Héctor Sagastume

Con el objetivo de contribuir al desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro*, del Cactus Cabeza de Viejo utilizando como explantes secciones de plántulas del cactus que fueron previamente germinadas *in vitro*, se evaluaron 30 tratamientos consistentes en combinaciones de los reguladores de crecimiento BAP y ANA, en un medio de sales básicas MS. De los 30 tratamientos evaluados se encontraron 2 combinaciones mejores, tanto en términos de producción de brotes como en términos de peso fresco y altura de

brotos, así como también presencia de raíz y callo. Los dos tratamientos son: medio de cultivo basal MS suplementado con 1 mg/l de ANA más 2.2 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de ANA más 0.5 mg/l de BAP, que produjeron 4.93 y 4.58 brotes, con un peso medio de 280 y 300 mg, altura de 2.89 y 2.87 mm, respectivamente 37 días después de la siembra de los explantes. Ambos medios manifestaron la presencia de raíces y callo, con esta investigación se contribuyó al desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo, al lograrse el establecimiento *in vitro*, a partir de semillas botánicas, en un medio MS sin reguladores de crecimiento y también se logró su propagación *in vitro*. Para terminar el desarrollo del protocolo de propagación se recomienda evaluar combinaciones de reguladores de crecimiento para inducir enraizamiento *in vitro* y, posteriormente, evaluar sustratos para la aclimatación de las plántulas en invernadero.

1.5.8.2 Propagación in vitro de *Mammillaria voburnensis* Scheer (Cactaceae)

Año: 2003

Autores:

Licda. Aura Elena Suchini

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

En este trabajo se desarrolló un procedimiento para la propagación *in vitro* de la *Mammillaria voburnensis* Scheer. Como una alternativa para su conservación. Dicha investigación se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos del ICTA

El estudio se realizó en dos fases, la primera consistió en la elección de la *Mammillaria voburnensis* Scheer. Como especie a trabajar, para luego recolectar frutos de esta en el campo y germinar las semillas en condiciones *in vitro*. Para esta fase se utilizó el medio basal MS, se obtuvo un porcentaje de germinación del 80%. Después de seis meses las plántulas que medían aproximadamente un centímetro de altura estaban listas para ser usadas como material para obtener explantes.

En la segunda fase, se indujo la formación de brotes axilares, para lo cual se evaluaron 7 tratamientos, que consistieron en el medio MS suplementado con diferentes combinaciones y concentraciones de BAP y ANA y un testigo sin reguladores de crecimiento. Los explantes se obtuvieron al eliminar la parte apical y basal de la plántula y cortar longitudinalmente el segmento restante, para sembrar cada explante lateral en un tubo de vidrio que contenía el medio de cultivo. Los explantes se mantuvieron bajo condiciones de incubación controladas por dos meses, luego de los cuales respondieron morfogénicamente con la formación de brotes.

Los tratamientos presentaron diferencias significativas en cuanto al promedio de brotes por explante y con caso a la prueba de Tukey se estableció que el medio MS suplementado con 0.1 mg/l de BAP y 0.01 mg/l de ANA fue el óptimo, debido a que este indujo el mayor promedio de brotes por explante, los brotes obtenidos eran semiesféricos, de color verde, medían entre 0.3 y 0.4 cm de diámetro, al menos 0.4 cm de altura, con desarrollo externo de espinas radiales y centrales sobre las areolas y en la anatomía interna hubo diferenciación del sistema dérmico, fundamental y vascular.

1.5.9 Camote

1.5.9.1 Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) sobre la regeneración de plántulas de tres clones de camote (*Ipomoea batata* L.), partiendo del cultivo de meristemos.

Año: 2002

Autores:

Ing. Agr. Luis Fernando Baldetti Herrera

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

El camote tiene raíces reservantes con un contenido de 30% de carbohidratos, proporciona un estimado de 113 cal/100g, mientras que la papa proporciona 75 cal/100g, además contiene 18 g de proteína, 6.6 g de grasa, 350 mg de Calcio, 488 mg de fosfatos y 7 mg de Hierro, por kilogramo de porción comestible, superando en gran parte a la papa. Es un cultivo con gran versatilidad y adaptación que va desde los 0 a los 2000 msnm, resiste sequías y no requiere de técnicas de cultivo especiales. Dado el gran potencial que el camote tiene como cultivo y su importancia alimenticia, su propagación a gran escala, partiendo , en este caso, del cultivo de meristemos, proporciona grandes ventajas como: control de la sanidad del material, propagación clonal más rápida, alto índice de multiplicación en espacio y tiempo reducido, no depende de condiciones climáticas, conservación a largo plazo, uniformidad y ahorro de recursos, por lo que en la investigación se evaluó el cultivo de meristemos de tres clones de camote, utilizando dos concentraciones de ANA y seis concentraciones de BAP, con el fin de determinar los tratamientos adecuados, para cada uno de los tres clones.

Los resultados de la investigación se pueden resumir así: a) para el clon Morado la combinación óptima de reguladores del crecimiento en la fase de iniciación es la de 0.1 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP, que alcanzó el 100% de regeneración, una tasa de propagación de 6.4 plantas por mes y una producción de 186 plantas luego de dos propagaciones partiendo de 6 meristemos; b) para el Amarillo la combinación de reguladores de crecimiento eficiente en la fase de iniciación es de 0.05 mg/l de ANA y 0.25 mg/l de BAP, la cual alcanzó el 56% de regeneración, una tasa de propagación de 5.3 plantas por mes y una producción de 90 plantas luego de dos propagaciones, partiendo de 9 meristemos; c) para el clon Anaranjado la combinación de reguladores de crecimiento que produce mejores resultados es la de 0.05 mg/l de ANA y 0.75 mg/l de BAP, con 75% de regeneración, una tasa de propagación de 4.7 plantas por mes y una producción de 42 plantas luego de 2 propagaciones, partiendo de 9 meristemos.

1.5.10 Caña de Azúcar

Fueron encontrados los siguientes títulos de investigaciones realizadas en caña de azúcar, mas no el informe de estas:

- Análisis de la similitud genética de 48 variedades de caña de azúcar utilizando secuencias microsatélite de ADN. Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.
- Evaluación de técnicas de extracción de ADN para marcadores moleculares microsatélites en caña de azúcar (*Saccharum spp.*). Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.

1.5.11 Chamaedorea

1.5.11.1 Conservación in vitro de cinco especies de *Chamaedorea* endémicas y en peligro de extinción en Guatemala.

Año: 2007

Autores:

Licda. Aura Suchini

Ing. Agr. Juan José Castillo

Ing. Agr. Oscar Medinilla

En esta investigación se realizaron viajes de colecta a los departamentos de Alta y Baja Verapaz, Izabal, Quetzaltenango y San Marcos, se colectaron semillas de las especies *Chamaedorea geonomiformis* H. Wendl, *Chamaedorea nationsiana* Hodel y Castillo y *Chamaedorea pinnatifrons* (Jacq.) Oerst para las cuales se determino que el sustrato de algodón en cajas de petri permitió un mayor porcentaje de germinación de las semillas respecto de otros. No se obtuvo formación de callo en las porciones de meristemo de raíz y porciones de hoja sembradas en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, reportados como eficaces en plantas de este género.

Se colectaron plantas vivas de las especies *Chamaedorea brachypoda* H. Wendl, *Chamaedorea lehmannii* Burret, *Chamaedorea tenerrima* Burret y *Chamaedorea verapacensis* Hodel y Castillo, se trasladaron al invernadero del laboratorio de biotecnología donde se procedió a la siembra de porciones de nudo y hoja para su propagación pero no se obtuvieron resultados.

Se trabajó con 7 especies de *Chamaedorea*, de tres especies se colectaron semillas *Chamaedorea geonomiformis* H. Wendl, *Chamaedorea nationsiana* Hodel y Castillo y *Chamaedorea pinnatifrons* (Jacq.) Oerst y de cuatro especies se colectaron las plantas vivas por no encontrarse en fase de fructificación cuando se realizó el viaje de colecta ellas son: *Chamaedorea brachypoda* H. Wendl, *Chamaedorea lehmannii* Burret, *Chamaedorea tenerrima* Burret y *Chamaedorea verapacensis* Hodel y Castillo; habiendo logrado la propagación y conservación *in vitro* de las especies *Chamaedorea geonomiformis* H. Wendl, *Chamaedorea nationsiana* Hodel y Castillo y *Chamaedorea pinnatifrons* (Jacq. Oerst, por siembra de epicótilos en medio MS suplementado con 3 mg/l de BAP y 3 mg/l de carbón activado, con una tasa de propagación de dos. Este medio de cultivo resultó efectivo para la conservación *in vitro* a mediano plazo de las especies *Chamaedorea geonomiformis* H. Wendl, *Chamaedorea nationsiana* Hodel y Castillo y *Chamaedorea pinnatifrons* (Jacq.) Oerst.; mismo que puede utilizarse en otras especies de *Chamaedorea*. Las plántulas producidas *in vitro* se aclimataron en botellas de plástico conteniendo una mezcla de tres cuartas partes de tierra y una cuarta parte de arena.

1.5.12 Chipe

1.5.12.1 Evaluación de cinco medios de cultivo para la reproducción in vitro del Helecho Chipe (*Cnemidaria mutica* L.).

Año: 2002

Autores:

Ing. Agr. Luis Carlos Portillo

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

El chipe es un helecho de bosques nubosos, que se encuentra en amenaza de extinción debido a la fuerte explotación que sufren sus tallos, y a la acelerada destrucción de su hábitat natural por asentamientos humanos y al avance de la frontera agrícola. En la búsqueda de opciones para su reproducción, en el presente estudio se estableció un protocolo para la reproducción *in vitro* a partir de esporas. Se comenzó con el proceso de desinfección; y luego de varias pruebas, se dejó establecida una metodología con un 48% de contaminación, utilizando la centrifuga y 0.5% de hipoclorito de sodio y 1% de tween 20. Después se realizó una evaluación de 5 medios de cultivo para producir gametofitos, que es la parte sexual del helecho, utilizando los medios MS (un medio de la concentración normal) , Knudson C, Miller y Miller, Moore (un medio de la concentración normal), y White, concluyendo luego de realizar el análisis estadístico que el medio más eficiente es el MS a un medio de su concentración normal, posteriormente para lograr un crecimiento más rápido de los gametofitos, se procedió a separarlos y subcultivarlos aproximadamente cada mes en un medio MS a un medio de su concentración normal, donde se evaluó su capacidad de propagación, pesando el tejido gametofítico de 5 tubos y volviéndolos a pesar después de 75 días, dando como resultado un aumento de más de 10 veces su peso inicial. Luego se realizó una homogenización del tejido gametofítico, la cual consiste en una maceración del mismo en un medio MS líquido, distribuyéndolo en dos recipientes de cultivo conteniendo sustrato con la cual se esperaba la aparición directa de esporofitos, pero únicamente hubo una regeneración del tejido gametofítico.

Después se registró la aparición y formación de esporofito por fusión sexual, luego de 4 meses y 17 días de incubación en los tubos de cultivo debido a que el gametofito ya se encontraba plenamente desarrollado, por lo que se midió la cantidad de esporofitos formados por cada tubo de tejido gametofítico, haciendo una separación de los mismos, trasladándolos a un medio MS a un medio de su concentración normal, contando el número de esporofitos propagados, obteniendo una media de 18 esporofitos por cada tubo de cultivo.

1.5.13 Cítricos

- Fue encontrado el siguiente título de investigación realizado en cítricos, mas no el informe de esta, a continuación se enuncia dicha investigación:
- Evaluación de dos métodos para la micropropagación de cítricos (*Citrus* sp) y ensayo para la micropropagación de dos portainjertos y una variedad de naranja. Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.

1.5.14 Coníferas

Fueron encontrados los siguientes títulos de investigaciones en coníferas, mas no el informe de estas, a continuación se enuncia dichas investigaciones:

- Micropropagación de pino blanco (*Pinus ayacahuite*) a partir de ápices meristemáticos (etapa II). Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración
- Propagación por cultivo de tejidos vegetales de tres especies de coníferas (*Abies guatemalensis* Redher, *Pinus ayacahuite* Ehr y *Pinus rudis* Endl) e inoculación con hongos micorrizicos para inducir el enraizamiento in vitro y ex vitro de las plantas micropropagadas. Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.

1.5.15 Espárrago

1.5.15.1 Identificación de la metodología de propagación in vitro de espárrago (*Asparragus officinalis*)

Año: 1996

Autores: Ing. Agr. Ken Okabe e Inga. Agra. Ruth Victores

La Disciplina de Biotecnología desarrolló la metodología específica para la micropropagación de este cultivo, para lo cual se realizaron pruebas para evaluar medios de cultivo en las fases de: iniciación, multiplicación y enraizamiento así como el endurecimiento de dichos materiales. Durante los años de 1993 y 1994, fueron ejecutados ensayos iniciales y exploratorios en los cuales se planteó la evaluación de alternativas para el desarrollo de las tres fases mencionadas que comprende normalmente la propagación utilizando la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Los resultados obtenidos son favorables para las primeras dos fases, pero no se logró identificar el procedimiento adecuado para la fase de enraizamiento, por lo que se obtuvieron plantas con brotación bien diferenciada pero sin raíz, fue necesario realizar ajustes a los protocolos evaluados y otros específicos con los que se cuenta actualmente para espárrago, con la finalidad de que el ICTA cuente con una tecnología propia validada para este cultivo y que pueda ofrecerse a los productores interesados en este cultivo, el servicio de micropropagación masiva y acelerada para diversas variedades, con la certeza de que es funcional y rentable.

1.5.16 Frijol

1.5.16.1 Caracterización molecular, mediante AFLP, de la colección de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) liberadas por el ICTA.

Año: 2003

Autores:

Lic. Andrés Ávalos

Lic. Karla Ponciano

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

El objetivo principal de la investigación fue hacer un estudio básico del ADN genómico de 12 genotipos de frijol, mediante el aislamiento de ADN genómico y su posterior caracterización molecular mediante la técnica AFLP, para, finalmente, determinar

distancias genéticas entre los genotipos, para esto fueron sembradas semillas de cada una de las variedades caracterizadas en el invernadero del laboratorio de biotecnología, de estas plantas fueron recolectadas porciones de hoja (200 mg) este material vegetal fue sometido al proceso de extracción de ADN utilizando CTAB, la calidad y concentración del ADN extraído fue evaluado según la absorbancia A230 nm para concentración y calidad según la relación entre las absorbancias A230 entre A280 nm, ambas medidas en un espectrofotómetro, posterior a eso se llevo a cabo el proceso de digestión de ADN con las endonucleasas *EcoRI* y *Mse I*. la ligación de los adaptadores al ADN molde, las reacciones de preamplificación, la amplificación selectiva y la electroforesis.

Los datos fueron analizados y a partir de estos fue generado un dendrograma utilizando el índice de similitud de Dice y el método de aglomeración de UPGMA, entre las principales conclusiones de la investigación se pueden mencionar: A) se obtuvo ADN aislado, de alta pureza y calidad, para otros posibles usos como: identificación de marcadores moleculares, desarrollo de SCAR's identificación varietal, protección de obtenciones vegetales, etc. En una posible continuación de esta investigación; B) se generó un patrón genético molecular para cada una de las 12 variedades; C) se obtuvo un dendrograma que indica las distancias o similitudes genéticas entre variedades, cuyas principales características encontradas son: a) agrupó las variedades en tres grandes grupos; b) en el primer gran grupo se encuentran las variedades Compuesto Chimalteco 2, San Martín y IAN5091; c) en el segundo gran grupo se encuentra únicamente la variedad ICTA Ligerio; d) en el tercer gran grupo se encuentran las variedades ICTA Santa Gertrudis, ICTA Ostúa, ICTA Texel, ICTA Hunapú, ICTA Altense, Quinack-Ché, Parramos y Doricta; e) las variedades más relacionadas entre sí son: San Martín con IAN5091, ICTA Santa Gertrudis con ICTA Ostúa, ICTA Hunapú con ICTA Altense y Parramos con Doricta; f) la variedad que menos relación genética tiene con las demás es ICTA Ligerio.

1.5.16.2 Caracterización de 20 variedades mutantes de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la técnica de AFLP.

Año: 2003

Autores:

Lic. Andrés Ávalos

Ing. Agr. Luis Molina

Se presenta el análisis de 20 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados; estas compuestas por 10 mutantes de ICTA Altense y 10 mutantes de ICTA Hunapú pertenecen a la colección de mutantes inducidos por radiación gamma del programa de mejoramiento genético de frijol del ICTA, presentan en común la característica de desarrollo precoz. Adicionalmente se analizaron las variedades ICTA Altene e ICTA Hunapú que pertenecen al conjunto de variedades liberadas por el ICTA.

Se extrajo, de porciones de hoja de 200 mg de cada individuo, ADN de alta integridad (con poca cola en la migración electroforética) y de alta pureza (A260/A280 media de 1.85 ± 0.03), requerimientos críticos para la técnica, se obtuvo una concentración media de 760 ± 260 ng/ μ l.

Se determinó que las combinaciones de partidores del Kit AFLP de Invitrogen adecuadas para el análisis sin M y CAG/E y ACC, M y CTC/E y AGC, M y CAC/E y ACA, M y CAT/E y ACA y M y CTA/E y ACA; estas combinaciones diferenciaron a ICTA Altense de ICTA Hunapú individualmente, 4 de estas combinaciones de partidores se utilizaron para obtener los patrones de bandas de cada una de las variedades mutantes a manera de matriz binaria.

Este estudio constituye el primer paso en la búsqueda de marcadores AFLP ligados a la característica de desarrollo precoz, para lo que se requiere un análisis de conglomerado segregante.

1.5.16.3 Validación de una metodología de selección asistida con marcadores moleculares en el mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para resistencia al virus del mosaico dorado (BGYMV-GA; Begomovirus, Geminiviridae)

Año: 2008

Autores:

Ing. Agr. Héctor Sagastume

Licda. Karla Ponciano

Ing. Agr. Julio César Villatoro Mérida

El presente resumen contiene los resultados obtenidos en la validación de una metodología de selección asistida por los marcadores moleculares codominantes, tipo SCAR, SR2 y SR21 en la población segregante obtenida de la retrocruza entre ICTA Ligero y la F1 de la cruce entre ICTA Ligero y SEA15, en busca de plantas de frijol portadoras del gen *bgm-1* que confiere la resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV). La variedad ICTA Ligero es portadora del gen de resistencia *bgm-1* y SEA15 es portadora del gen susceptible *Bgm-1*. La población BC₁F₂ fue evaluada en una parcela-vivero BGYMV, observándose alta variabilidad fenotípica. Estos resultados no se pudieron relacionar con el genotipo de las plantas seleccionadas debido al desacoplamiento de las fases de campo y laboratorio. La población se avanzó a la generación BC₁F₄. Se establecieron modificaciones a los protocolos básicos de rutina para adaptarlos al formato 96, que se utilizó por primera vez en ICTA para un proceso de selección asistida por marcadores. Se estableció que las cajas de megatítulo son ventajosas para el muestreo en campo e invernadero y se adaptan exitosamente a la extracción alcalina de ADN. La calidad del ADN obtenido fue suficiente para amplificar los marcadores SR2 y SR21 en el 70% de las muestras donde fueron utilizadas porciones de 200 mg de hoja como fuente de ADN. Con base en el diagnóstico molecular positivo y grano negro pequeño, se redujo la población inicial a 10 individuos portadores del gen *bgm-1*, que podrán ser evaluados para correlacionar el fenotipo y genotipo en el avance generacional de autofecundación requerido para liberar una nueva variedad con resistencia a BGYMV.

Fueron encontrados los siguientes títulos de investigaciones realizadas en frijol, mas no el informe de estas, a continuación se enuncia dichas investigaciones

- A. Selección asistida para resistencia a antracnosis en frijol con el marcador microsatélite SBB14.
- B. Determinación de la dosis adecuada de irradiación gamma para inducir mutaciones con fines de mejoramiento genético en seis variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología ICTA. Guatemala, 2000. Sin numeración.

1.5.17 *Hoffmania sessilifolia* L.

1.5.17.1 Respuesta a la micropropagación de la especie endémica de Guatemala, *Hoffmania sessilifolia* L. informes técnicos del laboratorio de biotecnología ICTA, Guatemala.

Año: 2003

Autores:

Licda. Aura Elena Suchini

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

Con esta investigación se pretendió desarrollar una metodología para propagar esta especie endémica; determinando el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo de ápices y microestacas; estudiando la influencia de 4 concentraciones de BAP sobre el desarrollo de las microestacas; así también, conocer la influencia de dos diferentes concentraciones de 2,4-D y 2iP sobre el desarrollo de callo a partir de porciones de hoja y determinando el medio de cultivo adecuado para el desarrollo de plántulas a partir de segmentos de hoja, tallo y de callo.

Se logró la propagación de la especie por ápices y microestacas. El medio WPM sin reguladores de crecimiento fue el medio que brindó el crecimiento más rápido; reportando una tasa de propagación en ápices de 2 plántulas por mes y en microestacas de 3.5 plántulas. Además, el medio WPM desarrolló raíces en el 60% de las plántulas.

De cuatro concentraciones de BAP (10, 20, 30 y 40 mg/l) utilizadas en el desarrollo de las microestacas, la concentración de 30 mg/l permitió el crecimiento de 3 centímetros en las plántulas en el lapso de un mes, estas desarrollaron 5 ramificaciones con 3 nudos cada una. Concentraciones de 10 y 20 mg/l las plántulas crecieron 0.96 y 1.4 centímetros respectivamente, y desarrollaron 4 ramificaciones y de uno o dos nudos en cada ramificación.

El desarrollo de plántulas por organogénesis directa se observó en porciones de hoja, sembradas en medio WPM conteniendo 2.5 y 5 mg/l de ABA, luego de transcurridos dos meses. También, una concentración de 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA en medio WPM indujo la formación de plántulas en porciones de hoja y tallo en un lapso de 2 meses.

Un mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de 2iP propició el desarrollo de callo en porciones de hoja en un mes; así mismo, el medio WP; conteniendo concentraciones de 2.5, 5, 10 y 30 mg/l de ANA y 2.5, 5 y 10 mg/l de BAP permitió el desarrollo de callo en porciones de hojas, tallo y hoja completa en 23 días.

Se obtuvieron plantas por organogénesis indirecta en medio WPM conteniendo 5mg/l de ANA y 2.5 mg/l de BAP y 5 mg/l de ANA y 5 mg/l de BAP luego de transcurrido mes y medio, a partir de callo formado en porciones de hoja y tallo. También se desarrollaron plántulas a partir de callo formado en el pedúnculo de hojas en medio WPM conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.07 mg/l de ANA.

1.5.18 Maíz

1.5.18.1 Caracterización molecular de la diversidad existente en la colección nacional de maíz (*Zea mays* L.) utilizando marcadores de secuencia simple repetida.

Año: 2005

Autores:

Ing. Agr. Luis Molina

Licda. Karla Ponciano

Con el objetivo de generar información de base para el adecuado aprovechamiento de la diversidad genética del maíz, se analizó la variación mostrada por 10 marcadores de secuencia simple repetida en 731 colectas correspondientes a 20 departamentos de los 22 que conforman Guatemala. Los únicos departamentos de los cuales no se tuvo colectas fueron Guatemala y Sacatepéquez. El coeficiente de similitud promedio fue de 0.14 lo que indica alta diversidad entre las colectas. El análisis de varianza molecular mostró que del total de diversidad genética, el 88.52% se encuentra dentro de los departamentos. Sin embargo, existen diferencias significativas entre los departamentos. El análisis de agrupamientos muestra cuatro grupos claramente diferenciados. Se encontró también que el flujo genético es alto, principalmente en los departamentos vecinos como Alta Verapaz e Izabal; Chiquimula y Zacapa; Escuintla y Retalhuleu; Quetzaltenango y Totonicapán; Jalapa y Jutiapa; San Marcos y El Quiché. Las colectas provenientes de los departamentos de San Marcos, Quiché, Jalapa, Jutiapa y El Progreso son las que mostraron los mayores índices de diversidad. Por otro lado, debe tomarse en cuenta que existen departamentos pobremente representados como es el caso de Izabal y Escuintla. Las 80 muestras que representan al departamento de Chimaltenango, fueron obtenidas solamente en 3 municipios. A pesar de lo anterior, la información generada puede utilizarse de base para el mejor aprovechamiento de la variabilidad existente en maíz. No se pudo hacer una integración de la información morfológica y molecular debido a que se desconoce a correspondencia de las identificaciones entre los materiales utilizados en la caracterización morfológica y la presente.

Fueron encontrados los siguientes títulos de investigaciones realizadas en maíz, mas no el informe de estas, a continuación se enuncia dichas investigaciones:

- Desarrollo de variedades de maíz (*Zea mays* L.) con alto valor nutritivo adaptado a la zona del trópico bajo de Guatemala: Selección asistida con marcadores moleculares microsátélites. Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.
- Selección asistida con marcadores moleculares para el desarrollo de variedades de Maíz con alto valor nutritivo adaptado a la zona del Trópico Bajo de Guatemala. Informes técnicos del laboratorio de Biotecnología ICTA, Guatemala, 2003. Sin numeración.

1.5.19 Malanga

Fue encontrado el siguiente título de investigación realizado en Malanga, mas no el informe de esta, a continuación se enuncia dicha investigación:

- Establecimiento de una metodología para la propagación in vitro de malanga (*Colocasia esculenta*)

1.5.20 Orquídeas.

1.5.20.1 Manual de propagación de orquídeas *in-vitro*

Año: 2,000

Autor: Ing. Agr. Erwin Estuardo Archila Morales

El proceso inicia con la obtención del material que se empleará como explante, este debe obtenerse ya sea de campo o bien de colecciones privadas. Es importante que dicho material sea seleccionado tomando en cuenta la sanidad, para evitar que en el momento de la siembra se presente problemas de contaminación. Si la propagación se realiza

sexualmente, es decir empleando semillas, se mantiene la variabilidad genética lo que nos permite tener una herramienta útil para programas de conservación de germoplasma.

En el proceso de micropropagación sexual es preferible utilizar la cápsula que aún no ha mostrado dehiscencia debido a que en este momento las semillas aún se encuentran estériles y en el momento de la siembra los niveles de contaminación son bajos. Antes de realizar la siembra de las semillas es recomendable realizar observaciones al microscopio, si en las semillas se observa el embrión de forma redonda y de coloración verde, germinarán en período de tiempo mucho más reducido debido a que este es el indicativo del estado de madurez ideal del embrión.

Si la propagación se desarrolla asexualmente se deben utilizar diferentes tipos de explantes y los más comunes son yemas apicales o axilares, secciones de nudos y pedúnculos florales. Se debe tomar en cuenta que para cada tipo de explante existe un proceso de desinfección, del cual depende el éxito de su establecimiento bajo condiciones de laboratorio. Con la propagación micropropagación asexual se logra mantener la uniformidad genética de clones con características deseables y especiales como color, tamaño, forma, etc. Obteniendo el explante se procede a su establecimiento bajo condiciones de laboratorio, para luego proceder a realizar subcultivos hasta la obtención de un número determinado de plantas. Como se menciona existen una gran diversidad de explantes y orquídeas así mismo una serie de medios de cultivo específicos para algunas de ellas, por lo que en ocasiones se hace necesario propiciar condiciones especiales de cultivo a determinado género o especie.

El proceso de propagación *in vitro* de orquídeas dependerá mucho del género que se esté propagando, como por ejemplo el tipo de explante a ser utilizado o el medio de cultivo al que mejor se adapte el género de interés, por ejemplo el caso del género *Phalaenopsis* para el cultivo de explantes provenientes de pedúnculo floral es recomendable emplear una modificación del medio basal Murashige & Skoog, para el cultivo de brotes vegetativos del género *Dendrobium* es empleado como medio de cultivo una modificación del medio de Vacin y Went, para la siembra de ejes florales de este mismo género se puede utilizar

un medio resultante de la modificación del medio MS al 50%, con 2,4-D, BAP y KIN, para la siembra de nudos de este tipo de orquídea se emplea el medio de cultivo de Knop's al que se adicionan 2.0 mg de BAP por litro y 20 gramos de azúcar. Para la siembra de yemas del género *Cattleya* se emplea el medio de cultivo de Lindemann, otras alternativas de propagación incluyen el cultivo de yemas pero utilizando otros medios de cultivo dentro de estos podemos mencionar los medios de Reinert and Mohr; Vacin and Went, Knudson C modificado y Morel.

Luego de obtener plantas provenientes de laboratorio que alcanzan una altura de 5 a 6 cm y más de tres raíces son trasladados a invernadero. Es necesario tener mucho cuidado y seguir las recomendaciones para su aclimatación, debido a que en este momento las plantas son muy susceptibles al cambio brusco al que serán sometidas. Es en este paso cuando se marca el éxito de la micropropagación de orquídeas, debido a que si se les proporciona un manejo adecuado, se obtiene un alto grado de supervivencia de las plantas y los costos serán bajos.

1.5.21 Papa

1.5.21.1 Evaluación de la metodología para micro-tuberización de papa

Año: 1996

Autores: Ing. Agr. Ken Okabe

Plantas obtenidas por micropropagación *in vitro*, fueron sometidas a oscuridad a una temperatura de 20 a 24 centígrados por un período de 2 a 3 meses, esto provocó que las yemas axilares desarrollaran un microtubérculo cada una de ellas, posteriormente estos fueron almacenados en refrigeración durante 4 meses, esto con el fin de endurecer la epidermis de los tubérculos. Para inducir la formación de los microtubérculos, las plantas estuvieron en contacto con diferentes medios líquidos MS completo, con diferentes proporciones de vitaminas y reguladores de crecimiento, y azúcar al 9%. Las variedades evaluadas fueron Ictafrit, Ioman e ICTA Chiquirichapa.

En los medios que fueron probados las variedades Loman e ICTA Chiquirichiapa reaccionaron mejor al medio P2, para Ictafrit es adecuado p7, en estos medios las yemas axilares multiplicaron 10 veces cada mes.

1.5.21.2 Evaluación del efecto de medios de cultivo, intensidades lumínicas de incubación y edades de siembra en el cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Año: 1999

Autor: Ing. Agr. Walter Noe Mus Coy

La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología del ICTA y tuvo como objetivo evaluar el efecto de nueve medios de cultivo, dos intensidades lumínicas de incubación y dos edades de siembra sobre el crecimiento *in vitro* de los clones Ictafrit y Loman. Para lo cual se realizó un experimento utilizando un diseño de bloques al azar factorial para cada uno de los clones, con 36 tratamientos y 10 repeticiones dando un total de 360 unidades experimentales por clon; debido a que fue necesario establecer la consistencia de los resultados, se resembraron los materiales en las mismas condiciones, lo que constituyó la edad de siembra número dos.

Las variables de respuesta fueron: altura de planta, número de entrenudos, longitud de entrenudos, peso fresco de tallo y raíces, número de raíces y longitud de raíces.

El clon Ictafrit presentó una mayor respuesta en las variables altura de planta, número de entrenudos y peso de tallo fresco con el medio de cultivo C del CIP, en estado semisólido, con una intensidad lumínica de incubación de 3,000 lux. El clon Loman presentó una mayor respuesta en las variables número de entrenudos y longitud de entrenudos con el medio de cultivo D del CIP, en estado semisólido, con una intensidad lumínica de incubación de 2,000 lux. El medio de cultivo C del CIP, en estado semisólido, con una intensidad lumínica de incubación de 3,000 lux induce un mayor peso fresco de tallo en el

clon Loman. En los clones Ictafrit y Loman se obtuvo una mayor respuesta en las variables peso fresco de raíces y número de raíces con el medio de cultivo P7, el cual es un medio de sales balanceado, adicionado con 50 ml/l de agua de coco, sin reguladores de crecimiento, 1 mg/l de ácido fólico, 4 mg/l de L-arginina y 0.4 mg/l de Ancymidol desarrollado por Okabe, con una intensidad lumínica de incubación de 3,000 lux. En el medio de cultivo MS, con una intensidad lumínica de incubación de 3,000 lux induce una mayor longitud de raíces en los clones Ictafrit y Loman.

1.5.21.3 Efecto de 3 auxinas sobre el enraizamiento in vitro de 10 clones de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Año: 2000

Autor: Ing. Agr. Erick Edmundo Bolaños Lorenzana

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del ICTA, y tuvo como objetivo evaluar el efecto de las auxinas AIA, AIB y ANA y tres niveles de estas sobre el enraizamiento de diez clones de papa.

Para lo cual se realizó un experimento utilizando un diseño completamente al azar para cada uno de los clones, con 10 tratamientos y veinte repeticiones dando un total de 100 unidades experimentales por clon. Las variables de respuesta fueron: sobrevivencia, peso seco de raíces, número de raíces, longitud de raíces y altura de planta. Para la evaluación de todos los tratamientos fue utilizado el medio P2 desarrollado por Ken Okabe, el cual no es más que un medio de cultivo de sales balanceadas adicionado con ácido fólico, L-arginina, Panteonato de calcio y Putrescina.

Para todos los clones que se evaluaron, el mejor enraizamiento considerando todas las variables, se produjo con la auxina AIB, teniendo en cuenta que cada nivel es específico para cada clon. Para los clones Ictafrit, Loman, Atzimba, el nivel es de 1.5 mg/l de AIB; para el clon ICTA chiquirichapa el mejor nivel es de 1.0 mg/l de AIB; para los clones

Atlantic, Tollocan, Xalapán y Amigo el mejor nivel es de 0.5 mg/l de AIB; para los clones Floresta y Lemhi-Russet no se recomienda aplicar auxinas.

1.5.21.4 Efecto de dos reguladores osmóticos en la conservación *in vitro* de diez clones de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Año: 2001

Autor: Ing. Agr. Edwin Argueta

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del ICTA, el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos reguladores osmóticos sorbitol y manitol en la conservación *in vitro* de 10 clones de papa. Fue empleado el medio P2 de Ken Okabe, el cual no es más que un medio de cultivo de sales balanceadas adicionado con ácido fólico, L-arginina, panteonato de calcio y putrescina, este vario únicamente en el tipo y dosis de reguladores osmóticos empleados.

Para lo cual se realizó un experimento trifactorial, utilizando un diseño de bloques completos al azar con arreglo combinatorio de los tratamientos, se evaluaron seis tratamientos por los que suman 60 tratamientos por bloque, se hicieron diez repeticiones sembrando una repetición por día, para hacer un total de 600 unidades experimentales. Las variables de respuesta fueron: altura de planta, número de entrenudos y porcentaje de regeneración.

Las variables de respuesta se analizaron simultáneamente para los diez clones evaluados, considerados como la colección activa, con lo cual se determinó que para la conservación adecuada *in vitro* de los clones de papa el regulador que mejor funcionó es el sorbitol con una dosis específica de 30 g/l.

1.5.21.5 Efecto de medios de cultivo y tipos de recipientes en la tuberización *in vitro* de la papa (*Solanum tuberosum* L.)

Año: 2002

Autores:

Ing. Agr. Erwin Enrique Gómez Delgado

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

Todo programa de producción de semilla certificada de papa inicia con la producción de minitubérculos en invernadero, que pueden provenir de plantas o microtubérculos producidos *in vitro*. Para conseguir este propósito se planteó inducir microtuberización evaluando el efecto de seis medios semisólidos de cultivo; además de tres tipos de recipientes: Magentas, Gerber y tubos de cultivo, con densidades de siembra de 12, 5 y 1 explante por recipiente, empleando para el efecto dos clones, Loman e Ictafrit, incubados en un cuarto de crecimiento, en completa oscuridad a una temperatura de 21 °C por 60 días. Las variables respuesta fueron: número, peso, longitud y diámetro de los microtubérculos y brotes de los mismos. Las principales conclusiones fueron: a) los recipientes más adecuados para la producción *in vitro* de la papa fueron los tubos de cultivo, debido a que los mismos, conteniendo 10 ml de medio tuberizador, permitieron la formación de hasta 2 microtubérculos por explante, en la mayoría de los casos y el factor contaminación no fue significativo, de igual forma no se vieron afectados por hiperhidricidad causa por acumulación de etileno; b) en ambos clones, Loman e Ictafrit, se logró la microtuberización. El mejor medio para microtuberizar el clon Ictafrit fue el medio de cultivo de Palmer Smith (PS), que produjo dos microtubérculos por explante, con un peso de 288 mg, con 13 mm de diámetro y 20 mm de longitud y sin producción de brotes, utilizando como recipiente tubo de cultivo, mientras que para el clon Loman el medio seleccionado como mejor fue el MS, con una producción de un microtubérculo por explante, con un peso de 162 mg, un diámetro de 10 mm, una longitud de 18 mm y sin producción de brotes, también en el tubo de cultivo; c) los medios de Palmer y Smith, de Ken Okabe y MS favorecieron la formación de un mayor número de microtubérculos con brotes.

Fueron encontrados los siguientes títulos de investigaciones realizadas en papa, mas no el informe de estas, a continuación se enuncia dichas investigaciones:

- Renovación y conservación in vitro de germoplasm de papa (*Solanum tuberosum* L.). Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.
- Adecuación de un modelo de segundo orden para la conformación de una solución de cultivo de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum* L.). Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.
- Efecto de siete frecuencias de aplicación de estrés sobre la tuberización de plantas de papa, mediante la reducción de pH en una solución de cultivo. Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.
- Evaluación de desempeño agronómico de tubérculos producidos en cultivo en solución en una matriz de cultivo. Informes Técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, 2004. Sin numeración.

1.5.22 Papaya

1.5.22.1 Limpieza de virus y determinación de la metodología para la micropropagación de papaya

Año: 1996

Autores: Ing. Agr. Ken Okabe e Inga. Agra. Ruth Víctores

Fueron seleccionadas las variedades de papaya redonda y Guatemala, estas fueron seleccionadas por el programa de frutas tropicales y suministradas al laboratorio. A todos los ejemplares se les aplico la técnica de termoterapia. Para la micropropagación en las fases de iniciación y multiplicación se logró determinar que el tiempo requerido por el explante en la fase de iniciación es de 30 días a 35 grados centígrados y de 3 a 4 meses a 20 centigrados, con una tasa de multiplicación de 5. El medio de cultivo que mejor resultado ha ofrecido es el F15, evaluado originalmente para frambuesa, con un alto contenido de Giberelinas. Este medio puede ser empleado para ambas fases, iniciación y multiplicación.

1.5.23 Patchouli

Fue encontrado el siguiente título de investigación realizado en patchoulí, mas no el informe de esta, a continuación se enuncia dicha investigación:

- Establecimiento de una metodología para la propagación *in vitro* de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth).

1.5.24 Piña

1.5.24.1 Estandarización de la propagación *in vitro* de Piña (*Ananas comosus* L.) para la variedad MD2

Año: 2002

Autores:

Secia Mélida Rabanales Hernández

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

Hace 16 años variedad de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), denominada MD2, con muy buenas características comerciales, y gran demanda, sin embargo, el material vegetativo para su siembra comercial era escaso y no se habían evaluado medios para su propagación rápida, eficiente y en forma adecuada en laboratorios de cultivo de tejidos, con las sabidas ventajas que proporciona esta técnica, tales como: propagación rápida y en poco espacio, producción de plantas libres de patógenos y de alta calidad genética. Por las anteriores razones en el laboratorio de Biotecnología del ICTA en Bárcena, Villa Nueva, se llevó a cabo una investigación con el objetivo de contribuir al desarrollo de un protocolo para la micropropagación del nuevo cultivar, para determinar los mejores medios de cultivo para cada una de las fases de la propagación *in vitro* de piña. La investigación incluyó tres fases de la micropropagación establecimiento o iniciación, proliferación de brotes o propagación y enraizamiento *in vitro* utilizando como explante inicial las yemas axilares. Al final de los experimentos se llegó a la conclusión: el protocolo recomendado para las distintas fases en la propagación *in vitro* de la piña: para la fase de

establecimiento se debe utilizar el medio Linsmaier y Skoog (LS) suplementado con 0.1 mg/l de ANA y 0.1mg/l de BAP y 40mg/l de sulfato de adenina; para la fase de propagación se recomienda el uso del medio MS suplementado con 2 mg/l de ANA y 2mg/l de BAP; y para la fase de enraizamiento *in vitro* utilizar el medio MS suplementado con 0.2 mg/l de ANA y 0.2 mg/l de AIB.

1.5.25 Piñon.

1.5.25.1 Respuesta del piñón (*Jatropha curcas* L.) variedad Cabo Verde a la multiplicación *in vitro*.

Año: 2014

Autores:

Ing. Agr. Héctor Sagastume

Licda. Aura Suchini.

Con este proyecto se pretendió evaluar el potencial de propagación asexual de la variedad Cabo Verde, mediante la reproducción *in vitro* utilizando dos técnicas de cultivo de tejidos: regeneración de brotes axilares, a partir de la siembra de segmentos nodales, y regeneración de brotes adventicios a partir de la siembra de segmentos de hoja. En ambos casos se utilizó el medio basal MS. Los tratamientos evaluados consistieron en diferentes combinaciones de tidiázurón, BAP y AIB. Las variables de respuesta registradas fueron: el número de yemas brotadas y número de segmentos con diferenciación de brotes, para segmentos nodales y foliares, respectivamente. La variedad de piñón Cabo Verde no responde a la regeneración de brotes axilares, a partir de segmentos nodales, utilizando kinetina y tidiázurón, en dosis de 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 mg/l. la variedad de piñón Cabo Verde respondió en una forma muy débil a la regeneración de brotes axilares, utilizando BAP, en dosis de 1.0 mg/l. en promedio se producen 1.3 brotes por explante. La variedad de piñón Cabo Verde no responde a la regeneración de brotes adventicios, utilizando BAP, en dosis de 0.0, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 mg/l. Se recomienda evaluar dosis de otros reguladores de crecimiento, tales como: zeatina, 2-iP, dihidrozeatina, zeatina

ribosida, PBA, adenina, 2CI-4PU y 2,6CI-4PU y evaluar tamaños de explante, edad del explante, el grado de “stress” de la planta donante y época de extracción del explante.

Fue encontrado el siguiente título de investigación realizado en piñón, mas no el informe de esta, a continuación se enuncia dicha investigación:

- Caracterización molecular de 50 muestras de piñón (*Jatropha curcas* L.) mediante AFLP

1.5.26 Pitaya

1.5.26.1 Respuesta de la pitaya (*Hylocereus undatus* (Haworth), Britton y Rose) a la propagación in vitro.

Año: 2005

Autor: Inga. Agra. Dora María Corzantes

Para establecer sistemas intensivos de producción, es evidente que se necesita suficiente material de propagación seleccionado, lo cual se ve limitado mediante métodos tradicionales de propagación. La variabilidad de materiales de pitaya encontrada en Guatemala es amplia, de la cual se han seleccionado seis clones promisorios, sobre la base de variaciones evidentes en los rasgos visibles. Estos clones, se encuentran adaptados a distintas zonas de vida del país. La posibilidad de multiplicar masivamente clones nativos de individuos sobresalientes hace atractivo el estudio de la micropropagación de especies como la pitaya. El presente estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), ubicado en el kilómetro 21.5 carretera a Amatitlán en Bárcena, Villanueva y tuvo como objetivo principal evaluar la respuesta a la propagación in vitro de seis clones de pitaya en 22 medios de cultivo con 8 repeticiones bajo un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial haciendo un total de 132 tratamientos y 1,056 unidades experimentales utilizando como base el medio MS (Murashige & Skoog) y las diferentes concentraciones de ANA y BAP 0, 0.01, 0.1, 0.5 y 1 mg/l de ANA y 0, 0.5, 1,

2.2, 5 y 10 mg/l de BAP. Obteniéndose que el clon de pitaya CJ-PROFRUTA 06- 02, presentó el número más alto de brotes, la mayor longitud y el mayor peso fresco de brotes (3.25 brotes, 0.73 centímetros y 0.87 gramos) al aplicársele 0.01 mg de ácido naftalenacético (ANA) y 1 mg de bencilaminopurina (BAP), seguido por los clones CJPROFRUTA 01-94, CJ-PROFRUTA 03-94, CJ-PROFRUTA 04-94 y CJ-PROFRUTA 05-94; el clon CJ-PROFRUTA 02-94 no presentó brote alguno en los niveles de ANA y BAP evaluados.

1.5.27 Trigo

Fue encontrado el siguiente título de investigación realizado en trigo, mas no el informe de esta, a continuación se enuncia dicha investigación:

- Respuesta al cultivo de anteras de siete cultivares y cuarenta y dos híbridos de trigo (*Triticum aestivum* L.). Informe Técnico Final, Proyecto Fodecyt 13-98. Senacyt, Guatemala, 1999. Sin numeración

1.5.28 Uva

1.5.28.1 Identificación de la metodología de propagación in vitro de uva (*Vitis sp.*)

Año: 1996

Autores: Ing. Agr. Ken Okabe e Inga. Agra. Ruth Víctores

La Disciplina de Biotecnología desarrolló la metodología específica para la micropropagación de este cultivo (PROTOCOLO), para lo cual se efectuaron diferentes pruebas para evaluar medios de cultivo en las fases de: iniciación, multiplicación y enraizamiento así como el endurecimiento de dichos materiales (ADAPTACIÓN).

Se evaluaron 6 variedades de uva, una del ICTA y 5 variedades proporcionadas por PROFRUTA. En la parte de desinfección del tejido vegetal no se encontró ninguna dificultad, así como este no sufrió ningún daño por oxidación o contaminación.

En el medio de iniciación se evaluaron 3 diferentes medios, siendo el mejor el segundo evaluado donde se observó un buen crecimiento en las 6 variedades evaluadas, al transferir los explantes al medio de multiplicación, únicamente la variedad ICTA 105 logró la formación de brotes con un 20% de enraizamiento en estos. En las otras 5 variedades no hubo formación de callo y las plantas presentaron necrosis, por lo que estas fueron colocadas de nuevo en la fase de iniciación con el fin de encontrar otro medio donde estas puedan formar callo. En cuanto a la fase de adaptación o endurecimiento de las plántulas, fueron observados buenos resultados al colocar las plantas en arena bajo una cubierta de plástico transparente, evitando que esta toque a la planta, con riego diario durante un periodo de una semana.

1.5.29 Vainilla

1.5.29.1 Evaluación de medios de cultivo para la germinación y desarrollo de plántulas de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson) *in vitro*

Año: 2005

Autor: Inga. Agra. Sara García

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del ICTA, y se desarrolló en dos fases: la primera fue la germinación de las semillas y la segunda el crecimiento de las plántulas germinadas. En la primera fase se evaluaron los medios de cultivo MS y Knudson C, ambos en tres concentraciones: completo, al 10 y al 50% de su concentración normal. En total fueron seis los medios evaluados. Después de que las semillas germinaron, se inició la segunda fase, se evaluaron 12 medios de cultivo, con la finalidad de encontrar, al menos uno, que permitiera el adecuado crecimiento de las plántulas. Los medios que se evaluaron fueron: Knudson C completo, suplementado con agua de coco y sacarosa en diferentes concentraciones (0, 10 y 20 gramos por litro); MS, al 50% de su concentración normal, suplementado con sacarosa (0, 10 y 20 g/l); 3 ml/l de Bayfolán,

suplementado con agua de coco y sacarosa en diferentes concentraciones (0, 10 y 20 g/l); y MS al 10 %, suplementado con sacarosa en diferentes concentraciones(0, 10 y 20 g/l).

En la fase de germinación de semillas, los medios de cultivo que presentaron mejores resultados fueron MS al 10% y el medio Knudson al 50%, con 4.72 y 3.21% de germinación respectivamente.

Para la fase de crecimiento de plántulas, el medio de cultivo que mostró mejores resultados fue el de 3ml/l de Bayfolán, suplementado con 200ml/l de agua de coco y 20g/l de sacarosa. Las plántulas trasplantadas a este medio presentaron, a los dos meses de cultivo *in vitro*, muy buena altura de planta (4 cm) , buen número de hojas (6.3), buen número de raíces (3.8) y buena longitud de raíces (2.6 cm).

1.5.30 Xate

1.5.30.1 Efecto del 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) sobre la formación de callo y germinación *in vitro* de xate macho o jade (*Chamaedorea oblongata* Cronquist) a partir de embriones cigóticos.

Año: 2002

Autores:

Ing. Agr. César Guillermo Chang González

Ing. Agr. MSc. Héctor Alfredo Sagastume

Ing. Agr. Luis Molina

Con el objetivo de contribuir al desarrollo de una metodología para la propagación *in vitro* del xate macho o jade, se planteó un experimento para determinar el efecto de 8 niveles de 2,4-D sobre la inducción de callo y germinación *in vitro* de embriones cigóticos. Los principales resultados y conclusiones del experimento fueron las siguientes: a) la inducción de callo en embriones se ve influenciada por las dosis de 2,4-D, considerándose el mejor tratamiento el del 100mg/l de dicho regulador de crecimiento, el cual mostró un porcentaje

de inducción de callo de 6.1%; b) en la obtención de plantas, esta se logró principalmente en forma directa, mediante la germinación del embrión y no a través de una regeneración a partir de callo como se esperaba; c) de acuerdo al análisis de regresión lineal efectuado a la relación entre porcentaje de germinación de embriones y el 2,4-D se concluye que por cada unidad de cambio en concentración de 2,4-D existe una disminución de 0.0067 unidades en porcentaje de germinación de embriones.

1.6 Conclusiones

- Según el diagnóstico realizado en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, se han realizado más de “50” investigaciones, desde su fundación, en distintos cultivos como lo son ajo, alcachofa, anturio, arándano, arroz, bromelias, cactus, camote, caña de azúcar cítricos, chipe, coníferas, espárragos, frijol, especies endémicas, maíz, malanga, papa, papaya, piña, piñón, pitaya, trigo, uva, vainilla y xate.
- Los temas de investigación realizados en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas son principalmente relacionados con el cultivo de tejidos vegetales, en cuanto a la búsqueda de metodologías eficientes de propagación masiva de plantas, esto comprende la evaluación de medios de cultivos, reguladores de crecimiento, y explantes a ser empleados por cultivo o planta que va a ser propagada,
- Otro de los temas de investigación efectuado dentro del laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, es el de marcadores moleculares en especies vegetales, estos buscan analizar y medir la biodiversidad entre las colecciones del ICTA, buscando polimorfismos, mediante diferentes tipos de marcadores moleculares como son AFLP y SSR, discriminando así entre individuos y determinando que tan emparentados están, aportando información

para los programas de mejoramiento genético del ICTA, otra de las aplicaciones que se les ha dado a estos en el ICTA, es la de seleccionar líneas de plantas, mediante marcadores, que sirven para determinar la presencia o ausencia de un gen de interés para los fitomejoradores, como puede ser, resistencia a enfermedades, presencia de alguna sustancia, determinar plantas sanas y enfermas, etc.

- El Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, es un generador de conocimiento en cuanto a los temas de cultivo de tejidos vegetales y marcadores moleculares, aportando información valiosa al país, con el fin brindar el beneficio de esta a los agricultores guatemaltecos.

1.7 Recomendaciones

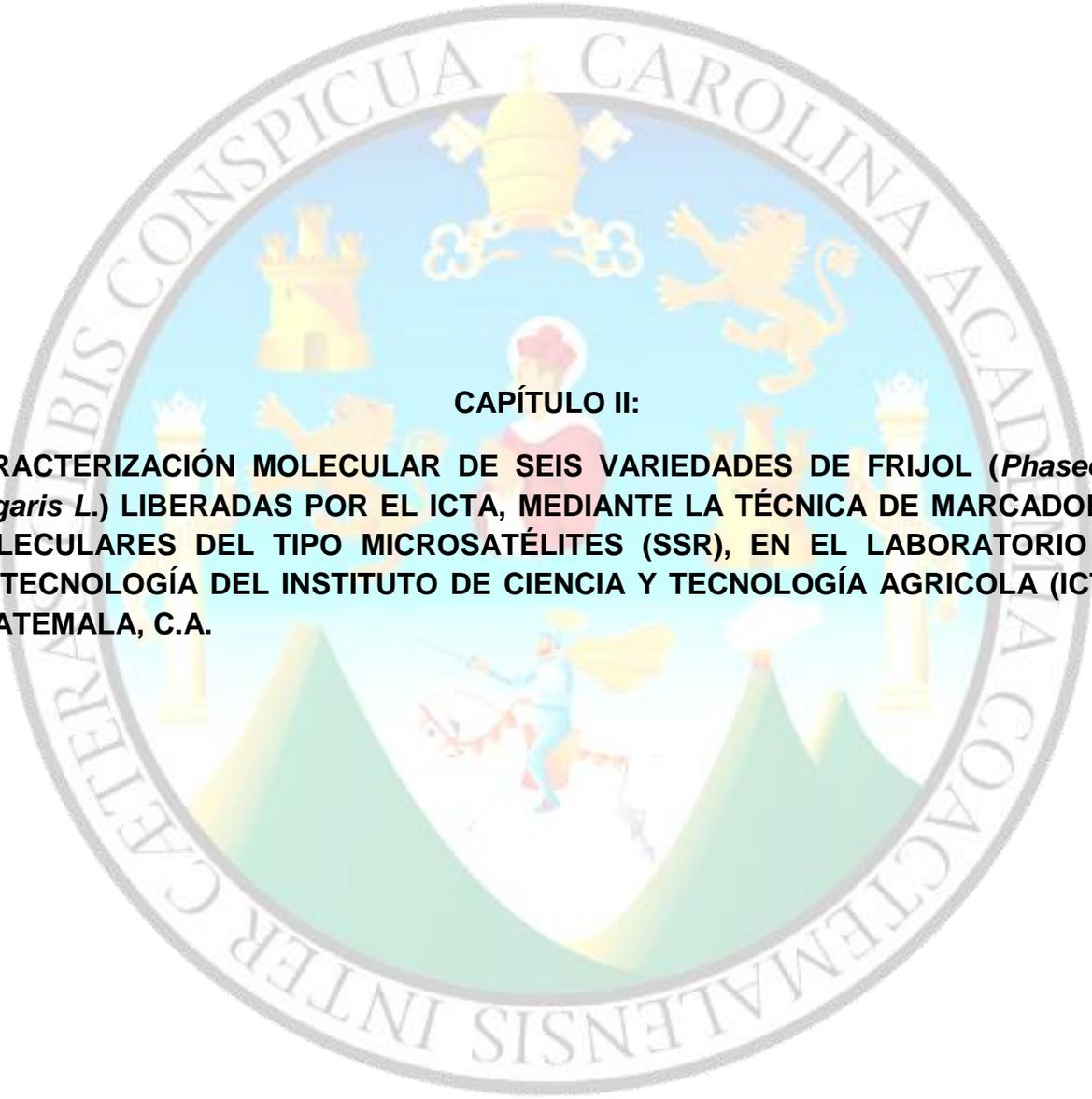
- Mantener dos copias debidamente identificadas de todas las investigaciones realizadas en el laboratorio de biotecnología del ICTA de ahora en adelante, guardando una en el CEDICTA y una en el laboratorio, organizándolas según cultivo y año de realización.
- Realizar un índice con las investigaciones realizadas en el laboratorio de biotecnología del ICTA, para localizarlas de una manera fácil y rápida.

1.8 Bibliografía.

1. Argueta, E. (2001). Efecto de dos reguladores osmóticos en la conservación in vitro de diez clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) (Tesis de Licenciatura), USAC, Guatemala.
2. Bolaños, E. (2000). Efecto de 3 auxinas sobre el enraizamiento in vitro de 10 clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) (Tesis de Licenciatura), USAC, Guatemala.
3. Corzantes, D. (2005) Respuesta de la pitaya (*Hylocereus* spp.) a la propagación in vitro. (Tesis de Licenciatura). USAC, Guatemala.
4. Cuevas, M. C. S. (2003). Biotecnología: Ventajas y desventajas para la agricultura. *Revista Científica UDO Agrícola*, 3(1), 1-11.
5. Cutz, A. (2004). Micropropagación de tres variedades de arándano (*Vaccinium ashei* Readell). (Tesis de Licenciatura), USAC, Guatemala.
6. de la Riva, G. A. (2000). Plant biotechnology and food security in Latin America and the Caribbean. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-20.
7. Flórez, Á. M. W. (2010). La biotecnología en un mundo globalizado. Colaboran Con revista colombiana de bioética.
8. García, S. (2005). Evaluación de medios de cultivo para la germinación y desarrollo de plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in vitro. (Tesis de Licenciatura) URL, Guatemala.
9. Herdt, R. W. (2006). Biotechnology in agriculture. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, 31, 265-295.
10. Izaguirre, D. (2000). Efecto de la Bencilaminopurina (BAP) sobre la propagación in vitro de tres clones de banano (*Musa acuminata* Colla). (Tesis de Licenciatura), USAC, Guatemala.

11. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
12. Molina, L. Sagastume, H. (2002) Efecto de tres medios de inducción de callo y de 20 genotipos en la respuesta al cultivo de anteras de arroz (*Oryza sativa* L.). Proyecto FODECYT(07-00).
13. Molina, L. Ponciano, K. Fuentes, M. (2005) Caracterización molecular de la diversidad existente en la colección nacional de maiz (*Zea mays* L.) utilizando marcadores de secuencia simple repetida. Proyecto FODECYT(28-03)
14. Morales, H. (2001) Inducción de callo y regeneración in vitro de plantas a partir de segmentos de hoja de anturio (*Anthurium* sp.) (Tesis de Licenciatura). USAC, Guatemala.
15. Muñoz, E. (2000). Biotecnología y desarrollo en distintos contextos culturales. Influencias e impactos. Ciencia, tecnología/naturaleza, cultura en el siglo, 21, 183-204.
16. Mus, W. (1999). Evaluación del efecto de medios de cultivo, intensidades lumínicas de incubación y edades de siembra en el cultivo in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L.) (Tesis de Licenciatura), USAC, Guatemala.
17. Orozco, C. (2004). Situación actual de la Biotecnología en Guatemala. Guatemala: CONAPOTECBIO. 85p.
18. Orozco, C. Sagastume, H. Feldhoff, U. Suchini, A. Cruz, M. Mansilla, J. Calderón, E. Castillo, A. (2011) Propagación in vivo e in vitro de cinco especies del género *Tillandsia* en vías de extinción y de potencial uso sustentable. Proyecto FODECYT(04-2006)
19. Robles, G. Sagastume, H. (2001) Efecto de cinco niveles de isopentenil adenina (2iP), sobre la micropropagación de seis variedades de arándano (*Vaccinium ashei*). (Tesis de Licenciatura). USAC, Guatemala.

20. Sagastume, H. Molina, L. (2002) Informes técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, Guatemala : ICTA.
21. Sagastume, H. Molina, L. (2003) Informes técnicos del Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, Guatemala : ICTA.
22. Sagastume, H., Molina, L., Ávalos, A., & Ponciano, K. (2003). Caracterización molecular, mediante AFLP, de la colección de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) liberadas por el ICTA. Proyecto FODECYT(15-01).
23. Sagastume, H. A., Ponciano K.M. Villatoro J.C. (2008) Validación de una metodología de selección asistida con marcadores moleculares en el mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para resistencia al virus del mosaico dorado (BGYMV-GA; Begomovirus, Geminiviridae). Proyecto FODECYT(42.2008)
24. Sagastume, H. Suchini, A. (2014) Respuesta del piñón (*Jatropha curcas* L.) variedad Cabo Verde a la multiplicación in vitro. Proyecto FODECYT(46-2007)
25. Sánchez, W. (2001) Efecto de la cinetina, bencilaminopurina y ácido naflenacético, sobre la regeneración de plantas in vitro, a partir de tejido no diferenciado de arroz (*Oryza sativa* L.)(Tesis de Licenciatura). USAC, Guatemala.
26. Sandoval, J. (2005) Propagación in vitro del cactus cabeza del viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose) en el laboratorio de biotecnología del ICTA de Bárcena, Villa Nueva, Guatemala. (Tesis de Licenciatura). USAC, Guatemala.
27. Suchini, A. Castillo, J. Medinilla, O. (2007) Conservación in vitro de cinco especies de *Chamaedorea* endémicas y en peligro de extinción en Guatemala. Proyecto FODECYT(27-2004)

The seal of the University of Coahuila de Zaragoza is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a castle, and a lion. The shield is surrounded by a blue border with the Latin motto "BIS CONSPICUA CAROLINA ACCADIA COACTEMALENSIS INTER CETERA".

CAPÍTULO II:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIETADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A.

2.1 Presentación

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una planta domesticada, que constituye la legumbre alimenticia más importante del mundo, esta planta es prácticamente cultivada en todo el mundo, excepto en la Antártida, desde su centro de origen, el cual es mesoamérica y la parte andina de sudamérica, hasta donde este fue introducido, tal es el caso de África, Europa y Asia (Voyses, 1983).

El frijol es la tercer legumbre más importante a nivel mundial, únicamente superado por la Soya [*Glycine max* (L.) Merr.] y el Maní (*Arachis hipogea* L.), aunque no está muy claro si el rendimiento del maní, se refiere a la vaina o a la semilla, y en muchos países la soya es utilizada únicamente para alimento de animales, esto hace al frijol la legumbre alimenticia más importante del mundo.

A pesar de que otras especies pertenecientes al género *Phaseolus* han sido domesticadas y cultivadas en distintas partes del mundo el frijol común es la más importante de ellas, constituyendo el 90% del cultivo de todas las plantas pertenecientes a este género (S.P. Singh, 2013).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes en Guatemala, que, junto al maíz y arroz, constituyen la dieta básica de la mayoría de guatemaltecos. El promedio de consumo en Guatemala es de alrededor de 20 kg en un año por persona.

El frijol suple proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (especialmente hierro, fósforo, magnesio, manganeso, zinc, cobre y calcio). Las proteínas del frijol son ricas en el aminoácido lisina, que en el maíz (*Zea mays* L.) es deficiente, por lo que los dos alimentos se complementan nutricionalmente muy bien para tener una dieta de proteínas balanceada.

El frijol es fuente importante de proteínas en la dieta diaria del guatemalteco, por lo que se le ha llamado “la carne de los pobres”. El frijol, nutritivamente, juega un rol muy importante en la dieta de los no privilegiados. El frijol provee de un 10 a 20% de los requerimientos nutritivos de una persona adulta. El frijol es un cultivo típico de pequeños agricultores de subsistencia, a menudo sembrado en pendientes de baja fertilidad (Sagastume, Molina, Ávalos, & Ponciano, 2003).

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) es el encargado en Guatemala de desarrollar variedades aptas, para el cultivo en los distintos climas del país, que sean capaces de tolerar diferentes factores bióticos, tales como plagas y enfermedades, y abióticos, como lo son la humedad relativa, el tipo de suelo según la zona, sequía, exceso de precipitación pluvial, temperatura, etc.

Es por ello que a través de los años de su existencia, este ha generado distintas variedades, tolerantes a enfermedades virales, fúngicas, entre otras. Además, dichas variedades se adaptan a distintas zonas del país, algunas de estas son variedades precoces, tal como el ICTA Ligero.

Para seguir con los actuales programas de mejoramiento genético del frijol común, y mejorarlos substancialmente, es necesario de hacer uso de herramientas moleculares, para conocer que poseen estos, es decir con que genes cuenta cada una de las variedades, y si estas están emparentadas o no, y tener en cuenta de que es capaz cada uno de los materiales, y su potencial en el mejoramiento de futuras variedades, tanto como en el plano nacional como internacional.

Para conocer estas variedades es necesario caracterizarlas más allá de su aspecto físico, con esto se hace referencia a realizar una caracterización molecular de las variedades, mediante el uso de marcadores que capaces de indicar variabilidad fácilmente y sean específicos para el frijol, es por eso que para el presente estudio se han elegido los microsatélites o SSR, Simple Sequence Repeat por sus siglas en Inglés, los cuales son arreglos de motivos de 1 a 5 nucleótidos repetidos uno detrás de otro. Se caracterizan por su hipervariabilidad, abundancia, reproducibilidad, herencia mendeliana y codominancia (Gaitán-Solís, Duque, Edwards, & Tohme, 2002).

Son ampliamente utilizados para la caracterización molecular de frijol porque se basan en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y porque el CIAT ha construido un mapa genómico anclado con estos marcadores (Blair *et al.*, 2003).

Con el fin de conocer la diversidad genética de las variedades de frijol más cultivadas, liberadas por el ICTA; ICTA Altense, ICTA Superchiva, ICTA Hunapú, ICTA Ligerero, ICTA Petén e ICTA Sayaxché se les extrajo de estas ADN, y se amplificó por medio de quince marcadores moleculares del tipo microsatélites, siendo separados los fragmentos por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 8% y visualizados mediante tinción de plata, amplificando un total de 45 bandas totales.

De las bandas amplificadas un 91.15 % fueron polimórficas, creando matrices binarias para dichos resultados, para así generar un índice de similitud de Dice, y posteriormente crear un dendrograma por el método de aglomeración de UPGMA con el fin de separar mediante distancias las diferentes variedades y representar estas diferencias en un medio gráfico, a partir de este se lograron identificar dos grupos con tres variedades cada uno.

El primer grupo encierra a las variedades ICTA Superchiva, ICTA Petén, e ICTA Ligerero, y el segundo grupo a ICTA Sayaxché, ICTA Hunapú e ICTA Altense, esto debido a que no todas las variedades provienen de genotipos mesoamericanos, sino que también andinos e híbridos entre estos dos centros de origen del frijol, además son diferentes entre ellos debido a su valor nutricional, resistencia y tolerancia a enfermedades, precocidad, etc, todo esto producto del proceso de mejoramiento genético. Las variedades más similares entre sí fueron ICTA Petén e ICTA Ligerero y las más distantes ICTA Petén e ICTA Sayaxché.

A partir de los fragmentos amplificados por los 15 pares de microsatélites fue construida una huella genética para cada una de las variedades frijol liberadas por el ICTA, esto con fines de registro.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Marco conceptual

2.2.1.1 El frijol

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una planta domesticada, que constituye la legumbre alimenticia más importante del mundo, esta planta es prácticamente cultivada en todo el mundo, excepto en la Antártida, desde su centro de origen, el cual es mesoamérica y la parte andina de sudamérica, hasta donde este fue introducido, tal es el caso de África, Europa y Asia (Voyses, 1983).

El frijol es la tercer legumbre más importante a nivel mundial, únicamente superado por la Soya [*Glycine max* (L.) Merr.] y el Maní (*Arachis hipogea* L.), aunque no está muy claro si el rendimiento del maní, se refiere a la vaina o a la semilla, y en muchos países la soya es utilizada únicamente para alimento de animales, esto hace al frijol la legumbre alimenticia más importante del mundo.

A pesar de que otras especies pertenecientes al género *Phaseolus* han sido domesticadas y cultivadas en distintas partes del mundo el frijol común es la más importante de ellas, constituyendo el 90 % del cultivo de todas las plantas pertenecientes a este género (S.P. Singh, 2013).

En América los países productores de frijol, corresponden a Brasil (2.5 millones T), Estados Unidos (1.3 millones T), México (0.98), siendo estos primeros 3 los mayores productores, seguidos de Argentina, Canadá, Colombia, Nicaragua, Honduras, Guatemala, El Salvador, Perú, Haití, Ecuador, Chile, Venezuela y República Dominicana, dentro de los países asiáticos se encuentran China, Irán, Japón y Turquía como los mayores productores, en África son Burundi, Etiopía, Malawi, Sudáfrica, Ruanda, Tanzania, Uganda, Zimbawe entre otros.

Dentro de estos mencionando a América Latina, Asia y África donde se encuentran en mayoría países con poco desarrollo, producen un 77 % de la producción mundial de frijol, en cuanto a Europa, y América del Norte, los cuales son países desarrollados, el frijol se cultiva con alta tecnología, y su producción representa el 23 % (figura 1) (Schwartz & Corrales, 1989). En el cuadro 1, se presentan datos de producción de frijol, según regiones del planeta tierra.

Cuadro 1. Producción desglosada de frijol, por regiones del planeta tierra.

Región	Área cosechada (miles ha)	Producción (miles t)	Rendimiento (kg/ha)
África	3,260	2,120	650
Asia	2,076	2,211	1,065
Europa	568	589	1,040
Américas	8,398	6,687	796
Cánada y E.E.U.U.	784	1,473	1,880
El Caribe	158	95	600
México y C.A.	2,296	1,432	620
Sur América	5,160	3,687	715
Total mundial		18.294	100.0

Fuente: Rosas, 2003.

El consumo *per cápita* de frijol se encuentra relacionado con el nivel de desarrollo con el que cuenta el país donde se encuentre (figura 1), el más alto se encuentra en África con un aproximado de 47.7 kg/año (Ruanda y Burundi), el más alto en América Latina se encuentra en Brasil y México con más de 13 kg/año (S.P. Singh, 2013); mientras que el más bajo en América del Norte y Europa Occidental, con menos de 2 kg/año (Schwartz & Corrales, 1989).

En países centroamericanos, la producción es de 9.8 kg/año, pudiendo ser mayor, pero está limitada por varios factores, cómo la tecnología de cultivo, el área cultivada, y los recursos económicos de los productores y consumidores (Rosas, 2003).



Fuente: Debouck & H, 1984.

Figura 1. Distribución del cultivo de frijol común a nivel mundial

A. Usos del frijol

El frijol común es cultivado principalmente por sus vainas verdes o inmaduras, sus semillas verdes o inmaduras y por sus semillas secas o granos, dependiendo si es para consumo o propagación sexual, los cultivares donde se cosecha la vaina verde o inmadura del frijol, han reducido sus fibras, o las han eliminado por completo, en las paredes de sus vainas, en algunos países de África y América Latina, las hojas jóvenes o flores son cosechadas como vegetales, los tallos, hojas y vainas verdes son utilizados para alimentar el ganado, y las plantas secas para ser incorporadas al suelo (S.P. Singh, 2013), (figuras 2, 3 y 4).



Fuente: Voysest, 2000.

Figura 2. Fotografía de granos de frijol seco.



Fuente: Google Images, 2017..

Figura 3. Fotografía de vaina inmadura de frijol



Fuente: Google Images, 2017.

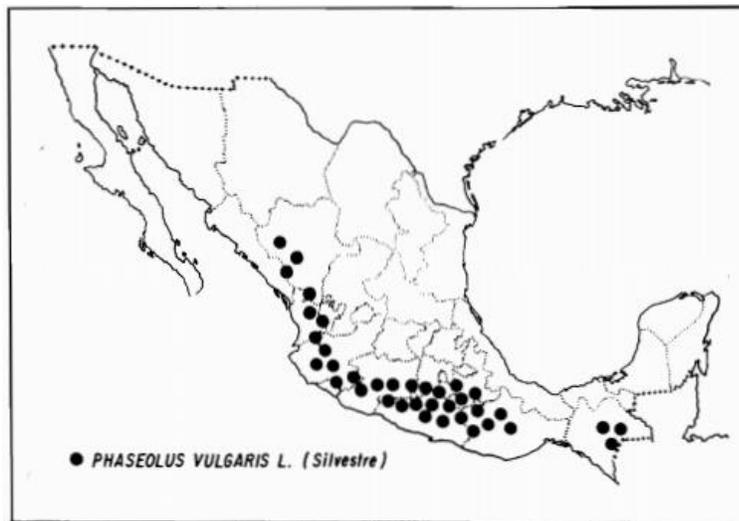
Figura 4. Fotografía de granos verdes de frijol.

B. Origen y domesticación del frijol común

En el siglo pasado, científicos empezaron a deducir mediante distintos tipos de datos que el continente americano es el centro de origen del frijol común, uno de estos tipos de datos, fueron los datos arqueológicos, tanto de Perú como del sudeste de Estados Unidos, se concluyó que el frijol común se había originado en las Américas, antes de esto se sostenía la creencia de un origen asiático, por ejemplo Linneo, sugirió que este se había originado en la India, las evidencias de su origen americano se basan en datos arqueológicos, morfológicos y moleculares, que se detallan a continuación.

a. Datos arqueológicos

En la obtención de los datos arqueológicos, para establecer la edad de las muestras utilizadas, una de las estrategias más utilizadas es la datación por ^{14}C , y han influido de manera significativa en la determinación del origen del frijol común. Los restos más antiguos de *Phaseolus vulgaris* fueron hallados en América, en la zona Andina y Mesoamérica, las cuales se encuentran lejos una de otra (Kaplan, 1965; Kaplan, Lynch, & Smith, 1973) (figura 5).



Fuente: Miranda Colín, 1967.

Figura 5. Distribución del frijol común silvestre en México.

El autor Kaplan en el año 1965, expone que el frijol común fue domesticado en el Valle de Tehuacán, Puebla, México hace unos 7,000 años. En Perú, en la cueva de Guitarrero se encontraron restos de frijol común, con características parecidas a las del frijol cultivado actual. Lo cual indica que Perú pudo haber sido uno de los primeros centros de domesticación, según la prueba del ^{14}C indicó que la edad media de frijol domesticado es de 7680 ± 280 años (Kaplan *et al.*, 1973).

Otro estudio con materiales encontrados en cuevas de Tamaulipas, Puebla y Oaxaca en México utilizando el método del radiocarbono y el uso de la espectrofotometría de masas, indicó que la edad de una de las formas domesticadas más recientes del frijol es menor a los 2,400 años (Smith, 2005). En resumen el origen del frijol se remonta a Mesoamérica y los Andes (figura 6).



Fuente: Berglund-Brücher & Brücher, 1976.

Figura 6. Lugares donde se han encontrado semillas de frijol domesticado en el continente americano.

b. Datos morfológicos

Fueron analizadas accesiones de variedades cultivadas, tanto de países mesoamericanos como México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y República Dominicana, comparándolas con países del sur andino como Colombia, Ecuador, Chile, Perú, Brasil, Argentina y Bolivia, los rasgos morfológicos de estas accesiones han permitido determinar dos grandes grupos de centros de origen y domesticación del frijol, en base a los patrones de diversidad y las relaciones genéticas (Shree P Singh, Gutierrez, Molina, Urrea, & Gepts, 1991).

Los rasgos morfológicos que se evalúan en las accesiones de frijol domesticado son: rasgos de la semilla, rasgos de la etapa vegetativa, del desarrollo floral, fructificación, madurez fisiológica y resistencia a enfermedades (Shree P Singh *et al.*, 1991).

Los resultados separan las accesiones en dos grandes acervos genéticos del frijol domesticado, el mesoamericano y el andino, se describe a en el cuadro 2.

Cuadro 2. Diferencias morfológicas entre frijol común domesticado de cada uno de los acervos genéticos.

Característica	Centro de origen y domesticación	
	Mesoamericano	Sur Andino
Forma de la hoja	Acorazonada y ovalada	Lanceolada y aguda
Pubescencia en las hojas	Escasa y corta	Densa y larga
Longitud del quinto entrenudo	Corto	Largo
Inflorescencia	Varios nudos	Un solo nudo
Formas de la bráctea	Acorazonada y ovalada	Lanceolada y triangular
Base del pétalo	Rayada	Lisa
Posición del ápice de la vaina	Placentaria	Central
Tamaño de la semilla	Pequeña y mediana	Grande

Fuente: Hernández-López *et al.*, 2013.

c. Datos moleculares

La diversidad genética de los frijoles silvestre y cultivado se ha estudiado mediante marcadores moleculares de ADN, como RAPDs, AFLPs, SSRs, y RFLPs. Estos pueden discriminar claramente al germoplasma del frijol común en dos acervos genéticos de origen y domesticación (Hernández-López *et al.*, 2013).

El análisis de las tasas evolutivas indica que el clado *Phaseolus* tiene una edad entre 6 a 8 millones de años y cada clado del género va de 1 a 4 millones de años. La filogenia del género *Phaseolus* se ha caracterizado con base en el análisis de marcadores del tipo ITS que son espaciadores Internos Transcritos” (Delgado-Salinas, Bibler, & Lavin, 2006) los cuales son altamente variables entre especies, y los cuales se encuentran entre los genes de transcripción de los organismos (Yokota, Kawata, Iida, Kato, & Tanifuji, 1989).

C. Taxonomía del frijol.

El frijol común (figura 7), dentro del sistema de clasificación de Cronquist, se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub-Clase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: Phaseolus

Especie: *Phaseolus vulgaris* L. Fuente: R. J. Singh & Jauhar, 2005.

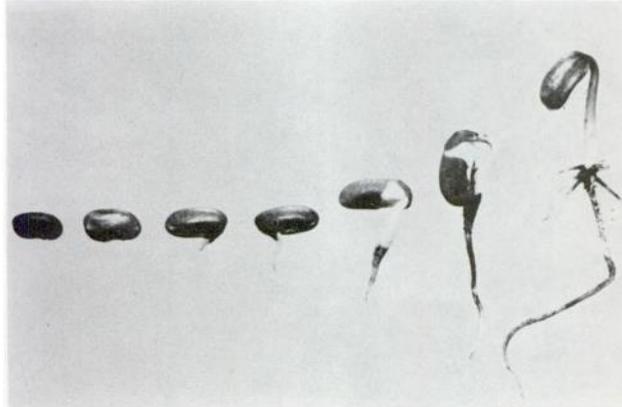


Fuente: HOUTTE
Figura 7. Planta de frijol común ilustrada

D. Morfología del frijol

a. La raíz.

El frijol como todas las plantas pertenecientes a la sub-división magnoliopsida posee un sistema radical axonomorfo, (Esau, 1972) el cuál en la primera etapa de desarrollo está formado por la radícula del embrión la cual se convierte después en la raíz principal o pivotante, a los pocos días de la emergencia de la radícula empiezan a surgir raíces secundarias un poco menos gruesas que la principal y aparecen en todos los puntos de crecimiento de la raíz como se muestra en la figura 8 (Debouck & H, 1984).



Fuente: Debouck & H, 1984

Figura 8. Desarrollo inicial de la raíz del frijol común.

Las raíces terciarias aparecen posteriormente sobre las secundarias y las cuaternarias sobre las terciarias, la última subdivisión la constituyen los pelos absorbentes, los cuales son órganos epidérmicos localizados principalmente en las partes jóvenes de las raíces, cuya función es la absorción de agua y nutrientes (Debouck & H, 1984). Como característica de los miembros de la familia Papilionoideae, el frijol común presenta nódulos en su sistema radicular, únicamente en las raíces laterales, estos fijan nitrógeno en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, el cual ayuda a satisfacer el requerimiento de la planta (figura 9) (Flores Vindas, 1994).



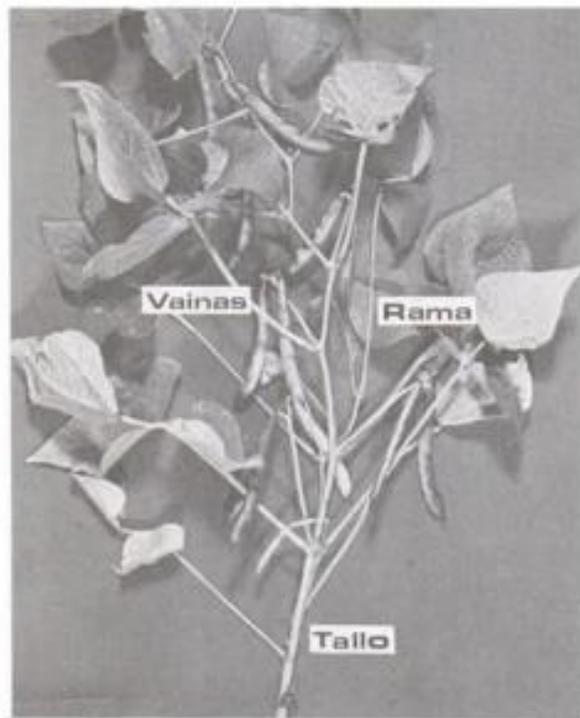
Fuente: Valladares, 2010

Figura 9. Raíz de Frijol con Nódulos.

b. El tallo

La planta posee un tallo principal, el cual, dependiendo del cultivar, puede presentar un hábito erecto, semierecto, semiprostrado o prostrado, con un crecimiento de 0.3 m a 2 m de longitud, según el hábito (figura 10).

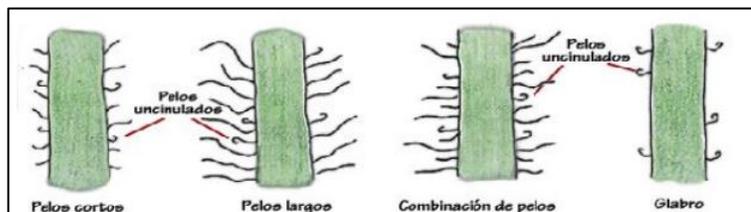
El tallo está conformado por nudos y entrenudos y este se inserta en el inicio de la raíz, el primer nudo se denomina cotiledonar luego aparece el segundo nudo que es el de las hojas primarias simples, después de estas el tallo continúa con una sucesión de nudos y entrenudos, en cada uno se encuentra una estípula, una hoja y entre el pecíolo de la hoja y la prolongación del tallo es decir las axilas, se encuentran estructuras vegetativas como las ramas o reproductivas como las inflorescencias (Debouck & H, 1984).



Fuente: (Debouck & H, 1984)

Figura 10. Tallo de frijol con sus partes señaladas.

Los tallos pueden presentar tricomas largos o cortos, pubescencias con ambos tipos de tricomas o ser glabros, pero siempre se encuentran unos tricomas pequeños en forma de gancho, llamados tricomas uncinulados fácilmente observables en las partes jóvenes, en la figura 11 se pueden observar los distintos tipos de pubescencia. Los nudos por tallo pueden estar entre 6 y más de 30 (Valladares, 2010). El tallo puede tener 3 colores, dependiendo de la variedad, que son verde, rosado y morado.



Fuente: (Valladares, 2010)

Figura 11. Tipos de pubescencia presentes en el frijol común.

i. Hábitos de crecimiento del tallo

Según estudios hechos en el CIAT (van Schoonhoven & Tropical, 1987) se consideró que los hábitos de crecimiento podrían ser agrupados en 4 tipos principales como se muestra en la figura 12, que son los siguientes:

- **Hábitos de crecimiento determinado**

- Hábito de crecimiento determinado arbustivo

Posee las siguientes características:

- El tallo y las ramas terminan en una inflorescencia desarrollada, cuando está inflorescencia se forma, el crecimiento del tallo se detiene.
- El tallo es fuerte, con pocos entrenudos de 5 a 10
- La altura varía entre 15 y 50 cm.
- La floración es corta y la maduración de los frutos es simultánea.
- Pueden existir variaciones, con entrenudos más largos y con mas de 8 de estos, algunos pueden ser trepadores

- **Hábitos de crecimiento indeterminado**

- Hábito de crecimiento indeterminado arbustivo.

Posee las siguientes características:

- Tallo erecto no trepador, que termina en una guía corta, las ramas no generan guías.
- Pocas ramas, pero en mayor número que el tipo anterior, generalmente cortas.
- Generalmente más de 12 nudos en el tallo.
- Como todas las plantas de hábito de crecimiento indeterminado, éstas continúan creciendo durante la etapa de floración, aunque a un ritmo menor.

- Hábito de crecimiento indeterminado postrado

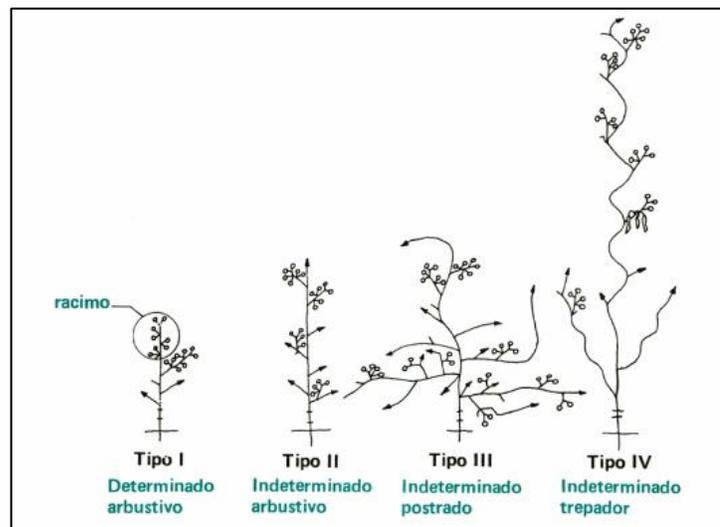
Posee las siguientes características:

- Plantas postradas o semipostradas con ramificación desarrollada.
- La altura de las plantas es superior a las plantas del primer hábito, mayor de 80 cm.
- Lo anterior se debe a que el número de nudos del tallo y de las ramas es superior a los primeros dos tipos, así mismo, la longitud de entrenudos es superior, por lo tanto, el tallo como las ramas terminan en guías.
- Algunas plantas empiezan a postrarse desde las primeras etapas de la fase vegetativa, otras desde la floración, algunas pueden presentar aptitud trepadora.

- Hábito de crecimiento indeterminado trepador

Posee las siguientes características:

- A partir de la primera hoja trifoliada el tallo desarrolla la doble capacidad de trepar.
- Ramas poco desarrolladas, a consecuencia de la dominancia apical.
- El tallo puede tener entre 20 a 30 nudos con más de 2 m de altura.
- La etapa de floración es significativamente más larga que la de los otros hábitos, de tal manera, que todas las etapas se presentan al mismo tiempo.



Fuente: Debouck & H, 1984.

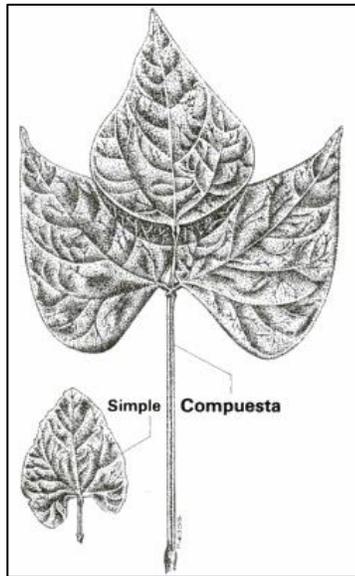
Figura 12. Tipos de hábitos de crecimiento del frijol común.

c. La hoja.

Estas pueden ser de dos tipos, simples y compuestas, dependiendo de la edad de la planta, estas están insertadas en los nudos del tallo y las ramas (figura 13). En dichos nudos siempre se encuentran brácteas que protegen la yema axilar, las cuales reciben el nombre de estípula, que constituyen un carácter importante en la clasificación de las leguminosas (Dimitri, Dimitri, & Orfila, 2000).

Las hojas primarias son simples, estas aparecen en el segundo nudo del tallo y se forman en la semilla. Son opuestas, cordiformes, unifoliadas, auriculadas, simples y acuminadas. Se caen antes de que la planta alcance su madure fisiológica. Sus estípulas son bífidas.

Las hojas trifoliadas son las hojas típicas del frijol. Tienen tres folíolos, un pecíolo y un raquis, siendo los dos acanalados. El folíolo central o terminal es simétrico y acuminado, los laterales son asimétricos (Graham & Ranalli, 1997).



Fuente: Debouck & H, 1984.

Figura 13. Tipos de hojas del frijol.

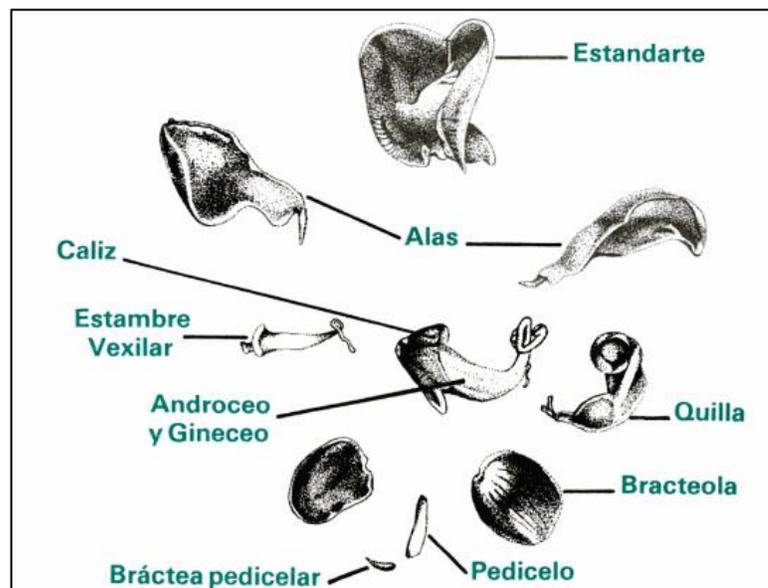
d. La flor

En su estado de prefloración inicial, está envuelto por las bractéolas que tienen forma ovalada, en su estado final, la corola que aún está cerrada sobresale y las bractéolas solo cubren el cáliz.

Cuando sucede la antesis la flor posee simetría bilateral con las sigs. características (Graham & Ranalli, 1997):

- Pedicelo glabro o subglabro con tricomas uncinulados y en su base una pequeña bráctea.
- Cáliz gamosépalo, campanulado, con 5 dientes triangulares dispuestos como labios en dos grupos, dos de ellos en la parte alta completamente soldados y tres más visibles en la parte baja. Posee dos bractéolas en la base del cáliz.
- La corola es pentámera y papilionácea, con dos pétalos soldados por su base y tres no soldados.
- El androceo está formado por 9 estambres soldados por su base en un tubo, y uno más libre llamado vexilar que se encuentra al frente del pétalo principal de la corola llamado estandarte.(Dimitri *et al.*, 2000)
- Gineceo supero e incluye el ovario comprimido, estigma interno, lo que genera la autogamia en esta especie, debajo de este se puede observar una agrupación de pelos en forma de brocha.

En la figura 14 se esquematizan las partes de una flor típica de frijol común.

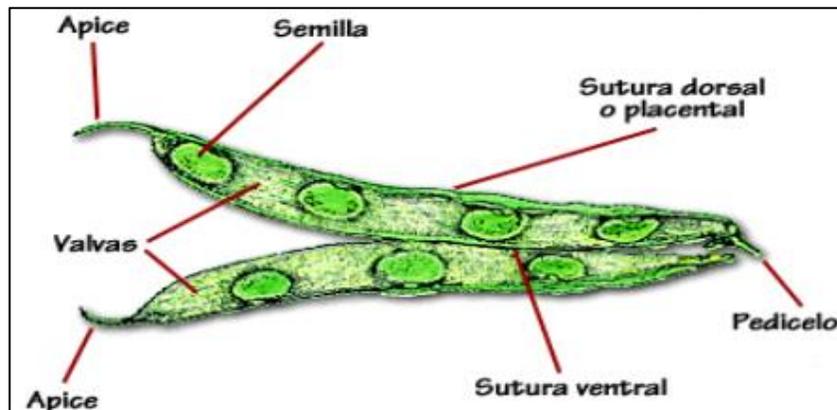


Fuente: Debouck & H, 1984.

Figura 14. Partes de la flor del frijol.

e. Fruto

El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Puesto que el fruto es una vaina, se le clasifica como leguminosa. Dos suturas aparecen en la unión de las dos valvas, una es dorsal, llamada placentar, y la otra ventral. Los óvulos alternan en la sutura placentar, con una placentación marginal propia de las leguminosas, como consecuencia las semillas también alternan en las dos valvas (figura 15) (Debouck & H, 1984).



Fuente: (Valladares, 2010)

Figura 15. Vaina de frijol con sus partes señaladas

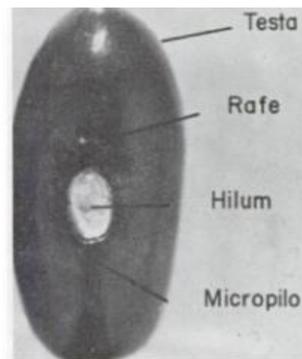
f. La semilla.

Esta no posee albumen por lo que guarda todas sus reservas energéticas en los cotiledones, se origina de un óvulo campilótropo, las partes externas e internas más importantes de la semilla son las siguientes (Adams, Coyne, Davis, Graham, & Francis, 1985; Debouck & H, 1984; Dimitri *et al.*, 2000; Graham & Ranalli, 1997; Valladares, 2010).

- Testa o cubierta.
- El hilum, es la cicatriz de donde la semilla estuvo conectada a la placenta.
- Micrópilo, es una abertura en la testa cerca del hilum, donde se realiza la absorción de agua.

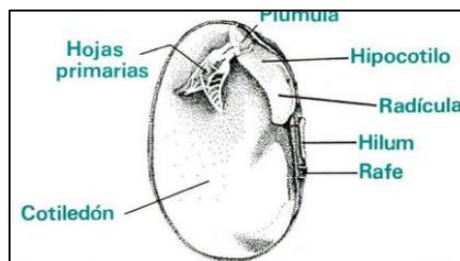
- La rafe, proviene de la unión del funículo con los tegumento externos del óvulo campilótropo.
- Embrión que se conforma de:
 - Plúmula
 - Radícula
 - Hojas primarias
 - Hipocotilo
 - Cotiledones

En las figuras 16 y 17 se señalan las partes tanto externas como internas de una semilla de frijol común.



Fuente: Debouck & H, 1984.

Figura 16. Partes externas de la semilla de frijol



Fuente: Debouck & H, 1984.

Figura 17. Partes internas de una semilla de frijol.

E. Citología y citogenética del frijol

Variedades cultivadas y silvestres, de la mayoría de las especies del género *Phaseolus* contienen $2n=2x=22$ cromosomas. Aunque los cromosomas del frijol son extremadamente pequeños, algunos estudios en la profase de células somáticas (Mok & Mok, 1977) y en el diploteno de la meiosis en células madre de polen, lograron identificar los 11 cromosomas (R. J. Singh & Jauhar, 2005).

2.2.1.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología, incluyendo los estudios de diversidad genética en plantas cultivadas, el cual es el objetivo del presente estudio.

Los marcadores moleculares, se definen como cualquier diferencia no típicamente controlada genéticamente, en base a esto se dice que cualquier tipo de molécula orgánica o inorgánica característica de un organismo es un marcador, también lo definen como cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para identificar o discriminar entre organismos mediante técnicas de separación como electroforesis o cromatografía. (MOCTEZUMA & KAHL, 2000) Los tipos de marcadores moleculares son los siguientes (Alcántara, 2007):

- ADN nuclear.
- ADN de cloroplasto
- ADN mitocondrial
- ADN ribosomal
- ARN
- Isoenzimas/Aloenzima

En el presente estudio solo se hizo énfasis en los marcadores de ADN debido a que estos serán utilizados.

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias de ADN entre individuos. Dentro de este grupo de marcadores, se encuentran de tres tipos, el primero, lo conforman aquellos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo, RFLP y VNTRs, los del segundo tipo son aquellos que amplifican secuencias al azar, basados en cebadores arbitrarios o semiarbitrarios, tal es el caso de los MAAP, RAPD y RAMPO y el último tipo lo conforman aquellos con un sitio objetivo específico como SSR, SCAR, CAPS, ISSR (Karp, 1997).

Algunos tipos de marcadores moleculares de ADN son:

- A. AFLP
- B. RFLP
- C. RAPD
- D. SCAR
- E. CAPS
- F. SSR
- G. ISSR
- H. SNP

Los marcadores moleculares que han sido más utilizados para evaluar diversidad genética en plantas son RAPDs, RFLPs, ISSR, y SSR, estos últimos serán los que se emplearán en el presente estudio (Reyes Martínez, 2014).

A. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y principalmente para la amplificación de fragmentos específicos de ADN, esta técnica emplea secuencias de oligonucleótidos conocidas, para iniciar a partir de ellas la amplificación de fragmentos menores a 6000 pares de bases de ADN (Azofeifa-Delgado, 2006).

Esta técnica emplea uno o dos oligonucleótidos sintéticos, llamados cebadores, generalmente de entre 10 a 24 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia de ADN y diseñados para hibridar en dirección contraria.

El método implica la repetición de una serie de ciclos térmicos, en los cuales mediante a diferentes temperaturas lleva a cabo actividades como la desnaturalización del ADN, la unión de los cebadores a las cadenas simples desnaturalizadas de ADN, y la amplificación, a partir del cebador, a partir de una doble cadena mediante la acción de una polimerasa termoestable, dando como resultado en una amplificación exponencial de un fragmento de ADN (MOCTEZUMA & KAHL, 2000).

B. Marcadores del tipo SSR

Los microsatélites (también conocidos como secuencias simples repetidas o SSR) son arreglos de motivos de 1 a 5 nucleótidos repetidos uno detrás de otro. Se caracterizan por su hipervariabilidad, abundancia, reproducibilidad, herencia mendeliana y codominancia (Gaitán-Solís *et al.*, 2002). Son ampliamente utilizados para la caracterización molecular de frijol porque se basan en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y porque el CIAT ha construido un mapa genómico anclado con estos marcadores (Blair *et al.*, 2003).

Se sabe que una gran proporción del genoma de organismos eucariontes está compuesta por secuencias repetitivas de ADN. Varias clases de estas secuencias han sido descritas y caracterizadas en varias especies animales y vegetales. Estas difieren en el número y la composición de los nucleótidos.

Por eso, desde el punto de vista de los marcadores moleculares, estas secuencias repetitivas se tornan importantes herramientas para el análisis genético pues ofrecen la posibilidad de realizar el muestreo simultáneo de un gran número de loci genéticos polimórficos dispersos en el genoma. Las secuencias repetitivas se encuentran agrupadas o dispersas a lo largo del genoma nuclear formando grupos altamente variables en términos estructurales, esto es, altamente polimórficos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Las regiones que contienen secuencias sencillas repetidas son amplificadas individualmente por medio de la PCR, a partir de un par de iniciadores, cebadores o partidores (“primers”) específicos, de 20 a 30 bases complementarias a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite.

Los segmentos amplificados a partir de estos sitios, casi invariablemente, presentan un extenso polimorfismo resultante de la presencia de diferente número de elementos simples repetidos. Así, cada microsatélite, independientemente del elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.), constituye un locus genético altamente variable, multialélico, de gran contenido informativo. Cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases) representa un alelo diferente del mismo locus (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Cada locus de microsatélite es analizado individualmente al utilizarse un par de iniciadores o partidores construidos específicamente para su amplificación. Es posible analizar más de un locus por vez, siempre que los alelos de cada locus tengan tamaños suficientemente diferentes y migren hacia zonas separadas del gel.

Los loci SSR parecen estables y poseen codominancia, es decir, ambos alelos de un individuo heterocigoto son visualizados y son altamente multialélicos, en una población donde potencialmente todos los alelos de aquel locus pueden ser detectados y discriminados (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

El método más eficiente para visualizar microsatélites en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida usa radioactividad o marcaje fluorescente de nucleótidos. Estos procedimientos requieren de equipo especial y consumen dinero y tiempo.

La tinción con plata fue originalmente descrita para detección ultrasensible de polipéptidos separados por electroforesis en gel de poliacrilamida y después adaptada a ácidos nucleicos. Esta última ha demostrado ser altamente sensible, con resultados similares a la autoradiografía y marcaje con fluorescencia (Creste, Neto, & Figueira, 2001).

2.2.1.3 Análisis cluster

El análisis cluster es un método matemático incluido dentro de la estadística multivariada, es principalmente para la formación de grupos de UBC's (Unidad Básica de Caracterización) a partir de las similitudes o disimilitudes que existen entre estas, a partir de las características que fueron evaluadas, este análisis está conformado por dos métodos interrelacionados, el primero es el cálculo de los índices de similitud o disimilitud entre los pares de UBC's. El segundo es la aplicación del método de aglomeración adecuado, el cual permite crear en base a los índices anteriormente mencionados, gráficas de árbol o dendrogramas. La elección de la mejor combinación de los métodos del análisis cluster depende principalmente de la naturaleza de los datos y del objetivo de la caracterización (Johnson, 2000).

A. Naturaleza de los datos

a. Datos doble estado

Estos datos son los que se obtienen cuando la variable solo tiene dos posibles resultados, como por ejemplo para ausencia presencia, y se representan con un "0" para ausencia en este caso y un "1" para presencia de la característica. Estos datos presentan distribución binomial. Para una caracterización con marcadores moleculares existe presencia y ausencia de las bandas, es por eso que este tipo de datos es el idóneo para este tipo de caracterizaciones (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

b. Datos multiestado

Estos son datos cualitativos, que presentan más de dos posibilidades de respuesta; estos pueden tener una secuencia lógica o no tenerla, es decir que los datos multiestado abarcan tanto a los datos nominales, sin lógica, y a los datos ordinales que si tienen lógica (Levitus *et al.*, 2010).

c. Datos cuantitativos

Son aquellos datos que se pueden contar y son continuos; estos generalmente con distribución normal, estos datos son los que más se utilizan en la actualidad en estudios de caracterización morfométrica (Levitus *et al.*, 2010).

d. Datos genéticos

Son aquellos datos donde el investigador es capaz de conocer ciertas características que se acoplen a la genética mendeliana y de poblaciones, es decir, cuando se conocen el número de loci que está siendo evaluado y el número de alelos por locus. Estos datos on por ejemplo, frecuencias alélicas y génicas por población (Levitus *et al.*, 2010).

B. Índices de similitud

Estos índices están desarrollados, principalmente, para datos doble estado, todos estos índices están basados en los principios mostrados en el cuadro 3:

Cuadro 3. Posibles combinaciones de comparación entre dos UBC'S para análisis de similitud

		Individuo <i>j</i>	
		1	0
Individuo <i>i</i>	1	a	b
	0	c	d

Fuente: Colín & López, 2011.

En el cuadro anterior “a” significa que los dos individuos tengan presente la misma característica, “b” que el individuo *i* la presente y el *j* no; “c” que el individuo *j* la presente y el *i* no y “d” que ninguno de los dos presenten esta característica. A partir de esto se calcula el valor de *m* que es la suma entre *a* y *d* ($m = a + d$), es decir, la suma de donde estas coinciden tanto en presencia (*a*) como en ausencia (*d*); la letra *u* representa la suma de *b* y *c* ($u = b + c$), es decir la suma de las veces donde estos dos individuos no coinciden, y *n* es la suma donde estos coinciden y donde no coinciden ($n = m + u$). A partir de esto se tienen el índice que aparece en el cuadro 4 (Colín & López, 2011). En el cuadro 4, se presentan los coeficientes de similitud, con el modelo matemático correspondiente.

Cuadro 4. Coeficientes de similitud entre individuos, con su respectiva fórmula y autor

Nombre del coeficiente	Fórmula	Autor
Dice	$\frac{2a}{2a + b + c}$	Dice (1945), Nei y Li (1979)

Fuente: Colín & López, 2011.

a. Coeficientes binarios que excluyen doble ceros

Dentro de los índices o coeficientes descritos anteriormente se encuentra disponible un grupo que para la comparación de UBC's por ausencia o presencia de características, debe excluir la doble ausencia, este tipo de coeficientes es el más empleado en marcadores moleculares, debido principalmente a que una concordancia por doble ausencia de una banda puede no deberse a la misma razón, es decir no concuerda (Salazar, 2000).

A. Coeficiente de Dice

Este coeficiente fue desarrollado por Dice (1945) originalmente para para la comparación de nichos ecológicos, sin embargo Nei y Li (1979) demostraron, que era el índice más congruente para la clasificación mediante matrices binomiales de presencia/ausencia de bandas de huellas de ADN, obtenidas por separación electroforética de fragmentos amplificados de ADN, principalmente que una concordancia por doble ausencia de una banda puede no deberse a la misma razón, es decir no es una concordancia. (Colín & López, 2011).

Este coeficiente es el único que expresa la probabilidad de que un alelo en un individuo esté en otro, cuantifica como la relación de número de bandas coincidentes al número total de bandas, mientras más pequeña sea la distancia genética entre accesiones más altas será esa probabilidad (Moreno, 2001).

B. Métodos de aglomeración

Existen tanto métodos jerárquicos como no jerárquicos, siendo los primeros los más utilizados. Todos los métodos se rigen bajo el principio de unir las UBC's con el máximo parecido en la matriz de coeficientes de similitud para el caso de una caracterización molecular de individuos, a este grupo de dos UBC's se les conoce como nudo, posterior a eso se rehace la matriz de similitud para que tenga un solo valor con respecto a las demás UBC's.

Después de esto se puede formar otro nudo entre UBC's diferentes o unir otra UBC diferente a un nudo ya formado, la matriz se rehará hasta que quede una sola agrupación. En cuanto más pequeño sea el índice de similitud entre agrupaciones más diferentes son estas entre ellas. Los métodos que aparecen en el cuadro 5 son los más empleados (Colín & López, 2011).

Cuadro 5. Métodos de aglomeración más empleados en las caracterizaciones de germoplasma

Nombre del método	Forma de rehacer la matriz	Tipo de representación	Autor
Simple	Vecino más cercano (dato más próximo)	Jerárquicos y no jerárquicos	Sokal y Michener (1958)
Completo	Vecino más lejano (dato más lejano)	Jerárquicos y no jerárquicos	Sorensen (1948)
UPGMA	Media aritmética no ponderada	Jerárquicos y no jerárquicos	Sokal y Michener (1958)
WPGMA	Media aritmética ponderada	Jerárquicos y no jerárquicos	McQuitty (1966)
UPGMC	Centroide aritmético	Jerárquicos	Edwards y Cavalli-Sforza (1965)
WPGMC	Mediana aritmética	Jerárquicos	Gower (1967)
Flexible β	Mediante el cálculo empírico de un coeficiente de error β	Jerárquicos	Williams y Lambert (1966)
Neighbor joining	Mediante cálculos filogenéticos	Filogenéticos de ramas con diferente longitud	Saitou y Nei (1987)
Ward	Varianzas mínimas	Jerárquicos	Ward (1963)

Fuente: Colín & López, 2011.

a. Métodos basados en distancias.

Estos métodos primero calculan la distancia total entre todas las parejas de taxones, teniendo en cuenta las diferencias en sus secuencias y luego, calculan un árbol basado en esas distancias. Todos los organismos poseen características que permiten hallar

semejanza o desemejanza con otros organismos, esta comparación se puede lograr basada en la comparación de sus secuencias. La presencia, ausencia o diferencia de un par de bases en un lugar específico de la secuencia puede determinar sus diferencias con respecto a la característica expresada por dicha secuencia. El término distancia se refiere a una medida resultante de la comparación de las secuencias, con respecto a la frecuencia y orden de los pares en estas (Acero, 2010).

C. Método UPGMA

Este método asume que las especies son grupos por sí mismas, luego relaciona los dos grupos más cercanos basado en la matriz de distancias, recalcula la matriz de distancia y repite el proceso hasta que todas las especies estén conectadas a un único grupo. El método UPGMA realiza todos los cálculos con la matriz calculada hallando la distancia genética entre las OTUs (Acero, 2010).

Ventajas

- Es un método muy sencillo
- Al realizar los cálculos basados en la matriz de distancias y no directamente sobre las secuencias es mucho más rápido computacionalmente que los métodos basados en carácter, tiene una complejidad de $O(n^2)$.

Desventajas

- a) Las secuencias no son consideradas como tales, sino que se trabaja con la matriz de distancias lo que puede causar pérdida de información.

2.2.2 Marco referencial

2.2.2.1 Ubicación geográfica

El presente trabajo de investigación se realizará en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA, ubicado en el kilómetro 21.5 de la ruta hacia el Pacífico, Bárcena, Villa Nueva, (figura 18) con las siguientes coordenadas.

Latitud: 14°31'4.97"N

Longitud: 90°36'59.17"O



Fuente: Google Maps.

Figura 18. Fotografía satelital de la ubicación del estudio.

2.2.2.2 Condiciones del laboratorio

El laboratorio de biotecnología, de Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas fue inaugurado en el año 1990, este fue construido mediante un proyecto llamado PROGETAPS (Proyecto de Generación y Transferencia de Tecnología y Producción de Semillas), el cual fue ejecutado mediante un préstamo del BID (Banco Interamericano de Desarrollo).

El laboratorio fue equipado en un 90% por donaciones japonesas y por la OIEA (Organización Internacional de Energía Atómica), el otro 10% fue brindado por la propia institución y otras donaciones por entidades nacionales. El laboratorio fue diseñado principalmente, para la investigación, la micropropagación masiva de plantas, capacitación de personal y conservación de plantas tanto *in vitro* y *ex vitro*, todo esto en apoyo de los programas de mejoramiento genético de plantas

En el año 2001, se implementó la parte de biología molecular, donde se realizan distintos trabajos de esta disciplina, tales como la identificación de genes de interés para el desarrollo de nuevas variedades, también caracterizaciones de variedades actuales, con fines de registro, y determinar qué tan emparentadas están una de otra. Este laboratorio al igual que el de cultivo de tejidos fue equipado por las mismas instituciones en la misma proporción.

El laboratorio cuenta con un equipo de trabajo de 5 personas, dos profesionales que velan por el funcionamiento del mismo, tanto en la parte de biología molecular como en cultivo de tejidos y tres operarios, que desarrollan las distintas tareas que se llevan a cabo en el laboratorio, entre ellas la preparación de medios de cultivo, la esterilización del equipo, desinfección de explantes, siembra y transferencia de explantes, preparación de geles para electroforesis, extracción de ADN, carga de muestras amplificadas, limpieza de las instalaciones del laboratorio y realización de electroforesis.

El laboratorio cuenta con dos partes principales una parte de cultivo de tejidos, la cual se subdivide, en las áreas de lavado de cristalería, área de autoclaves, área de cámaras de flujo laminar, área de cuartos de crecimiento, área de bodega de cristalería y de reactivos, y el área de invernaderos.

El sub área de invernaderos del laboratorio de biotecnología del ICTA es el lugar donde se aclimatan las plantas provenientes de la propagación *in vitro* esta se subdivide en dos invernaderos, equipados con mesas de enraizamiento, las cuales están llenas de sustratos como fibra de coco, arena blanca, peat moss y tierra negra, para la formación de raíces por parte de las plántulas que han sido propagadas en el laboratorio.

El área de invernaderos cuenta con una persona designada para su mantenimiento y la realización de las labores diarias relacionadas con la aclimatación de las plantas, tales como la siembra y el traslado de las plántulas, establecimiento de mesas con alta humedad relativa, aplicación de productos plaguicidas para el control de hongos, insectos, ácaros, la fertilización por la vía foliar de las plántulas, y la cosecha de las plantas enraizadas.

El área de marcadores moleculares, que se divide en el área de extracción de ADN y realización de PCR y el área de electroforesis, en la primera se realizan todas las actividades relacionadas a la preparación de soluciones, macerado, centrifugado, almacenamiento, e incubación de muestras para la extracción de ADN.

En esta área se realiza la mezcla para el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa donde son mezclados los reactivos necesarios para esta entre ellos, los nucleótidos, la polimerasa, la solución buffer, la solución de cloruro de magnesio, el agua tridestilada, los cebadores y el ADN molde, todo esto que será sometido a los ciclos de temperatura, creados por el termociclador, para ser amplificada la región de ADN objetivo.

Complementario a lo anterior se encuentra el área de electroforesis donde son preparadas las soluciones madre para la preparación de los medios porosos por donde migran los productos de PCR mediante una corriente eléctrica, siendo el gel de agarosa para electroforesis horizontal y el gel de poliacrilamida para la electroforesis vertical; en esta área también son cargadas en los geles las muestras procedentes del proceso de reacción en cadena de la polimerasa y expuestas a la corriente eléctrica por medio de una fuente de poder, después de su migración estas son expuestas a un proceso de tinción para hacer visibles los fragmentos amplificados de ADN.

Como parte de la parte de investigación y capacitación de personal del laboratorio este abre sus puertas constantemente a estudiantes de licenciatura, con el fin de la realización de investigaciones de graduación, en los temas de interés para el Instituto dentro de estos temas se incluyen los relacionados con el cultivo de tejidos vegetales, como la creación de protocolos de propagación masiva de plantas, dosis óptimas para determinados procesos dentro del protocolo de propagación y métodos de conservación de plantas *in vitro*.

También se incluyen las relacionadas con marcadores moleculares como caracterizaciones moleculares de las variedades y accesiones pertenecientes al banco de germoplasma, selección asistida por marcadores moleculares para genes de interés de los programas de mejoramiento de plantas del ICTA.

La misión del laboratorio es apoyar a los programas de mejoramiento de plantas a través de las actividades que realiza a nivel nacional, utilizando la biotecnología moderna.

2.2.2.3 Equipo utilizado

En la presente investigación fue utilizado el equipo que se describe a continuación:

A. Micropipetas

Instrumento utilizado especialmente para medir pequeños volúmenes de líquidos con gran precisión y exactitud, estas pueden medir desde 0.5µl hasta 2ml dependiendo el rango de volumen de cada una. Estas utilizan puntas de distintos tamaños, para medir una solución, las puntas deben estar totalmente estériles con el fin de no contaminar las soluciones. Estas fueron utilizadas para medir los distintos volúmenes de los reactivos a utilizar, así como también de ADN en volúmenes muy pequeños. Las micropipetas utilizadas para la realización de la presente investigación son de marca Eppendorf© y modelo *Research Plus*©

B. Autoclave

Aparato empleado para la esterilización de instrumentos a ser empleados en el laboratorio, con el fin de evitar posibles contaminaciones a partir de hongos, bacterias y otros patógenos, este aparato funciona a partir de temperatura y presión de vapor, eliminando así cualquier patógeno de la superficie de los instrumentos, esterilizándolos y dejándolos aptos para su empleo en el laboratorio. La autoclave en esta investigación fue utilizada para esterilizar las puntas de las micropipetas. La autoclave empleada es una Market Forge© Sterilmatic©

C. Puntas para micropipetas

Las puntas para micropipetas son piezas de plástico desechables, que son empleadas para medir pequeños volúmenes de cada uno de los líquidos empleados en el laboratorio, estas se desechan para evitar contaminaciones en los líquidos, sus volúmenes pueden variar desde 10µl hasta 1ml, en la investigación estas fueron utilizadas para medir volúmenes de los distintos líquidos empleados.

D. Centrifuga

Aparato empleado para hacer girar las muestras a grandes revoluciones, bajo condiciones controladas, esto se hace con el fin de separar soluciones, o sedimentar elementos de una solución, siempre con fines de separación, la centrifuga fue utilizada para el proceso de extracción de ADN, para separar por densidad los componentes del tejido vegetal, la utilizada fue una centrifuga Eppendorf© Centrifuge 5430©.

E. Baño María

Es un equipo utilizado para el calentamiento de soluciones, de manera indirecta, debido a que este calienta agua mediante una resistencia, y las muestras son introducidas en el agua, siendo calentadas por esta y no por la resistencia directamente, es empleado en el laboratorio al momento de realizar la extracción de ADN, con el fin de separar los distintos componentes del tejido vegetal, el aparato empleado fue un PRECISION© 280 series.

F. Placas para PCR

Son objetos de plástico, los cuales consisten en una placa con 96 pozos, en cada uno de estos pozos, ocurre una reacción de PCR, es decir que en estos son colocados todos los reactivos necesarios para la reacción, en la investigación fueron utilizados para realizar la amplificación de los segmentos de ADN, las que fueron utilizadas son de marca Applied Biosystems©

G. Termociclador

Es un aparato empleado para la amplificación de fragmentos de ADN, este cumple la función de exponer las muestras a cambios de temperatura que van desde los 4 °C hasta

los 94 °C, con el fin de desnaturalizar, hibridar, y elongar el ADN, llevando a cabo el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa, este fue utilizado para amplificar los diferentes marcadores del tipo microsatélites en las 6 variedades de frijol, con el fin de su caracterización, este es un modelo Veritti© de la marca Applied Biosystems©.

H. Cámara de electroforesis vertical

Esta es empleada con el fin de separar los productos de la reacción en cadena de la polimerasa, según su carga y su peso molecular, esta funciona con carga eléctrica, una positiva y una negativa, es vertical porque emplea exclusivamente geles de poliacrilamida, los cuales son el medio poroso donde los componentes son separados, además esta utiliza una sustancia amortiguadora, donde la carga eléctrica viaja arrastrando así los productos a separar, esta fue utilizada para separar las diferentes bandas producidas por los microsatélites en las seis variedades de frijol caracterizadas, la cámara utilizada fue una Fisher Scientific© FB-VE16-1©

I. Fuente de poder

Es un aparato el cual supe de carga eléctrica tanto positiva como negativa, a la cámara de electroforesis, mediante cables, este aparato genera la corriente eléctrica, es capaz de programarse, para un tiempo y voltaje determinado por el usuario, fue empleada para suplir de corriente a la cámara de electroforesis vertical, descrita con anterioridad, la marca y el modelo de esta son Fisher Scientific© FB1000©

J. Bandejas

Son bandejas de metal, empleadas para realizar la tinción de nitrato de plata, a los geles de poliacrilamida, luego de haber sido separados los fragmentos por el proceso de electroforesis

2.2.2.4 El frijol en Guatemala

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes en Guatemala, que, junto al maíz y arroz, constituyen la dieta básica de la mayoría de guatemaltecos. El promedio de consumo en Guatemala es de alrededor de 20 kg/año/persona.

El frijol suple proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (especialmente hierro, fósforo, magnesio, manganeso, zinc, cobre y calcio). Las proteínas del frijol son ricas en el aminoácido lisina, que en el maíz (*Zea mays* L.) es deficiente, por lo que los dos alimentos se complementan nutricionalmente muy bien para tener una dieta de proteínas balanceada.

El frijol es fuente importante de proteínas en la dieta diaria del guatemalteco, por lo que se le ha llamado “la carne de los pobres”. El frijol, nutritivamente, juega un rol muy importante en la dieta de los no privilegiados. El frijol provee de un 10 a 20% de los requerimientos nutritivos de una persona adulta. El frijol es un cultivo típico de pequeños agricultores de subsistencia, a menudo sembrado en pendientes de baja fertilidad (Sagastume *et al.*, 2003).

El cultivo de frijol en Guatemala, ha sido cultivado básicamente para autoconsumo, constituyendo la principal fuente de proteínas en el área rural. Esta condición es la que determina las características actuales del sector, en donde de acuerdo a la Encuesta Agropecuaria del MAGA, una alta proporción de la producción (53.42%), es realizada en unidades productivas menores de siete hectáreas (86.59% de las unidades productivas), que equivale al 66% del área cultivada, lo que significa una baja productividad por unidad de área.

Los niveles de consumo varían de acuerdo con el estrato económico de los consumidores y su localización geográfica, de esta cuenta se tiene que en el área rural y estratos con bajo nivel de ingresos son los que consumen mayor cantidad de frijol por día (Masaya *et al.*, 1984).

2.2.2.5 Variedades utilizadas

Las variedades utilizadas en el presente estudio fueron las siguientes:

- A. ICTA Altense
- B. ICTA Superchiva
- C. ICTA Hunapú
- D. ICTA Ligero
- E. ICTA Petén
- F. ICTA Sayaxché

A. ICTA Altense

Es una variedad de frijol negro, cuyo hábito de crecimiento es de tipo indeterminado arbustivo, tolerante a *Ascochyta*, antracnosis, roya, y picudo de la vaina. El fruto es una vaina de color crema con 6 granos. Se adapta bien a altitudes entre 1600 y 2300 msnm. Su ciclo de cosecha es de 120 DDS con un rendimiento de 2500 kg/ha, en el cuadro 6 se detalla su linaje.

Cuadro 6. Linaje de la variedad ICTA Altense de frijol negro.

AÑO	GENEALOGÍA	APORTACIÓN
1980	A-230 X Guate 192	PLANTA ERECTA TOLERANCIA A ROYA, ANTRACNOSIS Y ASCHOCHYTA
1983	C-88 (Cruza simple) X A-175	TOLERANCIA A PICUDO DE LA VAINA
1984	160 (Cruza simple)	
1989	CH 89-10 (selección)	
	ICTA ALTENSE (variedad)	

Fuente: ICTA, 1996.

B. ICTA Superchiva

Es una variedad de vainas moradas y grano negro, se alcanza la cosecha 120 a 135 DDS, su crecimiento es de tipo arbustivo indeterminado, produce entre 15 a 20 vainas por planta, con 5 a 6 semillas, es tolerante a antracnosis y moderadamente a la roya. Su rendimiento es de 25 qq/mz, se a 1,800 m a 2,400 m s.n.m., es una variedad biofortificada. Presenta alto contenido de Hierro y Zinc.

C. ICTA Hunapú.

Es una variedad de frijol negro, cuyo hábito de crecimiento es de tipo indeterminado arbustivo, tolerante a Ascochyta, antracnosis, roya. El fruto es una vaina color morado con 6 granos. Se adapta bien a altitudes entre 1,500 m y 2,300 m s.n.m. Su ciclo de cosecha es de 120 días con un rendimiento de 2,500 kg/ha, en el cuadro 7 se detalla su linaje.

Cuadro 7. Linaje de la variedad de frijol negro ICTA Hunapú.

AÑO	GENEALOGÍA	APORTE
1980	NEGRO PACOC X A 216 = C 132 (cruza simple)	Precocidad Tolerancia a Ascochyta, Roya y Antracnosis.
1988	C 132-4-CM-4-CM (población)	Arquitectura
1990	ICTA HUNAPÚ	

Fuente: ICTA, 1996

D. ICTA Ligero

Es una variedad de frijol negro que se adapta bien a alturas hasta de 1,200 m s.n.m., es de hábito de crecimiento indeterminado arbustivo, crece una altura de 60 cm, posee flores color lila, vainas color crema con 5 semillas por vaina, es una variedad precoz, que se cosecha 70 DDS si el clima es seco. Esta variedad es resistente al virus del mosaico dorado, y tolerante a bacteriosis, Roya y Antracnosis. Su rendimiento es de 35 qq/mz (Gillespie, 1999).

E. ICTA Petén.

En el cuadro 8 se detalla toda la información sobre esta variedad.

Cuadro 8. Características de la variedad ICTA Petén

Altura de la planta.	50 cm en promedio	
Crecimiento	Tipo II: hábito de crecimiento indeterminado arbustivo	
Color de la vaina	Crema con pequeñas tonalidades jaspeadas	
Promedio de vainas / planta	25 vainas	
Número de granos / vaina	5 granos	
Días a floración	33 35 días después de la siembra (DDS)	
Duración de la floración	20 días	
Ciclo del cultivo	65 días a madurez fisiológica	
Rendimiento promedio	35 qq por manzana	
Días a cosecha	78 DDS	
Color de flor	Morado	
Forma del grano	Ovoide	
Color del grano	Negro opaco	
Distancias de siembra	40 cm entre surco y 30 cm entre posturas, depositando 3 semillas en cada una de ellas	

Fuente: ICTA, 2010

F. ICTA Sayaxché.

En el cuadro 9 se detalla toda la información sobre esta variedad.

Cuadro 9. Características de la variedad ICTA Sayaxché

Altura de la planta.	70 cm en promedio	
Crecimiento	Tipo II: hábito de crecimiento indeterminado arbustivo	
Color de la vaina	Crema con pequeñas tonalidades jaspeadas	
Promedio de vainas / planta	28 vainas	
Número de granos / vaina	5 granos	
Días a floración	33 a 42 días después de la siembra (DDS)	
Duración de la floración	25 días	
Ciclo del cultivo	80 días a madurez fisiológica	
Rendimiento promedio	40 qq por manzana	
Días a cosecha	88 DDS	
Color de flor	Morado	
Forma del grano	Ovoide	
Color del grano	Negro opaco	
Distancias de siembra	50 cm entre surco y 30 cm entre posturas, depositando 3 semillas en cada una de ellas	

Fuente: ICTA, 2010.

2.2.2.6 Antecedentes

Dadas las ventajas que los marcadores microsatélites poseen por su naturaleza, muchos estudios se han hecho en genomas de mamíferos y plantas y su información ha sido muy útil para saturar mapas de ligamiento. El primer anclaje de microsatélites en un mapa de ligamiento de frijol común fue realizado por Yu *et al.* (2000). Los microsatélites que se identificaron en este trabajo han sido muy utilizados en estudios de diversidad genética y para seguir saturando el mapa de ligamiento del frijol.

Gaitán *et al.* (2002) realizó un estudio de bibliotecas genómicas para identificar microsatélites en el genoma de frijol. Toda esta información fue utilizada por Blair *et al.* (2003) para saturar el mapa original de frijol con muchos más microsatélites, esta vez buscándolos en la base de datos genética (Genbank) y, desde entonces, los microsatélites son muy utilizados en estudios de diversidad genética (Díaz & Blair, 2006), discriminación entre razas de frijol (Blair, Diaz, Hidalgo, Diaz, & Duque, 2007) y selección asistida con marcadores para una gran variedad de enfermedades del frijol (Miklas, 2008).

Muchos microsatélites han sido desarrollados a partir del genoma del frijol y algunos como BM160 y BM201 (Gaitán-Solís *et al.*, 2002) son capaces de discriminar entre especies de *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L. y *Phaseolus polyanthus* Greenman. Un análisis de diversidad completo y muy confiable se obtiene de amplificar por lo menos 30 microsatélites con diferentes técnicas de detección, por ejemplo fluorescencia, que es más confiable que la detección con tinción en plata.

Los marcadores moleculares han demostrado ser una herramienta muy útil para predecir las características de una población muy temprano en su desarrollo. La selección asistida por marcadores requiere de someter material vegetal a los siguientes procedimientos: extracción de ADN, cuantificación de ADN, amplificación de marcadores moleculares por PCR, visualización de productos de PCR y diagnóstico molecular.

Es importante adaptar las condiciones reportadas en estudios previos para cada uno de los ambientes nuevos donde se desarrollarán, especialmente cuando se tiene una población que no se ha estudiado antes. Al hacer esta adaptación se garantiza que se optimizará la eficiencia de la técnica general (MENA)

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente, mediante el empleo de marcadores del tipo microsatélites (SSR), variedades de frijol tanto nuevas como liberadas previamente por el ICTA

2.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar distancias genéticas entre las variedades de frijol para definir similitudes y diferencias genéticas entre genotipos con fines de mejoramiento genético.
2. Definir una huella digital genética para cada variedad, según un patrón de bandas generadas por los microsatélites.

2.4 Hipótesis

Los marcadores moleculares del tipo microsatélites utilizados serán capaces de identificar regiones polimórficas dentro de los loci analizados en las variedades de frijol desarrollada por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola.

2.5 Metodología

2.5.1 Metodología experimental

A continuación se describe la metodología experimental, y todos los procedimientos que fueron realizados en la elaboración de esta investigación, incluyendo el análisis estadístico.

2.5.1.1 Manejo del experimento

A. Asignación de las variedades.

Se utilizaron 6 variedades de frijol liberadas por el instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola, cultivadas frecuentemente, son un tipo de frijol arbustivo, estas fueron escogidas debido a que son las de mayor producción a nivel nacional, para además tener un registro molecular basado en un patrón de bandas producto de electroforesis, esto para futuros programas de mejoramiento. Las variedades fueron:

1. ICTA Altense
2. ICTA Superchiva
3. ICTA Hunapú
4. ICTA Ligero
5. ICTA Petén
6. ICTA Sayaxché

B. Selección de los marcadores de tipo microsatélites.

Los marcadores empleados para la realización de la caracterización molecular fueron seleccionados en base a varios criterios, el principal de estos fue, la disponibilidad de los cebadores, en el laboratorio de Biotecnología del ICTA, investigaciones previas sobre el desarrollo de marcadores moleculares del tipo microsatélites en frijol, y caracterizaciones moleculares de colecciones de frijol realizadas con estos previamente, se seleccionaron 15 marcadores moleculares del tipo microsatélites según índices como el PIC (Contenido de información polimórfica), el número de bandas polimórficas generadas por el marcador, y el índice de heterocigosis. Los marcadores seleccionados se detallan en el cuadro 10.

Cuadro 10. Microsatélites empleados en la caracterización molecular

No.	Microsatélite	Cromosoma	Tamaño esperado (Pares de bases)	Tm* (°C)	Secuencias de los cebadores utilizados	Fuente bibliográfica
1	BMd-19	2	154	47	F: GCC AAC CAC ATT CTT CCC TAC R: GGA AGC GAG GCA GTT ATC TTT	(Blair <i>et al.</i> , 2003)
2	PVBR107	1	150	53	F: CCC CTT TCT CAC CAC TTC AG R: ACC AAA AAC GGT GCT CAA AC	(Grisi <i>et al.</i> , 2007)
3	BMd-7	2	166	47	F: GGA TAT GGT GGT GAT CAA GGA R: CAT ACC CAA TGC CAT GTT CTC	(Blair <i>et al.</i> , 2003)
4	BMd-2	2	106	47	F: AGC GAC AGC AAG AGA ACC TC R: CAA CAA ACG GTG ATT GAC CA	(Blair <i>et al.</i> , 2003)
5	BMd-1	3	165	47	F: CAA ATC GCA ACA CCT CAC AA R: GTC GGA GCC ATC ATC TGT TT	(Blair <i>et al.</i> , 2003)
6	BMd-17	2	116	47	F: GTT AGA TCC CGC CCA ATA GTC R: AGA TAG GAA GGG CGT GGT TT	(Blair <i>et al.</i> , 2003)
7	GATS91	2	229	53	F: GAG TGC GGA AGC GAG TAG AG R: TCC GTG TTC CTC TGT CTG TG	(Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2002)
8	PVBR31	1	204	56	F: AAT GGC AGG TCA GTG AAA CA R: ATG ACC ACG CAG TGA CAG AG	(Grisi <i>et al.</i> , 2007)
9	BM172	3	107	50	F: CTG TAG CTC AAA CAG GGC ACT R: GCA ATA CCG CCA TGA GAG AT	(Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2002)
10	PV-GCCACC001	2	95	48	F: CGT TAG ATC CCG CCC AAT AGT R: CCG TCC AGG AAG AGC GAG C	(Yu <i>et al.</i> , 2000)
11	BM152	2	127	50	F: AAG AGG AGG TCG AAA CCT TAA ATC G R: CCG GGA CTT GCC AGA AGA AC	(Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2002)
12	BM181	3	192	50	F: ATG CTG CGA GTT AAT GAT CG R: TGA GGA GCA AAC AGA TGA GG	(Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2002)
13	BM201	7	102	50	F: TGG TGC TAC AGA CTT GAT GG R: TGT CAC CTC TCT CCT CCA AT	(Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2002)
14	BMd-36	3	164	47	F: CAT AAC ATC GAA GCC TCA CAG T R: ACG TGC GTA CGA ATA CTC AGT C	(Blair <i>et al.</i> , 2003)
15	J04555	4	152	48	F: CCA ACC ACA TTC TTC CCT ACG TC R: GCG AGG CAG TTA TCT TTA GGA GTG	(Yu <i>et al.</i> , 2000)

Tm: Temperatura de hibridación por sus siglas en inglés (Melting Temperature)

Fuente: elaboración propia, 2017.

C. Siembra y germinación de los materiales.

Quince semillas de las variedades ICTA Altense, ICTA Superchiva, ICTA Hunapú, ICTA Lígero, ICTA Péten e ICTA Sayaxché fueron sembradas en arena en el invernadero del laboratorio de Biotecnología en las oficinas centrales, para su germinación bajo condiciones controladas (figuras 19 y 20).



Figura 19. Líneas de frijol sembradas en invernadero



Figura 20. Líneas de frijol sembradas en invernadero en etapa de crecimiento vegetativo

D. Colección de muestras de tejidos

Las muestras de tejidos fueron recolectadas de cada uno de los materiales mencionados y sembrados anteriormente, de estas se seleccionaron tres plantas al azar, de donde se cortó una de las primeras hojas trifoliadas (200 mg aprox.), las muestras fueron trasladadas directamente al laboratorio, en tubos de 1.5 ml de microcentrífuga marca Eppendorf® e identificadas para la posterior extracción de ADN (figura 21).



Figura 21. Momento de la colección de tejido vegetal.

E. Extracción del ADN.

Las muestras fueron maceradas con pistilos dentro de tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marca Eppendorf® o utilizando morteros con la solución de buffer de extracción del kit, los componentes de este se ilustran en la figura 22. La solución obtenida fue sometida al protocolo de extracción propuesto por Biotecon Diagnostics© detallado en el cuadro 11. Todos los volúmenes fueron medidos utilizando micropipetas modelo Research Plus® de la marca Eppendorf® y puntas para micropipetas de la misma marca.

Cuadro 11. Protocolo de extracción de ADN, propuesto por Biatecon Diagnostics©

PASO	ACCIÓN	VOLUMEN	TIEMPO y rpm ó TIEMPO y TEMPERATURA
1	Poner 200 mg de muestra homogenizada en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Agregar el Buffer de Extracción (bote 1, tapón rojo).	1 ml	
2	Vortex.		30 s
3	Incubar (NOTA: mezclar 2 a 3 veces durante la incubación invirtiendo el tubo. Si la matriz absorbe el Buffer de Extracción, agregar Buffer de Extracción adicional).		80 °C durante 30 min
4	Centrifugar.		10 min a 12,000 rpm
5	Agregar el Buffer de Unión (bote 2, tapón verde) a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml.	400 µl	
6	Transferir el sobrenadante obtenido en el paso 3 a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml con Buffer de Unión. Mezclar suavemente pero a fondo pipeteando hacia arriba y hacia abajo.	600 µl	
7	Agregar la solución de trabajo de Proteinasa K (100 mg por cada 5 ml de agua tridestilada).	80 µl	
8	Mezclar suavemente pero a fondo pipeteando hacia arriba y hacia abajo.		
9	Incubar.		72 °C durante 10 min
10	Agregar isopropanol y mezclar bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo.	200 µl	
11	Pipetear la mezcla dentro de la parte superior del reservorio del ensamblaje combinado de TUBO-FILTRO-TUBO COLECTOR.	650 µl	
12	Centrifugar.		1 min a 5,000 rpm
13	Descartar el líquido y el TUBO COLECTOR. Poner el TUBO FILTRO en un nuevo TUBO COLECTOR.		
14	Agregar la mezcla remanente al mismo TUBO FILTRO y centrifugar.		1 min a 5,000 rpm
15	Descartar el líquido y el TUBO COLECTOR. Poner el TUBO FILTRO en un nuevo TUBO COLECTOR.		
16	Agregar la solución de trabajo del Buffer de Lavado (bote 3, tapón azul) al reservorio superior.	450 µl	
17	Centrifugar.		1 min a 5,000 rpm
18	Descartar el líquido y reusar el TUBO COLECTOR.		
19	Agregar solución de trabajo del Buffer de Lavado (bote 3, tapón azul) al reservorio superior.	450 µl	
20	Centrifugar.		1 min a 5,000 rpm
21	Descartar el líquido y reusar el TUBO COLECTOR.		
22	Centrifugar para remover residuos del Buffer de Lavado.		10 s a 13,000 rpm
23	Insertar el TUBO FILTRO en un tubo de reacción limpio de 1.5 ml.		
24	Calentar el Buffer de Elución (bote 4, tapón sin color).		70 °C
25	Agregar el Buffer de Elución precalentado.	100 µl	
26	Incubar.		Entre 15 °C y 25 °C durante 5 min
27	Centrifugar.		1 min a 5,000 rpm
28	El tubo de microcentrifuga ahora contiene el ADN diluido.		
29	Usar directamente el ADN diluido o almacenar la muestra de 2 °C a 8 °C ó -15 °C a -25 °C para análisis posterior.		

Fuente: Biatecon Diagnostics©, 2015.



Figura 22. Kit de extracción de ADN

F. Cuantificación del ADN.

Se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro Bio-Rad SmartSpec3000 con un factor de conversión $A_{260} \text{ nm } 1.0 = 50.0 \mu\text{g/ml}$. La calidad del ADN se determinó a partir de la razón A_{260}/A_{280} . El ADN fue diluido a $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ para las siguientes amplificaciones.

G. Amplificación mediante PCR.

En todas las muestras se amplificaron secuencias microsatélites (SSR) representativas de todo el genoma del frijol. Estos marcadores fueron amplificados por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) punto final (Mullis *et al.*, 1986) en placas de 96 pozos de la marca Applied Biosystems® en un termociclador Marca Applied Biosystems® Modelo Veriti® (figura 23) . Los microsatélites fueron sintetizados por la empresa Eurofins®.

El programa de amplificación consistió en los pasos:

1. Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min.
2. 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s.
3. 30 ciclos de hibridación a la temperatura (T) indicada en el cuadro 10 para cada uno de los marcadores por 1 min.
4. 30 ciclos elongación a 72 °C por 1 min.
5. Elongación final a 72 °C por 5 min.

Cada uno de los pozos utilizados en la placa, contenían una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µl que contenían (Los elementos empleados por pozo, contenían un colorante, que cumplía la función de buffer de carga para la futura visualización):

- 100 ng de ADN genómico
- 1X buffer PCR
- 2.5 mM de MgCl₂
- 400 µM de cada dNTP
- 1 µM de cada partidor (forward y reverse)
- 1 unidad de Taq polimerasa.



Figura 23. Termociclador empleado en el proceso de PCR

Los reactivos empleados para la reacción en cadena de la polimerasa a excepción de los cebadores el ADN base y el agua tridestilada, eran parte del kit GoTaq Green Master Mix para PCR de la marca Promega®

H. Electroforesis

a) Preparación de la gel de poliacrilamida.

Los productos de la amplificación de la PCR se separaron en geles de poliacrilamida (Weber & Osborn, 1969) al 8 y 16 por ciento. Los fragmentos fueron separados en una cámara de electroforesis vertical Fisher Scientific® FB-VE16-1© (figura 24) con un tamaño de 16 cm x 14 cm y espaciadores de 1.5 mm y una fuente de poder de la marca Fisher Scientific® modelo FB1000 ©.

El propósito de esta actividad fue separar por tamaño los fragmentos.

El procedimiento a seguir fue:

- Ambos vidrios fueron lavados con agua destilada y secados.
- Ambos vidrios fueron lavados con isopropanol y secados.
- Ambos vidrios fueron lavados dos veces con alcohol etílico al 95 % y secados.
- El sistema fue armado.
- Se colocaron los separadores de 1.5 mm sobre el vidrio trasero.
- Se colocaron encima el vidrio delantero y se selló el sistema.

b) Preparación del gel de poliacrilamida (16x14cm) y electroforesis.

Para preparar el gel de poliacrilamida en diferentes porcentajes se utilizaron los siguientes ingredientes se presentan en el cuadro 12 para preparar 30 ml de solución

Cuadro 12. Cantidades e ingredientes empleados para la elaboración de un gel de poliacrilamida.

Porcentaje del gel	Solución al 40% de Poliacrilamida (ml)	Agua destilada (ml)	TBE 5X (ml)	APS* 10 % (ml)	TEMED** (ml)
8	6	18	6	0.5	0.025
16	12	12	6	0.5	0.025

*Persulfato de amonio, por sus siglas en inglés (Amonium PerSulphate)

** Abreviación para Tetrametiletilendiamina

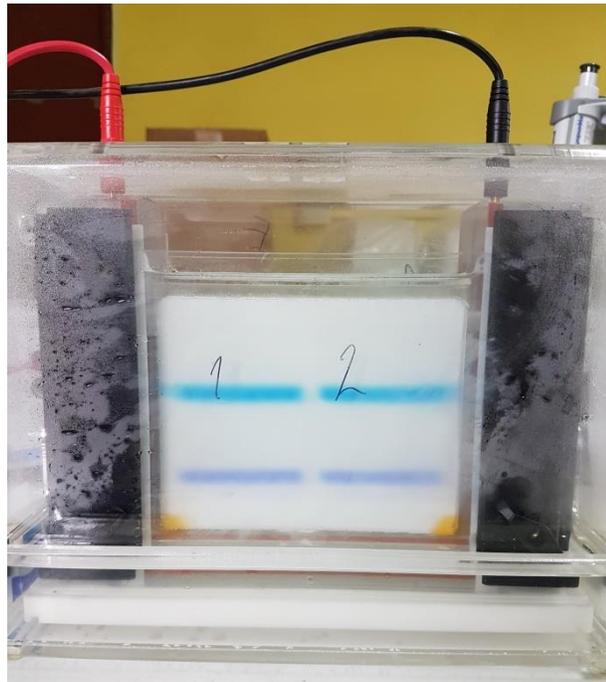
Fuente: UC DAVIS, 2003

La metodología para preparar un gel al 8 % fue la siguiente:

1. Se tomó tubo de 40 ml
2. Se añadieron 6 ml de solución al 40 % de poliacrilamida
3. Se añadieron 18 ml de agua destilada.
4. Se añadieron 6 ml de TBE 5X
5. Se añadieron 0.5 ml de APS al 10 % y 0.025 ml de TEMED. (Estos deben agregarse justo antes de verter la solución en los vidrios, puesto que son catalizadores de la polimerización de la poliacrilamida).
6. La solución fue agitada.
7. La solución fue cargada cuidadosamente en el sistema de electroforesis vertical, evitando la aparición de burbujas.
8. Se colocaron encima del gel peines con 15 pozos.
9. Se esperaron 15 min para que el gel polimerice.
10. Los peines fueron retirados cuidadosamente del gel, evitando romperlo o dañarlo.
11. Se agregó buffer TBE 1X al sistema de electroforesis vertical hasta que el gel se encontró sumergido por completo.

12. El producto de la amplificación por el proceso de PCR fue cargado en los pozos del gel, tomando 5 μ l de este por pozo.
13. Se cargaron las escaleras de peso molecular, en el caso de la caracterización fueron añadidas escaleras de 50 bp.
14. El sistema fue conectado a una fuente de poder a 100 voltios constantes durante 5 horas para separar mediante carga eléctrica por tamaño los fragmentos de ADN amplificados.
15. La fuente de poder fue desconectada y el gel retirado del sistema.

En la figura 24, se presenta una fotografía del equipo de electroforesis vertical, empleado para la separación de fragmentos de ADN.



Fuente: Elaboración propia, 2017.

Figura 24. Sistema de electroforesis vertical empleado para la separación de fragmentos de ADN

Los reactivos empleados en la elaboración de un gel de poliacrilamida son de la marca Sigma Aldrich®

G. Visualización de los productos amplificados

Para detectar las bandas de ADN, de diferentes tamaños, se procedió a teñir el gel de poliacrilamida. Para poder visualizar las bandas se utilizó la técnica de tinción con nitrato de plata (Bassam, Caetano-Anollés, & Gresshoff, 1991) al 0.2 %, cuyo procedimiento se resume en el cuadro 13.

Cuadro 13 Procedimiento para tinción de plata de fragmentos de ADN separados en geles de poliacrilamida.

PASO	SOLUCIÓN	TIEMPO
1	Fijadora	5 min
2	Tinción	5 min
3	H ₂ O	10 s
4	Reveladora	5 min a 15 min
5	H ₂ O	10 s
6	Detención	3 min
7	H ₂ O	2 min (2 veces)

Fuente: Hoisington, 1994.

El gel no permaneció mucho tiempo en la solución reveladora, únicamente hasta que las bandas fueron vistas con facilidad, todo esto para evitar el fondo en el gel, es decir que el gel también fuera teñido, evitando la visualización de las bandas.

La composición de las soluciones utilizadas en la tinción se detalla a continuación:

a) Preparación de las soluciones para la tinción

Las soluciones empleadas en la tinción previamente descrita, fueron las siguientes:

- Fijadora: etanol al 10 % y 0.5 ml / 100 ml de ácido acético.
- Tinción: nitrato de plata (0.2 %).
- Reveladora: NaOH al 3 % y 0.5 ml/100 ml de formaldehído (36 % - 38 %).
- Detención: ácido acético al 10 % ó Na₂EDTA.2H₂O al 1.5 %.

En todos los geles se incluye una escalera de peso molecular de 50 pares de bases (pb). Los reactivos empleados en la elaboración de las soluciones para la tinción son de la marca Sigma Aldrich®.

b) Registro de los fragmentos de ADN amplificados.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron registrados, mediante el escaneo de los geles expuestos a la tinción, esto con el fin de poder analizar los geles a futuro.

H. Análisis de datos

A partir de los patrones de bandas visualizados en los geles se codificó la información alélica en una matriz de ausencia y presencia, en una hoja Excel, la cual fue utilizada para hacer el análisis de conglomerados y calcular el índice de similaridad de en InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014). Se creó una matriz de distancias genéticas con el método de aglomeración de UPGMA (Sokal *et al.*, 1958) y el índice de similaridad de Dice (Dice, 1945), Se construyó así un dendrograma basado en los cálculos, con el fin de determinar distancias genéticas entre las variedades con fines de mejoramiento, Además, se construyó una huella genética para cada genotipo, según el patrón de bandas generadas por los microsatélites, se calculó el coeficiente de polimorfismo (PIC) para cada uno de los microsatelites.

2.6 Resultados y discusión

2.6.1 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de hojas de las variedades ICTA Altense, ICTA Super Chiva, ICTA Hunapú, ICTA Lígero, ICTA Petén e ICTA Sayaxché mediante el protocolo del kit de extracción de ADN de Biotecon Diagnostics© (cuadro 11) dando como resultado las siguientes concentraciones de ADN las cuales se presentan en el cuadro 14.

Cuadro 14. Razones A260 y A280 y concentraciones obtenidas en el proceso de extracción de ADN de las seis variedades de frijol evaluadas.

Variedad	A260 nm	A280 nm	A260/A280 nm	Concentración
ICTA Altense	1.798	0.768	2.34114583	1798.2791 µg/ml
ICTA Hunapú	1.833	0.786	2.33206107	1833.0410 µg/ml
ICTA Lígero	2.912	2.350	1.23914894	2912.2222 µg/ml
ICTA Petén	2.213	0.952	2.32457983	2213.2520 µg/ml
ICTA Sayaxché	1,622	0.679	2388.80707	1622.1870 µg/ml
ICTA Super Chiva	2.877	2.318	1.24115617	2876.5061 µg/ml

En la figura 25, se muestra el equipo utilizado para la extracción del ADN.



Figura 25. ADN extraído de las variedades de frijol

El cálculo de la concentración de ADN se realizó mediante la razón A_{260}/A_{280} , las cantidades presentadas en el cuadro 13 son más que óptimas para ser utilizadas en el PCR, debido a que la cantidad suficiente para esto es de $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ para alcanzar una concentración final por pozo de reacción de 100 ng , cantidad requerida protocolo de amplificación recomendado por el fabricante del kit (Promega, 2012). Con esta concentración los cebadores son capaces de amplificar los fragmentos de ADN en siguientes procesos de PCR.

Una porción del ADN obtenido fue diluido a la concentración de $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ y almacenado a una temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para su uso posterior en el proceso de PCR, el ADN restante se mantuvo a las concentraciones obtenidas, para posibles análisis futuros.

La utilización del kit de extracción de ADN de Biotecon Diagnostics, reflejó el aislamiento de ADN de alto peso molecular a partir del tejido foliar del frijol, las concentraciones variaron desde 1622.1870 a $2912.2222 \mu\text{g}/\text{ml}$, siendo estas cantidades suficientes para ser empleadas en una amplificación vía PCR. El ADN obtenido fue amplificado y visualizado con bandas muy marcadas mediante la tinción con nitrato de plata, como muestra la figura 25, por ende se afirma que el ADN extraído cumple con una buena calidad para ser empleado en las técnicas llevadas a cabo.

Los valores obtenidos para A260nm, A280nm y la relación A260 entre A280nm (cuadro 14), las estimaciones de pureza no cumplieron con los criterios reportados por algunos autores (Reyes Martínez, 2014) que sugieren que la relación A260 entre A280nm debe ser mayor que 1.7 y menor a 2.0, sin embargo, prácticamente todos en los casos, las amplificaciones mediante PCR se pudieron llevar a cabo, obteniendo con los marcadores perfiles de amplificación, reproducibles y definidos.

2.6.2 Amplificación mediante PCR y visualización de microsatélites para caracterización molecular

Para medir la diversidad genética de 6 variedades de frijol liberadas por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) fueron sometidas al proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con 15 marcadores moleculares polimórficos del tipo microsatélites, (cuadro 10), las muestras de ADN de cada una de las variedades fueron sometidas al proceso de PCR, cada una con los 15 microsatélites, dando como resultado una secuencia de bandas para cada variedad por marcador empleado.

Las bandas fueron visualizadas en geles de poliacrilamida al 8 y 16% esto debido a que la concentración del gel, depende del peso molecular de las muestras que fueron previamente amplificadas, todo eso se debe a que a una mayor concentración, los poros del gel serán de menor tamaño y a menor concentración todo lo contrario (Dunn, 2014).

En cuanto los poros de la matriz a ser empleada en la electroforesis, en este caso un gel de poliacrilamida, sean más pequeños, el peso molecular de las muestras a ser separadas en dicha matriz debe ser también de un bajo tamaño, con el fin de evitar fricción entre el ADN y los poros de la matriz, mientras que los fragmentos de mayor tamaño migrarán por la matriz con mayor dificultad debido a fricción producida, esto para acelerar el proceso de separación de los fragmentos amplificados (Dunn, 2014) .

Las muestras amplificadas fueron cargadas en los geles de poliacrilamida y expuestas a una corriente eléctrica de 100 voltios durante 5 horas, esto con el fin de separar los fragmentos amplificadas según su peso molecular a través de una matriz porosa, en este caso el gel de poliacrilamida, al ser separados los fragmentos.

Los geles fueron expuestos a un proceso de tinción con nitrato de plata, descrito en la metodología de la presente investigación, esto debido a que esta técnica suele diferenciar de mejor manera pequeñas diferencias de peso molecular entre fragmentos, es decir posee mayor sensibilidad al momento de realizar la tinción por ende es mejor para la visualización, de fragmentos provenientes de una amplificación con marcadores del tipo microsatélites, además esta tiñe con mayor intensidad que otras técnicas como el empleo de bromuro de etidio.

En la figura 26 se presenta el gel en donde fueron cargadas muestras amplificadas con el marcador pv.gccacc001, mostrando gran calidad de bandas visualizadas, demostrando así la eficiencia del método de amplificación y tinción empleados en el proceso.

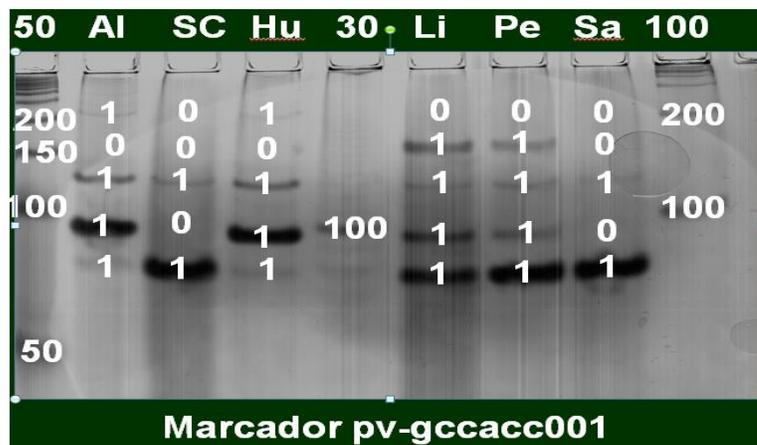


Figura 26. Gel de poliacrilamida al 8 %, en este se muestran las bandas amplificadas por el marcador molecular pv.gccacc001 para 6 variedades de frijol.

Las bandas de cada gel se digitalizaron utilizando un escáner, esto para el registro de las bandas, de cada variedad y marcador utilizado, a partir de estas fotografías de los geles, fueron construidas matrices de ausencia y presencia, “1” para presencia y “0” para ausencia, de manera de que los datos quedasen ordenados de la manera que se presenta en el cuadro 15.

Cuadro 15. Matriz de datos binarios, para análisis clúster de diversidad genética, en las columnas se puede apreciar los fragmentos amplificados, mientras que en las filas, las variedades sometidas al análisis.

Variedad	PVGCCACC001-A	PVGCCACC001-B	PVGCCACC001-C	PVGCCACC001-D	PVGCCACC001-E
ICTA ALTENSE	1	0	1	1	1
ICTA SUPERCHIVA	0	0	1	0	1
ICTA HUNAPU	1	0	1	1	1
ICTA LIGERO	0	1	1	1	1
ICTA PETEN	0	1	1	1	1
ICTA SAYAXCHE	0	0	1	0	1

1 = Presencia

2 = Ausencia

2.6.3 Estadística descriptiva para los datos de marcadores moleculares

Las matrices como la del cuadro 15, fueron sometidas a un análisis de datos moleculares, la estadística descriptiva de los 15 pares de marcadores microsatélites, se presenta en el cuadro 16.

Cuadro 16. Estadística descriptiva para los datos de marcadores moleculares

RESUMEN	CANTIDAD DE CASOS
Muestras	6
Muestras duplicadas	0
Bandas (número)	45
Patrón bandas duplicadas	32
Bandas monomórficas	4
Bandas polimórficas (%)	91.11
Marcadores	15

Estos marcadores amplificaron un total de 45 bandas para las 6 variedades de frijol común, dentro de las cuales un 91.1 % fueron polimórficas aportando así un gran porcentaje de información genética útil en la discriminación de las variedades. No se obtuvieron muestras duplicadas al momento de realizar el análisis, revelando que ninguna de las variedades son iguales.

El número de bandas monomórficas indica que bandas estuvieron presentes en todos los genotipos, es decir aquellas características que todos comparten, estas fueron un total de 4 bandas, información útil para emparentar a los genotipos, en cuanto a las bandas duplicadas son aquellas bandas que su patrón se duplica en diferentes marcadores, las cuales dieron un total de 32 bandas duplicadas, lo que significa que el patrón de similitud entre las variedades se repite 32 veces, indicando que mantienen su parentesco con 32 bandas amplificadas. El número promedio de bandas amplificadas por marcador fue de 3, esto puede ser explicado debido al pequeño número de individuos sometidos al proceso.

2.6.3.1 Bandas polimórficas (BP)

Las bandas polimórficas son aquellas presentadas por un marcador molecular, en este caso del tipo microsatélite, cuando dos o más bandas son visualizadas, y estas son

correspondientes a diferentes individuos que fueron sometidos al proceso de PCR bajo el mismo marcador molecular, es decir es una banda que se visualiza en un individuo, más no en otro. Las bandas polimórficas tienen la función de discriminar entre individuos, es decir cada una de las bandas es un locus, aquellos individuos que comparten este locus estarán más emparentados, y aquellos que difieran en esta, estarán menos emparentados.

La presente investigación, presentó un total de 41 bandas polimórficas para todos los marcadores, el número de bandas generadas por cada cebador varió de 1 a 6 bandas, siendo la media 2.7 bandas polimórficas lo cual concuerda con los reportado por otros autores una media de 2.7 polimorfismos por microsatélites (Hanai, Santini, Camargo, Fungaro, Gepts, Tsai, & Vieira, 2010), 2.9 alelos por locus (Yu *et al.*, 1999) y 3.1 alelos polimórficos como media (Guerra-Sanz, 2004),

Otras investigaciones han reportado valores bastante altos en relación a los mencionados con anterioridad tal es el caso de los descritos por Gaitán-Solís *et al.* (2002) el cual reporta valores medios de 6 alelos por locus, al igual que Buso *et al.* (2006) el cual reportó valores de 7 alelos por locus, la diferencia tan grande en cuanto a la media de alelos amplificados por locus, que son más o menos cuatro alelos.

La diferencia puede ser explicada al origen de las secuencias de los microsatélites, mientras que los valores bajos se derivan de secuencias expresadas es decir son EST, o marcadores de secuencia expresada, comúnmente estas secuencias son asociadas a procesos biológicos básicos, y por lo tanto son más conservadas dentro de los individuos, en cambio los valores altos corresponden a secuencias anónimas no asociadas a ningún proceso, es decir aleatorias dentro del genoma, por ende son regiones poco conservadas incluso dentro de la misma especie.

Las bandas variaron entre 80 y 280 pares de bases, apareciendo en todas las amplificaciones los tamaños reportados por los autores desarrolladores de los cebadores (ver cuadro 10).

El marcador molecular que más bandas polimórficas amplificó fue el J0455, con 6 bandas en total, y el que menos amplificó fue el microsatélite BMd19 con una sola banda

polimórfica amplificada (Cuadro 16) infiriendo sobre esto que es el marcador con menor poder discriminante de todos aquellos empleados al momento de realizar la caracterización de los seis individuos, el 51.21% de los polimorfismos fue aportado por solo 5 marcadores que fueron J0455, BMd7, BMd36, PVBR107 Y GATS91 mostrándose así estos como los marcadores más polimórficos y que más información genética aportaron al análisis de conglomerados realizado.

2.6.3.2 Bandas monomórficas

Las bandas monomórficas son aquellas que son visualizadas en la totalidad de los individuos evaluados, estas representan una característica común entre los individuos, es decir son características iguales, por lo que disminuyen las distancias o aumentan las similitudes entre los individuos expuestos al proceso de amplificación mediante el uso de este marcador.

En el caso de la presente investigación, solo tres de los quince microsatélites amplificaron fragmentos monomórficos, los cuales fueron BMd-19, PVBR107, y PV-gccacc001, siendo el último el único en amplificar más de una banda monomórfica, lo cual indica que no todas las bandas amplificadas por estos marcadores, poseen el poder para discriminar entre los individuos, únicamente la capacidad de acortar las diferencias genéticas que existen entre los seis individuos evaluados, colocándolos así más emparentados entre sí, denotando que poseen la misma característica asociada a la secuencia de bases nitrogenadas amplificada por cada uno de los marcadores que amplificaron bandas monomórficas.

2.6.3.3 Bandas totales

Las bandas totales evidencian el número total de bandas amplificadas por un microsatélite en este caso, es decir que estas indican el número de bandas polimórficas más el número de bandas monomórficas amplificadas por un marcador molecular, este dato es útil al momento de realizar posteriores amplificaciones con dicho marcador, además de conocer la capacidad de amplificación que el marcador posee.

En el caso de la presente investigación el marcador molecular que más bandas amplificó fue el J0455 (6 bandas), todas polimórficas, seguido del marcador PVBR107 con 5 bandas de las cuales 4 son polimórficas y una monomórfica, el marcador que amplificó menor número de bandas fue el marcador BMD19 con una banda de estas polimórfica.

Al momento de comparar los resultados de la presente con los reportados por otros autores, el número de loci amplificados fue mayor que el reportados por Coehlo *et al.* (2009), quien informó sobre 25 fragmentos amplificados con seis marcadores del tipo microsatélites para 20 cultivares de frijol común en Portugal; el número de loci amplificados fue menor que el reportado por Khaidizar *et al.* (2012), quienes informaron sobre 72 fragmentos amplificados con 30 marcadores microsatélites, entre ellos uno utilizado en la presente investigación (GATS91), para 38 cultivares de frijol común en Turquía.

2.6.3.4 PIC (Contenido de Información Polimórfica)

El PIC (por sus siglas en inglés para Polymorphism Information Content) estima el nivel de información de un marcador genético y estima la probabilidad de detectar polimorfismo por un primer o par de primers entre dos genotipos, alcanza un valor máximo de 1 para marcadores codominantes como los microsatélites. (Sehga, Rajpal, Raina, Sasanuma, & Sasakuma, 2009).

Este es calculado a partir de la frecuencia de bandas polimórficas presentes en todos los genotipos. Los cebadores BM172, BM181 y BM201 obtuvieron el valor más alto de PIC (0.38) (cuadro 16), esto señala que estos cebadores detectaron el número más alto de bandas informativas, es decir, que aportan a la diferenciación de las variedades de frijol analizadas, por el otro lado los primer Bmd-19 y PVBR31 obtuvieron el valor más bajo de PIC (0.24), estos generaron el menor número de bandas informativas, por ende aportaron poco en la información de la variación de las variedades de frijol.

Los valores de contenido de información polimórfica generados por los marcadores empleados en la presente investigación se encuentran entre los valores reportados por Cabral *et al.* (2011), quien reporta un intervalo de 0.11 a 0.51 por marcadores del tipo microsatélites en accesiones de frijol común, también por Hanai *et al.* (2007), quienes reportan un intervalo de PIC de 0.05 a 0.83, utilizando también marcadores moleculares del tipo microsatélites en frijol común, por último los presentes resultados son mayores a aquellos reportados por Reyes (2014) quien encontró un rango de 0.16 a 0.25 de contenido de información polimórfica.

2.6.3.5 Porcentaje de alelos polimórficos (PMF(95))

Este dato señala la proporción del total de bandas amplificadas que son polimórficas, es decir este porcentaje indica la capacidad discriminatoria de cada uno de los marcadores moleculares a los que las muestras fueron expuestas, en este caso particular el primer PV-gccacc001, mostró el porcentaje de alelos polimórficos más bajos con 0.60, eso conlleva a que este es el que posee la menor capacidad discriminatoria de todos los primers empleados, seguido de Bmd17 y PVBR31; el resto de primers mostraron una capacidad discriminatoria similar (cuadro 17).

Cuadro 17. Estadística descriptiva para los microsatélites empleados en la caracterización molecular.

Marcador	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas	Bandas totales	Coefficiente de información polimórfica	Proporción de alelos polimórficos
J0455	6	0	6	0.34	1.00
PV gccacc001	3	2	5	0.35	0.60
BMd19	1	0	1	0.24	1.00
BMd7	3	0	3	0.31	1.00
BMd2	2	0	2	0.35	1.00
BMd1	2	0	2	0.35	1.00
BMd17	2	1	3	0.29	0.67
BM181	2	0	2	0.38	1.00
BM152	2	0	2	0.35	1.00
BM201	2	0	2	0.38	1.00
BMd36	4	0	4	0.33	1.00
PVBR107	4	1	5	0.27	0.80
GATS91	4	0	4	0.36	1.00
PVBR31	2	0	2	0.24	1.00
BM172	2	0	2	0.38	1.00
TOTAL	41	4	45		

2.6.4 Análisis multivariado

Fueron calculados a partir de la matriz de datos binarios (ausencia, presencia) los índices de similitud de Dice, y transformados en distancias (cuadro 18), debido a que el objetivo de la presente investigación es la apoyar a el programa de mejoramiento genético de frijol, se generó un dendrograma utilizando el método de aglomeración UPGMA.

Cuadro 18. Datos de distancia calculados a partir del índice de similaridad de Dice en la seis variedades de frijol.

	ICTA ALTENSE	ICTA HUNAPÚ	ICTA LIGERO	ICTA PETÉN	ICTA SAYAXCHÉ	ICTA SUPERCHIVA
ICTA ALTENSE	0					
ICTA HUNAPÚ	0.28	0				
ICTA LIGERO	0.49	0.45	0			
ICTA PETÉN	0.55	0.47	0.16	0		
ICTA SAYAXCHÉ	0.33	0.41	0.57	0.60	0	
ICTA SUPERCHIVA	0.53	0.58	0.33	0.48	0.47	0

El índice de similaridad de Dice varió de 0.40 a 0.84, lo cual se traduce en 0.60 y 0.16 en cuanto a porcentaje de distancia. El índice de similaridad más alto (0.84) se observó entre entre ICTA Petén e ICTA Ligero; mientras que el valor de índice de similaridad de Dice más bajo fue observado entre las variedades ICTA Sayaxché e ICTA Petén (cuadro 18).

El valor promedio de similitud entre materiales basada para el índice de Dice (1945) resultó alcanzar un valor de 0.65 o bien 0.35 de distancia, estos resultados son menores a los reportados por Benchimol *et al.* (2006) quienes informan de un promedio de distancia genética 0.57 para genotipos mesoamericanos, 0.63 para andinos y 0.74 entre individuos de frijol con diferente acervo genético, esto puede deberse al empleo de diferentes índices de similaridad para el cálculo de distancias entre individuos, reveló que las variedades liberadas por el ICTA, están bastante emparentadas, debido a que estas pertenecen al mismo programa de fitomejoramiento, además que las fuentes de variación provienen de los mismos centros de mejoramiento: CIAT y la Universidad de Michigan.

2.6.4.1 Dendrograma

En base a los resultados obtenidos en la matriz de distancias, basadas en el índice de similitud de Dice (Cuadro 18) no se usó la similitud entre individuos, debido a que las variedades pertenecen a un programa de mejoramiento genético, es útil conocerlos individuos más distantes, puede ser útil en el desarrollo de híbridos, fue construido un dendrograma, utilizando el método de UPGMA o encadenamiento promedio por medio del programa estadístico Infostat©, el cual agrupo según distancias, los loci amplificados por medio de microsatélites de seis variedades de frijol liberadas por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (figura 26) .

A un coeficiente de similitud de 0.59, el dendrograma (figura 26), separó dos grupos de variedades: en el primer grupo se encuentran las variedades ICTA Superchiva, ICTA Petén e ICTA Ligero con distancias calculadas a partir del índice de similitud de Dice que van desde 0.16, hasta 0.48 y un segundo grupo donde se encuentran las variedades ICTA Hunapú, ICTA Altense e ICTA Sayaxché con distancias que van desde 0.28 a 0.55.

Dentro de ambos grupos las variedades más similares entre sí, genéticamente son: ICTA Petén e ICTA Ligero, los cuales proviene de materiales desarrollados por el CIAT, en base a germoplasmas mesoamericanos, siendo el ICTA Petén desarrollado a partir del genotipo MDSX 14801-43-34 y el ICTA Ligero siendo proveniente de DOR 385 (generada por el programa de frijol de CIAT en Guatemala) y JU-90-4 (generada por el programa de frijol de ICTA), estas dos variedades son las más similares entre sí por ende no se recomienda realizar una cruce entre ellas, con fines de mejoramiento genético, puesto que comparten muchas características, y no habría oportunidad de añadir características a la progenie proveniente de dicha cruce.

Después de estas dos variedades se encuentran las variedades ICTA Hunapú e ICTA Altense, con una distancia de 0.28, esta corta distancia concuerda con la reportada por Sagastume *et. al* (2003) quien reportó un coeficiente de similitud de Dice de 0.81 lo que se traduce en una distancia de 0.19 que difiere en 0.09 con la generada por los patrones de bandas generados por los marcadores del tipo microsatélite de la presente investigación, la explicación más directa para esta diferencia, es el tipo de marcadores moleculares que

se emplearon en las caracterizaciones son diferentes, en la caracterización realizada por Sagastume, las bandas utilizadas fueron generadas por marcadores del tipo AFLP.

Los marcadores del tipo AFLP suelen generar grandes cantidades de polimorfismos debido a que los primers son bastante cortos, es decir que están conformados por pocas pares de bases, no más de 10, en cambio en la presente investigación fueron empleados microsatélites, los cuales son marcadores bastante específicos pues son diseñados para un organismo en particular, en este caso el frijol común.

Por otro lado los microsatélites son marcadores codominantes, es decir que por lo general solo amplifican dos fragmentos por genotipo evaluado, al amplificar un menor número de fragmentos su poder discriminante disminuye, es decir este tipo de marcadores solo denota una baja cantidad de diferencias entre individuos, en cambio los marcadores del tipo AFLP generan gran cantidad de bandas y por ende es más probable que se encuentren diferencias entre individuos que puedan agrupar o discriminar a dos genotipos.

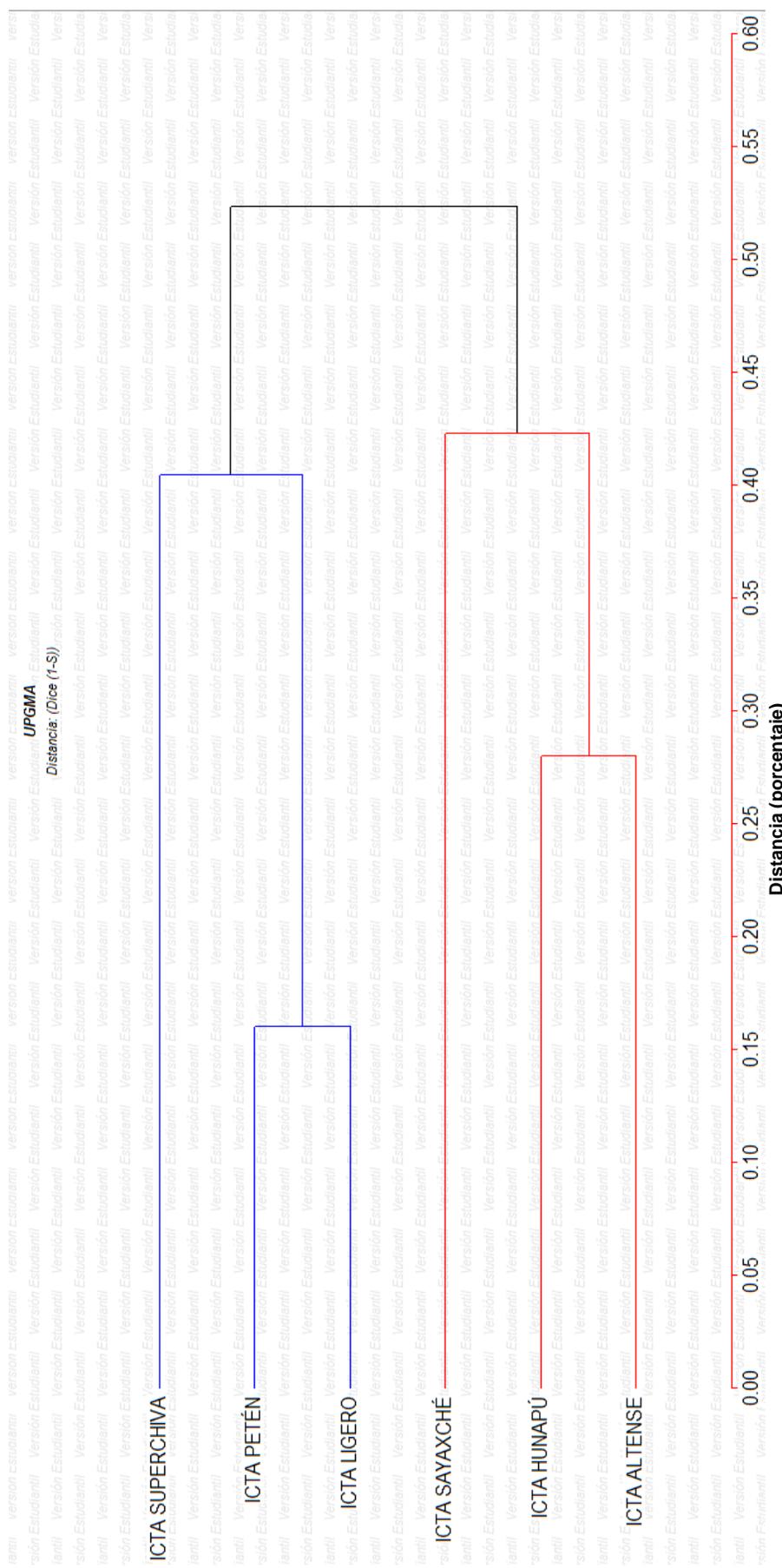
Dentro de ambos grupos separados en el dendrograma las variedades más distantes entre sí son ICTA Petén e ICTA Sayaxché con una distancia entre ellas de 0.60 esto se puede deber debido al origen de ambas variedades, por ejemplo la variedad ICTA Petén proviene del programa de mejoramiento genético de frijol del CIAT con el bajo el código MDSX 14801-43-34 en cambio la variedad ICTA Sayaxché proviene de un diferente programa de mejoramiento genético el cual está a cargo de la Escuela Agrícola Panamericana, otra de estas diferencias es la biofortificación de la variedad ICTA Petén, la cual tiene alto contenido de minerales, en cambio el ICTA Sayaxché no cuenta con esta cualidad.

Dentro de ambos grupos separados en el dendrograma (figura 26) el segundo par de variedades más distantes entre sí son ICTA Superchiva e ICTA Hunapú con una distancia entre ellas de 0.58 esto puede ser explicado debido a que la variedad ICTA Superchiva, proviene de la línea INB-35 el cual es un material 100% mesoamericano, en cambio el frijol ICTA Hunapú tiene sus orígenes en una cruce entre el material Negro Pacoc del programa de mejoramiento del ICTA y A216 el cual es un material andino proveniente de CIAT.

Otra de las diferencias a remarcar es que el ICTA Superchiva es una variedad con alto contenido de minerales, es decir biofortificada, en cambio el ICTA Hunapú no lo es, en base a la distancia calculada a partir del índice de similaridad de Dice estos dos genotipos son los más aptos para que sean utilizados como parentales en futuras cruzas para el programa de mejoramiento genético de frijol del ICTA, debido a que al ser lo más distantes el resultante de la crusa de ambos generaría una progenie que compartiera características de ambos, es decir un genotipo donde por medio de selección se podría aislar las mejores características de ambos

Por lo discutido, se plantean cruzas entre aquellos genotipos donde la distancia generada a partir de los marcadores moleculares de tipo microsatélite sea mayor a 0.50 (Sagastume, 2003) , es decir que sean diferentes entre sí en un 50%, por ello las cruzas serían ICTA Altense e ICTA Petén con 0.55, ICTA Altense e ICTA Superchiva con 0.53, ICTA Húnapu e ICTA Superchiva con 0.58, ICTA Ligera e ICTA Sayaxché con 0.57, y por último ICTA Petén e ICTA Sayaxché con 0.60, esto dependería de las características morfológicas, tipo de frijol, tolerancia a enfermedades, objetivos del fitomejorador, entre otras. Por consecuencia lógica no se recomienda hacer cruces entre los genotipos donde la distancia sea menor a 0.50.

En la figura 26 se presenta el dendrograma correspondiente.



Distancia = 1 – Similaridad

Fuente: elaboración propia, 2017

Figura 26. Dendrograma generado por los datos de distancia, calculados a partir del índice de similitud de Dice, y el método de aglomeración UPGMA

2.6.5 Huella genética.

La huella genética de las variedades es definida como un patrón de fragmentos amplificados específico para cada individuo que fuese sometido a la caracterización molecular, en la presente investigación fue elaborada una huella genética para cada una de las 6 variedades de frijol liberadas por el ICTA evaluada, para ello fueron construidos cuadros para cada par de cebadores con los que se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, indicando en cada uno de los cuadros los fragmentos amplificados y su tamaño en pares de base por variedad, adicional a ello fue construido una especie de código de barras utilizando una hoja de cálculo en Microsoft Excel© donde aparecen todos los fragmentos amplificados (cuadro 19 y figura 27).

Cuadro 19. Fragmentos amplificados por los marcadores moleculares presentados en el cuadro 10 para las variedades de frijol ICTA Altense, ICTA Superchiva, ICTA Hunapú, ICTA Ligero, ICTA Petén e ICTA Sayaxché, donde 1, significa que amplificó la banda y 0 que no amplificó.

Marcador	PB	ICTA ALTENSE	ICTA SUPERCHIVA	ICTA HUNAPÚ	ICTA LIGERO	ICTA PETÉN	ICTA SAYAXCHÉ
PV-GCCACC001-A	209	1	0	1	0	0	0
PV-GCCACC001-B	173	0	0	0	1	1	0
PV-GCCACC001-C	135	1	1	1	1	1	1
PV-GCCACC001-D	96	1	0	1	1	1	0
PV-GCCACC001-E	80	1	1	1	1	1	1
J04555-A	172	1	0	0	1	1	0
J04555-B	167	0	0	0	1	1	0
J04555-C	152	1	0	0	0	0	0
J04555-D	134	0	0	0	1	1	0
J04555-E	129	0	1	0	1	1	0
J04555-F	111	1	0	1	0	0	1
BMd19-A	163	1	1	1	1	1	0
BMd7-A	166	1	1	1	1	0	1
BMd7-B	143	1	1	0	1	0	1
BMd7-C	131	1	0	0	0	0	1
BMd2-A	106	0	1	0	1	1	1
BMd2-B	100	1	0	1	0	0	0
BMd1-A	193	1	1	1	1	0	0
BMd1-B	165	1	1	1	1	0	0
BMd17-A	148	0	0	0	1	1	0
BMd17-B	116	1	0	1	1	0	0
BMd17-C	96	0	1	0	1	1	1
BM181-A	192	0	0	1	1	1	0
BM181-B	187	1	1	0	0	0	1
BM152-A	101	0	1	0	1	1	1
BM152-B	93	1	0	1	1	1	0
BM201-A	111	1	0	1	0	0	1
BM201-A	102	0	1	0	1	0	1
BMd36-B	175	1	1	0	0	0	1
BMd36-C	171	1	0	0	1	1	0
BMd36-D	164	1	0	1	0	0	0
PBVR107-A	249	1	1	1	1	1	1
PBVR107-B	165	1	0	0	0	0	0
PBVR107-C	156	0	0	0	1	0	1
PBVR107-D	150	0	0	1	0	0	0
PBVR107-E	147	0	1	0	0	0	0
GATS91-A	280	0	1	0	1	1	0
GATS91-B	253	1	0	1	0	0	1
GATS91-C	238	0	1	0	1	0	0
GATS91-D	229	1	0	1	0	1	1
PVBR31-A	204	1	0	1	1	1	1
PVBR31-B	200	0	1	0	0	0	0
BM172-A	148	0	0	1	1	1	0
BM172-B	141	1	1	0	0	0	1

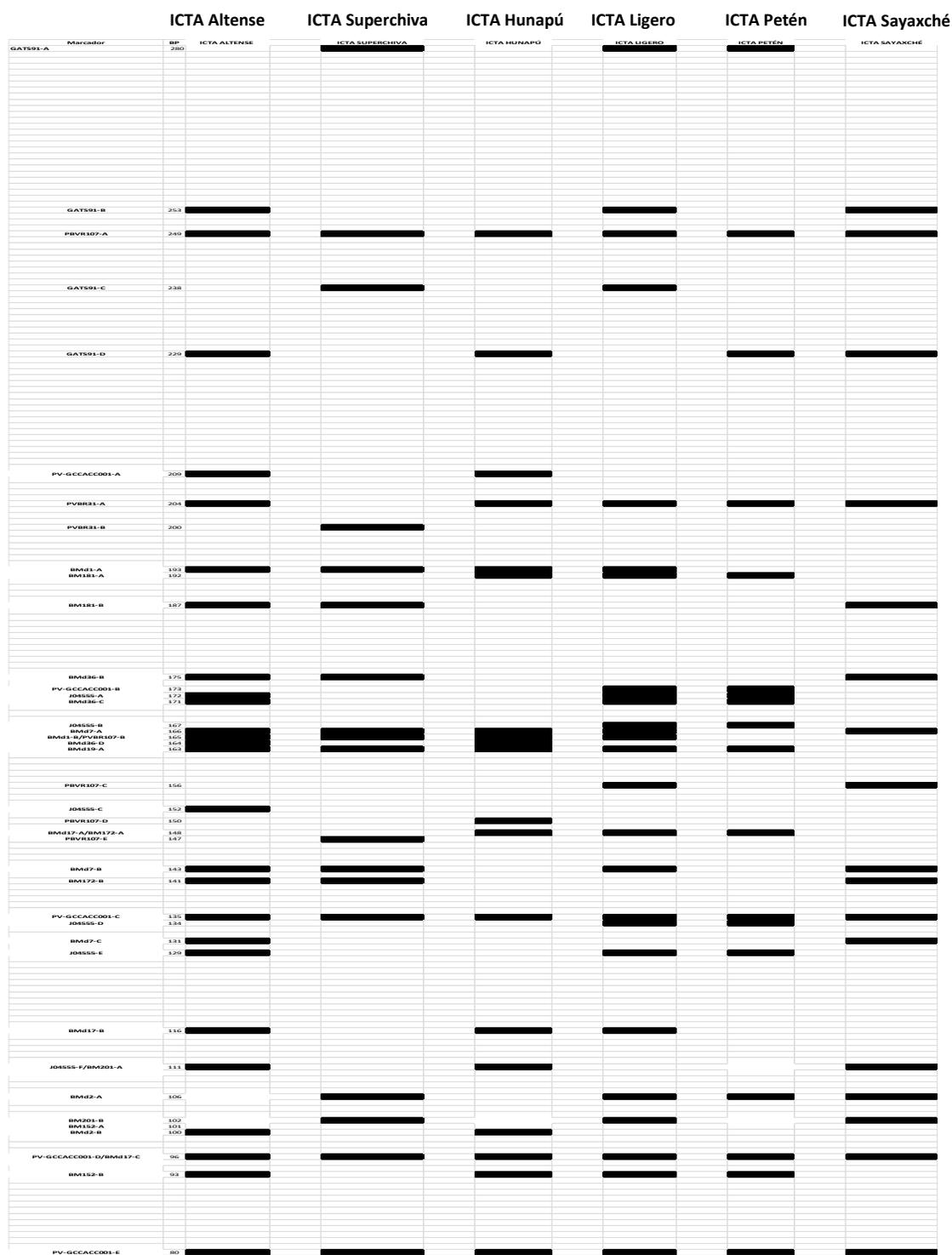


Figura 27. Patrón molecular generado en hoja de cálculo electrónica, por los 15 pares de cebadores, para las 6 variedades de frijol en estudio, carriles del 1 al 6, ICTA Altense, ICTA Superchiva, ICTA Hunapú, ICTA Ligero, ICTA Petén e ICTA Sayaxché respectivamente

2.7 Conclusiones

1. Los marcadores moleculares de tipo microsatélites o SSR por sus siglas en inglés (Simple Sequence Repeats) fueron efectivos en la discriminación de las seis variedades de frijol liberadas por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola, puesto que fueron capaces de amplificar polimorfismos diferentes entre los individuos objetivos de la presente investigación, esto fue demostrado en base a la construcción de un dendrograma el cual se elaboró con los resultados de la matriz de distancias calculadas a partir del índice de similitud de Dice, el cual emparenta a los individuos por sus similitudes eliminando las dobles ausencias y tomando en cuenta las presencias comunes entre las variedades, demostrando así que todas las variedades son diferentes entre sí.
2. Las distancias calculadas a partir del índice de similaridad de Dice son un criterio útil para la selección de genotipos que pueden convertirse en parentales al momento de realizar cruzas con fines de mejoramiento genético, puesto que aquellos genotipos menos emparentados pueden aportar mayor variabilidad genética en la progenie resultante, en contraste de aquellas que se encuentren más emparentadas.
3. Según las distancias calculadas a partir del índice de similitud de Dice, el dendrograma elaborado, logró separar dos grupos principales de variedades a una distancia de 0.59, dentro de ambos grupos, algunas de las variedades son bastante diferentes entre sí, siendo en caso más evidente el de las variedades ICTA Petén e ICTA Sayaxché con una distancia de 0.60, lo que indica que entre las variedades evaluadas y los fragmentos amplificados por los 15 pares de marcadores estas son las variedades con un genotipos más diferentes entre sí, por el otro lado la menor distancia calculada fue de 0.16, esta distancia corresponde a las variedades ICTA Ligero e ICTA Petén.

4. Los fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa y por cada par de marcadores empleados generaron un patrón de bandas para cada una de las variedades que fueron sometidas a la caracterización molecular, este patrón es único para cada una de ellas, por lo que pueden ser identificadas en base a dicho patrón, este funciona como una huella genética que puede ser empleada como material de respaldo para el registro de las variedades como propiedad intelectual del ICTA en el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGA).

2.8 Recomendaciones

1. Por compartir muchas características, en programas de cruzamientos del programa de mejoramiento genético de frijol, no utilizar las cruzas entre sí de las variedades: ICTA Petén e ICTA Ligero, ICTA Ligero e ICTA Superchiva, ICTA Hunapú e ICTA Altense, e ICTA Sayaxché e ICTA Altense.
2. Realizar la separación de fragmentos de analizados utilizando un analizador de fragmentos, por medio de electroforesis capilar, para tener una diferenciación más precisa de aquellos fragmentos que contienen una cantidad parecida de pares de bases.
3. Realizar una caracterización molecular de variedades de frijol comercial, con los mismos microsatélites y las mismas variedades empleadas en la presente investigación, y volver a realizar el análisis cluster con el mismo índice de similitud y método de aglomeración, para conocer qué tan emparentados se encuentran las variedades liberadas por el ICTA con relación a las variedades comerciales.

2.9 Bibliografía

1. Acero Barraza, S. M. (2010). *Algoritmo para análisis filogenético: UPGMA*. (Tesis Master). Universidad del Norte, División de Ingenierías, Departamento de Ingeniería de Sistemas: Barranquilla, Colombia.
2. Adams, M., Coyne, D., Davis, J., Graham, P., & Francis, C. (1985). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L). In *Grain legume crops*. London: Collins.
3. Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. In Eguiarte, L. E., Souza, V., & Aguirre, X. (comps.). *Ecología molecular*. México: SEMARNAT / INEc / UNAM / CONABIO. p. 541-566.
4. Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221-242.
5. Balzarini, M., Bruno, C., Peña, A., Teich, I., & Di Rienzo, J. A. (2010). *Estadística en biotecnología: Aplicaciones en Info-Gen*. Córdoba, Argentina: Encuentro Grupo de Editor.
6. Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196(1), 80-83.
7. Berglund-Brücher, O., & Brücher, H. (1976). The south american wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. *Economic Botany*, 30(3), 257-272.
8. Biotecon Diagnostics. (2015). Foodproof® sample preparation kit III (version 1). Recuperado el 23 de Septiembre de 2016, http://www.bc-diagnostics.com/downloads/products/bpz/S_400_06_1%2020_foodproof_Sample_Preparation_Kit_III_BPZ_V1-1.pdf

9. Blair, M. W., Diaz, J., Hidalgo, R., Diaz, L., & Duque, M. (2007). Microsatellite characterization of andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 116(1), 29-43.
10. Blair, M. W., Pedraza, F., Buendia, H., Gaitán-Solís, E., Beebe, S. E., Gepts, P., & Tohme, J. (2003). Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 107(8), 1362-1374.
11. Buso, G. S. C., Amaral, Z. P. S., Brondani, R. P. V., & Ferreira, M. E. (2006). Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Ecology Resources*, 6(1), 252-254.
12. Cabral, P. D. S., Soares, T. C. B., Lima, A. B. P., De Miranda, F. D., Souza, F. B., & Gonçalves, L. S. A. (2011). Genetic diversity in local and commercial dry bean (*Phaseolus vulgaris*) accessions based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 140-149.
13. Coelho, R. C., Faria, M. A., Rocha, J., Reis, A., Oliveira, M. B. P., & Nunes, E. (2009). Assessing genetic variability in germplasm of *Phaseolus vulgaris* L. collected in Northern Portugal. *Scientia Horticulturae*, 122(3), 333-338.
14. Colín, C. A. N., & López, D. E. (2011). Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415-427.
15. Creste, S., Neto, A. T., & Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4), 299-306.
16. Debouck, D. G., & H, R. H. (1984). *Morfología de la planta de frijol comun*. Colombia: CIAT.

17. Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779-791.
18. Díaz, L., & Blair, M. W. (2006). Race structure within the mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(1), 143-154.
19. Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3), 297-302.
20. Dimitri, M. J., Dimitri, E. N. J., & Orfila, E. N. (2000). *Tratado de morfología y sistemática vegetal*. USA: Acme.
21. Dunn, M. J. (ed.). (2014). *Gel electrophoresis of proteins*. USA: Elsevier.
22. Esau, K. (1972). *Anatomía vegetal*. (Trad. de J. Pons R). Barcelona: Ediciones Omega.
23. Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Brasil: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CENARGEN.
24. Flores Vindas, E. M. (1994). *La planta: estructura y función*. Cartago, Costa Rica: Tecnológica de Costa Rica.
25. Gaitán-Solís, E., Duque, M., Edwards, K., & Tohme, J. (2002). Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Science*, 42(6), 2128-2136.
26. Gallardo, J. (2006). *Métodos jerárquicos de análisis de Clúster*. Recuperado el 23 de septiembre de 2016, www.ugr.es/~gallardo/pdf/cluster-3.pdf
27. Gillespie, L. (1999). *Icta Ligero, nueva variedad de frijol negro precoz y resistente a mosaico dorado*. Guatemala: Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas.

28. Graham, P., & Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1), 131-146.
29. Grisi, M. C. M., Blair, M. W., Gepts, P., Brondani, C., Pereira, P. A. A., & Brondani, R. P. V. (2007). Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. *Genet. Mol. Res.*, 6(3), 691-706.
30. Guerra-Sanz, J. M. (2004). New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. *Plant Breeding*, 123(1), 87-89.
31. Hanai, L. R., De Campos, T., Camargo, L. E. A., Benchimol, L. L., De Souza, A. P., Melotto, M., & Siqueira, M. V. B. M. (2007). Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. *Genome*, 50(3), 266-277.
32. Hanai, L. R., Santini, L., Camargo, L. E. A., Fungaro, M. H. P., Gepts, P., Tsai, S. M., & Vieira, M. L. C. (2010). Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. *Molecular Breeding*, 25(1), 25-45.
33. Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, M., Luisa, P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(2), 95-104.
34. Hoisington, D. (1994). *Protocolos de laboratorio: laboratorio de genética molecular aplicada CIMMYT*. México: CIMMYT.
35. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, Guatemala (ICTA). (1996). *ICTA Altense, ICTA Hunapu, dos nuevas variedades de frijol negro para el altiplano de Guatemala*. Guatemala: ICTA, Publicación Técnica no. 33.

36. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, Guatemala (ICTA). (2010). *Nuevas variedades del frijol para el Petén ICTA Petén, ICTA Sayaxché*: ICTA, Sin numeración.
37. Jenkins, J. B. (1985). *Genética*. USA: Reverté.
38. Johnson, D. E. (2000). *Métodos multivariados aplicados al análisis de datos*. USA: International Thomson Editores.
39. Johnson, D. E. (2018). *Métodos multivariados aplicados al análisis de datos*. Madrid, España: Paraninfo.
40. Khaidizar, M. I., Haliloglu, K., Elkoca, E., Aydin, M., & Kantar, F. (2012). Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces grown in northeast Anatolia of Turkey assessed with simple sequence repeat markers. *Turkish Journal of Field Crops*, 17(2), 145-150.
41. Kaplan, L. (1965). Archeology and domestication in american *Phaseolus* (beans). *Economic Botany*, 19(4), 358-368.
42. Kaplan, L., Lynch, T. F., & Smith, C. (1973). Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*) from an intermontane peruvian valley. *Science*, 179(4068), 76-77.
43. Karp, A. (1997). *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. Roma, Italia: IPGRI.
44. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotechnología y mejoramiento vegetal II*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
45. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala (MAGA). (2016). *Situación del frijol (informe 2016)*. Guatemala: MAGA, Dirección de Planeamiento.

46. Martínez, R. D., Fernández, E. N., Género, E., & Broccoli, A. (2006). Avances en la caracterización genética y morfológica del bovino criollo de origen patagónico. Recuperado el 6 de febrero de 2013, http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/raza_criolla/30-caracterizacion.pdf
47. Miranda Colín, S. (1968). Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común). *Agronomía Tropical* (Venezuela), 18(2), 191-205.
48. Valadez Moctezuma, G., & Kahl, E. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio)*. España: MundiPrensa.
49. Mok, D., & Mok, M. (1977). Monosomics in common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Theoretical and Applied Genetics*, 49(3), 145-149.
50. Moreno, V. S. (2001). Análisis de resultados en la caracterización molecular. *In Conservación y caracterización de recursos filogenéticos* (p. 253-266). Valladolid, España, Universidad Pontificia Comillas, INEA Ingeniería Agrícola y Agroambiental.
51. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
52. Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.
53. Ponciano-Samayoa, K. M., Villatoro-Mérida, J. C., & Monterroso, L. G. M. (2009). Caracterización preliminar con microsatélites de la colección guatemalteca de frijol común trepador. *Agronomía Mesoamericana*, 20(2), 245-254.
54. Promega, USA. (2016). *Certificate of analysis: GoTaq® Green Master Mix*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2016, <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf>

55. Reyes Martínez, A. (2014). *Variabilidad genética de frijol (Phaseolus vulgaris L.) cultivado y silvestre en el estado de Durango*. (Tesis Ph.D.). Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo, Integral Regional Unidad Durango: México.
56. Rosas, J. C. (2003). *El cultivo del frijol común en América tropical*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano.
57. Sagastume, H., Molina, L., Ávalos, A., & Ponciano, K. (2003). *Caracterización molecular, mediante AFLP, de la colección de variedades de frijol (Phaseolus vulgaris L.) liberadas por el ICTA*. Guatemala: Proyecto FODECYT(15-01).
58. Sagastume, H. A., Ponciano, K. M., & Villatoro, J. C. (2008). *Validación de una metodología de selección asistida con marcadores moleculares en el mejoramiento genético del frijol (Phaseolus vulgaris L.) para resistencia al virus del mosaico dorado (BGYMV-GA; Begomovirus, Geminiviridae)*. Guatemala: Proyecto FODECYT(42.2008).
59. Rodríguez Salazar, M. R., Álvarez Hernández, S., & Bravo Nuñez, R. (2000). *Coefficientes de asociación*. Madrid, España: Plaza y Valdés.
60. Schwartz, H. F., & Corrales, M. A. P. (1989). *Bean production problems in the tropics*. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
61. Sehgal, D., Rajpal, V. R., Raina, S. N., Sasanuma, T., & Sasakuma, T. (2009). Assaying polymorphism at DNA level for genetic diversity diagnostics of the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) world germplasm resources. *Genetica*, 135(3), 457-470.
62. Singh, R. J., & Jauhar, P. P. (2005). *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: grain legumes*. USA: CRC Press.
63. Singh, S. P. (2013). *Common bean improvement in the twenty-first century*. Netherlands: Springer.

64. Singh, S. P., Gutierrez, J., Molina, A., Urrea, C., & Gepts, P. (1991). Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Science*, 31(1), 23-29.
65. Smith, B. D. (2005). Reassessing Coxcatlan cave and the early history of domesticated plants in Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9438-9445.
66. Sokal, R. R. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.*, 38, 1409-1438.
67. UC Davis. (2003). *DNA polyacrylamide gel electrophoresis: how to pour and run a neutral polyacrylamide gel*. Recuperado el 23 de Septiembre de 2016, http://microbiology.ucdavis.edu/heyer/wordpress/wpcontent/uploads/2013/11/dna_page.pdf
68. Valladares, C. (2010). *Taxonomía y botánica de los cultivos de grano*. La Ceiba, Honduras, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Centro Universitario Regional del Litoral Atlántico (CURLA).
69. Van Houtte, L. (1880). *Flore des Serres et des Jardins de l'Europe* (5):425-539
70. Van Schoonhoven, A. (1987). *Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol*. Colombia: CIAT.
71. Voyses, O. (1983). *Varietades de frijol en América Latina y su origen*. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
72. Voyses, O. (2000). *Mejoramiento genético del frijol (Phaseolus vulgaris L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999*. Colombia: CIAT.
73. Weber, K., & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406-4412.

74. Yokota, Y., Kawata, T., Iida, Y., Kato, A., & Tanifuji, S. (1989). Nucleotide sequences of the 5.8 S. rRNA gene and internal transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 29(4), 294-301.
75. Yu, K., Park, S. J., & Poysa, V. (1999). Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42(1), 27-34.
76. Yu, K., Park, S., Poysa, V., & Gepts, P. (2000). Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity*, 91(6), 429-434.



CAPÍTULO III
SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS-ICTA-, BÁRCENA, VILLA
NUEVA.

3.1 Presentación

Dentro del Ejercicio Profesional Supervisado de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se establece los servicios como una de las tres partes principales. En el presente documento, se informa de los proyectos profesionales realizados en el periodo agosto 2016 a mayo 2017, dentro del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, siendo más específicos, el Laboratorio de Biotecnología ubicado en las Oficinas Centrales, Bárcena, Villa Nueva.

Fueron realizados varios servicios en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología agrícola, principalmente en el apoyo de las actividades diarias de este, especialmente la preparación de medios de cultivo para la propagación *in vitro* de especies como camote, nido de ave y geranio, el manejo agronómico del invernadero de aclimatización de plantas, en cuanto a riego, prácticas culturales, fertilización y manejo de plagas, la siembra de líneas a ser seleccionadas por marcadores moleculares, la dilución de cebadores del tipo SCAR y SSR, la irradiación de microesquejes de papa y camote para la inducción de mutaciones y el servicio que se detalla en el anexo 1

Dicho servicio consistió en la selección asistida por marcadores moleculares del tipo SCAR los cuales son capaces de identificar genes de resistencia a las siguientes enfermedades, virus del mosaico común y dorado, mancha angular y roya, todos estos marcadores siendo un total de siete fueron evaluados en 14 líneas avanzadas de frijol, provenientes de Puerto Rico

Las líneas avanzadas serán empleadas por el programa de mejoramiento genético de frijol del ICTA para la generación de nuevas variedades que afronten los entornos guatemaltecos y así generen el mayor rendimiento con el menor gasto posible por parte de los agricultores del país, esta investigación fue realizada con el fin de agilizar el proceso de mejoramiento genético en la etapa de selección y asegurar que los individuos seleccionados contengan las características deseadas en su genotipo, lo cual genera un ahorro de tiempo y asegura sin necesidad de la realización de pruebas de campo e inoculación de patógenos los genotipos con la presencia de los genes objetivo.

Estos servicios fueron elegidos en base a las necesidades del laboratorio y del pueblo de Guatemala por mejores variedades de frijol que beneficien a los agricultores del país.

3.1.1 Apoyo a las actividades diarias del laboratorio de biotecnología del ICTA

3.1.1.1 Elaboración de medios de cultivo de camote, geranio y nido de ave en el laboratorio de cultivo de tejidos

Fue elaborado, medio de cultivo en el laboratorio de cultivo de tejidos del ICTA. Esto con el fin de suplir las demandas nutricionales y hormonales de los explantes, de los cultivos de camote (*Ipomoea batata* L.) (Figura 1), geranio de olor (*Pelargonium graveolens* L.) y nido de ave (*Asplenium nidusavis* L.). El medio de cultivo elaborado para camote tiene como base el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Figura 27) tanto medio semisólido como medio líquido, que contienen las concentraciones indicadas en el cuadro 1, exceptuando el agar en el último mencionado.

El medio de geranio de olor fue modificado según las necesidades de propagación de la planta, agregando distintos tipos de reguladores del crecimiento, como lo son: auxina que es el ácido naftalenacético a una concentración de 1.0 mg/l y una citoquinina que es la kinetina a una concentración de 5.0 mg/l. La aplicación de los reguladores del crecimiento induce la producción de callo, el cual es una masa de células indiferenciadas, a partir de explantes de hoja, con fines de propagación masiva de esta especie.

La especie nido de ave se encontraba en la etapa de propagación masiva en el laboratorio de Biotecnología del ICTA, a pesar que su tasa de supervivencia al momento de ser dividida y transferida a un nuevo medio es bastante alta (98%), el tiempo de diferenciación de los explantes es muy prolongado para un medio MS, es por eso que fue necesario revisar literatura con protocolos usados previamente en esta especie, con el fin de encontrar un medio que indujera diferenciación en los explantes, como resultante fue encontrado el medio: MS a la mitad de concentración enriquecido con reguladores de crecimiento, los cuales son BAP a una concentración de 3.0 mg/l y ANA a una

concentración de 0.5 mg/l, un porcentaje de sacarosa del 3%, 200 mg/l de difosfato de sodio, un pH de 5.75 y un porcentaje de agar del 0.

Cuadro 20. Composición del medio basal MS, empleado en el laboratorio de Biotecnología.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN FINAL EN EL MEDIO mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ • H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₄	6.2
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.025
KI	0.83
MgSO ₄ •7H ₂ O	370
MnSO ₄ •4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ •7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ •7H ₂ O	27.8
TIAMINA	0.1
AC. NICOTÍNICO	0.5
PIRIDOXINA	0.5
GLICINA	2
INOSITOL	100
SACAROSA	30,000
AGAR	6,000



Figura 28. Medio de cultivo elaborado para propagación de camote in vitro.



Figura 29. Elaboración de medio de cultivo para propagación de plantas in vitro.

3.1.1.2 Manejo agronómico del invernadero de aclimatación de plantas del laboratorio de biotecnología

Las plantas propagadas in vitro fueron llevadas al invernadero del laboratorio para su aclimatación. En este espacio se les proporcionó a las plantas, un manejo agronómico adecuado, desde la siembra hasta su aclimatación. Las especies trabajadas durante el período fueron: cuerno de alce, macal y yuca.

A la yuca y al cuerno de alce se les colocó una malla antivectores, con el fin de guardar el mayor porcentaje de humedad, esto debido a que en condiciones in vitro las plantas no son expuestas a temperaturas tan altas como las alcanzadas en un invernadero, además de que en el cuarto de crecimiento y dentro de los frascos donde las plantas se ubican la humedad relativa es cercana al 100%, por ende es necesario imitar, en un principio, estas condiciones, acercándolas paulatinamente a las condiciones reales del invernadero.

Las plantas fueron regadas con una frecuencia de tres veces por semana, esto con el fin de suplir las necesidades hídricas de los cultivos. Lo que se busca en cada riego es llevar el sustrato donde se encuentran las plantas hasta capacidad de campo para aprovechar la capacidad de retención de agua de este, evitando así el desperdicio de agua y que las plantas sufran de estrés hídrico.

En cuanto a plagas y enfermedades, se dio control del ácaro comúnmente llamado “araña roja” (*Tetranychus sp.*) (ver figura 29) debido a que este incidió en plantas de yuca (*Manihot sculenta L.*) y malanga (*Collocasia sculenta L.*).

Las medidas de contingencia utilizadas fueron las mismas para ambas especies, la realización de una poda del follaje dañado, con el fin de eliminar huevos y estadios adultos del ácaro, más control químico, empleando un producto acaricida cuyo ingrediente activo es el amitraz que es un derivado triazapentadieno, es un miembro de la clase amidina.

Es un insecticida y acaricida usado para el control de la araña roja, minadores, cochinillas, y áfidos con un mecanismo de acción parecido a otros agonistas del $\alpha 2$ -adrenoreceptores como también por inhibición de la enzima monoaminooxidasa., con una dosis de 200ml por cada 100 lt de agua con un intervalo de aplicación de siete días debido a que por ser un rebrote es importante evitar el mayor daño posible a las plantas de yuca. La chinche harinosa (*Pseudococcus sp.*) también se presentó en el invernadero, principalmente en plantas de macal, la cual se controló con riego al follaje y una aplicación de una solución al 2% de detergente líquido.



Figura 30. Araña roja (*Tetranychus sp.*) en plantas de yuca (*Manihot esculenta*).



Figura 31. Chinche Harinosa (*Pseudococcus sp.*) en plantas de Macal (*Xanthosoma sagittifolium*).



Figura 32. Daño en yuca provocado por Araña roja (*Tetranychus sp.*).



Figura 33. Araña roja (*Tetranychus sp.*).

3.1.1.3 Siembra de líneas y selecciones de frijol a ser analizadas con el marcador sbb14

El día 21 de junio de 2017 fueron sembradas 23 líneas y 25 selecciones de frijol provenientes del CIALC en el invernadero de climatización de plantas del laboratorio de biotecnología. Estas semillas, pertenecientes al programa de frijol, serán analizadas con el marcador molecular de tipo SCAR SBB14 (cuadro 21), el cual amplifica la región correspondiente al gen Co-42 el cual confieren resistencia a antracnosis a la planta. Cinco semillas de cada línea y selección fueron sembradas en camas, una para las líneas y otra para las selecciones, de estas cinco semillas, serán seleccionadas cuatro plantas para las líneas y tres para las selecciones, esto con el fin de que las muestras se ajusten a una placa para PCR con capacidad para 96 muestras, la cual es igual para el termociclador, al momento de que las plantas alcancen la primera hoja trifoliada, el tejido vegetal correspondiente a cada planta será removido y sometido a un proceso de extracción de ADN. Las plantas serán cultivadas hasta el momento de su cosecha, esto para conservar las semillas de aquellas líneas que tengan la presencia del gen de interés.

Cuadro 21. Características del marcador molecular SCAR SBB14 para el gen Co-42.

Patógeno	Tamaño de los fragmentos (pb)	Secuencia del SCAR (Forward)	Secuencia del SCAR (Reverse)	Tm Reportada
Antracnosis	1150/1050	5'- GTGGGACCTGTTCA AGAATAATAC-3'	5'- GTGGGACCTGGGTA GTGTAGAAAT-3'	67 °C



Figura 34. Selecciones sembradas en el invernadero del laboratorio de Biotecnología.



Figura 35. Selecciones de frijol después de la germinación en el invernadero del laboratorio de Biotecnología.

3.1.1.4 Solubilización y dilución de cebadores de tipo microsatélites altamente polimórficos de frijol.

Fueron solubilizados 10 microsatélites reportados altamente polimórficos por la literatura, según sus valores de PIC, y el número de polimorfismos generados por cada uno. Esto para la caracterización de variedades de frijol, aunque aún no se cuenta con las semillas que serán empleadas en esta. En el cuadro 22 se detalla el nombre de los microsatélites y sus características.

Cuadro 22. Características de los microsatélites altamente polimórficos

<i><u>Nombre</u></i>	<i><u>Tamaño bp</u></i>	<i><u>Tm</u></i>	<i><u>Primer</u></i>	<i><u>Secuencia</u></i>	<i><u>Cromosoma</u></i>	<i><u>No. Caja</u></i>	<i><u>Vol for 100pmol / μL</u></i>	<i><u>Dilución</u></i>
BM53	287	55	F	AAC TAA CCT CAT ACG ACA TGA AA	1	9	295	10/90
			R	AAT GCT TGC ACT AGG GAG TT		10	351	10/90
BM143	143	55	F	GGG AAA TGA ACA GAG GAA A	2	51	123	10/90
			R	ATG TTG GGA ACT TTT AGT GTG		52	385	10/90
BM164	182	52	F	CCA CCA CAA GGA GAA GCA AC	2	49	231	10/90
			R	ACC ATT CAG GCC GAT ACT CC		50	359	10/90
BM172	107	50	F	CTG TAG CTC AAA CAG GGC ACT	3	81	370	10/90
			R	GCA ATA CCG CCA TGA GAG AT		82	363	10/90
BM142	157	55	F	TTC CGC TGA TTG GAT ATT AGA G	2	53	304	10/90
			R	AGC CCG TTC CTT CGT TTA G		54	455	10/90
BM197	201	54	F	TGG ACT GGT CGA TAC GAA GC	3	85	253	10/90
			R	CCC AGA AGA TTG AGA ACA CCA C		86	148	10/90
PVBR31	204	56	F	AAT GGC AGG TCA GTG AAA CA	1	15	218	10/90
			R	ATG ACC ACG CAG TGA CAG AG		16	244	10/90
PVBR87	163	56	F	CTC ATT GCG TCT ACC AGT GC	3	99	284	10/90
			R	CCT AGG TTC CGC AGC ATG T		100	388	10/90
PVBR218	185	56	F	TGT AAA TGG CAG GCA GTG AA	1	25	261	10/90
			R	ATG ACC ACG CAG TGA CAG AG		26	158	10/90
PVBR94	165	58	F	ACG ACG GAG AGA GAG GTT GA	2	67	146	10/90
			R	CCG TGT TCC TTC TGT CTG TG		68	440	10/90

3.1.1.5 Irradiación de microesquejes de papa y camote.

Fueron irradiados microesquejes de papa y camote, 25 de estos fueron colocados en cajas Petri, las cuales fueron llevadas hasta la planta del programa Mosca del Mediterráneo (MOSCAMED), ubicada en la laguna del pino, donde fueron expuestas a una fuente de radiación de cobalto 60, durante un determinado tiempo, según la dosis de cada tratamiento (cuadro 23).

Esto se realizó con la finalidad de inducir mutaciones en estas plantas de reproducción asexual, cada caja Petri contenía 25 microesquejes (figura 35), fueron irradiadas 2 cajas Petri de cada cultivo.

Los explantes elegidos para la irradiación fueron microesquejes debido a que estos contienen solo una yema vegetativa, y lo que se busca es que la irradiación afecte de manera homogénea toda la planta.

Cuadro 23. Tratamientos de irradiación en camote y papa.

Dosis (Gy's)	Camote	Papa	Segundos	Minutos
100	No	Sí	484.64	8.08
75	No	Sí	363.48	6.06
50	Sí	Sí	242.32	4.04
37.5	Sí	No	181.74	3.03
25	Sí	Sí	121.16	2.02
12.5	Sí	No	60.58	1.01

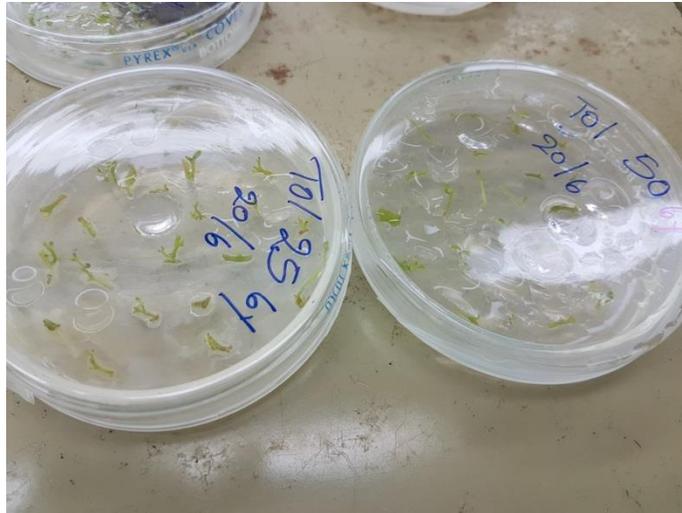


Figura 36. Microesquejes de papa irradiados.

3.1.1.6 Pruebas preliminares de micropropagación de geranio

Fueron realizadas pruebas preliminares para el establecimiento de un protocolo para la micropropagación de geranio de olor (*Pelargonium graveolens* L.). Fueron extraídos de la planta, explantes de porciones de hoja y segmentos nodales del tallo. Estos fueron sometidos a un proceso de desinfección con los pasos:

1. Sumergidos en alcohol al 70% (v/v) por un período de cinco minutos.
2. Sumergidos en hipoclorito del calcio al 1% durante un período de 30 minutos.
3. Lavados con agua destilada, estéril, para remover excesos de alcohol e hipoclorito de sodio.
- 4.

Fue preparado un medio de cultivo basado en el MS basal (cuadro 20), modificado, añadiendo ácido naftalenacético (ANA) en una concentración de 1.0 mg/l y 8.0 mg/l de cinetina, para microesquejes y 5.0 mg/l para hojas.

Los explantes fueron sembrados dentro de cámaras de flujo laminar con el fin de evitar contaminaciones. A pesar de esto casi un 50% del material vegetal sembrado presentó contaminación fúngica y bacteriana, debido a contaminación endógena, por ende para futuras desinfecciones será necesario el empleo de un fungicida y bactericida sistémico, con el fin de evitar contaminación.

Después de dos semanas de haber sido sembrados, los explantes presentan buena respuesta al medio de cultivo y crecimiento, así como una lenta formación de brotes a partir de explantes de hoja. (figura 36)



Figura 37. Establecimiento in vitro de explantes de geranio para propagación masiva.

Los explantes que fueron sembrados con anterioridad en el medio MS enriquecido con reguladores de crecimiento presentaron formación de plántulas bien diferenciadas.

Las plántulas formadas fueron transferidas a un medio MS basal modificado con reguladores de crecimiento, a las siguientes concentraciones 2.5mg/l de bencil aminopurina y 6.5 mg/l de GA₃, esto con el fin de generar brotes adventicios, y el elongamiento de los mismos posterior a eso, las plántulas fueron colocadas en los cuartos de crecimiento, exponiéndolas a las condiciones de luz y temperatura cualeses adecuadas para su crecimiento.

Las plántulas presentaron deshidratación, esto causado por la alta concentración de giberelinas en el medio de cultivo, por eso fueron transferidas nuevamente a un medio MS basal para su recuperación.

Nuevos explantes de hoja fueron llevados al laboratorio de biotecnología para ser propagados, estos fueron sembrados en 4 litros de medio MS modificado con una auxina que es el ácido naftalenacético a una concentración de 1.0 mg/l y una citoquinina que es la kinetina a una concentración de 5.0 mg/l. La aplicación de los reguladores del crecimiento induce la producción de callo, el cual es una masa de células indiferenciadas, a partir de explantes de hoja, con fines de propagación masiva de esta especie

Los explantes que fueron sembrados con anterioridad en el medio MS basal presentaron formación de plántulas bien diferenciadas (figura 37).

Las plántulas formadas fueron colocadas en los cuartos de crecimiento, exponiéndolas a las condiciones de luz y temperatura adecuadas para su crecimiento.



Figura 38. Formación de plántulas generadas por explantes de geranio.

3.2 Anexos

3.2.1 Anexo I: Selección asistida con marcadores ligados a genes de resistencia a enfermedades en frijol

3.2.1.1 Presentación

El frijol es un cultivo de importancia alimenticia en Guatemala. Los problemas que afectan su producción son diversos, siendo los más importantes las enfermedades, especialmente roya, mosaico común, mosaico dorado, mancha angular y antracnosis. La Biotecnología es una herramienta científica aplicada que puede contribuir a introducir la resistencia genética a las enfermedades en variedades de frijol mejoradas. Esta actividad tiene el objetivo de contribuir en el mejoramiento genético del frijol con la inclusión de herramientas moleculares como la selección asistida por marcadores tipo SCAR ligados a genes asociados a características de interés (Sagastume *et al.*, 2011).

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. SCAR (Regiones Amplificadas Caracterizadas y Secuenciadas), descrita en 1993, es una técnica de marcadores moleculares que aprovecha fragmentos de ADN generados por otros marcadores moleculares y que están relacionados con una característica de interés. Estos fragmentos se clonan y secuencian para elaborar oligonucleótidos específicos. Esto permite el desarrollo rápido de marcadores moleculares relacionados con una característica genética de interés tales como resistencia a enfermedades. La metodología básica de su aplicación requiere de la extracción de ADN de interés, la amplificación por PCR y visualización de los patrones de banda en geles de agarosa.

La selección asistida disminuye considerablemente el tiempo de desarrollo de variedades que tienen fijado genes asociados a resistencia a enfermedades y plagas. Los resultados de la selección asistida permiten una liberación más rápida de nuevas variedades mejoradas. Estas variedades, al momento de su liberación, beneficiarán a los agricultores productores de frijol, que verán cómo adaptarse a las tecnologías innovadoras hace más rentable su cultivo.

3.2.1.2 Marco teórico

A. El frijol en Guatemala

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes en Guatemala, que, junto al maíz y arroz, constituyen la dieta básica de la mayoría de guatemaltecos. El promedio de consumo en Guatemala es de alrededor de 20 kg/año/persona. El frijol suple proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (especialmente hierro, fósforo, magnesio, manganeso, zinc, cobre y calcio).

Las proteínas del frijol son ricas en el aminoácido lisina, que en el maíz (*Zea mays* L.) es deficiente, por lo que los dos alimentos se complementan nutricionalmente muy bien para tener una dieta de proteínas balanceada. El frijol es fuente importante de proteínas en la dieta diaria del guatemalteco, por lo que se le ha llamado “la carne de los pobres”. nutritivamente, juega un rol muy importante en la dieta de los no privilegiados, provee de un 10 a 20% de los requerimientos nutritivos de una persona adulta. es un cultivo típico de pequeños agricultores de subsistencia, a menudo sembrado en pendientes de baja fertilidad (Sagastume et al., 2003).

El frijol en Guatemala, ha sido cultivado básicamente para autoconsumo, constituyendo la principal fuente de proteínas en el área rural. Esta condición es la que determina las características actuales del sector, en donde de acuerdo a la Encuesta Agropecuaria del MAGA, una alta proporción de la producción (53.42%), es realizada en unidades productivas menores de siete hectáreas (86.59% de las unidades productivas), que equivale al 66% del área cultivada, lo que significa una baja productividad por unidad de área. Los niveles de consumo varían de acuerdo con el estrato económico de los consumidores y su localización geográfica, de esta cuenta se tiene que en el área rural y estratos con bajo nivel de ingresos son los que consumen mayor cantidad de frijol por día (Masaya et al., 1984).

B. Virus del Mosaico Común del Frijol (BCMV Bean Common Mosaic Virus)

El virus del mosaico común del frijol (BCMV por sus siglas en inglés) es el agente causa de una de las peores enfermedades para la producción de frijol común, este potyvirus es transmitido no persistentemente por afidos y es también transmitido por semilla (McKern et al., 1992). Los síntomas causados por el BCMV pueden incluir una clorosis de la nervadura de la hoja, retraso en el crecimiento, mosaico y acoloramiento de la hoja y una reducción severa en el rendimiento de la planta. Adicionalmente las cepas inductoras de necrosis del virus como la NL3 pueden inducir necrosis vascular en genotipos de frijol que contengan el gen dominante I, el cual condiciona la resistencia a las cepas que no inducen necrosis del virus (Drijfhout, 1978). El BCMV esta distribuido alrededor del mundo, no obstante las cepas inductoras de necrosis no se encuentran presentes en California y en la mayoría de Latinoamérica, pero están ampliamente distribuidas en África, Europa, y otras partes de Norte América.

La resistencia genética al virus es la única forma efectiva de controlar su transmisión, la resistencia al BCMV está condicionada por una serie de genes específicos para cada cepa (Drijfhout, 1978). El gen bc-3 condiciona resistencia a todas las cepas conocidas del BCMV, solo se conoce un alelo resistente recesivo en el locus, es de tener presente que este gen es la forma más efectiva de enfrentar el problema del virus cuando las cepas inductoras de necrosis están presentes. En un esfuerzo por inducir resistencia genética al BCMV en plantas de frijol seco, y con el fin de evitar la inoculación de cepas inductoras de necrosis para la identificación del gen bc-3 Johnson (et al. 1997) desarrollo un protocolo mediante un SCAR que nombró ROC11, para la identificación de genotipos portadores del gen en calidad homocigota recesiva para la resistencia genética y asegurar su introgresión sin comprometer la producción de frijol de la zona donde los fitomejoradores se encuentren.

C. Virus del Mosaico Dorado del Frijol (BGMV Bean Golden Mosaic Virus)

El virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) es la enfermedad viral más seria del frijol común en latinoamérica (Gálvez and Morales, 1989). El mosaico dorado del frijol es causado por un geminivirus (Maxwell et al., 1994) cuyo vector es a mosca blanca *Bemisia tabaci* (Bellows and perring) y *B. argentifolii* (Genn.). Se ha probado que la resistencia genética es una forma muy efectiva de control de la enfermedad (Beebe, 1994; Morales and Singh, 1991), las primeras variedades resistentes al BGMV los cuales son el ICTA Jutiapaneco, ICTA Ostua e ICTA Quetzal fueron desarrollados en una alianza entre el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA)

Estas variedades expresan un mosaico reducido y un rendimiento superior, resistencia derivada de "Porrillo Sintético" (G4495) y resistencia al moteado difuso de Turrialba 1, las nuevas variedades como Dorado (DOR 364), Don Silvio (DOR 482), y Turbo III, tienen una gran resistencia al virus del mosaico dorado obtenida de varias combinaciones de resistencias parciales derivadas de Porrillo Sintético, Turrialba 1, la resistencia parcial al mosaico de Garrapato (G 2402), y la tolerancia de Honduras 46 (G 4791), para las nuevas líneas y variedades con alta resistencia a BGMV es necesario hacer énfasis que contienen la fuente de resistencia parcial de Garrapato en su pedigree, la falta de expresión de síntomas de mosaico de esta misma fuente, adicionado a eso los estudios de herencia involucrando a la línea A429 han apuntado a que todo esto está condicionado a un único gen recesivo (Blair and Beaver, 1993),

A este gen se le asignó el nombre de *bgm-1*, a la fecha este gen es ampliamente usado como una fuente de resistencia parcial, es considerada parcial debido a la merma en el rendimiento y la deformación de la vaina que se observan a altas presiones del patógeno, la introgresión de este gen es un importante primer paso en la mejora de nuevas variedades resistentes al mosaico dorado del frijol, en conjunto con otras fuentes de resistencia de alto rendimiento (Beebe, 1994).

En un esfuerzo por inducir resistencia genética al BGMV en plantas de frijol, y con el fin de evitar la inoculación del virus en el campo mediante la liberación de moscas virulentas, la propagación del virus en zonas no afectadas, Urrea (et al., 1996) desarrolló un protocolo de identificación del gen bgm-1 basado en un marcador molecular del tipo RAPD íntimamente relacionado con el gen en mención, esto ha reducido significativamente la necesidad de retrocruzas para la introgresión del gen (Young and Kelly, 1996) llamando SR2 a dicho marcador molecular.

D. Roya del frijol común (*Uromyces appendiculatus*)

El Hongo causante de la roya del frijol, reduce consistentemente el rendimiento en frijol ejotero y de grano seco, las áreas más afectadas son las regiones tropicales y subtropicales húmedas de África y las regiones templadas de Norte y Sudamérica, en algunas áreas epidemias periódicas de roya reducen los rendimientos de frijol y dan como consecuencia la pérdida de una fuente primaria de proteína en la dieta, en Puerto Rico una merma del 75% del rendimiento en variedades susceptibles, fue observada como resultado de una epidemia de roya (Velez-Martinez et al. 1989). Más de 200 razas de *Uromyces appendiculatus* se conocen (Stavely and Pastor-Corrales 1989; Stavely et al. 1989; Stavely and Batra 1991).

La forma de control más económicamente viable de control del patógeno es la resistencia genética que presenta el hospedero, en el frijol común la resistencia a la roya es controlada por únicos genes dominantes (Stavely, 1984; Finke et al. 1986; Stavely and Pastor-Corrales 1989).

La resistencia piramidal monogénica ha sido propuesta como un medio para proveer la forma más estable y rentable de control para plantas cultivables, la epistasis entre los genes de resistencia a roya complican los esfuerzos piramidales, en consecuencia, el desarrollo de una pirámide de resistencia genética puede ser cara y consumir mucho tiempo debido a las indispensables pruebas de progenie, los marcadores moleculares

como los RAPDs, pueden ser utilizados para la selección indirecta de la progenie con genes de resistencia piramidales.

No obstante, la selección asistida por marcadores moleculares está limitada por la necesidad de una estrecha relación entre los loci de resistencia y los loci marcadores, los marcadores del tipo RAPD han identificado marcadores asociados a los genes de resistencia Up-2 (Miklas et al. 1993), Ur-3 (Haley et al. 1994), y al bloque de genes B-190, todos estos marcadores se encontraban en la fase de apareamiento de su gen de resistencia respectivo, los marcadores moleculares del tipo RAPD OAC2049 y OAE19890 fueron empleados juntos para diferenciar genotipos homocigotos y heterocigotos resistentes a la roya en una población procedente de una retrocruza para el gen Ur-11 (Johnson, et al. 1995)

E. Mancha Angular del Frijol (ALS)

La mancha angular del frijol común es una enfermedad causada por el hongo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., es una de las enfermedades más importantes del frijol común, ocasionando hasta un 69% de merma en la producción, en años recientes *P. griseola* se ha convertido en un patógeno de importancia económica en Bolivia, Centroamérica y México (Pastor-Corrales et al., 1998) el uso de variedades resistentes parece ser la estrategia más económica y ambientalmente efectiva para el control de la enfermedad, no obstante muchos autores han reportado variaciones patogénicas en *P. griseola* (Nietsche et al., 1998) un factor que limita el tiempo de vida de las variedades resistentes.

Debido a la creciente importancia de la mancha angular del frijol común, la determinación del número de genes de resistencia y el estudio de su mecanismo de herencia es esencial para el desarrollo de nuevas variedades resistentes, la herencia de la resistencia a este patógeno es controlada por uno, dos o tres genes dominantes o recesivos (Sartoro et al., 1999) varios marcadores moleculares asociados con genes de resistencia a

enfermedades en frijol común han sido identificados, dentro de estos marcadores, particularmente los del tipo RAPDs son conocidos por su problemas de reproducibilidad, principalmente entre diferentes laboratorios (Penner et al., 1993).

Por otro lado los marcadores de tipo SCAR (Sequence, Characterized, Amplified Regions) han sido propuestos como una alternativa para incrementar la reproducibilidad de la técnica RAPD, los SCAR son altamente específicos, Nietzsche (et al., 2000) identificó un marcador molecular asociado el gen de resistencia al mancha angular Phg-2 mediante el desarrollo del marcador molecular del tipo SCAR SN02, altamente reproducible, derivado de la cruce Rudá/Cornell 49-242.

3.2.1.3 Objetivos

A. General

Contribuir, mediante el empleo de herramientas moleculares, al mejoramiento genético del frijol.

B. Específico

Identificar genotipos con genes de resistencia a cuatro enfermedades, mancha angular (*Isariopsis griseola* (Sacc.)), roya (*Uromyces appendiculatus*) , virus del mosaico común (BCMV) y virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV).

3.2.1.4 Hipótesis

Existen marcadores moleculares tipo SCAR capaces de identificar genes de resistencia a cuatro enfermedades en frijol.

3.2.1.5 Metodología

A. Material vegetal

Se muestrearon cinco embriones provenientes de semillas de 12 líneas avanzadas de frijol provenientes de Puerto Rico y se analizaron genéticamente para determinar tolerancia a las enfermedades: virus del mosaico común del frijol (BCMV), virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV), roya y mancha angular (ALS).

B. Marcadores moleculares utilizados

El tipo de marcador molecular utilizado fue SCAR (Regiones Amplificadas Caracterizadas y Secuenciadas). (ver cuadro 24)

Cuadro 24. Marcadores moleculares tipo SCAR ligados a resistencia a enfermedades utilizados en frijol.

SCAR	Patógeno	Gen	Tamaño del producto de PCR (pb)	Secuencia del SCAR (Forward)	Secuencia del SCAR (Reverse)	Temperatura de Hibridación (°C)		
						F*	R**	Promedio
ROC11	BCMV***	<i>bc-3</i>	420 R	5'- CCA ATT CTC TTT CAC TTG TAA CC -3'	5'- GCA TGT TCC AGC AAA CC -3'	51.9	52.0	52
SR2	BGYMV****	<i>bgm-1</i>	530R/570S	5'- CAC AGC TGC CCT AAC AAA AT -3'	5'- CAC AGC TGC CAC AGG TGG GA -3'	53.5	62.6	58
SK14	Roya	<i>Uf-3</i>	620 R	5'- CCC GCT ACA CAC CAA TAC CTG -3'	5'- CCC GCT ACA CTT GAT AAA ATG TTA G -3'	57.8	54.0	56
SA14	Roya	<i>Uf-4</i>	1079R / 800S	5'- CTA TCT GCC ATT ATC AAC TCA AAC -3'	5'- GTG CTG GGA AAC ATT ACC TAT T -3'	51.8	52.9	52
SAE19	Roya	<i>Uf-11</i>	890 R	5'- CAG TCC CTG ACA ACA TAA CAC C -3'	5'- CAG TCC CTA AAG TAG TTT GTC CCT A -3'	55.5	55.7	55.6
SH13	Mancha Angular (ALS)	<i>Phg-1</i>	520 R	5'- GAC GCC ACA CCC ATT ATG TT -3'	5'- GCC ACA CAG ATG GAG CTT TA -3'	55.6	55.0	55.3
SN02	Mancha Angular (ALS)	<i>Phg-2</i>	890 R	5'- ACC AGG GGC ATT ATG AAC AG -3'	5'- ACC AGG GGC AAC ATA CTA TG -3'	54.9	54.4	54.65

*F = Foward

**R= Reverse

*** BCMV = Bean Common Mosaic Virus (Virus del mosaico común del frijol)

****BGYMV = Bean Golden Yellow Mosaic Virus (Virus del mosaico dorado del frijol)

C. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se procedió:

- En un mortero de porcelana se colocaron los embriones de cinco semillas de cada línea y se agregó 1 ml de Buffer de Extracción del kit de extracción de ADN de Biotecon Diagnostics.
- Con un pistilo se maceraron los embriones y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.6 ml.
- Se aplicó vortex durante 30 segundos.
- Los tubos Eppendorf se colocaron en baño de María, precalentado a 80°C, durante 30 minutos. Se agitó suavemente cada 10 minutos.
- Se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm.
- Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf.
- Se agregó 80 µl de la solución de trabajo de Proteinasa K (100 mg/5 ml de H₂O). Se mezcló suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- Se incubó a 72°C durante 10 minutos.
- Se agregaron 500 µl de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1). Se agitó suavemente durante 1 minuto y se esperó a que se separaran las dos fases. Se recuperó toda la fase superior posible (200 a 300 µl).
- Se agregaron 800 µL de Etanol absoluto o Isopropanol (almacenado a -20°C). Se esperó hasta que apareció el ADN (aproximadamente 5 minutos).
- Se recuperó toda la fase superior y se nivelaron todos los tubos a 1.5 ml con Etanol absoluto o Isopropanol.
- Se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm.
- Se descartó la fase líquida.
- Se resuspendió la pastilla de ADN precipitada en 100 µl de H₂O ultrapura y se almacenó a -20°C hasta su uso.

D. Cuantificación y calidad de ADN

Para cuantificar y determinar la calidad del ADN obtenido se procedió:

- Se agregaron 90 μl de H_2O destilada a la cubeta de cuarzo del espectrofotómetro Bio-Rad SmartSpec3000 y 10 μl de ADN de la solución de ADN extraído (dilución 1:10).
- Se leyó la absorbancia a 230, 260 y 280 nanómetros para determinar la cantidad y calidad del ADN. Se cuantificó el ADN con un factor de conversión $A_{260\text{nm}} 1.0 = 50.0 \mu\text{g/ml}$ (50 $\text{ng}/\mu\text{l}$).
- Se diluyó el ADN a 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ para las amplificaciones por PCR.

E. Mezcla de reacción de PCR

Para la mezcla de reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se utilizó GoTaq[®] G2 Green Master Mix que contiene ADN polimerasa, buffer de reacción (pH8.5), 400 μM de dATP, 400 μM de dTTP, 400 μM de dCTP, 400 μM de dGTP y 3 mM MgCl_2 (cuadro 25). El volumen final de reacción fue de 25 μl .

Cuadro 25. Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de los SCAR.

REACTIVO	Concentración Inicial	Concentración Final o Cantidad	Volumen de 1 Reacción
H_2O	-----	-----	2.5 μL
Iniciador Forward	10 μM	1 μM	2.5 μL
Iniciador Reverse	10 μM	1 μM	2.5 μL
GoTaq [®] G2 Green Master Mix	2X	1X	12.5 μL
ADN molde	50 $\text{ng}/\mu\text{L}$	250 ng	5 μL
Volumen final			25 μL

F. Amplificación mediante PCR

Los marcadores utilizados para determinar la tolerancia genética a enfermedades en líneas de frijol se amplificaron por medio de PCR convencional en placas de 96 pozos en un termociclador Marca Applied Biosystems Modelo Veriti. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos; después 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 segundos, seguido de hibridación a la temperatura de cada primer por 40 segundos y una elongación a 72°C por 2 minutos; terminando con una elongación final a 72°C por 5 minutos (cuadro 26).

G. Electroforesis

Después de la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.0% en 1X TBE (trizma base, ácido bórico y ácido etilendiaminotetraacético). Se corrieron en unidades de electroforesis horizontal a una potencia constante de 5 voltios por cada centímetro de gel hasta que el colorante hubiese llegado a tres cuartas partes del total del gel (4 a 6 horas). En todos los geles se incluyó una escalera de peso molecular de 50 pares de bases (50 bp DNA Ladder marca Caisson). Los geles se cargaron con 12 µl de productos de PCR. Todas las soluciones fueron recicladas un máximo de cinco geles.

Cuadro 26 Programa del termociclador para la amplificación de los genes de resistencia a enfermedades utilizando primers tipo SCAR.

Evento	Número de Ciclos	Temperatura(°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94	2'
Desnaturalización	34	94	10''
Hibridación		Según el primer	40''
Elongación		72	2'
Elongación final	1	72	5'
Finalización	1	4	Indefinido

H. Visualización de los productos amplificados

Para la visualización de los productos amplificados se utilizó tinción con bromuro de etidio. De una solución de bromuro de etidio que contenía 10 mg/ml se aplicaron 50 µl por litro de agarosa. Para la visualización se utilizó un transiluminador (3UV™) ajustado a 302 nm. Finalmente, se tomaron fotografías del gel y se analizaron con el programa de análisis de geles GelQuantNET®.

3.2.1.6 Resultados y discusión

Los resultados de las electroforesis de los siete marcadores moleculares utilizados, para cada una de las 14 líneas avanzadas evaluadas, se muestran en las figuras de la 1 a la 12. Para los marcadores SH13 y ROC11 ninguna línea mostró resistencia o la PCR no funcionó. Para tener seguridad de la amplificación de los fragmentos, se hubiese llevado a cabo, hubiese sido necesario correr un genotipo testigo resistente, por lo que se recomienda, para futuros experimentos, contar con los testigos positivos respectivos para cada marcador molecular. Esto para descartar falsos negativos y estar seguros de que la PCR está funcionando adecuadamente.



Figura 39. Marcadores SR2 y SK14.

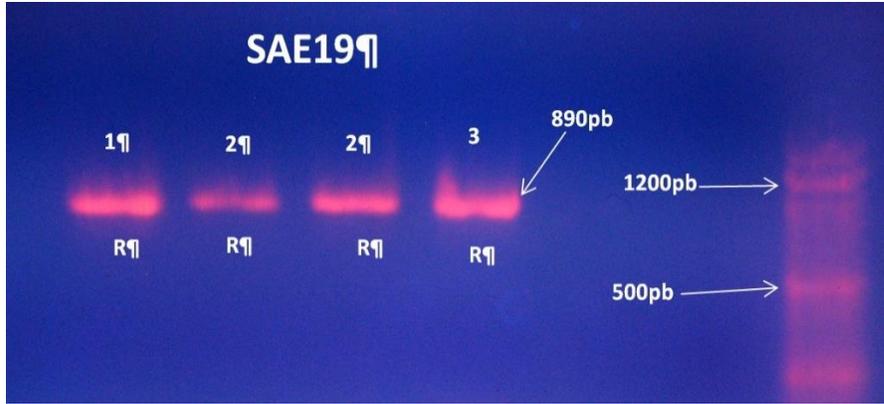


Figura 40. Marcador SAE19.

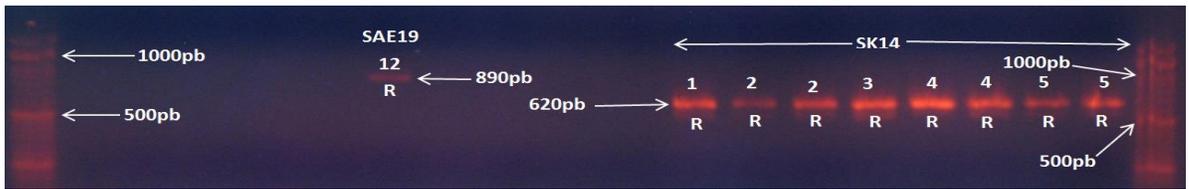


Figura 41. Marcadores SAE19 y SK14.

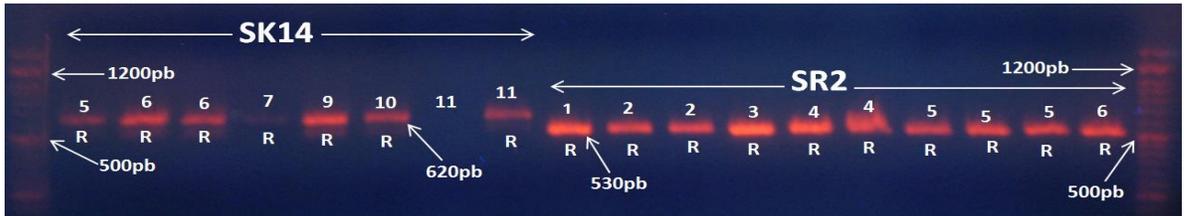


Figura 42. Marcadores SK14 y SR2.

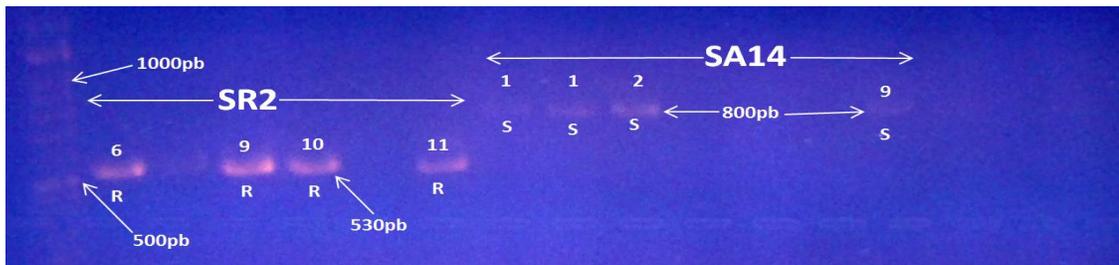


Figura 43. Marcadores SR2 y SA14.

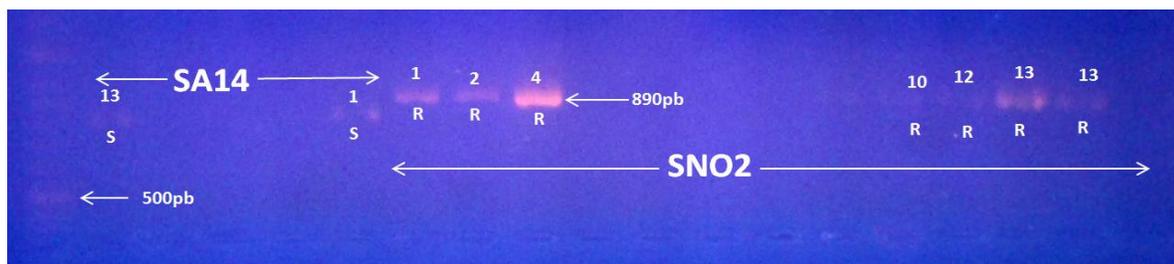


Figura 44. Marcadores SA14 y SNO2.



Figura 45. Marcadores SK14 y SAE19.

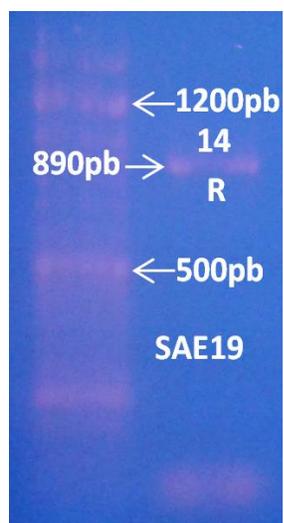


Figura 46. Marcador SAE19.



Figura 47. Marcadores ROC11, SNO2, SH13, SAE19, SK14 y SR2, para las líneas 8, 12, 13 y 14.

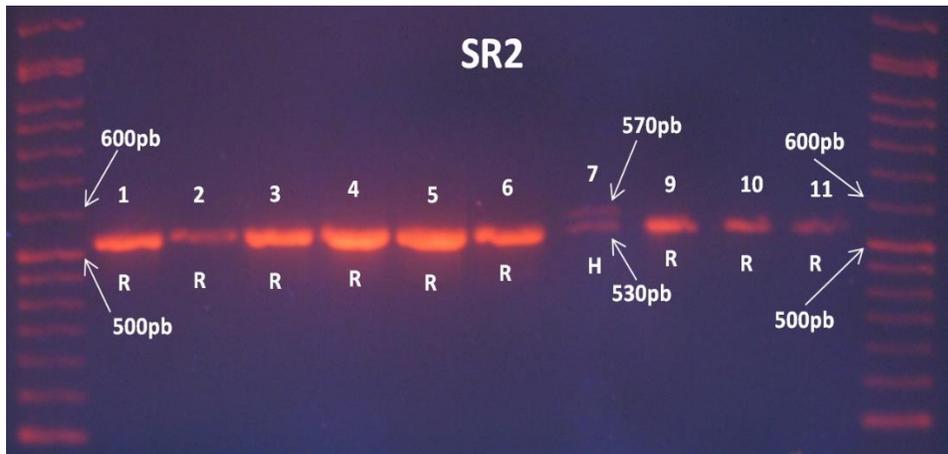


Figura 48. Marcador SR2.



Figura 49. Marcador SA14.

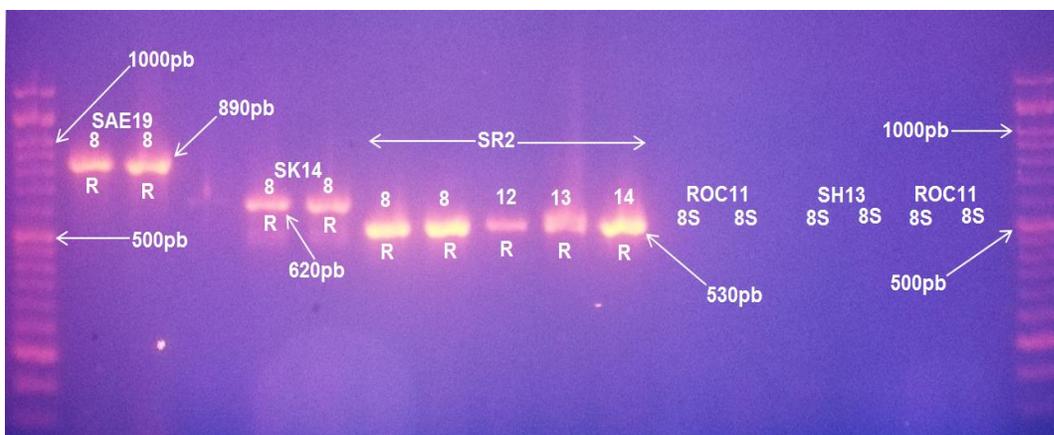


Figura 50. Marcadores SAE19, SK14, SR2, ROC11 y SH13 en las líneas 8, 12, 13 y 14.

En el cuadro 27 se resumen los resultados por línea y por marcador molecular. Se puede observar que nueve líneas fueron resistentes a mancha angular por el gen *Phg-2*. Las 14 líneas mostraron resistencia al virus del mosaico dorado (gen *bgm-1*), sin embargo las líneas 7 y 13 aún muestran segregación (son heterocigotas). Doce líneas fueron resistentes a roya (gen *Ur-3*). Seis líneas fueron resistentes a roya (gen *Ur-11*). Solamente tres líneas (4, 5 y 6) fueron resistentes a roya (gen *Ur-4*). En términos generales se puede decir que las 14 líneas avanzadas de frijol, provenientes de Puerto Rico, poseen cinco de siete genes de resistencia a enfermedades de interés para el fitomejoramiento en Guatemala.

Cuadro 27. Resumen de los resultados obtenidos en 14 líneas avanzadas de frijol provenientes de Puerto Rico.

LÍNEA	SN02 (mancha angular) <i>Phg-2</i>	SH13 (mancha angular) <i>Phg-1</i>	ROC11 (virus del mosaico común) <i>bc-3</i>	SR2 (virus del mosaico dorado) <i>bgm-1</i>	SK14 (roya) <i>Ur-3</i>	SAE19 (roya) <i>Ur-11</i>	SA14 (roya) <i>Ur-4</i>
1	R	S	S	R	R	R	S
2	R	S	S	R	R	R	S
3	R	S	S	R	R	R	S
4	R	S	S	R	R	S	R
5	S	S	S	R	R	S	R
6	S	S	S	R	R	S	R
7	S	S	S	H	R	S	S
8	R	S	S	R	R	R	S
9	R	S	S	R	R	S	S
10	R	S	S	R	R	S	S
11	R	S	S	R	R	S	S
12	R	S	S	R	S	R	S
13	R	S	S	H	S	S	S
14	S	S	S	R	R	R	S

R = resistente; S = susceptible; H = heterocigoto.

3.2.1.7 Conclusiones

- Las 14 líneas avanzadas de frijol, provenientes de Puerto Rico, poseen cinco de los siete genes de resistencia a enfermedades de interés para el fitomejoramiento en Guatemala.
- Nueve líneas fueron resistentes a mancha angular por el gen *Phg-2*.
- Las 14 líneas mostraron resistencia al virus del mosaico dorado (gen *bgm-1*), sin embargo, las líneas 7 y 13 aún muestran segregación (son heterocigotas).
- Doce líneas fueron resistentes a roya (gen *Ur-3*).
- Seis líneas fueron resistentes a roya (gen *Ur-11*).
- Solamente tres líneas (4, 5 y 6) fueron resistentes a roya (gen *Ur-4*).

3.2.1.8 Recomendaciones

- Se recomienda, para futuras investigaciones con los marcadores moleculares evaluados, contar con los genotipos testigos positivos. Esto servirá para evitar falsos negativos y corroborar que la PCR se llevó a cabo en buenas condiciones.

3.2.2 Bibliografía

1. Beebe, S. (1994). Breeding for resistance to bean golden mosaic virus: history and perspectives.
2. Blair, M. W., & Beaver, J. S. (1993). Inheritance of bean golden mosaic virus resistance from bean genotype A429. Annual report of the Bean Improvement Cooperative (USA).
3. Drijfhout, E. (1978). Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implication for strain identification and breeding for resistance (p. 98). Pudoc
4. Finke, M. L., Coyne, D. P., & Steadman, J. R. (1986). The inheritance and association of resistance to rust, common bacterial blight, plant habit and foliar abnormalities in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*, 35(3), 969-982.
5. Galvez, G. E., & Morales, F. J. (1989). Whitefly-transmitted viruses. *Bean Production Problems in the Tropics*, 379-408.
6. Haley, S. D., Afanador, L. K., Miklas, P. N., Stavely, J. R., & Kelly, J. D. (1994). Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(3-4), 337-342.
7. Johnson, E., Miklas, P. N., Stavely, J. R., & Martinez-Cruzado, J. C. (1995). Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. *Theoretical and applied genetics*, 90(5), 659-664.
8. Johnson, W. C., Guzmán, P., Mandala, D., Mkandawire, A. B. C., Temple, S., Gilbertson, R. L., & Gepts, P. (1997). Molecular tagging of the bc-3 gene for introgression into Andean common bean. *Crop Science*, 37(1), 248-254.

9. Masaya, S.; Díaz, C.; Salguero, V. 1984. Investigación y Producción de Frijol. ICTA-CIAT. Jutiapa. Guatemala, Guatemala. 449 p.
10. Maxwell, D. P., Gilbertson, R. L., Hanson, S. F., de Faria, J. C., Ahlquist, P., McLaughlin, W., & Morales, F. J. (1994). Genetic diversity of bean-infecting whitefly-transmitted geminiviruses.
11. McKern, N. M., Mink, G. I., Barnett, O. W., Mishra, A., Whittaker, L. A., Silbernagel, M. J., ... & Shukla, D. D. (1992). Isolates of bean common mosaic virus comprising two distinct potyviruses. *Phytopathology*, 82(9), 923-929.
12. Miklas, P. N., Stavely, J. R., & Kelly, J. D. (1993). Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(6-7), 745-749.
13. Morales, F. J., & Singh, S. P. (1991). Genetics of resistance to bean golden mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*, 52(2), 113-117.
14. Nietzsche, S., Borém, A., de Carvalho, G. A., de Paula Júnior, T. J., de Barros, E. G., & Moreira, M. A. (1998). FONTES DE RESISTÊNCIA À MANCHA-ANGULAR DO FEJOEIRO EM MINHAS GERAIS. *Ceres*, 45(262).
15. Nietzsche, S., Borém, A., Carvalho, G. A., Rocha, R. C., Paula Jr, T. J., De Barros, E. G., & Moreira, M. A. (2000). RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. *Journal of Phytopathology*, 148(2), 117-121.
16. Pastor-Corrales, M. A., Jara, C., & Singh, S. P. (1998). Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. *Euphytica*, 103(2), 161-171.
17. Penner, G. A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., ... & Fedak, G. (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *Genome Research*, 2(4), 341-345.

18. Sagastume, H.A.; Molina, L.; Ávalos, A. 2003. Caracterización molecular, mediante AFLP, de la colección de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) liberadas por el ICTA. FODECYT 15-01. Informe final. Guatemala, Guatemala. 75p.
19. Sagastume, H.A.; Ponciano, K.; Villatoro, J.; Carrillo, E. 2011. Validación de una metodología de Selección Asistida con Marcadores Moleculares en el mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para resistencia al virus del mosaico dorado (BGYMV-GA; Begomovirus, Geminiviridae). FODECYT 42-2008. Informe final. Guatemala, Guatemala. 45pp.
20. Sartorato, A., Nietsche, S., Barros, E. D., & Moreira, M. A. (1999). Inheritance of angular leaf spot resistance and RAPD markers linked to disease resistance gene in common beans. ANNUAL REPORT-BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE, 42, 21-22.
21. Stavely, J. R. (1984). Genetics of resistance to *Uromyces phaseoli* in a *Phaseolus vulgaris* line resistant to most races of the pathogen. *Phytopathology*, 74(3), 339-344.
22. Stavely, J. R., & Batra, L. R. (1991). Recently identified new pathogenic variability in *Uromyces appendiculatus*. *Phytopathology*, 81, 704.
23. Stavely, J. R., Steadman, J. R., & McMillan Jr, R. T. (1989). New pathogenic variability in *Uromyces appendiculatus* in North America. *Plant Disease (USA)*.
24. Stavely, J. R., & Pastor-Corrales, M. A. (1989). Rust. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
25. Urrea, C. A., Miklas, P. N., Beaver, J. S., & Riley, R. H. (1996). A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(6), 1035-1039.

26. Velez-Martinez, H., Lopez-Rosa, J., & Freytag, G. F. (1989). Determination of yield loss caused by rust [*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint.] in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Puerto Rico. *Annu Rep Bean Improv Coop*, 32, 134-135.

Ref. SAIEPSA-34.2018

Guatemala, 20 de agosto de 2018

TRABAJO DE GRADUACIÓN: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIEDADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L. LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A.

ESTUDIANTE: ALEX FERNANDO SOSA YUPE

No. CARNÉ: 201210589

Dentro del Trabajo de Graduación se presenta el Capítulo II que se refiere a la Investigación Titulada:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIEDADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L. LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A..”

LA CUAL HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Juan José Castillo Mont
Ing. Agr. Luis Montes Osorio
Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte

Los Asesores de Investigación, Docente Asesor de EPSA y la Coordinación del Área Integrada, hacen constar que ha cumplido con las normas universitarias y Reglamento de la Facultad de Agronomía. En tal sentido, pase a Decanatura.

“Id y enseñad a Todos”

Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte
Docente – Asesor de EPS



Vo. Bo. Ing. Agr. Silvel A. Elías Gramajos
Coordinador Area Integrada – EPS





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA - FAUSAC -
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
Y AMBIENTALES - IIA -



REF. Sem. 33/2018

EL TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIETADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A."

DESARROLLADO POR EL ESTUDIANTE: ALEX FERNANDO
SOSA YUPE

CARNÉ: 201210589

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Juan José Castillo Mont
Ing. Agr. Luis Montes Osorio
Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte

Los Asesores y la Dirección del Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales de la Facultad de Agronomía, hace constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y el Reglamento de este Instituto. En tal sentido pase a la Dirección del Área Integrada para lo procedente.

Ing. Agr. Luis Montes Osorio
A S E S O R

Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte
SUPERVISOR-ASESOR

Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
DIRECTOR DEL IIA

WNR/nm
c.c. Archivo



No. 45.2018

Trabajo de Graduación:	"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SEIS VARIEDADES DE FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) LIBERADAS POR EL ICTA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIPO MICROSATÉLITES (SSR), EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA (ICTA), GUATEMALA, C.A."
Estudiante:	Alex Fernando Sosa Yupe
Carné:	201210589

"IMPRÍMASE"


Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López
DECANO

