


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a blue background, depicting a figure on horseback. Above the shield is a golden crown. The shield is flanked by two golden lions. The entire emblem is surrounded by a circular border containing the Latin text "UNIVERSITAS CAROLINA ACADÉMIA COACTEMALENSIS INTER CETERAS QUAE CONSPICUA".

IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) PORTADORES DE MARCADORES LIGADOS A LA RESISTENCIA DE LA MANCHA ANGULAR (ALS), VIRUS DEL MOSAICO COMÚN DEL FRIJOL (BCMV) Y VIRUS DEL MOSAICO DORADO DEL FRIJOL (BGMV) MEDIANTE SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES (SAM) MOLECULARES EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL ICTA, GUATEMALA, C.A.

DENNISSE HONORIA LICARDIÉ JERÉZ

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2021

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES**

**“IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
PORTADORES DE MARCADORES LIGADOS A LA RESISTENCIA DE LA MANCHA
ANGULAR (ALS), VIRUS DEL MOSAICO COMÚN DEL FRIJOL (BCMV) Y VIRUS DEL
MOSAICO DORADO DEL FRIJOL (BGYMV) MEDIANTE SELECCIÓN ASISTIDA POR
MARCADORES (SAM) MOLECULARES EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
DEL ICTA, GUATEMALA, C.A.”**

TESIS

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

POR

DENNISSE HONORIA LICARDIÉ JERÉZ

En el acto de investidura como

**INGENIERA AGRÓNOMA EN
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADA**

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2021

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

RECTOR EN FUNCIONES

M.A PABLO ERNESTO OLIVA SOTO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

| | |
|-----------------------------|--|
| Decano | Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes |
| Vocal I | Dr. Marvin Roberto Salguero Barahona |
| Vocal II | Dr. Gricelda Lily Gutiérrez Álvarez |
| Vocal III | Ing. Agr. MSc. Jorge Mario Cabrera Madrid |
| Vocal IV | Br. Carmen Aracely García Pirique |
| Vocal V | P. Agr. Mynor Fernando Almengor Orenos |
| Secretario Académico | Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria |

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2021

Guatemala, noviembre de 2021

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

Distinguidos miembros:

De acuerdo con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración, el documento de graduación titulado:

**“IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
PORTADORES DE MARCADORES LIGADOS A LA RESISTENCIA DE LA MANCHA
ANGULAR (ALS), VIRUS DEL MOSAICO COMÚN DEL FRIJOL (BCMV) Y VIRUS DEL
MOSAICO DORADO DEL FRIJOL (BGYMV) MEDIANTE SELECCIÓN ASISTIDA POR
MARCADORES (SAM) MOLECULARES EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
DEL ICTA, GUATEMALA, C.A. ”**

Presentando como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el presente documento llene los requisitos necesarios para su aprobación, agradeciendo la atención prestada a la presente.

Atentamente

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”



DENNISSE HONORIA LICARDIÉ JERÉZ

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

MIS PADRES:

Dennis Emir Licardié Herrera.
Mayra Lorena Jeréz Santizo.

MIS HERMANAS:

Mayra Karina Licardié Jeréz.
Iris Amanda Licardié Jeréz.
Dennisse Stephanie Licardié Jeréz.

MIS ABUELOS:

Carlos Efraín Jeréz Motta (Q.E.P.D.).
Amanda Izabel Santizo Orellana.
Honoría Herrera.

TESIS QUE DEDICO

A:

DIOS.
MIS PADRES.
MIS HERMANAS.
MIS AMIGOS.
MIS TIOS Y PRIMOS.
MI CUÑADO.
MI SUPERVISOR Y ASESOR.
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS -ICTA-
FACULTAD DE AGRONOMÍA.
UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA.

AGRADECIMIENTOS

A:

Dios por brindarme sabiduría y entendimiento para lograr esta meta.

Mis padres gracias por su esfuerzo día a día para lograr esta meta, por ser ejemplo de lucha, perseverancia y responsabilidad, en realidad no hay palabras para agradecer su apoyo incondicional. Especialmente a mi mamá por cada madrugada, desvelada y la comida preparada durante estos años de mi carrera, eres todo lo que necesito en mi vida.

Mis hermanas por su apoyo en todo momento, por compartir conmigo en mis mejores momentos y celebrarlos a mi lado, por ser mis mayores ejemplos de superación, las amo.

Mis abuelos y abuelas por ser grandes ejemplos de superación y perseverancia, especialmente gracias a mi papi Carlos que siempre deseo ver este logro y sé que desde el cielo estás siendo presente, que Diosito te tenga en su santa gloria.

Mis amigos: Julio, Madelin, Vicente, Karla y Edu gracias a ustedes la carga universitaria fue menos pesada, fueron muy buenos y grandes momentos compartidos durante mi carrera universitaria, me siento muy bendecida por tenerlos en mi vida. Mis compañeros que me acompañaron durante mi vida universitaria, se le agradece porque de cada uno aprendí mucho e hicieron que la universidad fuera acogedora.

A la Facultad de agronomía por brindarme las herramientas para desarrollarme como una buena profesional. Mi supervisor Dr. David Monterroso y mi asesor Dr. Amílcar Sánchez por su orientación y asesoría en la realización de esta investigación.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas -ICTA- por darme la oportunidad de realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado -EPS- en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología. Gracias a la Ing. Agr. Gabriela Tobar por su paciencia y dedicación al transmitirme su conocimiento y experiencia en el tema de biología molecular. Gracias a la Licda. Suchini, Julieta y Myrian por la amabilidad, cariño y apoyo hacia mi persona.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PÁGINA

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN----- | 1 |
| 2. | MARCO TEÓRICO ----- | 3 |
| 2.1. | Marco conceptual----- | 3 |
| 2.1.1. | Origen del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)----- | 3 |
| 2.1.2. | Generalidades del frijol----- | 4 |
| 2.1.3. | Clasificación taxonómica ----- | 5 |
| 2.1.4. | Descripción morfológica ----- | 5 |
| 2.1.5. | Etapas fenología del cultivo ----- | 6 |
| 2.1.6. | Importancia del frijol en Guatemala----- | 7 |
| 2.1.7. | La genética del frijol----- | 8 |
| 2.1.8. | Mancha angular de la hoja (ALS) (<i>P. griseola</i>)----- | 9 |
| A. | Distribución geográfica----- | 9 |
| B. | Transmisión ----- | 9 |
| C. | Sintomatología----- | 9 |
| D. | Epidemiología----- | 10 |
| E. | Control----- | 11 |
| a. | Resistencia genética----- | 11 |
| b. | Control cultural ----- | 11 |
| c. | Control químico----- | 11 |
| 2.1.9. | Virus del mosaico común del frijol (BCMV) ----- | 12 |
| A. | Transmisión ----- | 12 |
| B. | Sintomatología----- | 12 |
| C. | Epidemiología----- | 13 |
| D. | Control ----- | 14 |
| a. | Resistencia genética----- | 14 |
| b. | Control cultural ----- | 15 |
| 2.1.10. | Virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) ----- | 15 |
| A. | Distribución geográfica----- | 15 |
| B. | Transmisión ----- | 15 |
| C. | Sintomatología----- | 16 |
| D. | Epidemiología----- | 16 |
| E. | Control----- | 17 |
| a. | Resistencia genética----- | 17 |
| b. | Control cultural ----- | 17 |
| 2.1.11. | Mejoramiento genético ----- | 17 |
| 2.1.12. | Retrocruzas ----- | 18 |
| 2.1.13. | Marcadores moleculares----- | 19 |

PÁGINA

| | | |
|---------|---|----|
| 2.1.14. | Marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol ----- | 20 |
| 2.1.15. | Selección asistida por marcadores (SAM) ----- | 21 |
| 2.1.16. | Marcadores moleculares tipo SCAR ----- | 21 |
| 2.1.17. | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ----- | 23 |
| A. | Desnaturalización ----- | 24 |
| B. | Ensamblaje ----- | 24 |
| C. | Hibridación ----- | 25 |
| D. | Extensión ----- | 25 |
| 2.1.18. | Electroforesis en gel de agarosa ----- | 26 |
| 2.2. | Marco referencial ----- | 28 |
| 2.2.1. | Localización del experimento ----- | 28 |
| 2.2.2. | Equipo ----- | 29 |
| A. | Mortero y pistilo ----- | 29 |
| B. | Tubos de microcentrífuga ----- | 29 |
| C. | Micropipetas ----- | 29 |
| D. | Puntas para micropipetas ----- | 29 |
| E. | Autoclave ----- | 30 |
| F. | Vortex ----- | 30 |
| G. | Centrífuga ----- | 30 |
| H. | Baño María ----- | 30 |
| I. | Espectrofotómetro ----- | 30 |
| J. | Placas para PCR ----- | 31 |
| K. | Termociclador ----- | 31 |
| L. | Cámara de electroforesis horizontal ----- | 31 |
| M. | Fuente de poder ----- | 31 |
| 2.2.3. | Descripción de las líneas de frijol ----- | 31 |
| A. | Las 80 líneas F3 de frijoles volubles que se utilizaron para la detección del gen de resistencia a la Mancha angular de la hoja (ALS) ----- | 31 |
| B. | Las 2 líneas de frijol que se utilizaron para la detección del gen de resistencia de Virus del mosaico común (BCMV) ----- | 34 |
| C. | Las 95 líneas F2 de frijol que se utilizaron para la detección del gen de resistencia de Virus del mosaico dorado (BGYMV) ----- | 34 |
| a. | ICTA Ligerito * Rojo de Papa (Resistencia en campo) ----- | 34 |
| b. | ICTA Ligerito * Rojo de Seda (Resistencia en campo) ----- | 35 |
| c. | ICTA Ligerito * Rojo de Seda (Suceptibles en campo) ----- | 35 |
| d. | ICTA Ligerito * Rojo de Papa (Suceptibles en campo) ----- | 36 |
| D. | ICTA Altense ----- | 37 |
| E. | ICTA Hunapú ----- | 37 |

PÁGINA

| | | |
|--------|---|----|
| F. | ICTA Ligero | 38 |
| G. | G10474 | 38 |
| 2.2.4. | Antecedentes | 38 |
| A. | Virus | 38 |
| a. | Virus del mosaico común (BCMV) | 39 |
| b. | Virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) | 40 |
| B. | Mancha angular de la hoja (ALS) (<i>Pseudocercospora griseola</i>) | 41 |
| 3. | OBJETIVOS | 42 |
| 3.1. | Objetivo general | 42 |
| 3.2. | Objetivos específicos | 42 |
| 4. | HIPÓTESIS | 42 |
| 5. | METODOLOGÍA | 43 |
| 5.1. | Material vegetal y genes para evaluar | 43 |
| 5.2. | Marcadores moleculares | 43 |
| 5.2.1. | Marcador SH13 | 45 |
| 5.2.2. | Marcador SNO2 | 45 |
| 5.2.3. | Marcador ROC11 | 45 |
| 5.2.4. | Marcador SW13 | 45 |
| 5.2.5. | Marcador SR2 | 45 |
| 5.2.6. | Marcador STARP | 46 |
| 5.2.7. | Marcador SW12 | 46 |
| 5.3. | Siembra y germinación de materiales | 46 |
| 5.4. | Colección de las muestras de tejidos | 46 |
| 5.5. | Extracción de ADN | 47 |
| 5.6. | Cuantificación de ADN | 48 |
| 5.7. | Mezcla de reacción de PCR | 48 |
| 5.8. | Amplificación mediante PCR | 49 |
| 5.9. | Electroforesis | 50 |
| 5.10. | Visualización de los productos amplificados | 51 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 52 |
| 6.1. | Resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) (<i>P. griseola</i>) | 52 |
| 6.1.1. | Marcador molecular SCAR SN02 | 52 |
| 6.1.2. | Marcador molecular SCAR SH13 | 56 |
| 6.2. | Resistencia al virus del mosaico común del frijol (BCMV) | 65 |
| 6.3. | Resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) | 68 |
| 6.3.1. | Marcador molecular SCAR SR2 | 68 |
| 6.3.2. | Marcador molecular STARP | 72 |
| 6.3.3. | Marcador molecular SCAR SW12 | 75 |

PÁGINA

| | | |
|-----|-----------------------|----|
| 7. | CONCLUSIONES ----- | 83 |
| 8. | RECOMENDACIONES ----- | 84 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA----- | 85 |
| 10. | ANEXOS----- | 95 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | PÁGINA |
|------------|---|--------|
| Cuadro 1. | Etapas fenológicas del frijol. | 6 |
| Cuadro 2. | Interacción genética entre cultivares de frijol y cepas del Virus del mosaico común del frijol. | 14 |
| Cuadro 3. | Esquema general tradicional de mejoramiento en plantas autógamas..... | 19 |
| Cuadro 4. | Linaje de la variedad ICTA Altense..... | 37 |
| Cuadro 5. | Linaje de la variedad ICTA Hunapú. | 38 |
| Cuadro 6. | Marcadores moleculares tipo SCAR ligados a resistencia a enfermedades utilizados en frijol. | 44 |
| Cuadro 7. | Protocolo de extracción de ADN, propuesto por Promega©..... | 47 |
| Cuadro 8. | Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de los SCAR. | 48 |
| Cuadro 9. | Programa del termociclador para la amplificación de los genes de resistencia a enfermedades utilizando primers tipo SCAR..... | 49 |
| Cuadro 10. | Protocolos específicos de programas del termociclador para los genes de resistencia a enfermedades en el cultivo de frijol. | 49 |
| Cuadro 11. | Preparación de gel grande de agarosa al 2 %..... | 51 |
| Cuadro 12. | Preparación de buffer TBE 5 X y 1 X..... | 51 |
| Cuadro 13. | Resultados de los marcadores moleculares SCAR para identificar la presencia del gen Phg-2 y Phg-1 para ALS en 80 líneas F3 de frijoles volubles..... | 59 |
| Cuadro 14. | Resultados de los marcadores moleculares SCAR para identificar la presencia del gen bc-3 y I para virus del mosaico común en dos líneas frijol. | 67 |
| Cuadro 15. | Resultados de la evaluación de 95 líneas F2 de frijol con los marcadores moleculares SCAR que indican la presencia de los genes de resistencia al Virus del mosaico dorado del Frijol (SR2, STARP y SW12 del gen bgm-1, CITUP 1 y Q TL mayor, respectivamente)..... | 80 |

ÌNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Localización de los hallazgos arqueológicos de <i>P. vulgaris</i> .----- | 4 |
| Figura 2. | Frijol común (<i>P. vulgaris</i>). ----- | 6 |
| Figura 3. | Fenología del frijol. ----- | 7 |
| Figura 4. | Lesiones características de la enfermedad mancha angular de la hoja en plantas de frijol. ----- | 10 |
| Figura 5. | Síntomas del virus mosaico común del frijol (BCMV). ----- | 13 |
| Figura 6. | Síntomas del virus mosaico dorado del frijol (BGYMV). ----- | 16 |
| Figura 7. | Generación de marcadores tipo SCAR. ----- | 22 |
| Figura 8. | Componentes básicos para la reacción PCR. ----- | 24 |
| Figura 9. | Proceso de la reacción PCR. ----- | 25 |
| Figura 10. | Electroforesis en gel de agarosa. ----- | 27 |
| Figura 11. | Mapa de ubicación del laboratorio de Biotecnología. ----- | 28 |
| Figura 12. | Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen Phg-2 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 53 |
| Figura 13. | Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen Phg-2 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 53 |
| Figura 14. | Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen Phg-2 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 54 |
| Figura 15. | Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen Phg-2 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 54 |
| Figura 16. | Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen Phg-2 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 55 |
| Figura 17. | Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen Phg-1 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 56 |
| Figura 18. | Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen Phg-1 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 57 |
| Figura 19. | Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen Phg-1 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 57 |
| Figura 20. | Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen Phg-1 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 58 |
| Figura 21. | Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen Phg-1 de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles. ----- | 58 |
| Figura 22. | Bandas generadas por el primer SW13 (690 pb) en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen I asociado a la resistencia al virus del mosaico común (BCMV). E. Escalera 1. ICTA Ligeró 2. Línea NSMC17524-12.----- | 65 |

- Figura 23. Bandas generadas por el primer ROC11 (420 pb) en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen bc-3 asociado a la resistencia al virus del mosaico común (BCMV). **E.** Escalera **1.** ICTA Ligerito **2.** Línea NSMC17524-12. -----66
- Figura 24. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. -----69
- Figura 25. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. -----69
- Figura 26. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. -----70
- Figura 27. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. -----70
- Figura 28. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. -----71
- Figura 29. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. -----71
- Figura 30. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) (110/115 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. -----72
- Figura 31. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. -----73

PÁGINA

- Figura 32. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 73
- Figura 33. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 74
- Figura 34. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 74
- Figura 35. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen bgm-1 que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 75
- Figura 36. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 76
- Figura 37. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 76
- Figura 38. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 77
- Figura 39. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 77
- Figura 40. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. ----- 78
- Figura 41. Amplificación con el marcador tipo SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. 78

PÁGINA

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 42A. | Líneas de frijol sembradas en el invernadero del laboratorio de Biotecnología del ICTA A. Líneas de frijol para la evaluación del gen de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) B. Líneas de frijol para la evaluación del gen de resistencia al virus del mosaico común (BCMV).----- | 95 |
| Figura 43A. | Colección del tejido vegetal. A. Colección de la primera hoja trifoliada B. Tubos de microcentrífuga identificados. ----- | 96 |
| Figura 44A. | Kit de extracción de ADN. ----- | 96 |
| Figura 45A. | ADN extraído de las líneas de frijol. ----- | 97 |
| Figura 46A. | Mezcla de la reacción de los PCR.----- | 97 |
| Figura 47A. | Termociclador empleado en el proceso de PCR. ----- | 98 |
| Figura 48A. | Preparación del gel de agarosa al 2 %.----- | 98 |
| Figura 49A. | Sistema de electroforesis horizontal empleado para la separación de fragmentos de ADN. ----- | 99 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AFLP | Amplified fragment length polymorphism |
| ALS | Angular leaf spot |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BCMV | Bean common mosaic virus |
| BGYMV | Bean golden yellow mosaic virus |
| CAPS | Cleaved amplified polymorphic sequence |
| cM | centimorgan |
| ICTA | Instituto de Ciencia y Tecnología agrícolas |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| QTL | Quantitative trait locus |
| RAPD | Random amplified polymorphic DNA |
| RFLP | Restriction fragment length polymorphism |
| SAM | Selección asistida por marcadores |
| SCAR | Sequence characterised amplified region |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SSR | Simple sequence repeats |
| TBE | Trizma base, ácido bórico y ácido etilendiaminotetraacético |
| µL | Microlitro |

IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) PORTADORES DE MARCADORES LIGADOS A LA RESISTENTES DE LA MANCHA ANGULAR (ALS), VIRUS DEL MOSAICO COMÚN DEL FRIJOL (BCMV) Y VIRUS DEL MOSAICO DORADO DEL FRIJOL (BGYMV) MEDIANTE SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES (SAM) MOLECULARES EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL ICTA, GUATEMALA, C.A.

IDENTIFICATION OF GENOTYPES OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) CARRYING MARKERS LINKED TO RESISTANT ANGULAR SPOT (ALS), BEAN COMMON MOSAIC VIRUS (BCMV) AND BEAN GOLDEN MOSAIC VIRUS (BGYMV) BY MOLECULAR MARKER-ASSISTED SELECTION (SAM) AT THE BIOTECHNOLOGY LABORATORY OF ICTA, GUATEMALA, C.A.

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los granos de gran demanda para la nutrición humana, además de ser un producto agrícola de gran importancia para los pequeños agricultores en Guatemala. Este cultivo es afectado; entre otras, por la mancha angular de la hoja (*Pseudocercospora griseola*), virus del mosaico común del frijol (BCMV) y virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV). Estas enfermedades ocasionan pérdidas significativas en el rendimiento y provocan la disminución de la calidad del grano.

La mancha angular de la hoja es una de las principales enfermedades del frijol en las regiones tropicales y subtropicales, causada por el hongo *P. griseola* (Sacc.) Ferraris.; el virus del mosaico común del frijol (BCMV) es una de las enfermedades más importantes transmitida por áfidos y semillas; y el virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*).

El objetivo de este estudio fue identificar genotipos que porten los marcadores asociado a los genes que confieren resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS), virus del mosaico común del frijol (BCMV) y virus del mosaico dorado del frijol (BGMYV) mediante el uso de la selección asistida por marcadores (SAM) moleculares en líneas de frijol, con los marcadores SCAR (Región amplificada de secuencia caracterizada por sus siglas en inglés) asociados a los genes *Pgh-1* y *Pgh-2* para ALS, *l* y *bc-3* para BCMV, y *bgm-1* y *QTL_{mayor}* para BGYMV.

El estudio incluyó 80 genotipos F3 de frijoles volubles, de las cuales 37 líneas mostraron presencia del marcador molecular SNO2 del gen dominante *phg-2* que confiere resistencia a la mancha angular de la hoja; 17 líneas presentaron el marcador SH13 del gen dominante *Pgh-1* que confiere resistencia a esta enfermedad; y 16 líneas de frijol presentaron los dos genes que confieren resistencia a dicha enfermedad.

Con el objetivo de evaluar la presencia de marcadores asociados a los genes que confieren resistencia al virus del mosaico común del frijol (BCMV), se utilizaron 2 genotipos de frijol, una línea avanzada NSMC17524-12 y la línea testigo que fue el ICTA Ligero, donde la línea NSMC17524-12 dio positiva para el gen *I*, pero negativa para el gen *bc-3* que confieren resistencia a dicha enfermedad. Mientras, ICTA Ligero confiere resistencia a ambos genes, *I* y *bc-3*, esto fue debido a que la variedad presenta resistencia a la enfermedad.

Se evaluaron 95 líneas F2 de la población ICTA Ligero x Rojo papa e ICTA Ligero x Rojo seda para seleccionar los genotipos que portan los marcadores asociados a los genes *bgm-1* y *QTL_{mayor}* que confieren la resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV). Se identificaron con el marcador SCAR SR2, 11 líneas portadoras del gen *bgm-1* y con el marcador STARP, se determinó que 40 líneas confieren resistencia al gen *bgm-1*. Además, con el marcador SW12 nos permitió identificar 80 genotipos portadores del *QTL_{mayor}* (Mapeo de loci de caracteres cuantitativos por sus siglas en inglés) que confieren la resistencia al BGYMV.

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*P. vulgaris*) es de origen mesoamericano y se encuentra dentro del grupo de las leguminosas más importante en América Latina, debido a su alta producción de pequeños productores. El frijol contiene un alto contenido de proteínas (18 % - 25 %), fibra (18 %), grasa (1.70 %), carbohidratos (61.40 %), vitaminas y minerales (CIAT, 1991; Bennink, 2005) que incorpora a la dieta alimenticia de la población. Además, el cultivo de frijol ocupa el tercer lugar en superficie sembrada superando únicamente por la soya (*Glycine max* (L.) Merr.) y el maní (*Arachis hypogea* L.). (Singh 1996)

Guatemala es el principal productor de frijol en Centroamérica, siendo el segundo grano básico más importante para los guatemaltecos, por ser un producto que forma parte en la seguridad alimentaria y nutricional en la población. Además, este cultivo ocupa una superficie del área potencial de uso agrícolas de 25.50 % (AKIANTO, 2012). De acuerdo con datos de la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL, 2011), el promedio de consumo de frijol por habitante en Guatemala es de 7.20 kg/persona/año.

En Guatemala la producción de frijol es afectada por diferentes enfermedades, entre ellos la mancha angular de la hoja (*P. griseola*), virus del mosaico común del frijol (BCMV) y virus del mosaico dorado del frijol (BGMV), que provocan una pérdida total en el rendimiento. El mejoramiento genético es una herramienta que permite el desarrollo de variedades con resistencia genética a estas enfermedades.

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas -ICTA- durante el periodo de tres meses, además esta investigación forma parte del Ejercicio Profesional Supervisado –EPS-, el cual es requisito previo para optar el grado de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, de la Facultad de Agronomía, de la Universidad De San Carlos de Guatemala.

El objetivo de este estudio fue identificar genotipos que porten los marcadores asociados a los genes que confieren resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS), virus del mosaico común del frijol (BCMV) y virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) mediante el uso de la selección asistida por marcadores (SAM) moleculares en líneas de frijol.

Para la selección de líneas de frijol resistentes a estas enfermedades se utilizaron marcadores moleculares tipo SCAR. Para la mancha angular de la hoja se utilizó el SCAR SH13 para el gen *Pgh-1* y el SCAR SNO2 para el gen *Pgh-2*. Para el virus del mosaico común del frijol se utilizaron el SCAR SW13 para el gen *I* y el SCAR ROC11 para el gen *bc-3*. Para el virus del mosaico dorado del frijol se utilizó el SR2 y STARP para el gen *bgm-1* y el SCAR SW12 para el *QTL*_{mayor}.

Además, la presencia o ausencia de los genes de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS), virus del mosaico común del frijol (BCMV) y virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) se determinaron mediante las etapas de extracción, cuantificación, dilución, amplificación, separación y visualización del ADN.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Origen del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El centro de origen del frijol común es el continente americano, basándose en importantes descubrimientos arqueológicos tanto en México y Centro América como en América del sur, se registró que este cultivo era conocido aproximadamente 5,000 años antes de la era cristiana (Debouck & Hidalgo, 1984).

Además, el frijol es uno de los cultivos más antiguos del nuevo mundo, en términos de métodos de cultivo, usos, adaptación, y variabilidad morfológica. (Broughton et al., 2003)

Hay evidencias que señalan que en toda Mesoamérica se sembraban los cultivos de frijol, maíz y calabaza, demostrando un rango de antigüedad de 300 años a 10,000 años (Voyses, 1983). Además, se cree que la distribución del frijol como alimento se extendió muy tempranamente en América, como lo indican los murales de los templos y pirámides del antiguo imperio Maya, donde se exhiben semillas de frijoles junto con las de maíz (*Zea Mays*, L).

Estos dos cultivos eran alimentos básicos que los indígenas preservaban como parte primordial de su alimentación, asimismo, estas plantas se usaron como medicinales, especialmente el frijol escarlata (*P. coccineus*). En la figura 1 se presenta la localización de los hallazgos arqueológicos del cultivo de frijol.



Fuente: Debouck & Hidalgo (1984).

Figura 1. Localización de los hallazgos arqueológicos de *P. vulgaris*.

2.1.2. Generalidades del frijol

El frijol común (*P. vulgaris*) se encuentra dentro del grupo de las leguminosas comestibles más importante en América Latina, debido a su alta producción y por su alto contenido de proteínas (18 % - 25 %), fibra (18 %), grasa (1.70 %), carbohidratos (61.40 %), vitaminas y minerales (CIAT, 1991; Bennink, 2005) que incorpora a la dieta alimenticia de la población.

El frijol se cultiva en todo el mundo; en las zonas tropicales, subtropicales y zonas templadas, y ocupa más del 90 % de las áreas de producción del género *Phaseolus*. (Singh S., 1996)

El frijol común es un cultivo de pequeños productores en regiones de América latina, África y Asia. Según Singh (1996) el frijol es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial, superado solamente por la soya (*Glycine max (L.) Merr.*) y el maní (*Arachis hypogea L.*). Aproximadamente, el 45 % de la producción mundial provienen de América Latina, siendo esta región la de mayor producción y consumo. (CIAT, 2000)

El grano de frijol posee un alto valor nutricional en sus cotiledones (CIAT, 1991), además, de ser un componente esencial para la población rural de los países productores más pobres o en vías de desarrollo.

2.1.3. Clasificación taxonómica

El nombre científico del frijol es *Phaseolus vulgaris* L. (The plant List, 2010). El frijol común es un miembro de la familia de las legumbres, y su jerarquía taxonómica es:

Orden: Fabales.

Familia: Fabaceae.

Género: *Phaseolus* L.

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

2.1.4. Descripción morfológica

La planta es de tipo herbácea anual y puede llegar a alcanzar alturas de 50 cm a 200 cm de altura. Pueden presentar cuatro hábitos de crecimiento: tipo I determinado arbustivo, tipo II indeterminado arbustivo, tipo III indeterminado postrado y tipo IV indeterminado trepador.

Posee un sistema radicular superficial de 20 cm de longitud del suelo, formado por la raíz principal y las raíces secundarias, donde se forman nódulos simbióticos con bacterias, principalmente del género *Rhizobium*. El tallo es herbáceo pubescente y presentan hojas de tipos simples y compuestas.

Las flores son hermafroditas y autofecundables. Se desarrollan en una inflorescencia de racimo que consta de pedúnculo, raquis, brácteas y botones florales. Las flores son de color blanco, crema, malva o rosado. El fruto es una vaina. Las vainas son generalmente glabras o subglabras, con pelos muy pequeños. (CIAT, 1984; FAO, 2018)

La semilla del frijol se origina de un ovulo campilótropo, de tal forma que no posee albumen, por lo que sus reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. En base a materia seca el 9 % representa la testa, los cotiledones representa un 90 % y el 1 % correspondiente al embrión. La semilla tiene diferentes formas, además su coloración externa varía mucho (Ruiz & Rincón, 1966). En la figura 2 se muestra el frijol común (*P. vulgaris*).



Fuente: Samayoa (2010).

Figura 2. Frijol común (*P. vulgaris*).

2.1.5. Etapas fenología del cultivo

El desarrollo de la planta del frijol comprende dos fases sucesivas la vegetativa y reproductiva. En el cuadro 1 y figura 3 se presentan las etapas fenológicas del frijol.

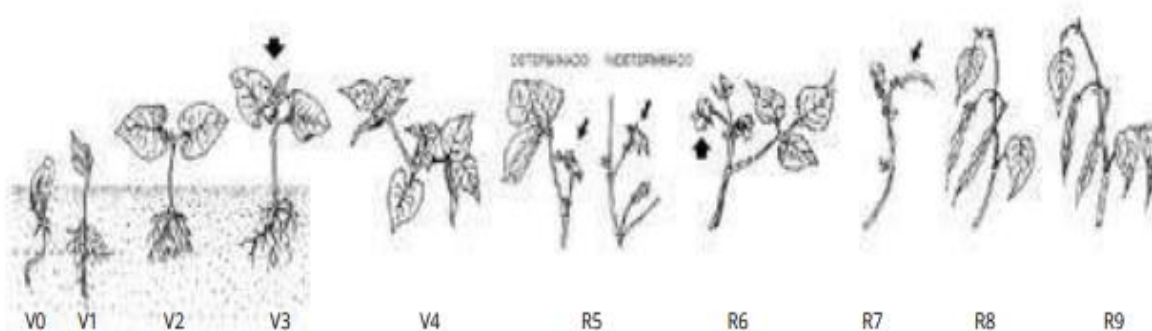
Cuadro 1. Etapas fenológicas del frijol.

| Fase | Código | Nombre | Evento en que se inicia cada etapa |
|------------|--------|-------------------------|---|
| Vegetativa | V0 | Germinación | La semilla está en condiciones favorables para su germinación. |
| | V1 | Emergencia | Los cotiledones del 50 % de las plantas aparecen a nivel del suelo. |
| | V2 | Hojas primarias | Las hojas primarias del 50 % de las plantas están desplegadas. |
| | V3 | Primera hoja trifoliada | La primera hoja trifoliada del 50 % de las plantas está desplegada. |
| | V4 | Tercera hoja trifoliada | La tercera hoja trifoliada del 50 % de las plantas está desplegada. |

Continuación cuadro 1.

| | | | |
|--------------|----|-------------------------|--|
| Reproductiva | R5 | Prefloración | Los primeros botones o racimos han aparecido el 50 % de las Plantas. |
| | R6 | Floración | Se ha abierto la primera flor en el 50 % de las plantas. |
| | R7 | Formación de las vainas | Al marchitarse la corola, en el 50 % de las plantas aparece por lo menos una vaina. |
| | R8 | Llenado de las vainas | Llenado de semillas en la primera vaina en el 50 % de las plantas. |
| | R9 | Maduración | Cambio de color en por lo menos una vaina en el 50 % de las plantas (del verde al amarillo uniforme o pigmentado). |

Fuente: CIAT (1986); FAO (2018).



Fuente: Yzarra & Lopez (2006).

Figura 3. Fenología del frijol.

2.1.6. Importancia del frijol en Guatemala

La prevalencia de desnutrición crónica en Guatemala es del 43.40 % (ENSMI 2008-2009), siendo la tasa más alta de América Latina. La región con mayor prevalencia es la noroccidental (64.80 %), presentando igualmente tasas significativas la región norte (51.10 %) y sur occidental (47.10 %). (Nicolò, Escobar, García, & Ortiz, 2010)

Guatemala es el principal productor de frijol en Centroamérica. Además, en el país aproximadamente el 50 % de la población se dedica a la agricultura (IPNI, 2009). El frijol ocupa una superficie del área potencial de uso agrícolas de 25.50 %, ya que este cultivo

forma parte de la seguridad alimentaria y nutricional de la población guatemalteca. Además, es cultivado en todo el país para autoconsumo, para el mercado, y es uno de los alimentos básicos de la población (AKIANTO, 2012).

De acuerdo con datos de la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL, 2011), el promedio de consumo de frijol por habitante en Guatemala es de 7.20 kg/persona/año.

Según el BANGUAT (2012) el cultivo de frijol ocupó en el año 2011 una superficie total de 231,000 ha, con una producción de 4.30 millones/qq equivalentes a 215,990 T métricas, el cultivo se exporta en una mínima proporción, ya que lo cultivado se dedica al consumo interno.

La producción de frijol es de 0.93 T/ha. El frijol negro es el más cultivado por los agricultores de bajo recursos económicos (AKIANTO, 2012). Según MAGA (2017) para el año agrícola 2016/2017 se estima que una producción de frijol de 5,640.40 miles/qq.

En Guatemala la producción de frijol se encuentra distribuida así: Petén (27 %), Jutiapa (13 %), Chiquimula (10 %), Santa Rosa (7 %), Jalapa (6 %), Quiché (5 %), Alta Verapaz (5 %), Huehuetenango (4 %), Guatemala (4 %), Chimaltenango (4 %) y el resto de los departamentos suman un 15 %. (MAGA, 2017)

2.1.7. La genética del frijol

El frijol es una especie predominantemente autógama. Es diploide que posee uno de los genomas más pequeños entre todas las especies de leguminosas, tiene aproximadamente 587 Mpb/genoma haploide. Además, tiene 11 cromosomas ($2n= 2x=22$), los cuales miden entre 1 mm a 3 mm, que pueden ser metacéntricos o submetracéntricos y poseen normal mitosis y meiosis.

Asimismo, el genoma de frijol presenta un 20 % de secuencias altamente repetidas (SSR) que se localizan principalmente en las regiones heterocromatina, y el ADN satelital se encuentra alrededor de los centrómeros. (Gepts, 2001)

2.1.8. Mancha angular de la hoja (ALS) (*P. griseola*)

La mancha angular de la hoja es causada por el hongo hemibiotrófico *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous y U. Braun [anteriormente conocida como *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferrari (Crous et al. 2006)], es una limitación importante en la producción de frijol común, pues causa pérdidas de rendimiento de hasta un 60 % y 80 %. (De Jesus et al., 2001)

A. Distribución geográfica

La mancha angular de la hoja ha sido reportada por lo menos en 60 países, casi todos localizados en zonas tropicales y templadas del mundo. (Saavedra, 2009)

B. Transmisión

Las esporas germinan en la superficie de la hoja después de 3 días en condiciones de humedad, la entrada del hongo es a través de las estomas y el avance en el tejido del hospedante es primero intercelular y luego intracelular, causando una lesión angular. (Monda, Sanders, & Hick, 2001)

La principal fuente de inóculo primario para la mancha angular de la hoja son los residuos de cosecha infestado por el patógeno. La forma en que se diseminan los conidios es a través de corrientes de aire y salpicaduras de lluvia. La semilla puede ser otro medio de diseminación. (Araya & Hernández, 2006)

C. Sintomatología

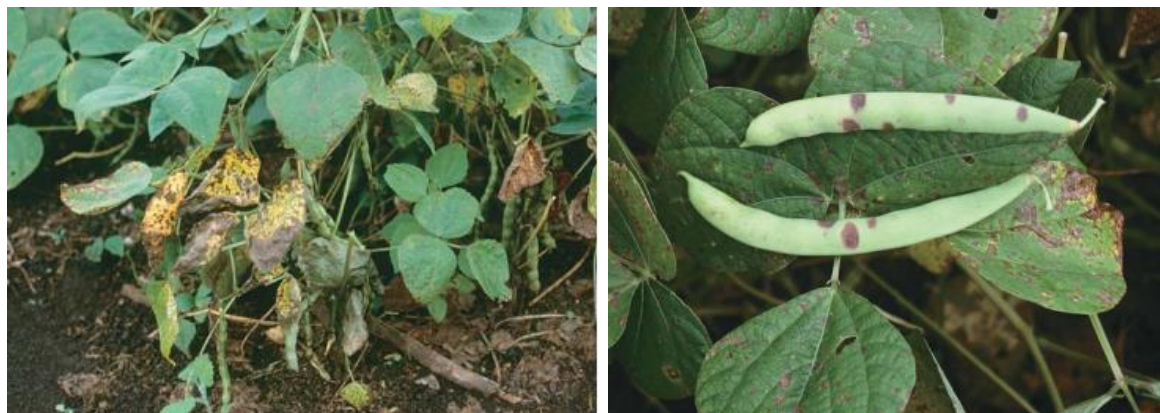
La mancha angular de la hoja puede cubrir gran parte del área foliar asociándose con diversos grados de clorosis. Además, ataca el follaje, las vainas y las semillas del frijol. En las hojas la enfermedad se inicia como pequeñas manchas de color gris brillante, que aumentan de tamaño y toman la forma de los ángulos de las venas.

En estado más avanzado la mancha toma color café oscuro y provoca la caída de las hojas desde el inicio de la floración hasta el final del ciclo vegetativo. (Araya & Hernández, 2006)

Campos-Ávila (1987), menciona que las vainas también pueden ser afectadas, ocasionando manchas casi circulares, superficiales y de color rojizo oscuro. En variedades que son muy susceptibles, el hongo afecta la semilla transformándola en un transmisor potencial de la enfermedad.

Las vainas infectadas pueden producir semillas mal desarrolladas o totalmente arrugadas. Además, se pueden presentar lesiones alargadas de color café en los tallos, ramas y pecíolos de la planta. (Schwartz & Gálvez, 1980)

En la figura 4 se presentan las lesiones características de la enfermedad en el cultivo de frijol.



Fuente: Araya & Hernández (2006).

Figura 4. Lesiones características de la enfermedad mancha angular de la hoja en plantas de frijol.

D. Epidemiología

Según Saavedra (2009) para el desarrollo de la enfermedad es necesario un período prolongado de clima cálido y húmedo junto con una fuente de inóculo. El hongo puede sobrevivir el invierno en semillas y como estroma en desecho de plantas en el suelo.

La infección y la esporulación ocurren en un amplio rango de temperatura, de 10 °C a 33 °C (Allorent & Savary, 2005) y con una alta humedad relativa del 80 % a 95 %. De este modo, las condiciones climáticas más favorables para una epifita son temperaturas templadas y lluvias o períodos de altas humedades lo suficientemente largos como para producir coremios e infección por conidios (3 días - 4 días), alternando con atmósferas secas y acción eólica para la dispersión de esporas. (Araya & Hernández, 2006)

E. Control

a. Resistencia genética

Los genes de resistencia contra la mancha angular de la hoja están controlados por los genes dominantes y recesivos, dependiendo de los parentales, actuando ya sea individualmente o por duplicado (Mahuku, Jara, Cajiao, & Beebe, 2003). La herencia de la resistencia está controlada por un solo gen recesivo (Santos-Filho & Ferraz, 1976), pero en un estudio anterior, se informó que la resistencia a la mancha angular de la hoja estaba controlada por un solo gen dominante.

Además, se han identificado varios genotipos como donadores de genes de resistencia, para el mejoramiento genético del frijol (Mahuku, Jara, Cajiao, & Beebe, 2003). La resistencia genética es la estrategia más eficiente para prevenir la pérdida de rendimiento considerando factores ecológicos y económicos (Miklas et al. 2006). Sin embargo, solo unos pocos genes de resistencia se han marcado con marcadores estrechamente relacionados.

Se han reportado diversas fuentes de resistencia a la mancha angular de la hoja en los genotipos de frijol, las cuales se encuentran: A 75, A 140, A 152, A 175, A 229, BAT 76, BAT 431, BAT 1432, BAT 1458 and G5686, MAR 1, MAR 2. (Ferreira et al., 2000)

b. Control cultural

Con el fin de disminuir los daños ocasionados por esta enfermedad, se recomienda la rotación de cultivos por un mínimo de dos años, la eliminación de residuos de cosecha en los cultivos donde se haya presentado la enfermedad, uso de semilla libre de patógeno y el uso de variedades resistentes. (CIAT, 1994; Trujillo, 2007)

c. Control químico

Aplicación de aspersiones foliares con una combinación de ferbam, azufre y un adherente, con zineb, con benomil (0.13 g/L a 0.25 g/L) y con tiofanato. (Saavedra, 2009)

2.1.9. Virus del mosaico común del frijol (BCMV)

El BCMV pertenece al género Potyvirus, es uno de los principales agentes virales reportados en el mundo, causante de una de las enfermedades más limitantes en la producción de frijol común en toda América Latina (Beebe et al., 2011).

Los áfidos son un importante vector en la propagación del virus en las zonas de producción de frijol y causan epidemias de BCMV (Kelly, 1992). En variedades susceptibles, el BCMV puede ocasionar pérdidas en el rendimiento entre 53 % y 83 %. (Sastry, 2013)

Las infecciones por BCMV pueden alcanzar hasta el 100 % de las plantas, aunque las pérdidas en rendimiento dependerán de la variedad de frijol, las condiciones ambientales, el tiempo de infección y de si la infección se origina por semilla o es dispersada por áfidos. (Mukeshimana, Hart, & Kelly, 2003)

A. Transmisión

Esta enfermedad puede ser transmitida por insectos (áfidos, mosca blanca, vaquitas o chicharritas). Dependiendo del insecto transmisor, la distribución de las plantas afectadas puede ser uniforme u homogénea.

Otra vía de transmisión del virus es a través del polen y es fácilmente transmitido por medios mecánicos (Araya & Hernández, 2006). También, se transmite generalmente a través de semillas infectadas, pero no todos los embriones infectados se convierten en una plántula infectada. (Ekpo & Saettler, 1974)

B. Sintomatología

Los síntomas que ocasionan este virus son variados y fácilmente se confunden con otras alteraciones como deficiencias nutricionales, toxicidades o efectos ambientales (Araya & Hernández, 2006).

Los síntomas más comunes son: un mosaico con áreas de color amarillo y verde oscuro, generalmente acompañados por un ampollamiento, distorsión y enrollamiento de las hojas hacia abajo (Mukeshimana, Hart, & Kelly, 2003).

Las vainas pueden ser más pequeñas de lo normal, con malformaciones y con un número menor de semilla (Conti et al., 2000). Asimismo, puede ocasionar otros síntomas como

epinastia, deformación de tallos, aborto de flores y reducción del rendimiento. (Reyes-Mancera et al., 2001)

En la figura 5 nos muestra los síntomas que ocasionan este virus en el frijol.



Fuente: Araya & Hernández (2006).

Figura 5. Síntomas del virus mosaico común del frijol (BCMV).

C. Epidemiología

La transmisión de BCMV por semilla es de hasta el 80 %, durante el desarrollo del cultivo el virus es dispersado por pulgones como *Macrosiphum solanifolii* (Ashmead), *M. pisi* (Kalt), *M. ambrosiae* (Thomas), *Myzus persicae*, *Aphis rumicis* L. *A. gossypii*, *A. medicaginis* Koch, *A. fabae*, *Acrytosiphum pisum*, *Hyalopterus atriplicis* (L.) y *Rhopalosiphum pseudobrassicae* Davis.

Por medio de investigaciones, se ha comprobado que algunas especies de áfidos como *Rhopalosiphum padi* (L.), *Schizaphis graminum* (Rondani) y *Sitobion avenae* (Fabricius), que usualmente no colonizan las plantas de frijol, pero pueden transmitir este virus. (APS, 1991; Halbert et al., 1994; Mukeshimana et al., 2003; Conti et al., 2000)

Los síntomas de la enfermedad tienden a enmascarse con temperaturas inferiores a 16 °C y superiores a 25 °C, mientras que en rangos de 20 °C a 28 °C se desarrollan rápidamente. Además, una población alta de áfidos puede incrementar la incidencia del virus hasta el 100 %. La eficiencia de la transmisión dependerá de la fuente del inóculo y la transmisión del virus. (Gálvez & Morales, 1989)

D. Control

a. Resistencia genética

El control genético del virus del mosaico común del frijol implica el uso de variedades tolerantes o resistentes, capaces de producir baja incidencia de la enfermedad sin sufrir pérdidas en el rendimiento. La resistencia al BCMV en frijol está condicionada por genes específicos contra ciertas cepas del virus (*bc-1*, *bc-2* y *bc-3*), por genes no específicos (*bc-u*) y principalmente, por el gen dominante *I* que condiciona la reacción de la planta a ciertas cepas del virus conocida como necrosis sistemática. (Drijfhout, 1978)

En cuadro 2 se presentan la interacción genética entre cultivares de frijol y cepas del virus del mosaico común del frijol.

Cuadro 2. Interacción genética entre cultivares de frijol y cepas del virus del mosaico común del frijol.

| Cultivar diferencial | Genes de resistencia | Cepa BCMV y genes de patogenicidad | | | | | | |
|----------------------|---|------------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------------|--|---------|---------|
| | | Tipo/ PO | Fla- NL6/ P1.1 ² | NY15- NL2/ P1.2 | NL3- NL5/ P1.1 ² .2 | NL4/ P1.1 ² .2 ² | NL7/ P1 | NL8/ P2 |
| Double While | I+ | + | + + | + + | + + | + | + | + |
| Lmuna | I+bc-u bc-1 | | + + | + + | + + | + | + | |
| RG-B | I+bc-u bc-1 ² | | + + | | + + | + | | |
| Michelie | I+bc-u bc-2 | | | + + | + + | | | + |
| Pino 114 | I+bc-u bc-1 bc-2 | | | + + | + + | | | |
| GN 31 | I+bc-u bc-1 ² bc-2 ² | | | | | + | | |
| Widusa | I | | + | | + + | | | + |
| Jubila | I bc-1 | | + | | + + | | | |
| Top Crop | I bc-1 | | + | | + + | | | |
| Amanda | I bc-1 ² | | | | + | | | |

Fuente: Morales (1979).

b. Control cultural

Samayoa, (2010) menciona que una de las medidas culturales para el control de esta enfermedad es manejar adecuadamente las fechas de siembra, es decir las fechas de siembra se deben programar, para reducir al mínimo el periodo en el que los cultivos susceptibles permanezcan expuestos a la infección por áfidos. Otra práctica, es el uso de semilla libre del virus.

2.1.10. Virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV)

El virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) es una enfermedad transmitida por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) es la enfermedad viral de mayor importancia en América Latina. El primer registro de este virus se hizo en Brasil (Costa, 1965). Este virus afecta el follaje del cultivo, produciendo un moteado intenso entre las venas, provocando pérdidas de rendimiento entre 40 % y 100 %. (Morales, 2000)

A. Distribución geográfica

Ampliamente distribuido en todo el mundo, sobre todo en aquellos lugares donde se cultiva frijol. Esta enfermedad se encuentra distribuida en todos los países centroamericanos, en Costa Rica apareció en 1960, en Nicaragua a inicios de 1970 y en Honduras fue identificado en los años 80, siendo una limitante en la producción de frijol en Costa Rica y Honduras en los años 1987 y 1990, respectivamente (Gámez, 1970). En México, el virus fue observado en 1977 y se ha reportado su diseminación a varias regiones productoras de frijol. (Morales, 1979)

B. Transmisión

Esta enfermedad es transmitida por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) de manera semi-persistente. Los adultos de *Bemisia tabaci* pueden adquirirse entre las plantas del cultivo o en las malezas del cultivo. Además, este virus no se transmite por medio de la semilla (Campos-Ávila, 1991).

C. Sintomatología

Los síntomas del virus del mosaico dorado son muy característicos: las hojas presentan un color amarillo intenso, generalmente acompañado de achaparramiento y prolongación de un periodo de vida de 2 semanas a 4 semanas más de lo normal. Además, si las plantas son afectadas antes de la floración, hay aborto prematuro de las flores y deformaciones de las vainas. Las semillas presentan manchas y deformaciones, y su peso disminuye. (Álvarez, 2018)

Morales (2000) menciona que los síntomas en las plantas afectadas con el virus aparecen en los primeros 17 días después de siembra, produciendo en promedio un 57 % menos de semillas.

En la figura 6 nos muestra los síntomas que ocasionan este virus en el cultivo.



Fuente: Álvarez (2018).

Figura 6. Síntomas del virus mosaico dorado del frijol (BGYMV).

D. Epidemiología

El virus afecta a los cultivos sembrados en zonas inferiores a 1,200 m s.n.m, donde las temperaturas son más altas, y las fuentes de inóculo y las poblaciones del vector son abundantes. (Álvarez, 2018)

E. Control

a. Resistencia genética

Dentro de su manejo de control se incluye el uso de variedades mejoradas genéticamente. Las variedades que se han servido como fuentes de resistencia han sido: ICA-Pijao, Turrialba 1 y Porrillo Sintético, todas de Mesoamérica. Estas fueron seleccionadas por el ICTA de Guatemala en 1974, trabajo supervisado por el CIAT de Colombia, que contemplaba la selección material con algún grado de resistencia al virus del mosaico dorado entre más de 600 accesiones del banco de germoplasma del frijol de CIAT (CIAT, 1996).

La fuente de resistencia aplicada ampliamente al virus del mosaico dorado del frijol es el gen recesivo *bgm-1* derivado del cultivar local Garrapato (México) que condiciona una resistencia parcial sin mosaico como respuesta al patógeno (Blair & Beaver, 1993). El gen que también evita la clorosis en las hojas es el gen recesivo *bgm-2* identificado en la línea andina DOR303. (Velez, Bassett, Beaver, & Molina, 1998)

b. Control cultural

Morales (2000) recomienda sembrar el frijol lejos de otros cultivos que son reservorios de mosca blanca, el tomate; controlar la mosca blanca; eliminar malezas o frijol voluntario que pueden conservar el virus.

2.1.11. Mejoramiento genético

Cubero (1999) menciona que las actividades de mejoramiento genético del frijol permiten el desarrollo de especies genéticamente superiores, las cuales pueden llevarse a cabo por distintos métodos de introducción, selección e hibridación.

En los programas de mejoramiento genético, es importante la edificación de padres donantes de genes necesarios de alta resistencia. Los padres donantes y líneas elites receptoras de genes se deben seleccionar y agrupar en las combinaciones que se van a cruzar; por ello, se debe tener información sobre las características morfológicas (adaptación, habito de crecimiento), y agronómicas (reacción de estrés hídrico y baja fertilidad del suelo, plagas y rendimiento) de los cultivares a mejorar.

Asimismo, se debe considerar la distancia genética entre los padres involucrados en cada cruce, sus relaciones y el origen evolutivo; como razas y acervo, tipo de semilla y los genes de resistencia de interés. (Singh, 1996)

Actualmente se han desarrollado varias investigaciones sobre el mejoramiento genético de *P. vulgaris* en México, América Central y el Caribe, esto gracias a las investigaciones conducidas desde 1980 por el Programa Cooperativo Regional del Frijol (PROFRIJOL) y el liderazgo científico del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). El enfoque del mejoramiento genético del frijol se ha dirigido al desarrollo de variedades con hábito de crecimiento arbustivo y con resistencias a las principales enfermedades.

2.1.12. Retrocruzas

Este método consiste en manipular un número limitado de genes intensivamente e introducirlos en una variedad o línea conocida. (Beebe & Pedraza, 1998)

Este método propuesto por Harland y Pope (1922), consiste en mejorar variedades que son sobresalientes para un buen número de características pero que son deficientes para una o pocas. Ha sido muy utilizado para incorporar resistencia a determinadas enfermedades en variedades cuya susceptibilidad puede comprometer la estabilidad de la producción.

Con este método se busca reducir la variación genética indeseable atribuida al silvestre, por medio de retrocruzamientos hacia el cultivado. Consiste en cruzar una variedad de interés que actúa como progenitor recurrente con otra variedad que presenta un carácter de interés, no presente en el parental recurrente. Los productos de cruzamiento que llevan el gen o los genes (F1) se retrocruzan con el parental recurrente.

Este proceso se repite con los productos de los retrocruzamientos, teniendo en cuenta que la cantidad de retrocruzamientos depende del grado de similitud entre los padres. (Camera, Chura, & Blas, 2015)

Según Cubero (1999) cada vez que se hace el retrocruzamiento con el parental recurrente se reduce a la mitad el aporte del germoplasma del donante. Asimismo, cualquier diferencia entre el parental cultivado y la línea avanzada puede ser atribuida, a los alelos derivados del parental silvestre o donantes. (Kelly et al., 2000)

En programas de retrocruzas, el uso de marcadores moleculares puede facilitar la elección de progenitores donadores de menor distancia genética del progenitor recurrente. Además, los marcadores pueden servir para identificar los genes que han pasado a las progenies, y

así seleccionar las plantas que servirán como padres en otro ciclo de retrocruzamiento. (Camera, Chura, & Blas, 2015)

En el cuadro 3 nos presenta el esquema general tradicional de mejoramiento en plantas autógamas.

Cuadro 3. Esquema general tradicional de mejoramiento en plantas autógamas.

| Fase | Generación | Observación |
|------|------------|---|
| I | AxB | Selección de progenitores, cruzamientos. |
| II | F1 | No hay selección. |
| III | F2 | Segregación y selección individual según los casos. |
| IV | F3, F4 | Métodos de selección extracción de líneas puras. |
| V | F5 | Prueba de líneas puras (F5). |
| VI | → | Selección familiar (F6, F7, F8). |
| VII | Fv | Obtención de la variedad mejorada (F9). |

FL = generación de líneas, FV = generación de variedades.

Fuente: Camera, Chura, & Blas (2015).

2.1.13. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares pueden estar localizados en regiones del ADN que codifican para un carácter (gen) o en regiones cuya función codificante no se conoce. (Stuber, 1989)

Los marcadores moleculares pueden ser utilizados para estimar la distancia genética entre genotipos y para orientar al mejorador en la elección de progenitores. Además, son utilizados en diversos estudios como la identificación de variedades, líneas puras e híbridos; estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos; determinación de las relaciones de parentesco; construcción de mapas de ligamiento genético, localización e identificación de genes y en programas de selección asistida por marcadores. (Muhamba et al., 2013)

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

Los tipos de marcadores moleculares de ADN son:

- Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados -AFLP- (del inglés: Amplified Fragment Length Polymorphism).
- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción -RFLP- (del inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism).
- Polimorfismo de ADN amplificado al azar -RAPD- (del inglés: Random Amplified Polimorphic DNA).
- Región Amplificada de Secuencia Caracterizada -SCAR- (del inglés: Sequence Characterised Amplified Region).
- Secuencia polimórfica amplificada y digerida -CAPS- (del inglés: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence).
- Microsatélites -ISSR- (del inglés: Simple Sequence Repeats).
- Polimorfismo de nucleótidos simples -SNP- (del inglés: Single Nucleotide Polimorphism).

Según Camera, Chura, & Blas (2015) los procedimientos generales en el uso de marcadores moleculares son:

1. Extracción de DNA.
2. Generación de polimorfismo.
 - Enzimas de restricción.
 - Reacción PCR.
 - Combinación de los 2 anteriores (enzimas de restricción y PCR).
3. Electroforesis (horizontal, y/o vertical).
4. Detección de los fragmentos.
 - Sondas marcadas.
 - Bromuro de etidio, UV.
 - Quimioluminiscencia.
 - Tinción en plata.
5. Autoradiografía y/o fotografía.
6. Evaluación de los fragmentos.
7. Análisis estadístico.

2.1.14. Marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol

Los marcadores moleculares han sido aplicados en el frijol para diversos fines, que incluyen estudios como: el origen y la diversidad de los diferentes cultivos de frijol (Gepts, Kmiecik, Pereira, & Bliss, 1988), patrón de domesticación (Koinange, Singh, & Gepts, 1996); y base

genética de la resistencia a enfermedades. (Yu, Stall, & Vallejos, 1998; Miklas, Delorme, & Riley, 2003)

El uso de los marcadores moleculares ha permitido el desarrollo de mapas genéticos, el análisis de genes y genomas, identificación varietal y la selección asistida por marcadores moleculares (SAM). Los marcadores más utilizados en el frijol son los RAPD y SCAR, con el fin de la identificación de genotipos resistentes a la antracnosis, bacteriosis, roya, mosaico común, mosaico dorado, mancha angular de la hoja, apion. (Adam-Blandom, Seignac, Bennerot, & Dron, 1994; Kelly & Miklas, 1998; Singh & Muñoz, 1997; Terán, 2000)

Se han utilizado varios tipos de marcadores moleculares para estos estudios, siendo los más comunes las alozimas, proteínas de la semilla, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), amplificación al azar ADN polimórfico (RAPDs), ADN polimórfico de longitud de fragmento amplificado (AFLPs), microsatélites (SSR) y repeticiones de secuencias inter-simples (ISSR). (Kour, 2010)

2.1.15. Selección asistida por marcadores (SAM)

La selección asistida por marcadores (SAM), se refiere al uso de marcadores moleculares para seleccionar aquellos individuos en una población dada, que son portadores de alelos específicos de interés para un carácter particular o para varios caracteres. Asimismo, permite seleccionar en cualquier momento del desarrollo de la planta, incluyendo el estado de semilla. (Hoisington, Listman, & Morris, 1998; Muhamba et al., 2013)

La selección asistida es una herramienta muy utilizada en programas de mejoramiento del frijol, ya que permite la selección indirecta de los caracteres en ausencia de la presión de selección para rasgos como la resistencia a enfermedades y plagas, así como la tolerancia al estrés abiótico. (Kelly, Geps, Miklas, & Coyne, 2003; Miklas, Kelly, Beebe, & Blair, 2006)

2.1.16. Marcadores moleculares tipo SCAR

Los SCAR (Región amplificada de secuencia caracterizada por sus siglas en inglés) son fragmentados de ADN genómico-localizados en un locus genéticamente definido e identificados por la amplificación vía PCR, utilizando un par de oligonucleótidos específicos como cebadores (iniciadores o primers). (Ferreira & Grattapaglia, 1998)

Según Beebe (1997), los SCAR pueden ser derivados por RAPD, RFLP, o AFLP. Utilizan cebadores de 22 nucleótidos a 24 nucleótidos, que consisten en clonar y secuencias los

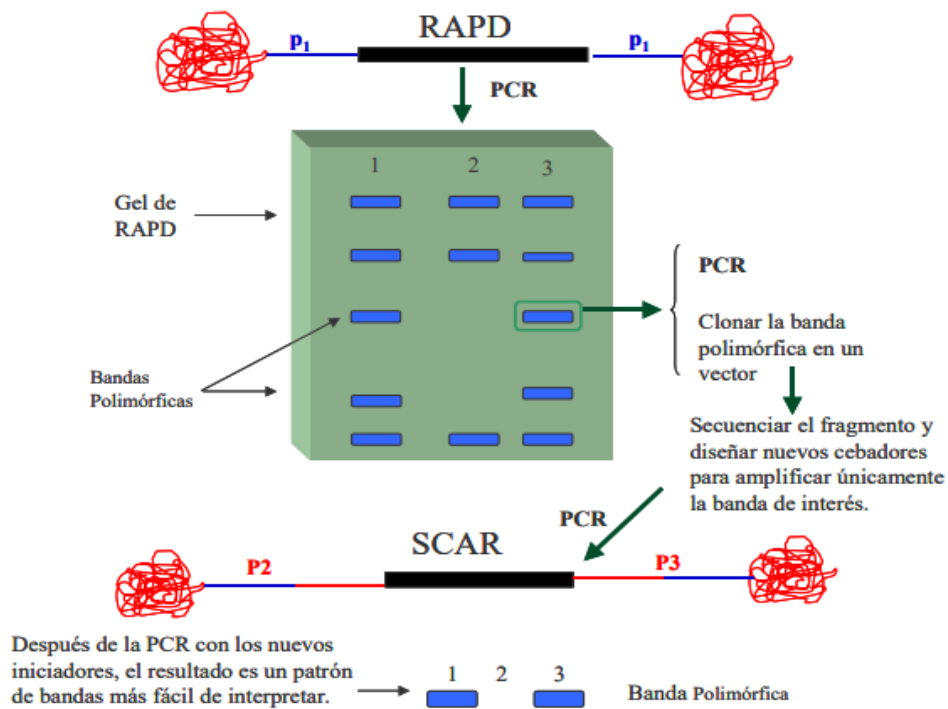
fragmentos de ADN procedentes de un marcador RAPD, y que permitan la amplificación por PCR de la banda de interés.

Estos marcadores son cada vez más utilizados, en los programas de mejoramiento genético de plantas e identificación de sexo en las plantas, ya que permiten separar fácilmente, especialmente si están muy ligados al gen o son parte del gen. (Muhamba et al., 2013)

Según García-Mas et al. (2003) las ventajas de un marcador SCAR son:

- Detección de un único locus.
- Su amplificación es menos sensible a las condiciones de reacción de la PCR.
- Posible conversión en marcadores codominantes.

En la figura 7 nos muestra la generación de marcadores tipo SCAR.



Fuente: Camera, Chura, & Blas (2015).

Figura 7. Generación de marcadores tipo SCAR.

2.1.17. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Innis, Gelfand, Sninsky, & White (1990) lo definen como una reacción cíclica dirigida enzimáticamente que permite la amplificación *in vitro* de una región del ácido desoxirribonucleico (ADN), localizada entre dos regiones de secuencia conocida.

Esta reacción utiliza dos oligonucleótidos que funcionan como iniciadores, que se hibridan a las cadenas opuestas de ADN de secuencia complementaria, flanqueando a la secuencia de interés. Los iniciadores, toman diferentes denominaciones, tales como oligonucleótidos, cebadores, primadores, amplimeros, detonadores o primers.

Estos iniciadores son moléculas de ADN de cadena individual y de longitud corta (10 nucleótidos - 30 nucleótidos), se hibridan complementariamente a las partes terminales o flancos de una secuencia específica de la cadena sencilla de ADN patrón, se efectúa la extensión de la amplificación por la ADN polimerasa, la enzima que cataliza la síntesis de cadenas largas de polinucleótidos.

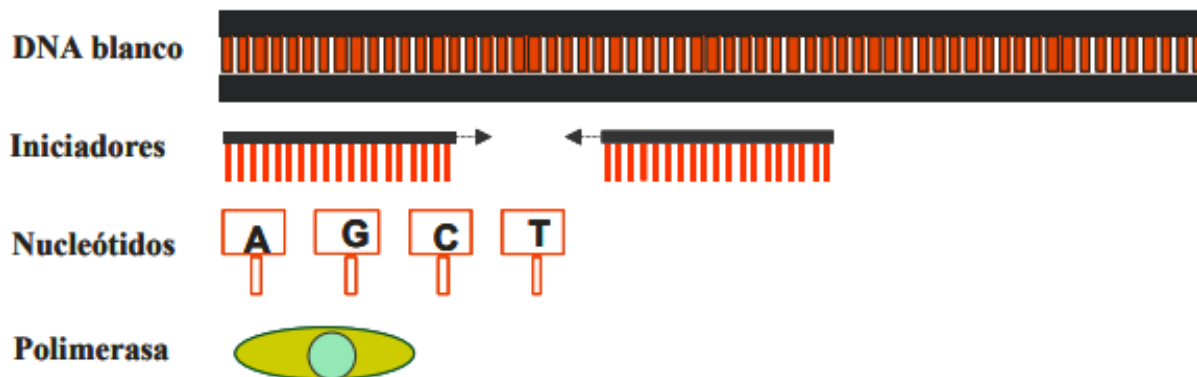
La síntesis se dirige incorporando monómeros de trifosfato de desoxinucleósido al grupo libre 3'-hidroxilo del iniciador en dirección 5'—>3', la polimerización se efectúa siempre del α -fosfato 5' del trifosfato de desoxinucleósido al grupo hidroxilo terminal 3' de la cadena creciente de DNA. Esto resulta en la síntesis de nuevas cadenas de DNA complementarias a las cadenas patrón iniciales. (Rincón., 2004; Cornejo, Serrato, Rendón, & Martha, 2014)

En cada ciclo de amplificación, las cadenas de ADN sintetizadas se convierten en un patrón para cualquier nuevo ciclo, donde la secuencia de ADN "objetivo" o "ADN blanco" se amplificará de manera selectiva ciclo tras ciclos. Teóricamente, los productos de amplificación del primer ciclo serían el resultado de la síntesis de ADN del patrón original, de longitud indefinida. (Camera, Chura, & Blas, 2015)

Según Rincón (2004) los componentes de la reacción del PCR son:

- Dos iniciadores sintéticos, que son regiones complementarias a las cadenas opuestas que flanquean a la región de ADN blanco que se desea amplificar.
- Una secuencia blanca en una muestra de ADN que este entre el par de primers, la cual puede ser de 100 pb a 5,000 pb.
- Una enzima, la ADN polimerasa termoestable que pueda resistir altas temperaturas de calentamiento (95 grados centígrados a más).
- Los cuatro deoxiribonucleótidos (dNTPs).
- Un buffer para darle las condiciones adecuadas al sistema en conjunto.

En la figura 8 nos presenta los componentes básicos para la reacción vía PCR.



Fuente: Camera, Chura, & Blas (2015).

Figura 8. Componentes básicos para la reacción PCR.

Según Camera, Chura, & Blas (2015) las etapas del ciclo de amplificación de PCR son:

A. Desnaturalización

La temperatura entre 90 °C a 96 °C provoca una desnaturalización completa del ADN genómico para permitir el ensamblaje posterior de los iniciadores. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20 s a 30 s, este tiempo dependerá de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por 3 enlaces, uno más que las bases de A-T.

Al final de esta etapa se tendrá las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

B. Ensamblaje

Periodo térmico que define el ensamblaje (alineamiento, anillamiento, anclaje) o hibridación de los iniciadores a la secuencia complementaria, entre 36 °C y 70 °C.

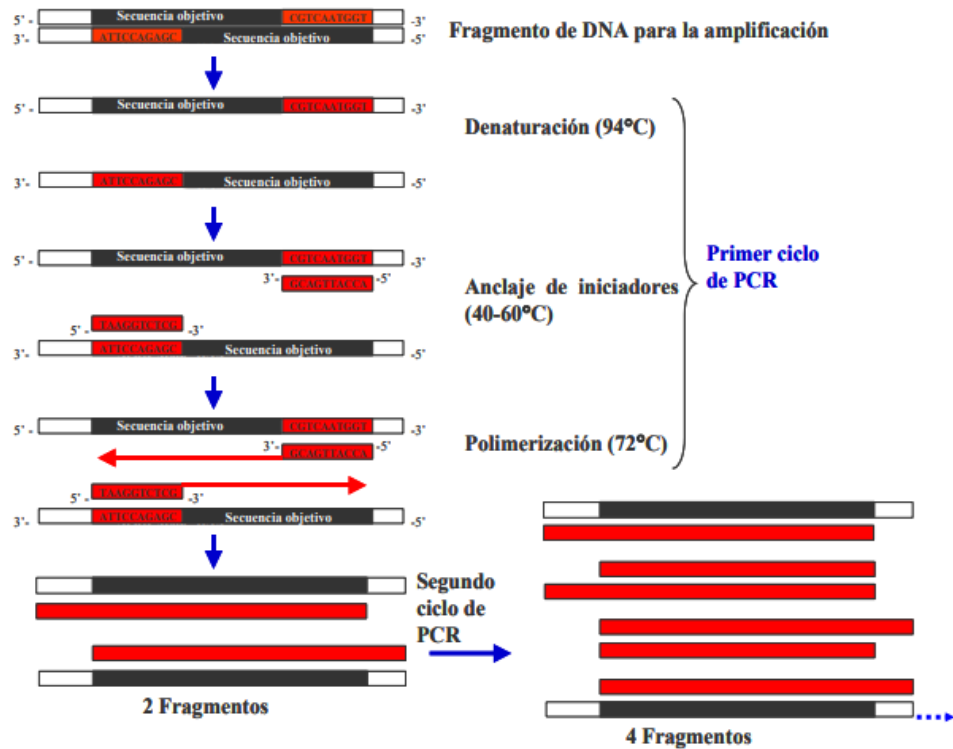
C. Hibridación

En esta fase, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima, esta generalmente oscila entre 50 °C a 60 °C.

D. Extensión

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; la extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis de ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima en los PCR es 72 °C, donde la Taq polimerasa tiene su mayor actividad catalítica.

En la figura 9 nos muestra el proceso de la reacción PCR.



Fuente: Camera, Chura, & Blas (2015).

Figura 9. Proceso de la reacción PCR.

2.1.18. Electroforesis en gel de agarosa

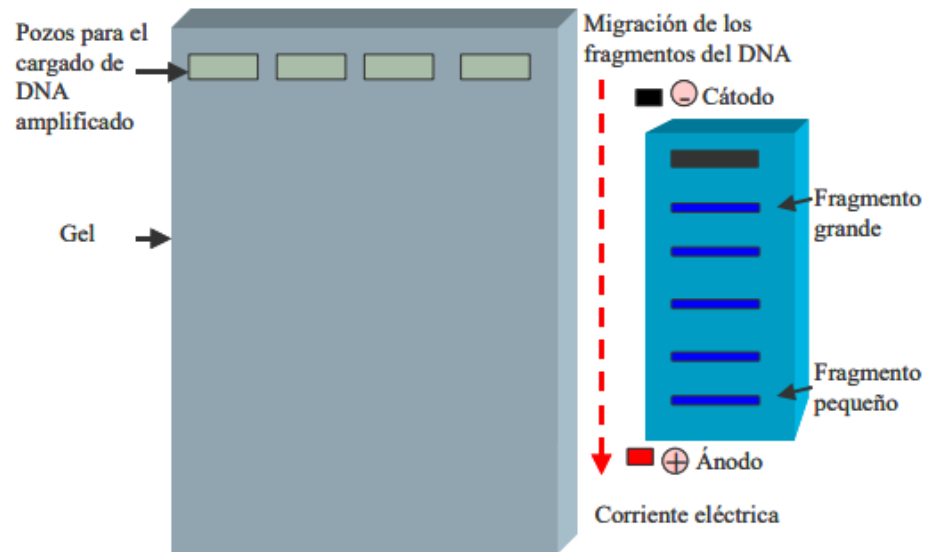
La electroforesis consiste en separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño y carga eléctrica. Se visualiza mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. También se puede extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

En esta técnica utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas y que se separen a través del gel. Los poros del gel actúan como un colador, permitiendo que las pequeñas moléculas se muevan más rápido que las grandes. Las moléculas cargadas son colocadas en un campo eléctrico, ellas migran hacia los polos, al positivo (ánodo) o al negativo (cátodo) según sus cargas. (Cornejo, Serrato, Rendón, & Martha, 2014)

La agarosa es un polisacárido lineal (con un peso molecular promedio de 12,000 Da) que se extrae de las algas marinas. Se utiliza típicamente en las concentraciones de 0.50 % a 2 %. Los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida. Este gel es muy fácil de preparar: se mezcla simplemente el polvo de agarosa con la solución tampón (buffer), se derrite calentando, y luego se vierte el gel. Este gel no es tóxico. Los geles tienen un rango grande de la separación, pero el poder de resolución es relativamente bajo. (Camera, Chura, & Blas, 2015)

Los geles de agarosa se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante. La electroforesis en gel de agarosa tiene un límite superior de unos 40 kb – 50 kb en el tamaño de las moléculas de ADN que puede separar. Los fragmentos del DNA de cerca de 200 pb a 50,000 pb se pueden separar usando técnicas electroforéticas estándares. (Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012; Cornejo, Serrato, Rendón, & Martha, 2014)

En la figura 10 nos presenta la electroforesis en gel de agarosa.



Fuente: Camera, Chura, & Blas (2015).

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa.

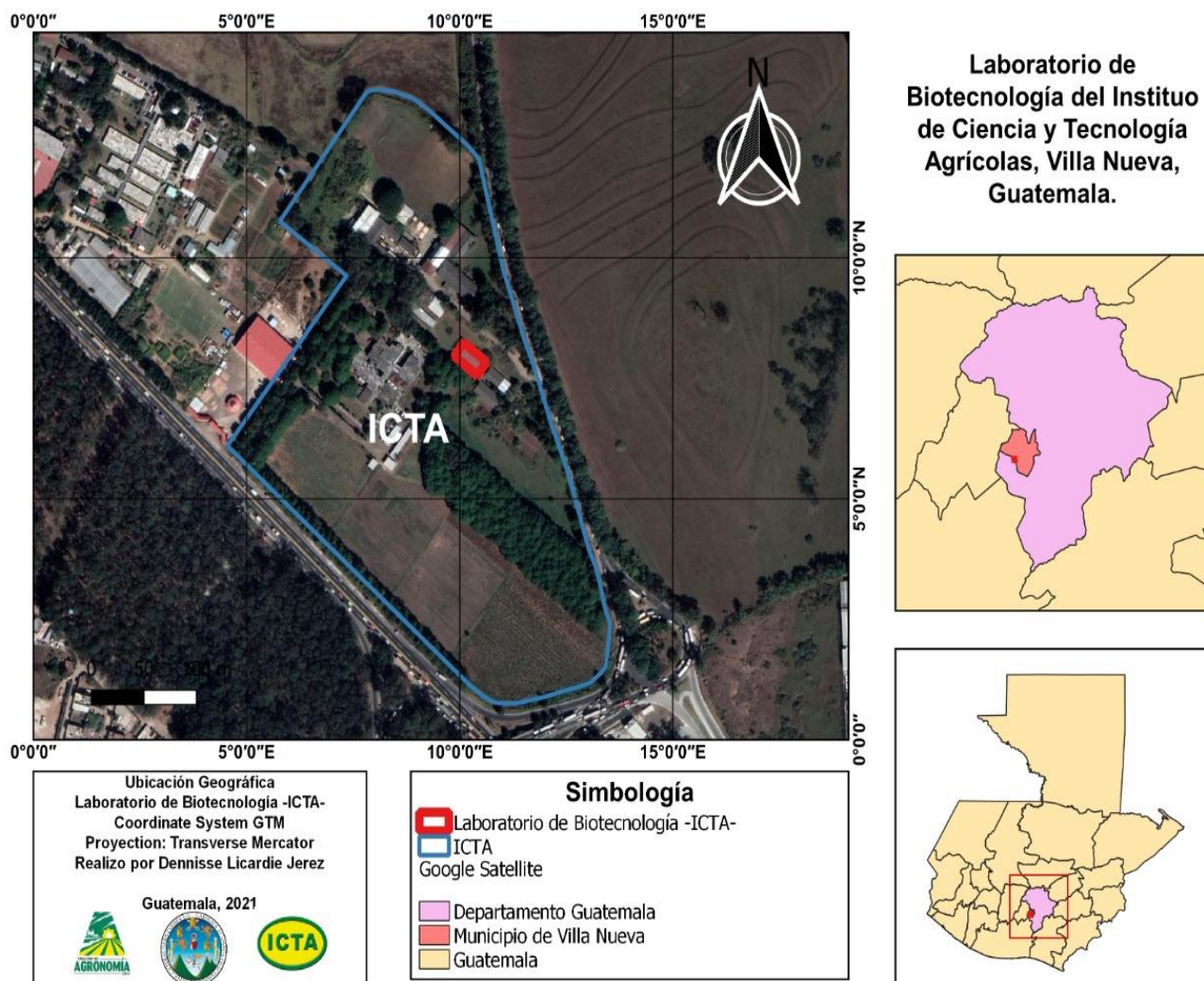
Según Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim (2012) la velocidad de migración de una molécula de ADN a través de un gel se determina por lo siguiente:

- El tamaño de la molécula de ADN.
- La concentración de agarosa.
- La conformación de ADN.
- La tensión aplicada.
- La presencia de bromuro de etidio.
- El tipo de tampón de electroforesis en agarosa.
- Después de la separación, las moléculas de ADN pueden ser visualizadas bajo luz UV después de la tinción con un colorante adecuado.

2.2. Marco referencial

2.2.1. Localización del experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas -ICTA-, ubicado en el kilómetro 21.5 carretera hacia Amatitlán, Bárcena, Villa nueva. En la figura 11 se muestra el mapa de ubicación del laboratorio de Biotecnología.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 11. Mapa de ubicación del laboratorio de Biotecnología.

2.2.2. Equipo

A. Mortero y pistilo

Se usaron morteros y pistilo para macerar las muestras del frijol, con el fin de extraer el ADN.

B. Tubos de microcentrífuga

Los microtubos para microcentrífuga resultan pieza clave para almacenamiento o procesamiento de casi cualquier muestra, ya sea para centrifugación, mezclas y otras aplicaciones. Se utilizaron tubos de microcentrífuga de 1.50 mL para el almacenamiento y procesamiento de muestras de ADN.

C. Micropipetas

Este utensilio es usado para absorber y transferir pequeños volúmenes de líquidos de forma segura y precisa. La unidad de medida de la micropipeta es el microlitro (μL), estas pueden medir de 2.5 μL , 10 μL , 20 μL , 200 μL y 1,000 μL . Se usaron micropipetas de la marca Eppendorf© y modelo Research Plus©, para medir distintos volúmenes de los reactivos a utilizar, también para medir volúmenes de ADN muy pequeños.

D. Puntas para micropipetas

Son puntas de plástico desechables, son empleadas para recoger el líquido a dispensar. Las puntas deben estar estériles, es por eso, se deben desechar para evitar contaminaciones en los líquidos.

Existen varios tipos de puntas para pipetear: las amarillas para volúmenes pequeños (10 μL) y las azules para volúmenes grandes (1,000 μL). En la investigación se utilizaron puntas para micropipetas de la marca Eppendorf© para medir volúmenes de los distintos líquidos a emplear, se usarán puntas de 10 μL , 200 μL y 1,000 μL .

E. Autoclave

Es un equipo que se utiliza para eliminar las impurezas y bacterias de cualquier material, utilizados como parte esencial en la esterilización de todo instrumento que en él se utiliza. Se utilizó para esterilizar los morteros y pistilos.

F. Vortex

Es un aparato que se utiliza para agitar tubos o frascos pequeños que contengan cualquier líquido. Se usó el vortex para el proceso de extracción de ADN, con el fin de mezclar los reactivos de las muestras.

G. Centrifuga

Es un aparato que consiste en generar movimientos de rotación, con el fin de separar los componentes que constituyen una sustancia. Se usó la centrifuga Eppendorf© Centrifuge 5430©, para el proceso de extracción de ADN, para separar por densidad los componentes del tejido vegetal.

H. Baño María

Es utilizado para calentar muestras sumergidas en agua a una temperatura constante durante un largo período de tiempo. Se usó el aparato de la marca PRECISION© 280 series Water Bath y el PRECISION© 180 series Water Bath para el proceso de la extracción de ADN, con el fin de separar los distintos componentes del tejido vegetal.

I. Espectrofotómetro

Se usó el espectrofotómetro BIO-RAD SmartSpex™3000 para determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN, basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.

J. Placas para PCR

Se utilizaron placas de PCR con 96 pozos de la marca Applied Biosystems© para realizar la amplificación de los segmentos de ADN.

K. Termociclador

Es un aparato que consiste en realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se usó el termociclador de la Marca Applied Biosystems©, Modelo Veriti© para amplificar los diferentes marcadores del tipo SCAR en las líneas de frijol, con el fin de su caracterización.

L. Cámara de electroforesis horizontal

La cámara 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 horizontal porque emplea exclusivamente geles de agarosa. Se usó la cámara de la marca Fisher Scientific© FB-VE16-1© esto con el fin de separar las diferentes bandas producidas por los marcadores de tipo SCAR en las líneas de frijol caracterizadas.

M. Fuente de poder

Se usó el modelo de Fisher Scientific© FB1000© para suplir de carga eléctrica, tanto negativa como positiva, a la cámara de electroforesis horizontal. Este aparato es capaz de programarse, para un tiempo y voltaje determinado.

2.2.3. Descripción de las líneas de frijol

A. Las 80 líneas F3 de frijoles volubles que se utilizaron para la detección del gen de resistencia a la Mancha angular de la hoja (ALS)

- ICTA ALTENSE/G2333 152-382-F5.
- ICTA ALTENSE/G2333 151-381-407.
- GUATE427/G2333 111-278-230-F5.

- GUATE539/G2333 121-296-F5.
- GUATE16/G2333 140-336-310-F5.
- GUATE306/G2333 148-358-F5.
- GUATE101/G2333 1-2-8 F5.
- GUATE28/G2333 6-16-35-F5.
- GUATE300/G2333 68-171-139-F5.
- GUATE304/G2333 81-212-171-F5.
- GUATE305/G2333 93-225-190-F5.
- ICTA ALTENSE/G10474 168-453-F5.
- ICTA ALTENSE/G10474 172-459-F5.
- ICTA HUNAPU/G10474 173-460-F5.
- GUATE305/G10474 94-226-190-F5.
- GUATE305/G10474 96-228-192-F5.
- GUATE305/G10474 97-229-192-F5.
- GUATE305/G10474 98-230-192-F5.
- GUATE305/G10474 99-231-194-F5.
- CH2019-89 Col.NAC.ARB Guate-560.
- CH2019-81 Col.NAC.ARB Guate-547.
- CH2019-83 Col.NAC.ARB Guate-550.
- CH2019-236 Col.NAC.ARB Guate-681.
- CH2019-53 Col.NAC.ARB Guate-421.
- CH2019-200 Col.NAC.ARB Guate-116.
- CH2019-190 Col.NAC.ARB Guate-89.
- CH2019-202 Col.NAC.ARB Guate-118.
- CH2019-78 Col.NAC.ARB Guate-542.
- CH2019-191 Col.NAC.ARB Guate-96.
- CH2019-73 Col.NAC.ARB Guate-537.
- CH2019-86 Col.NAC.ARB Guate-553.
- CH2019-46 Col.NAC.ARB Guate-388.
- CH2019-23 Col.NAC.ARB Guate-161.
- CH2019-90 Col.NAC.ARB Guate-561.
- CH2019-80 Col.NAC.ARB Guate-546.
- CH2019-24 Col.NAC.ARB Guate-167.
- CH2019-45 Col.NAC.ARB Guate-386.
- CH2019-189 Col.NAC.ARB Aguacatan-85.
- CH2019-154 Col.NAC.ARB Guate-1339.
- CH2019-209 Col.NAC.ARB kakakinac.
- CH2019-197 Col.NAC.ARB tac.tic 110.
- CH2019-163 Col.NAC.ARB vaina blanca.

- H2019-1 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-2 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-3 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-4 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-5 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-6 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-7 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-8 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-9 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-10 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-11 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-12 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-13 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-14 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-15 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-16 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-17 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-18 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-19 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-20 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-21 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-22 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-23 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-24 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-25 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-26 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-27 sel-Ind F2-3 G10474/HUNAPU.
- CH2019-28 sel-Ind F2-3 G10474/HUNAPU.
- CH2019-29 sel-Ind F2-3 G10474/HUNAPU.
- CH2019-30 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-31 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-32 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-33 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-34 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-35 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-36 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- CH2019-37 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU.
- Gorgojos PR103-129 progenitor 12.

B. Las 2 líneas de frijol que se utilizaron para la detección del gen de resistencia de virus del mosaico común (BCMV)

- ICTA Ligerero.
- NSMC17524-72.

C. Las 95 líneas F2 de frijol que se utilizaron para la detección del gen de resistencia de virus del mosaico dorado (BGMV)

a. ICTA Ligerero * Rojo de papa (Resistencia en campo)

- 1-21.
- 2-2.
- 2-20.
- 2-23.
- 2-47.
- 2-54.
- 3-11.
- 7-8.
- 7-25.
- 7-41.
- 7-52.
- 9-45.
- 10-1.
- 10-19.
- 12-37.
- 13-5.
- 13-47.
- 15-22.
- 16-46.
- 48-14.
- 18-31.
- 19-4.
- 19-7.
- 20-3.

b. ICTA Ligerio * Rojo de seda (Resistencia en campo)

- 1-7.
- 1-17.
- 3-18.
- 3-22.
- 5-13.
- 5-20.
- 5-25.
- 7-8.
- 7-16.
- 7-24.
- 8-4.
- 10-28.
- 10-21.
- 12-9.
- 15-10.
- 15-27.
- 17-26.
- 18-14.
- 18-15.
- 19-19.
- 21-3.
- 21-5.
- 23-6.

c. ICTA Ligerio * Rojo de seda (Suceptibles en campo)

- 1-5.
- 1-15.
- 3-10.
- 4-13.
- 6-10.
- 7-21.
- 8-11.
- 9-11.
- 10-10.
- 13-3.

- 14-12.
- 19-9.
- 16-3.
- 17-11.
- 20-15.
- 21-8.
- 22-2.
- 25-6.
- 26-4.
- 27-7.
- 28-7.
- 39-1.
- 41-8.
- 44-6.

d. ICTA Ligero * Rojo de papa (Suceptibles en campo)

- 1-2.
- 1-9.
- 3-21.
- 4-18.
- 5-6.
- 6-4.
- 6-12.
- 7-3.
- 9-1.
- 11-9.
- 12-11.
- 13-2.
- 14-8.
- 19-14.
- 20-19.
- 21-3.
- 24-2.
- 26-13.
- 34-11.
- 36-10.
- 40-9.

- 43-11.
- 43-14.
- 16-14.

D. ICTA Altense

Es una variedad de hábito de crecimiento de tipo arbustivo, tolerante a enfermedades como Roya, *Ascochyta* y antracnosis. Presentan vainas de color rosado y grano de color negro. Se cosecha entre los 120 días a 130 días después de la siembra. Rinde de 5.80 qq/cuerda a 6.30 qq/cuerda de 40 varas por lado (35 qq/mz a 38 qq/mz). Se adapta altitudes comprendidas entre 1,500 m a 2,300 m s.n.m. (ICTA, 1996). En el cuadro 4 nos muestra el linaje de la variedad ICTA Altense.

Cuadro 4. Linaje de la variedad ICTA Altense.

| Año | Cruzas | Aporte |
|------|-----------------------------|---|
| 1980 | A-230 X Guate-192 | Planta erecta con tolerancia a Roya, Antracnosis y <i>Ascochyta</i> . |
| 1983 | C-88 (Cruza simple) X a-175 | Tolerancia a Picudo de la vaina. |
| 1984 | C-160 (Cruza simple) | |
| 1989 | CH 89-10 (selección) | |
| | ICTA Altense | |

Fuente: ICTA (1996).

E. ICTA Hunapú

Es una variedad de hábito de crecimiento de tipo arbustivo, tolerante a enfermedades como roya, *Ascochyta* y antracnosis, también, presenta una buena arquitectura de planta, vainas de color morado y grano de color negro. Se cosecha entre los 120 días a 130 días después de la siembra. Rinde de 5 qq/cuerda a 6 qq/cuerda de 40 varas por lado (35 qq/mz). Se adapta a altitudes comprendidas entre 1,500 m a 2,300 m s.n.m (ICTA, 1996).

En el cuadro 5 nos muestra el linaje de la variedad ICTA Hunapú.

Cuadro 5. Linaje de la variedad ICTA Hunapú.

| Año | Cruzas | Aporte |
|------|--|--|
| 1980 | Negro Pacoc X A-261= C-132 (cruza simple) | Tolerancia a Ascochyta, Roya y Antracnosis; Precocidad. |
| 1988 | C132-4-CM-4-CM | Arquitectura. |
| 190 | ICTA HUNAPU | |

Fuente: ICTA (1996).

F. ICTA Ligero

Es una variedad de hábito de crecimiento de tipo arbustivo con resistencia a enfermedades como al virus del mosaico dorado, antracnosis, bacteriosis y roya. Es un cultivar precoz, de 71 días a cosecha y posee un rendimiento que varía entre 20 qq/mz y 30 qq/mz. Esta variedad se adapta bien a alturas de 1,200 m s.n.m, crece una altura de 60 cm y la floración ocurre entre 29 días y 30 días después de siembra, presentan vainas maduras de color crema y flores de color lila. (Gillespie, 1999)

G. G10474

Es una línea diferencial que presenta el gen *Phg-2* de resistencia a la mancha angular de la hoja. El G10474 es un pequeño germoplasma de frijol trepador de semillas rojas del altiplano de Guatemala que se identificó con altos niveles de resistencia a *P. griseola* en condiciones de campo en Darién y Santander de Quilichao. (Pastor-Corrales, Jara, & Singh., 1998)

Los otros códigos son líneas experimentales que presentan un buen rendimiento y una buena calidad del grano.

2.2.4. Antecedentes

A. Virus

Los primeros estudios sobre la genética de resistencia al virus del mosaico común (BCMV), y el virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) fueron realizados por Pierce (1935), quien demostró que existían dos tipos de resistencia: dominante y la recesiva.

Ali (1950) propuso la existencia de dos genes dominantes, uno requerido para la infección viral, y otro que condiciona una reacción de hipersensibilidad.

Además, describió los alelos recesivos de los genes que condicionan la susceptibilidad o resistencia del mosaico, esto dependiendo de la cepa viral. Andersen & Down (1954) y Petersen (1958) complementaron esta información para diferentes cepas del virus, además confirmaron la existencia de genes de resistencia específica a cepas del BCMV.

En el año 1974 se inició un proyecto desarrollado entre el CIAT y el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas -ICTA- de Guatemala, que permitió continuar con la búsqueda de resistencia genética para solucionar el problema del mosaico dorado amarillo del frijol en América Central, este proyecto consistió: primero en la identificación de fuentes de tolerancia, como Porrillo Sintético, ICA Pijao, y Turrialba 1, todas variedades de grano negro. Estas variedades fueron cruzadas entre sí, para desarrollar las primeras líneas liberadas en 1979: ICTA Quetzal, ICTA-Jutiapan, e ICTA Tamazulapa.

Posteriormente, el ICTA generó variedades más precoces a partir de las DOR originales, tales como el ICTA-Ostúa; la segunda generación de líneas tolerantes al mosaico dorado incluía por primera vez genotipos de diferente color de semilla, como la línea DOR 364, que presentan un grano color rojo oscuro. La tercera generación de materiales incluía nuevas fuentes de resistencia identificadas en condiciones de campo e invernadero. (CIAT, 1996)

a. Virus del mosaico común (BCMV)

Drijfhout (1978) descubrió la existencia de cinco genes de resistencia específicos, el *bc-1*, *bc-1²*, *bc-2*, *bc-2²*, y *bc-3*, y un gen no específico (*bc-u*), requerido para la expresión de los otros genes; además demostró que la mejor estrategia de control para el daño del virus es la combinación del gen *I* y el gen *bc-3*.

Temple & Morales (1985) demostraron que los colores rojos en la semilla de frijol estaban ligados a la susceptibilidad al BCMV, mientras que los colores rojos oscuros estaban estrechamente ligados al gen (*I*) de necrosis.

Melotto et al (1996) desarrollaron el cebador SCAR SW13, a partir del marcador RAPD OW13. El SW13 amplificó un solo fragmento de 690 pb ligado al gen dominante *I*, que permitió de manera más consistente la identificación de plantas resistentes al BCMV.

Además, se detectó la presencia del gen *I* usando SW13 en genotipos provenientes de diferentes acervos de genes del frijol, lo que indica una amplia utilidad de este marcador para los programas de mejoramiento del frijol.

Johnson, et al. (1997) desarrollaron el cebador SCAR ROC11, a partir del marcador RAPD vinculados al locus *bc-3*. El marcador ROC11/350/420 era codominante con el gen *bc-3* y el marcador ROC20/460 era dominante. Este cebador amplifica un solo fragmento de 420 pb, lo que permite la identificación del genotipo de plantas de frijol común en locus de resistencia a la enfermedad *bc-3*.

b. Virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV)

Blair & Beaver (1993) describieron el gen *bgm-1* como responsable de la resistencia al amarillamiento en A 429. Velez, Bassett, Beaver, & Molina, (1998) identificaron el gen recesivo *bgm-2* en la línea andina DOR303. Este gen evita la clorosis en las hojas y es una fuente diferente al gen *bgm-1* pero actúa de una forma muy similar.

Además, propusieron la presencia del gen dominante *Dwf*, este gen evita el achaparramiento de las plantas y es independiente de los demás genes de resistencia que se han encontrado.

Garrido-Ramirez, Sudarshana, & Gilbertson (2000) estudiaron la composición nucleotídica del BGYMV y, además, detectaron germoplasma originario de Mesoamérica resistente al virus. Miklas et al., (2000) encontró un *QTL_{mayor}* (SW12) en la línea DOR364, que genera una resistencia complementaria a *bgm-1*.

Román et al. (2004) identificaron el gen dominante *Bgp-1*, este gen evita el enrollamiento de las vainas, pero requiere de la presencia del gen *bgm-1* para poder expresarse.

Blair et al. (2007) desarrollaron un marcador de región amplificada caracterizada por secuencia codominante (SCAR-SR2), basado en un marcador de ADN polimórfico amplificado aleatorio (RADP-R2) previamente identificado al gen de resistencia *bgm-1*. El SR2 amplifico dos bandas a 570 pb y 530 pb, presentando resistencia en su combinación homocigota recesiva (*bgm-1/bg m-1*) y susceptibilidad en su combinación homocigota dominante (*Bgm-1/Bgm-1*) y heterocigota (*Bgm-1/bg m-1*) lo que permite la identificación de plantas resistentes al virus.

Rodríguez, Faure, Benítez, & Beebe (2007) identificaron el marcador *bgm-1* que confiere resistencia al BGYMV en líneas y variedades seleccionadas con buen comportamiento en campo.

B. Mancha angular de la hoja (ALS) (*Pseudocercospora griseola*)

Sartorato et al., (2000) describieron el locus de resistencia mesoamericano, *Phg-2*, identificado en México 54, este gen se encuentra en el cromosoma 8 a una distancia de 5,9 cM y 11,8 cM de los marcadores SN02 y OPE04, respectivamente. Además, este gen presenta alelos potencialmente resistentes en Cornell 49-424, BAT 332, MAR 2, G10474 y G10909.

Queiroz et al., (2004) y Gonçalves-Vidigal et al., (2011) describieron el locus *Phg-1*, identificado en AND277, este gen se encuentra en el cromosoma 1, a una distancia de 1.3 cM del marcador SH13.

Oblessuc et al. (2012), identificaron el QTL mayor *Phg-5*, presentes en dos cultivares andinos CAL 1443 Y G5686. Gonçalves-Vidigal et al., (2013) identificaron el locus mesoamericano, *Phg-3*, presente en el cultivar Ouro Negro, este gen está vinculado al marcador G2303 a una distancia de 0 cM. Keller et al. (2015), Identificaron el QTL mayor *Pgh-4*, presente en el cultivar andino G5686.

Según Souza et al. (2016), se han identificado seis genes de resistencia al ALS: *Phg-1*, *Phg-2*, *Phg-2²*, *Phg-3*, *Phg-4* y *Phg-5*. Los genes *Phg-1*, *Phg-4* y *Phg-5* son de origen andino, y los genes *Phg2* y *Phg-3* son de origen mesoamericano.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Identificar genotipos que porten los marcadores asociados a los genes que confieren resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS), virus del mosaico común del frijol (BCMV) y virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) mediante selección asistida por marcadores (SAM) moleculares en líneas de frijol (*P. vulgaris*).

3.2. Objetivos específicos

1. Identificar genotipos que portan los marcadores asociados a los genes que confiere la resistencia a la mancha angular de la hoja (*P. griseola*) en 80 líneas F3 de frijoles volubles.
2. Evaluar la presencia de los marcadores asociados a los genes que confieren resistencia al virus del mosaico común del frijol (BCMV) en 2 líneas de frijol.
3. Seleccionar genotipos que portan los marcadores asociados a los genes que confiere la resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) en 95 líneas F2 de frijol.

4. HIPÓTESIS

H1: Los marcadores moleculares de tipos SCAR permiten identificar la presencia del gen de resistencia a la mancha angular de la hoja (*Phg-1* y *Pgh-2*), virus del mosaico común del frijol (*I* y *bc-3*) y virus del mosaico dorado del frijol (*bgm-1* y *QTL_{SW12}*).

5. METODOLOGÍA

5.1. Material vegetal y genes para evaluar

Se utilizaron 177 líneas experimentales del programa de mejoramiento de frijol del ICTA. Estas muestras se diagnosticaron para los genes: *bgm-1*, y *QTL_{SW12}* (BGYMV), *I* y *bc-3* (BCMV), *Phg-1* y *Phg-2* (ALS).

5.2. Marcadores moleculares

Se utilizaron marcadores tipo SCAR para identificar resistencia a mancha angular de la hoja (*Phg-1* y *Phg-2*), virus del Mosaico común del frijol (*I* y *bc-3*) y virus del mosaico dorado del frijol (*bgm-1* y *QTL_{mayor}*).

En el cuadro 6 se presentan los marcadores moleculares tipo SCAR ligados a resistencia a enfermedades utilizados en frijol.

Cuadro 6. Marcadores moleculares tipo SCAR ligados a resistencia a enfermedades utilizados en frijol.

| Marcador molecular | Enfermedad | Gen o locus | Tamaño de banda (pb) | Secuencia Forward | Secuencia Reverse |
|--------------------|------------|----------------------------|----------------------|---|---|
| SH13 | ALS | <i>Phg-1</i> | 520 | 5'-GAC GCC ACA CCC ATT ATG TT -3' | 5'- GCC ACA CAG ATG GAG CTT TA -3' |
| SNO2 | ALS | <i>Phg-2</i> | 890 | 5'- ACC AGG GGC ATT ATG AAC AG -3' | 5'- ACC AGG GGC AAC ATA CTA TG -3' |
| ROC11 | BCMV | <i>bc-3</i> | 420 | 5'- CCA ATT CTC TTT CAC TTG TAA CC -3' | 5'- GCA TGT TCC AGC AAA CC -3' |
| SW13 | BCMV | <i>l</i> | 690 | 5'-CAC AGC GAC ATT AAT TTT CCT TTC-3' | 5'- CAC AGC GAC AGG AGC TTA -3' |
| SR2 | BGYMV | <i>bgm-1</i> | 530/570 | 5'-CAC AGC TGC CCT AAC AAA AT -3' | 5'- CAC AGC TGC CAC AGG TGG GA -3' |
| STARP | BGYMV | <i>bgm-1</i> | 110/115 | ----- | ----- |
| SW12 | BGYMV | <i>QTL_{major}</i> | 700 | 5'-TGG GCA GAA GTT CTA GCA TGT GGC -3' | 5' - TGG GCA GAA GCA CAG TAT GAT TTG -3' |

Fuente: Tobar & Suchini (2019).

5.2.1. Marcador SH13

Este primer amplifica una banda a una altura de 520 pb, que indica la presencia del gen dominante *Phg-1* para la resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS). (Queiroz et al. 2004)

5.2.2. Marcador SNO2

Este cebador identifica el gen *Phg-2* que indica resistencia a la mancha angular de la hoja. Presenta un tamaño de banda a 890 pb. (Nietsche et al. 2000; Miklas, 2002)

5.2.3. Marcador ROC11

Este primer indica la presencia del gen *bc-3* resistente al virus del mosaico común del frijol (BCM^V). Presenta un tamaño de banda de gen homocigota dominante a 420 pb. (Johnson et al. 1997)

5.2.4. Marcador SW13

Este cebador indica la presencia del gen *I* en los genotipos homocigotos dominantes o heterocigotas (*I/I* o *I/i*) en 690 pb confiriendo la resistencia al virus del mosaico común del frijol (BCM^V), y no muestra la presencia de la banda del gen homocigota recesivo (*i/i*). (Haley et al. 1994; Melotto et al. 1996)

5.2.5. Marcador SR2

Este primer indica la presencia del gen *bgm-1* resistente al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYM^V). Posee un tamaño de 530 pb / 570 pb por lo que es co-dominante, y expresa resistencia en 530 pb (homocigota recesivo *bgm-1/bg m-1*), susceptibilidad en 570 pb (homocigota dominante *Bgm-1/Bgm-1*) y cuando en las dos bandas están presentes (heterocigota *Bgm1/bg m-1*). (Urrea et al. 1996; Blair et al. 2007)

5.2.6. Marcador STARP

Este es un primer co-dominante que indica la presencia del gen *bgm-1* resistente al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV). Posee un tamaño de banda de 110 pb / 115 pb y expresa resistencia en 110 pb (homocigota recesivo *bgm-1/bmg-1*). (McClellan et al. (Sin publicar))

5.2.7. Marcador SW12

Este primer indica la presencia del QTL_{mayor} que controla la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) aumentando la eficiencia del gen *bgm-1*. Posee un tamaño de 700 pb y expresa presencia del QTL_{mayor} en 700 pb. Este marcador es usado como complemento del marcador SR2 ya que por sí solo no proveerá la protección adecuada contra el virus del mosaico dorado amarillo del frijol severo. (Miklas et al. 2000; Singh et al. 2000)

5.3. Siembra y germinación de materiales

Se sembraron diferente número de semillas en cada línea de frijol en el invernadero del laboratorio de biotecnología del ICTA, para su germinación bajo condiciones controladas, ya que el número sembrado dependió de la disponibilidad del material (figura 42A).

5.4. Colección de las muestras de tejidos

Las muestras se recolectaron a los 21 días después de siembra, se colectó el tejido de la primera hoja trifoliada de dos plantas por cada línea de frijol en tubos de microcentrífuga. Los tubos, posteriormente identificados, se trasladaron directamente al laboratorio para la extracción de ADN (figura 43A).

5.5. Extracción de ADN

Con la ayuda de los morteros y pistilos se procedió a macerar las muestras y para la extracción de ADN se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA. Asimismo, se siguió el protocolo de extracción de ADN propuesto por Promega® (figura 44A). En el cuadro 7 se presentan el protocolo de extracción de ADN, propuesto por Promega®.

Cuadro 7. Protocolo de extracción de ADN, propuesto por Promega®.

| Paso | Acción | volumen | Temperatura y tiempo |
|--|--|---------|------------------------------------|
| Preparar el lisado de la planta | | | |
| 1 | Moler aproximadamente 40 mg de tejido de hoja en nitrógeno líquido. | | |
| 2 | Agregar Nuclei Lysis Solution. | 600 µL | |
| 3 | Incubar. | | 65 °C durante 15 min |
| 4 | Agregar RNase Solution. | 3 µL | |
| 5 | Vortex. | | 30 s |
| 6 | Incubar. | | 37 °C durante 15 min |
| 7 | Enfriar la muestra. | | Temperatura ambiente durante 5 min |
| Precipitación de proteínas y rehidratación del ADN. | | | |
| 1 | Agregar Protein Precipitation Solution. | 200 µL | |
| 2 | Incubar. | | 5 min en hielo |
| 3 | Vortex. | | 30 s |
| 4 | Centrifugar a 13.000 × g*. - 16.000 × g*. | | 3 min |
| 5 | Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga que contenga isopropanol a temperatura ambiente. | 600 µL | |
| 6 | Mezclar por inversión y centrifugar a 13,000 × g*. – 16,000 × g*. | | 1 min |
| 7 | Descartar el sobrenadante y agregar etanol al 70 %. | 600 µL | |
| 8 | centrifugar a 13,000 × g*. – 16,000 × g*. | | 1 min |
| 9 | Descartar el etanol y secar el pellet al aire. | | |
| 10 | Agregar DNA Rehydration Solution. | 50 µL | |

Fuente: Promega Corporation (2020).

5.6. Cuantificación de ADN

Para cuantificar y determinar la calidad del ADN se procedió:

- Se agregaron 90 μL de H_2O destilada a la cubeta de cuarzo del espectrofotómetro BIORAD SmartSpec© 3000 y 10 μL de ADN de la solución de ADN extraído (dilución 1:10).
- Se leyó la absorbancia a 260 nm y 280 nm para determinar la cantidad y calidad del ADN. Se cuantifico el ADN con un factor de conversión $A_{260 \text{ nm}} 1.0 = 50.0 \mu\text{g/mL}$.
- El ADN se diluyo en agua libre de nucleasas a 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para las amplificaciones de ADN (figura 45A).

5.7. Mezcla de reacción de PCR

Para la mezcla de reacción de PCR se utilizaron 25 μL que contenían 125 ng de ADN genómico, 1X de GoTaq® G2 Green Master Mix, agua libre de nucleasas y 1 μM de cada primer o cebador (forward y reverse) (figura 46A). En el cuadro 8 se presentan las concentraciones y volumen para la mezcla de la reacción de PCR.

Cuadro 8. Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de los SCAR.

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen para una reacción |
|----------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|
| H_2O | ----- | ----- | 2.5 μL |
| Iniciador Forward | 10 μM | 1 μM | 2.5 μL |
| Iniciador Reverse | 10 μM | 1 μM | 2.5 μL |
| Go Taq G2 Green Master Mix | 2 X | 1 X | 12.5 μL |
| ADN molde (1:5) | 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ | 125 ng | 5 μL |
| Volumen final | | | 25 μL |

Fuente: Tobar & Suchini (2019).

5.8. Amplificación mediante PCR

Los marcadores que se utilizaron 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® (figura 47A).

El cuadro 9 se muestra el programa de amplificación que se utilizará para el tipo de marcadores SCAR. Los diferentes tiempos y temperaturas de amplificación para cada uno de los marcadores tipo SCAR se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 9. 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 min a 5 min |
| Desnaturalización | 30 ciclos a 35 ciclos | 94 | 10 s a 60 s |
| Hibridación | | Depende del primer | 40 s a 60 s |
| Elongación | | 72 | 90 s a 120 s |
| Elongación final | 1 | 72 | 5 min a 7 min |
| Finalización | 1 | 4 | Indefinido |

Fuente: Tobar & Suchini (2019).

Cuadro 10. Protocolos específicos de programas del termociclador para los genes de resistencia a enfermedades en el cultivo de frijol.

| Enfermedad | Marcador | Protocolos de PCR |
|------------|----------|--|
| ALS | SH13 | Un ciclo de 2 min a 94 °C 35 ciclos 30 s a 94 °C, 60 s a 59°C y 90 s a 72 °C Un ciclo de 5 min a 72 °C. |
| ALS | SN02 | Un ciclo de 2 min a 94 °C 30 ciclos 30 s a 94 °C, 60 s a 65 °C y 90 s a 72°C Un ciclo de 5 min a 72 °C. |

Continuación cuadro 10.

| | | |
|-------|-------|--|
| BCMV | ROC11 | Un ciclo de 2 min a 94 °C 34 ciclos 10 s a 94 °C, 40 s a 55 °C y 120 s a 72 °C Un ciclo de 5 min a 72 °C. |
| BCMV | SW13 | Un ciclo de 2 min a 94 °C 34 ciclos 10 s a 94 °C, 40 s a 67 °C y 120 s a 72 °C Un ciclo de 5 min a 72 °C. |
| BGYMV | SR2 | Un ciclo de 2 min a 94 °C 34 ciclos 10 s a 94 °C, 40 s a 60 °C y 120 s a 72 °C Un ciclo de 5 min a 72 °C. |
| BGYMV | SW12 | Un ciclo de 60s a 94 °C 30 ciclos 30 s a 94 °C, 30 s a 59 °C y 60 s a 72 °C Un ciclo de 5 min a 72 °C. |

Fuente: Tobar & Suchini (2019).

5.9. Electroforesis

Después de la amplificación, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio al 0.005 % de una solución madre (10 mg/mL) en buffer 1X TBE (trizma base, ácido bórico y ácido etilendiaminotetraacético) (figura 48A).

En todos los genes se incluyeron una escalera de peso molecular de 50 pb al inicio y al final de cada gel. Los geles se cargaron con los productos de PCR, uno por celda. Todas las soluciones fueron recicladas para un máximo de 3 geles. La electroforesis se corrió a una potencia de 125 voltios durante 2 hr (figura 49A). En el cuadro 11 se muestra la reparación de gel grande de agarosa al 2 %. La preparación de buffer TBE 5 X y 1 X se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 11. Preparación de gel grande de agarosa al 2 %.

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|----------------------------|----------|---|
| Agarosa de alta resolución | 8 gr | Mezclar la agarosa con el buffer TBE y poner a calentar hasta que hierva mientras se agita. Retirar de la plancha y dejar enfriar a 40 °C sin dejar de agitar. Agregar el bromuro de etidio y servir en el tanque de electroforesis antes de solidificar, colocar los peines. |
| Buffer TBE 5x | 400 mL | |
| Bromuro de etidio | 20 µL | |

Fuente: Tobar & Suchini (2019).

Cuadro 12. Preparación de buffer TBE 5 X y 1 X.

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|----------------|----------|--|
| Tris | 108 gr | Colocar los reactivos en un beaker y agregar 60 mL de agua destilada, agitar. Cuando los reactivos estén disueltos aforar a 1 L y filtrar. Para 1 X TBE colocar 4 partes de agua destilada por 1 de 5 X TBE. |
| Ácido Bórico | 54 gr | |
| EDTA | 3.5 gr | |
| Agua destilada | 1 L | |

Fuente: Tobar & Suchini (2019).

5.10. Visualización de los productos amplificados

Para la visualización de los productos amplificados se utilizó un transiluminador (3 UV™) ajustado a 302 nm. Finalmente, se tomaron fotografías del gel, y a partir de los patrones de bandas visualizados en los geles se codificó la información alélica en una matriz donde se colocó el tamaño de cada banda por cada marcador en una hoja Excel, para identificar la presencia o no de los genes de resistencia en las muestras evaluadas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) (*P. griseola*)

6.1.1. Marcador molecular SCAR SNO2

Se sometieron las líneas a un proceso de selección asistida por marcador (SAM) molecular para identificar plantas con genes *phg-2* y *phg-1*. La ocurrencia de ambos genes proporciona resistencia universal a las cepas de la mancha angular de la hoja (Nietsche et al. 2000; Miklas, 2002; Queiroz et al. 2004a).

Para ellos, se seleccionaron 80 genotipos F3 de frijoles volubles establecidos por el programa de mejoramiento de frijol del ICTA. De cada planta se tomó tejido en la primera hoja trifoliada de dos plantas por cada línea de frijol para la extracción de ADN siguiendo el procedimiento propuesto por Promega©.

Para cada planta se amplificaron los fragmentos de ADN definidos por los oligonucleótidos SNO2 y SW13, ligados a la presencia de los genes *phg-2* y *phg-1* respectivamente. De los 80 genotipos F3 de frijoles volubles evaluados con el marcador SCAR SNO2, 37 líneas de frijol mostraron la banda de resistencia a la mancha angular a 890 pb, que indica la presencia del marcador del gen de resistencia *Phg-2*.

En el cuadro 13 se aprecian los resultados del marcador molecular de tipo SCAR SNO2 para la identificación del gen *Phg-2* para la resistencia al ALS en 80 líneas F3 de frijoles volubles. Las amplificaciones del marcador SCAR SNO2 (890 pb) se muestran en las figuras 12 a 16.

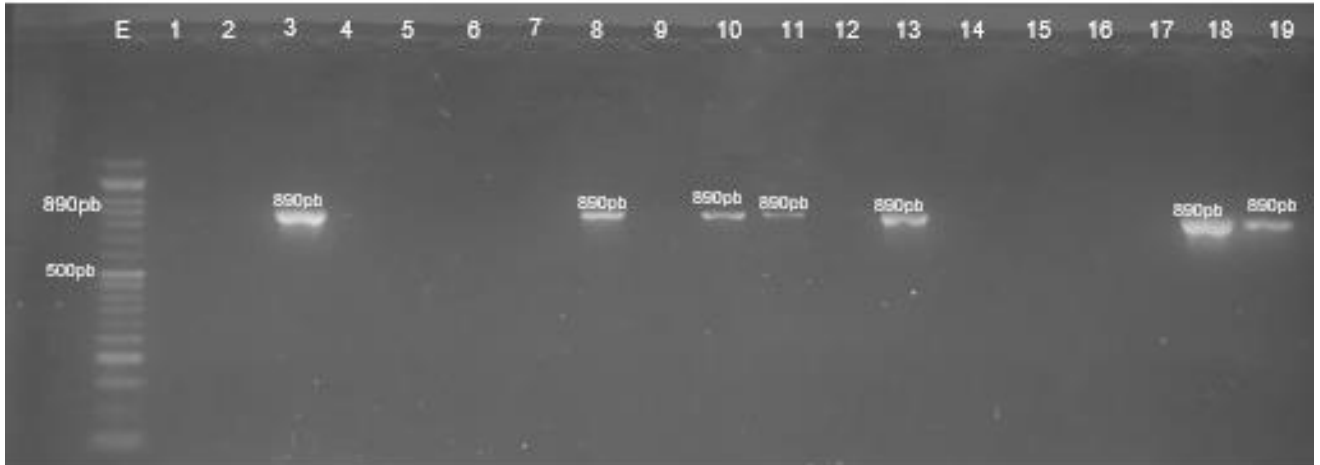


Figura 12. Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen *Phg-2* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.

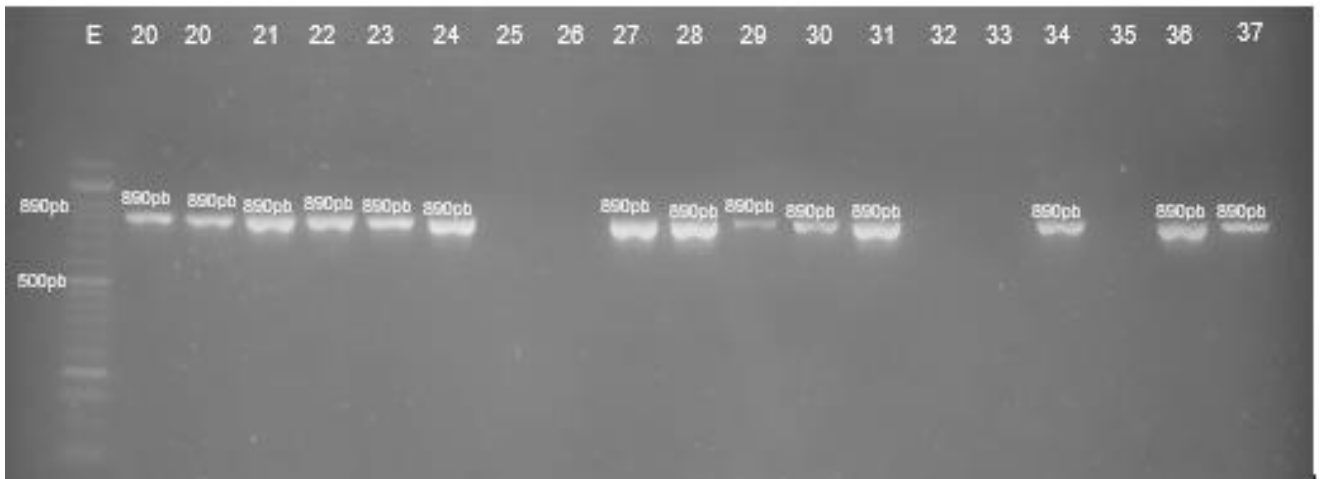


Figura 13. Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen *Phg-2* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.

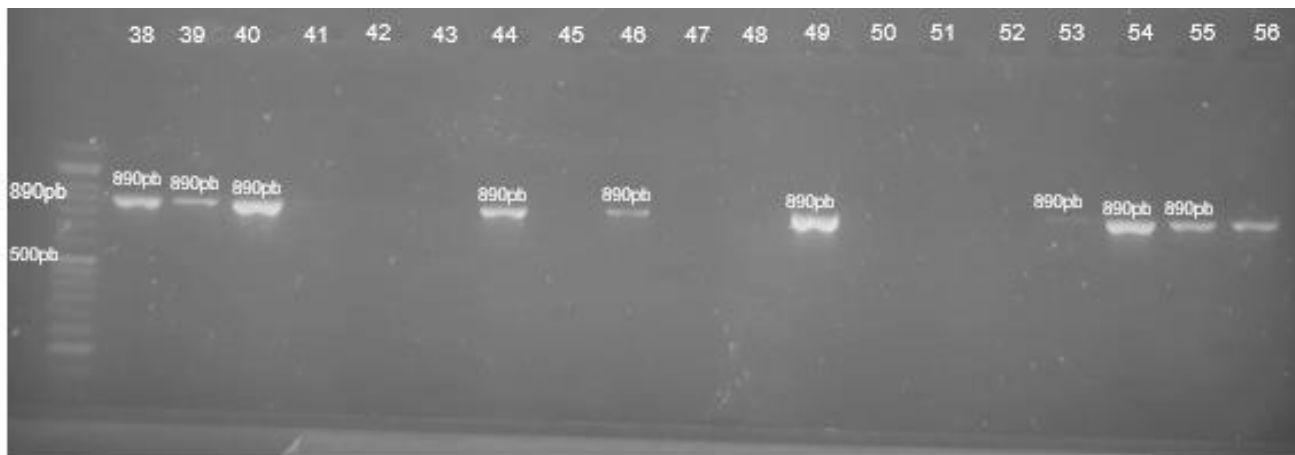


Figura 14. Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen *Phg-2* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.

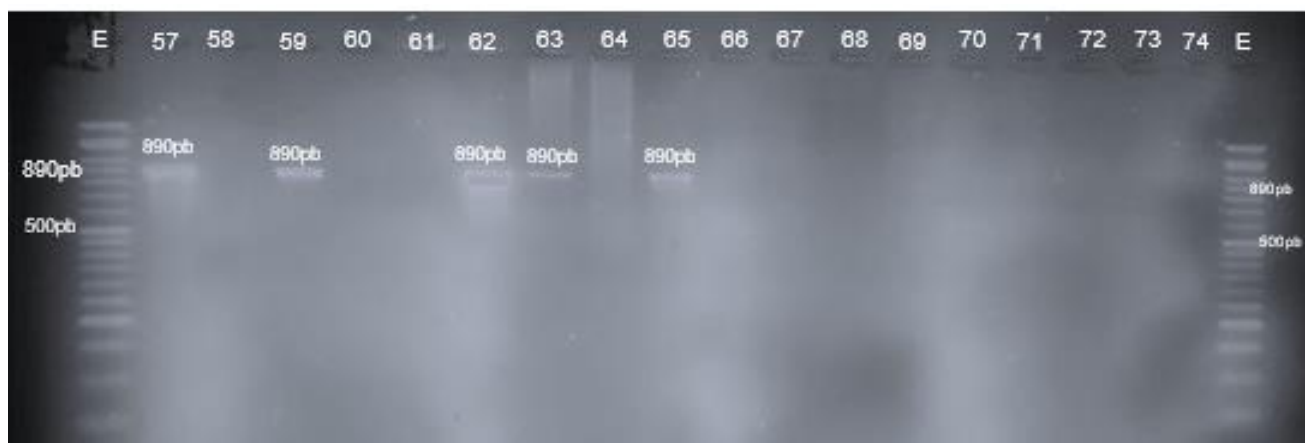


Figura 15. Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen *Phg-2* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.

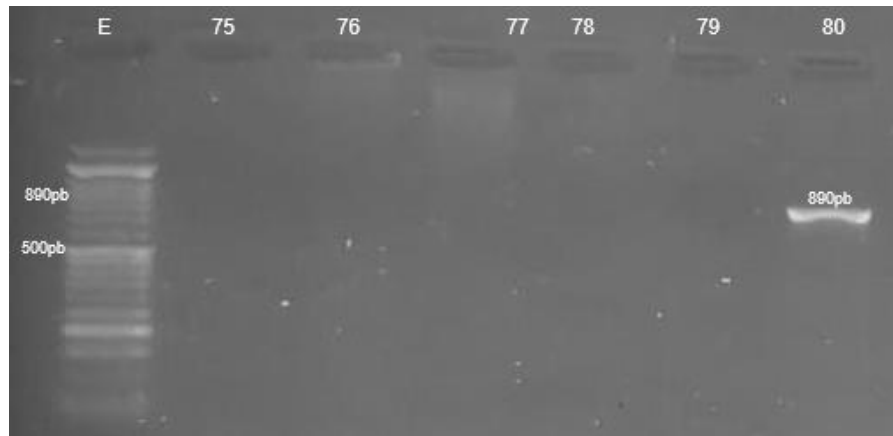


Figura 16. Amplificación del SCAR SNO2 (890 pb) asociado al gen *Phg-2* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.

Estas líneas son derivadas de la cruce con la línea G10474, la cual es una línea diferencial que presenta el gen dominante *Phg-2* de resistencia a la mancha angular de la hoja. Además, el G10474 es de origen mesoamericano y confiere la resistencia a la raza 63-63 de *P. griseola*, una de las razas más virulentas que supera la resistencia en todas las variedades diferenciales de la mancha angular de la hoja (Mahuku, Jara, Cajiao, & Beebe, 2003; Mahuku et al. 2004).

El *Phg-2* es el principal locus de resistencia que proporciona resistencia a diferentes razas del patógeno, lo que confirma que *Phg-2* es actualmente el locus de resistencia a la ALS más poderoso. (Nietsche et al. 2000)

El gen de resistencia *Phg-2* fue identificado por primera vez por Sartorato et al. (2000) en la fuente de resistencia México 54 y posteriormente descubierta en varias fuentes de resistencia, como G10474 (Mahuku et al. 2004), MAR 2 (Ferreira et al. 2000), Cornell 49–242 (Nietsche et al. 2000), Ouro Negro (Queiroz et al. 2004) y G10909 (Mahuku et al. 2011).

El marcador SCAR SNO2 indica la presencia del gen mesoamericano *Phg-2* de resistencia a la mancha angular raza 31-17 y 63-19 (Nietsche et al. 2000; Miklas, 2002). Sin embargo, el marcador SNO2 se podría usar para identificar materiales resistentes a la raza 31-17 u otras a las cuales el gen *Phg-2* presente resistencia. (Sartorato et al., 2000)

6.1.2. Marcador molecular SCAR SH13

Con el análisis del marcador SH13 que indica la presencia del gen *Pgh-1* (Queiroz et al. 2004) permitió identificar que 17 líneas presentaron la banda a 520 pb que expresa la presencia de este marcador ligado al gen de resistencia de la mancha angular de la hoja (ALS).

Según Ragagnin et al. (2004) la presencia del gen *Phg-1* de origen andino AND 277 expresa la resistencia a la raza 63-23 de mancha angular de la hoja, este gen fue identificado por Carvalho et al. (1998) al estudiar una población F2 del cruce AND 277 9 Ruda' inoculado con la raza 63-23 de *P. griseola*.

En el cuadro 13 se aprecian los resultados del marcador molecular de tipo SCAR SH13 para la identificación del gen *Phg-1* para la resistencia al ALS en 80 líneas F3 de frijoles volubles. Las amplificaciones del marcador SCAR SH13 (520 pb) se muestran en las figuras 17 a 21.

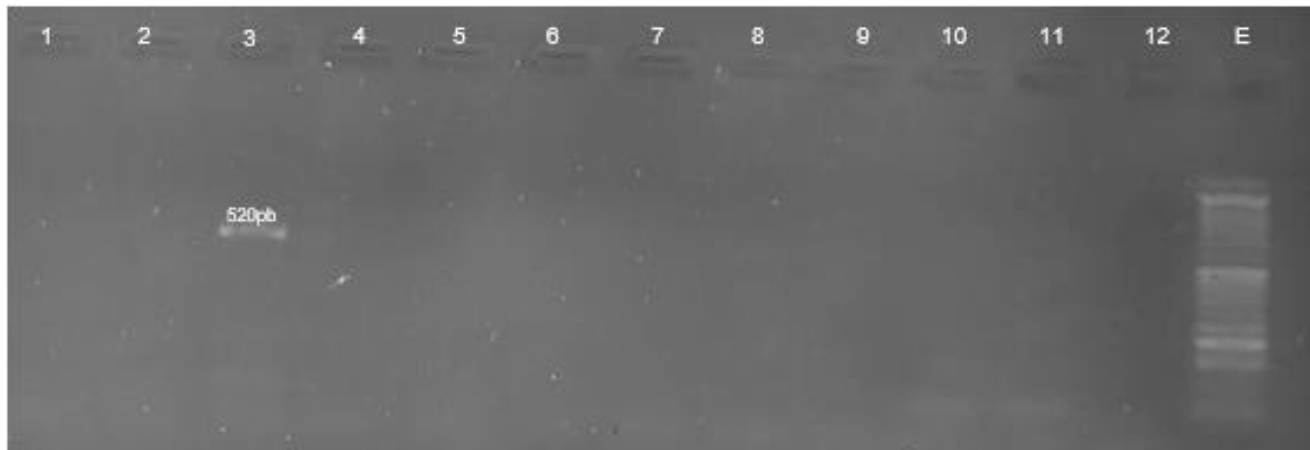


Figura 17. Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen *Phg-1* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.



Figura 18. Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen *Phg-1* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.



Figura 19. Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen *Phg-1* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.

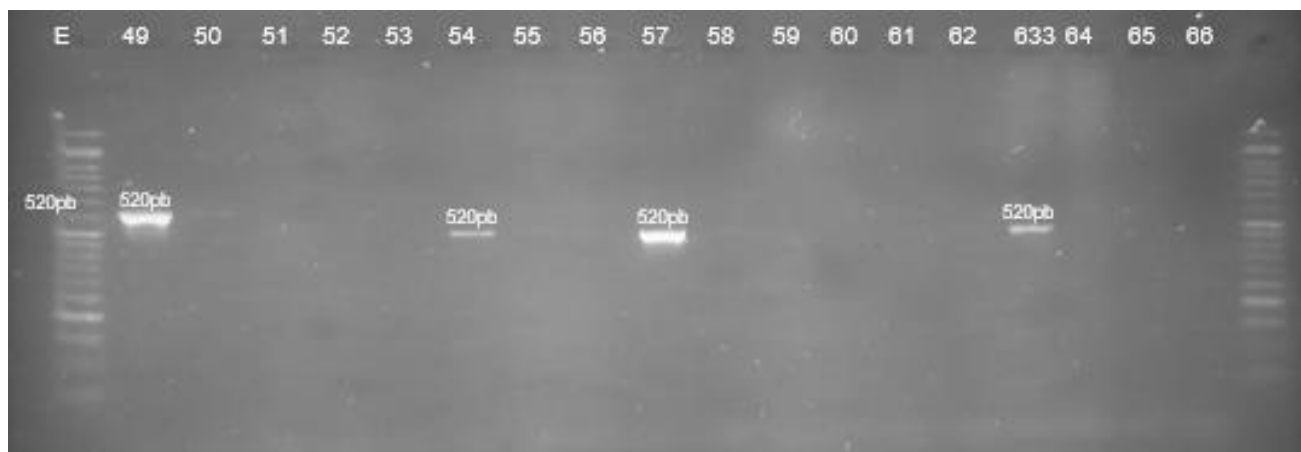


Figura 20. Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen *Phg-1* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.

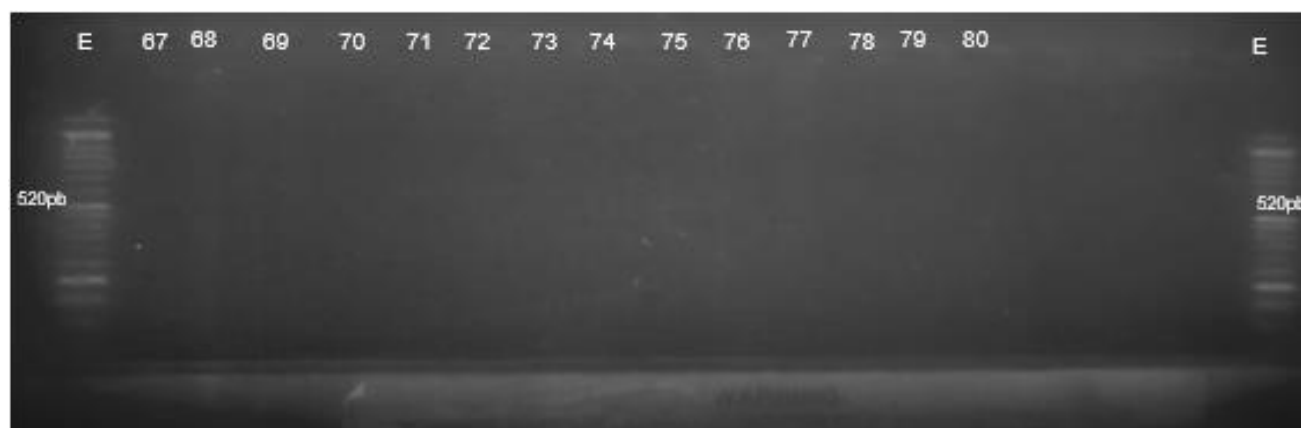


Figura 21. Amplificación del SCAR SH13 (520 pb) asociado al gen *Phg-1* de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) en líneas F3 de frijoles volubles.

Los resultados con los marcadores moleculares muestran que de las 80 líneas evaluadas solo las líneas ICTA ALTENSE/G10474 172-459-F5, GUATE300/G2333 68-171-139-F5, CH2019-21 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU, CH2019-22 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU, CH2019-23 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU, CH2019-15 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU, CH2019-53 Col.NAC.ARB Guate-421, CH2019-200 Col.NAC.ARB Guate-116, CH2019-190 Col.NAC.ARB Guate-89, CH2019-202 Col.NAC.ARB Guate-118, CH2019-78 Col.NAC.ARB Guate-542, CH2019-46 Col.NAC.ARB Guate-388, CH2019-45 Col.NAC.ARB Guate-386, CH2019-209 Col.NAC.ARB kakakinac, CH2019-163 Col.NAC.ARB vaina blanca, y GUATE304/G2333 81-212-171-F5 presentaron los dos genes que confieren en la resistencia a la mancha angular de la hoja (cuadro 13).

La combinación de estos dos genes de resistencias debería proporcionar una resistencia más eficiente y duradera. Esto es debido a la gran variabilidad del hongo *P. griseola* y la mejora de variedades resistentes a la enfermedad requerirá la introducción de genes de resistencia de origen andino y mesoamericano (Mahuku, Jara, Cajiao, & Beebe, 2003).

Los programas de mejoramiento genético han utilizado la práctica de la pirámide genética, con el objetivo de desarrollar cultivares que presenten un nivel más amplio y eficiente de nivel de resistencia. (Muhomi et al., 2011)

Arus y Merono-González (1993) afirma que con el uso de marcadores moleculares en la selección de cultivares resistentes es rápido y confiable, ya que no depende de la interacción con el entorno. Además, para obtener cultivares resistentes se debe comprender los genes involucrados y las posibles interacciones que pueden ocurrir entre ellos. (Bassi, 2014)

La gran diversidad genética para este hongo, en sus diferentes formas de razas fisiológicas, dificulta el desarrollo y uso de cultivares resistentes (Sartorato, 2002; Mahuku et al., 2003). Varios estudios indican niveles considerables de variabilidad entre y dentro de las poblaciones de *P. griseola* (Stenglein et al., 2003). Como resultado, los cultivares que se comportan como resistentes en ciertas regiones son susceptibles en otras. (Sartorato & Rava 1994)

Díaz (2001) recomienda que las evaluaciones de la reacción a la mancha angular de la hoja deben hacerse cuando la enfermedad este bien establecida, y las plantas y testigos susceptibles expresan síntomas de severidad bien definidos.

Cuadro 13. Resultados de los marcadores moleculares de tipo SCAR para identificar la presencia del gen *Phg-2* y *Phg-1* para ALS en 80 líneas F3 de frijoles volubles.

| No. | Enfermedad | Mancha angular de la hoja (ALS) (<i>Phaeoisariopsis griseola</i>) | |
|-----|--------------------------------|--|--------------------------|
| | | <i>Phg-2</i> SNO2 (D) | <i>Phg-1</i> SH13 (D) |
| | Gen | | |
| | Marcador molecular | | |
| 1 | ICTA ALTENSE/G2333 152-382-F5 | - | - |
| 2 | ICTA ALTENSE/G10474 168-453-F5 | - | - |
| 3 | ICTA ALTENSE/G10474 172-459-F5 | + | + |

Continuación cuadro 13.

| | | | |
|----|---------------------------------------|---|---|
| 4 | ICTA HUNAPU/G10474 173-460-F5 | - | - |
| 5 | CH2019-26 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 6 | CH2019-27 sel-Ind F2-3 G10474/HUNAPU | - | - |
| 7 | CH2019-28 sel-Ind F2-3 G10474/HUNAPU | - | - |
| 8 | CH2019-29 sel-Ind F2-3 G10474/HUNAPU | + | - |
| 9 | GUATE427/G2333 111-278-230-F5 | - | - |
| 10 | GUATE539/G2333 121-296-F5 | + | - |
| 11 | GUATE16/G2333 140-336-310-F5 | + | - |
| 12 | GUATE306/G2333 148-358-F5 | - | - |
| 13 | ICTA ALTENSE/G2333 151-381-407 | + | - |
| 14 | CH2019-16 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 15 | CH2019-17 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 16 | CH2019-18 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 17 | CH2019-19 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 18 | CH2019-20 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |
| 19 | GUATE300/G2333 68-171-139-F5 | + | + |
| 20 | CH2019-36 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |
| 21 | CH2019-37 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |

Continuación cuadro 13.

| | | | |
|----|--|---|---|
| 22 | CH2019-21 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | + |
| 23 | CH2019-22 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | + |
| 24 | CH2019-23 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | + |
| 25 | CH2019-24 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 26 | CH2019-25 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 27 | CH2019-11 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |
| 28 | CH2019-12 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |
| 29 | CH2019-13 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |
| 30 | CH2019-14 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |
| 31 | CH2019-15 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | + |
| 32 | CH2019-89 Col.NAC.ARB Guate-560 | - | - |
| 33 | CH2019-81 Col.NAC.ARB Guate-547 | - | - |
| 34 | CH2019-83 Col.NAC.ARB Guate-550 | + | - |
| 35 | CH2019-236 Col.NAC.ARB Guate-681 | - | - |
| 36 | CH2019-53 Col.NAC.ARB Guate-421 | + | + |
| 37 | CH2019-200 Col.NAC.ARB Guate-116 | + | + |
| 38 | CH2019-190 Col.NAC.ARB Guate-89 | + | + |
| 39 | CH2019-202 Col.NAC.ARB Guate-118 | + | + |

Continuación cuadro 13.

| | | | |
|----|--|---|---|
| 40 | CH2019-78 Col.NAC.ARB Guate-542 | + | + |
| 41 | CH2019-191 Col.NAC.ARB Guate-96 | - | - |
| 42 | GUATE305/G10474 94-226- 190-F5 | - | - |
| 43 | GUATE305/G10474 96-228- 192-F5 | - | - |
| 44 | GUATE305/G10474 97-229- 192-F5 | + | - |
| 45 | GUATE305/G10474 98-230- 192-F5 | - | - |
| 46 | GUATE305/G10474 99-231- 194-F5 | + | - |
| 47 | CH2019-73 Col.NAC.ARB Guate-537 | - | - |
| 48 | CH2019-86 Col.NAC.ARB Guate-553 | - | - |
| 49 | CH2019-46 Col.NAC.ARB Guate-388 | + | + |
| 50 | CH2019-23 Col.NAC.ARB Guate-161 | - | + |
| 51 | CH2019-90 Col.NAC.ARB Guate-561 | - | - |
| 52 | CH2019-80 Col.NAC.ARB Guate-45 | - | - |
| 53 | CH2019-24 Col.NAC.ARB Guate-167 | + | - |
| 54 | CH2019-45 Col.NAC.ARB Guate-386 | + | + |
| 55 | CH2019-189 Col.NAC.ARB Aguacatan-85 | + | - |
| 56 | CH2019-154 Col.NAC.ARB Guate-1339 | + | - |
| 57 | CH2019-209 Col.NAC.ARB kakakinac | + | + |

Continuación cuadro 13.

| | | | |
|----|--|---|---|
| 58 | CH2019-197 Col.NAC.ARB tac.tic 110 | - | - |
| 59 | CH2019-163 Col.NAC.ARB vaina blanca | + | + |
| 60 | G101/G2333 1-2-8 F5 | - | - |
| 61 | GUATE28/G2333 6-16-35-F5 | + | - |
| 62 | CH2019-35 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |
| 63 | GUATE304/G2333 81-212- 171-F5 | + | + |
| 64 | GUATE305/G2333 93-225- 190-F5 | - | - |
| 65 | CH2019-30 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | + | - |
| 66 | CH2019-31 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 67 | CH2019-32 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 68 | CH2019-33 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 69 | CH2019-34 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 70 | CH2019-1 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 71 | CH2019-2 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 72 | CH2019-3 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 73 | CH2019-4 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 74 | CH2019-5 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 75 | CH2019-6 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |

Continuación cuadro 13.

| | | | |
|----|--|---|---|
| 76 | CH2019-7 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 77 | CH2019-8 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 78 | CH2019-9 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 79 | CH2019-10 sel-Ind F2-3 G10474/ HUNAPU | - | - |
| 80 | Gorgojos PR103-129 progenitor 12 | + | - |

NOTA:

D = Marcador dominante.

+ = Presencia de la banda de 890 pb del marcador SNO2 de genotipo homocigota dominante (I/I) o Heterocigota (I/i); presencia de la banda de 520 pb del marcador SH13 de genotipo homocigoto dominante (I/I) o heterocigota (I/i).

- = Ausencia del marcador SNO2 en plantas susceptibles de genotipo homocigota recesivo (i/i); ausencia del marcador SH13 en plantas susceptibles de genotipo homocigota recesivo (i/i).

6.2. Resistencia al virus del mosaico común del frijol (BCMV)

Con el objetivo de evaluar la presencia de los genes asociados a la resistencia al virus del mosaico común del frijol (BCMV), se corrieron dos marcadores moleculares de tipo SCAR, para la línea avanzada de frijol NSMC17524-12 y para ICTA Ligero, para el diagnóstico a la enfermedad se utilizaron dos cebadores ROC 11 y SW13, que se encuentran ligados a la presencia de los genes *I* y *bc-3*, respectivamente.

En la figura 23 se muestran las Bandas generadas por el primer ROC11 en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen *bc-3* asociado a la resistencia al virus del mosaico común (BCMV). Las bandas generadas por el primer SW13 en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen *I* asociado a la resistencia al virus del mosaico común (BCMV) se aprecia en la figura 22.

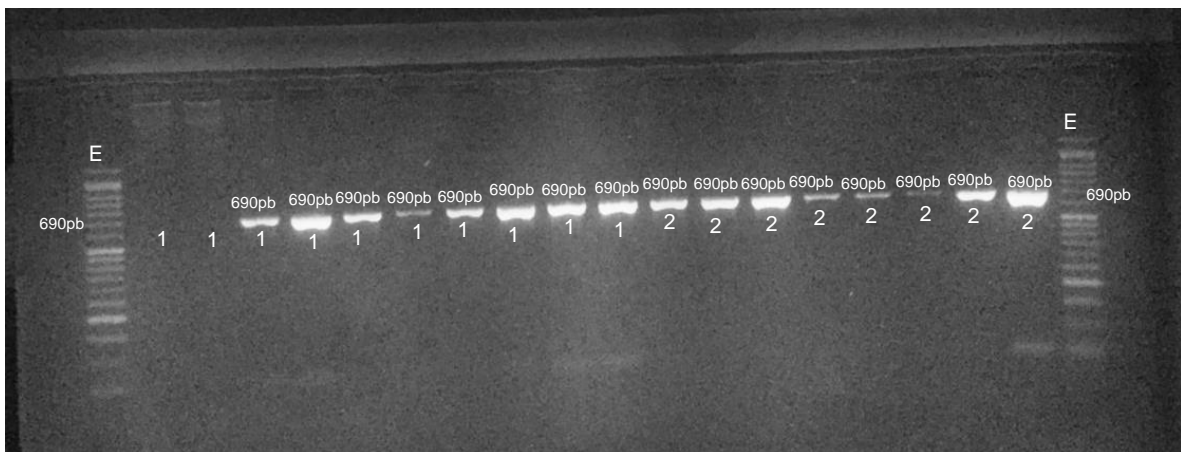


Figura 22. Bandas generadas por el primer SW13 (690 pb) en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen *I* asociado a la resistencia al virus del mosaico común (BCMV). **E.** Escalera **1.** ICTA Ligero **2.** Línea NSMC17524-12.

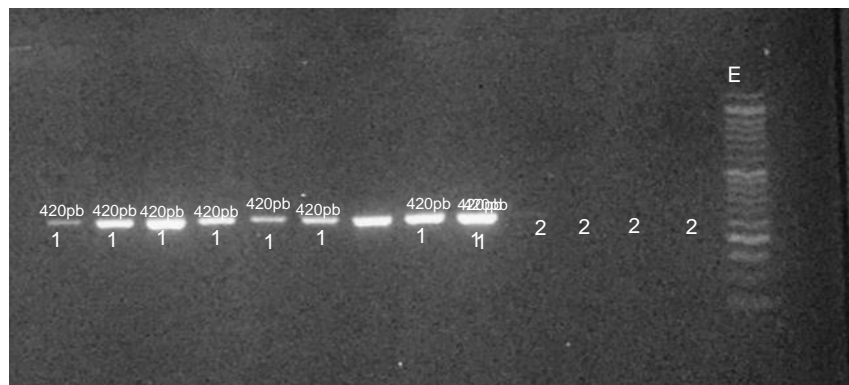


Figura 23. Bandas generadas por el primer ROC11 (420 pb) en ADN de líneas de frijol común para identificar la presencia del gen *bc-3* asociado a la resistencia al virus del mosaico común (BCMV). **E.** Escalera **1.** ICTA Ligerito **2.** Línea NSMC17524-12.

El marcador ROC11 amplifica un solo fragmento de 420 pb, lo que permite la identificación del genotipo de plantas de frijol común en locus de resistencia a la enfermedad *bc-3*. (Johnson et al., 1997)

El SW13 es un marcador dominante, que amplifica un solo fragmento de 690 pb ligado al gen *I*, que permite de manera más consistente la identificación de plantas resistentes al BCMV. Además, se detecta la presencia del gen *I* usando SW13 en genotipos provenientes de diferentes acervos de genes del frijol, lo que indica una amplia utilidad de este marcador para los programas de mejoramiento del frijol. (Haley et al., 1994; Melotto et al., 1996)

Es importante resaltar que el Marcador SW13 ha llegado a detectar a cortas distancias del gen *I* ($1.00 \text{ cM} \pm 0.70 \text{ cM}$ en poblaciones N84004/Michelite) y se ha comprobado que la presencia y ausencia del SCAR corresponden a la presencia o ausencia del gen *I* en genotipos tanto de origen Mesoamericano como Andino. (Singh et al., 1991)

Para la línea avanzada NSMC17524-12 evaluada con el marcador SW13 fue positiva para el gen *I* que confiere resistencia al virus del mosaico común, pero esta línea dio negativo al marcador ROC11 del gen de resistencia *bc-3*. Para el testigo ICTA que fue el ICTA Ligerito hubo presencia de ambos genes de resistencia al virus del mosaico común (BCMV), *I* y *bc-3*, ya que esta variedad presenta resistencia a esta enfermedad (Gillespie, 1999).

Según Anaya et al. (2018), el uso de variedades con resistencia específica a los virus predominantes en cada región contribuirá a reducir las pérdidas y la diseminación de estos virus dentro y entre regiones productoras.

Según Kelly (1997) la mejor combinación de genes para brindar una amplia resistencia al virus del mosaico común es la combinación de los genes *I* y *bc-3*, ya que estos son independientes y actúan utilizando diferentes mecanismos de defensa. Además, se ha determinado que cuando existe un solo gen confiriendo resistencia a una enfermedad, será más fácil que el patógeno supere al gen y la planta rompa resistencia.

En el cuadro 14 se muestran los resultados de los marcadores moleculares de tipo SCAR para identificar la presencia del gen *bc-3* y *I*, respectivamente, para virus del mosaico común en 2 líneas frijol.

Cuadro 14. Resultados de los marcadores moleculares SCAR para identificar la presencia del gen *bc-3* y *I* para virus del mosaico común en dos líneas frijol.

| Muestra | Enfermedad | Virus del mosaico común (BCMV) | |
|---------|--------------------|--------------------------------|----------|
| | Gen | BC-3 | I |
| | Marcador molecular | RCO11 (D) | SW13 (D) |
| 1 | ICTA Ligero | + | + |
| 1 | ICTA Ligero | + | + |
| 1 | ICTA Ligero | + | + |
| 1 | ICTA Ligero | + | + |
| 1 | ICTA Ligero | + | + |
| 1 | ICTA Ligero | + | + |
| 1 | ICTA Ligero | + | + |
| 1 | ICTA Ligero | + | + |
| 2 | NSMC17524-12 | - | + |
| 2 | NSMC17524-12 | - | + |
| 2 | NSMC17524-12 | - | + |
| 2 | NSMC17524-12 | - | + |
| 2 | NSMC17524-12 | - | + |
| 2 | NSMC17524-12 | - | + |
| 2 | NSMC17524-12 | - | + |
| 2 | NSMC17524-12 | - | + |

NOTA:
D = Marcador dominante.
+ = Presencia de la banda de 420 pb del marcador ROC11 de genotipo homocigota dominante (I/I) o heterocigota (I/i); presencia de la banda de 690 pb del marcador SW13 de genotipo homocigota dominante (I/I) o heterocigota (I/i).
- = Ausencia del marcador ROC11 en plantas susceptibles de genotipo homocigota recesivo (i/i); ausencia del marcador SW13 en plantas susceptibles de genotipo homocigota recesivo (i/i).

6.3. Resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV)

6.3.1. Marcador molecular SCAR SR2

Para identificar la presencia del gen *bgm-1* en los 95 genotipos F2 de ICTA Ligerero x Rojo papa e ICTA Ligerero x rojo seda se utilizaron dos marcadores diferentes, el SCAR SR2 y el STARP CHUP 1 (McClellan et al. Sin publicar).

Con el marcador SR2 se puede mostrar las bandas indicadoras para el gen *bgm-1* en cuatro formas: homocigota recesiva (530 pb), homocigota dominante (570 pb), heterocigota (530 pb / 570 pb) y sin el gen (sin banda). Además, de que su resistencia conferida por el gen *bgm-1* para el BGYMV es recesivo. (Blair et al. 2007)

La evaluación con el marcador SR2 permitió identificar que 11 genotipos amplificaron bandas de 530 pb que indican la presencia de los alelos recesivos del gen *bgm-1*. Cuarenta nueve genotipos amplificaron las dos bandas, 530 pb y 570 pb, indicando que son líneas heterocigotas para el gen *bgm-1*, estas líneas continuarán segregando por el carácter heterocigota del gen; mientras que 35 genotipos amplificaron la banda a 570 pb asociada con la presencia del gen homocigoto dominante *bgm-1*, por lo que son susceptibles a las razas que superan este gen de resistencia al BGYMV. Estas pueden ser eliminadas, ya que no tienen posibilidad de poseer la característica deseable de resistencia.

En el cuadro 15 se presentan los resultados del marcador molecular de tipo SCAR SR2 para la identificación del gen *bgm-1* para la resistencia al BGYMV en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerero * Rojo de Papa e ICTA Ligerero x Rojo de Seda. Las amplificaciones del marcador SR2 (530 pb / 570 pb) se muestran en las figuras 24 a 29.

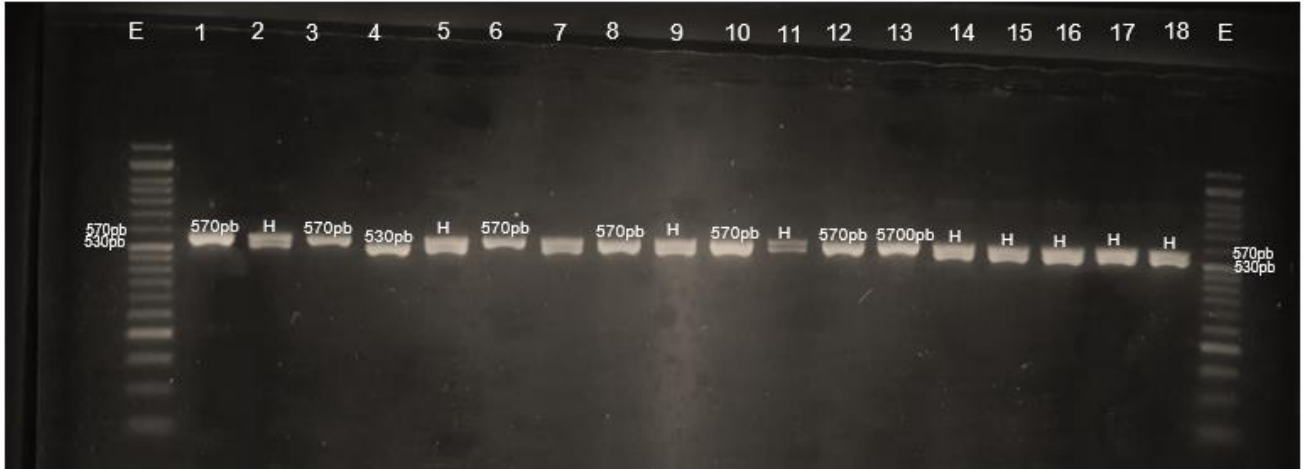


Figura 24. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

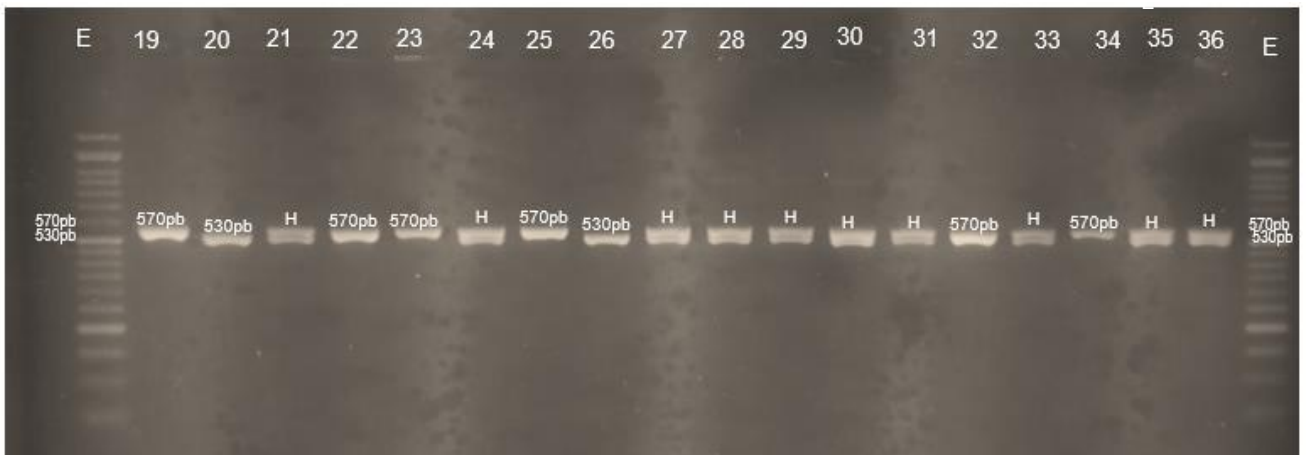


Figura 25. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.



Figura 26. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.



Figura 27. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

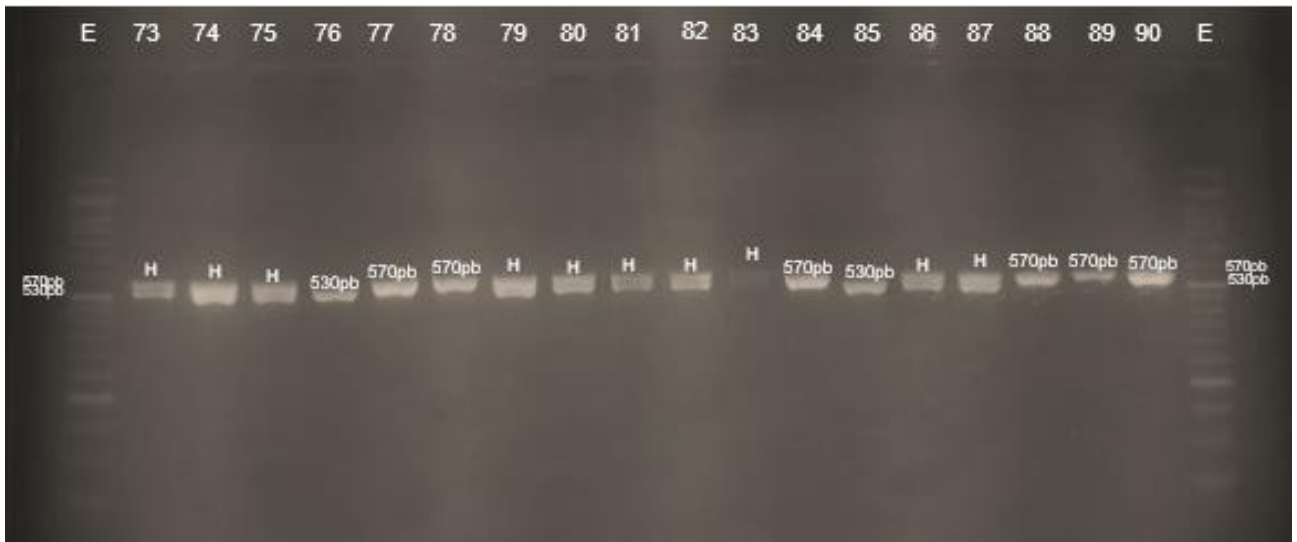


Figura 28. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

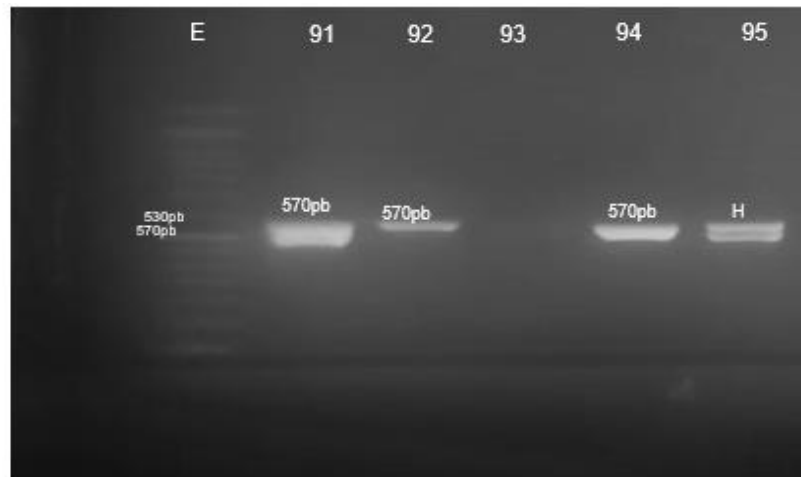


Figura 29. Amplificación del SCAR SR2 (530 pb / 570 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

6.3.2. Marcador molecular STARP

Con el marcador STARP, 40 líneas amplificaron la banda a 110 pb que indica la presencia del gen recesivo *bgm-1* que confiere resistencia al BGYMV. El marcador SR2 se ha estado utilizado por años en el laboratorio de Biotecnología del ICTA, mientras que el STARP se validó en el laboratorio en el año 2019, este marcador fue desarrollado recientemente con una metodología más moderna.

Se esperaba que el marcador STARP fuera más confiable y preciso, sin embargo, ambos marcadores mostraron que pocas líneas son positivas para el gen *bgm-1*, lo que indica que el marcador SR2 también es un marcador confiable.

En el cuadro 15 se presentan los resultados del marcador molecular de tipo STARP para la identificación del gen *bgm-1* para la resistencia al BGYMV en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda. Las amplificaciones del marcador STARP (110 pb / 115 pb) se muestran en las figuras 30 a 35.



Figura 30. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) (110/115 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligerito * Rojo de Papa e ICTA Ligerito x Rojo de Seda.

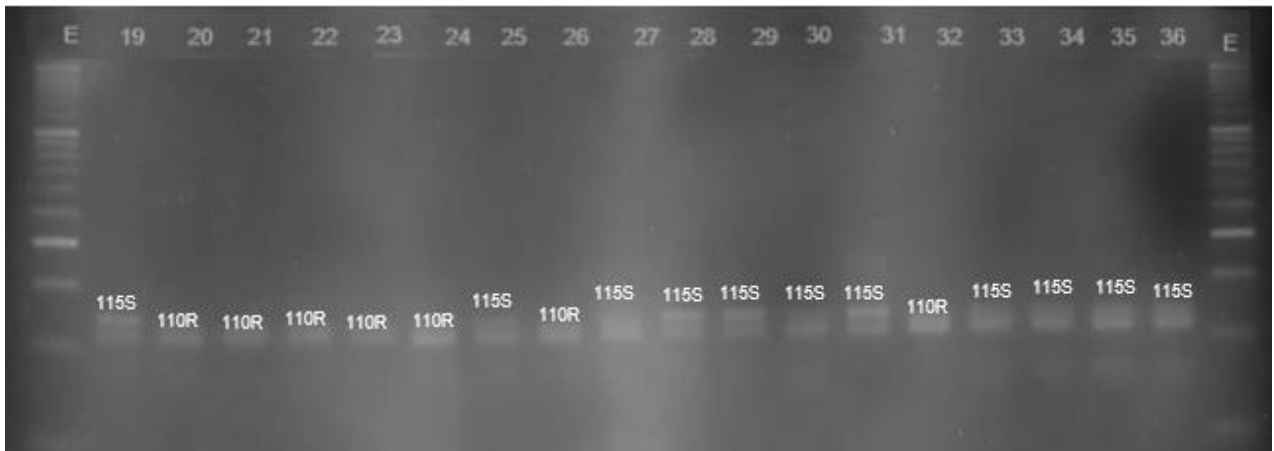


Figura 31. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

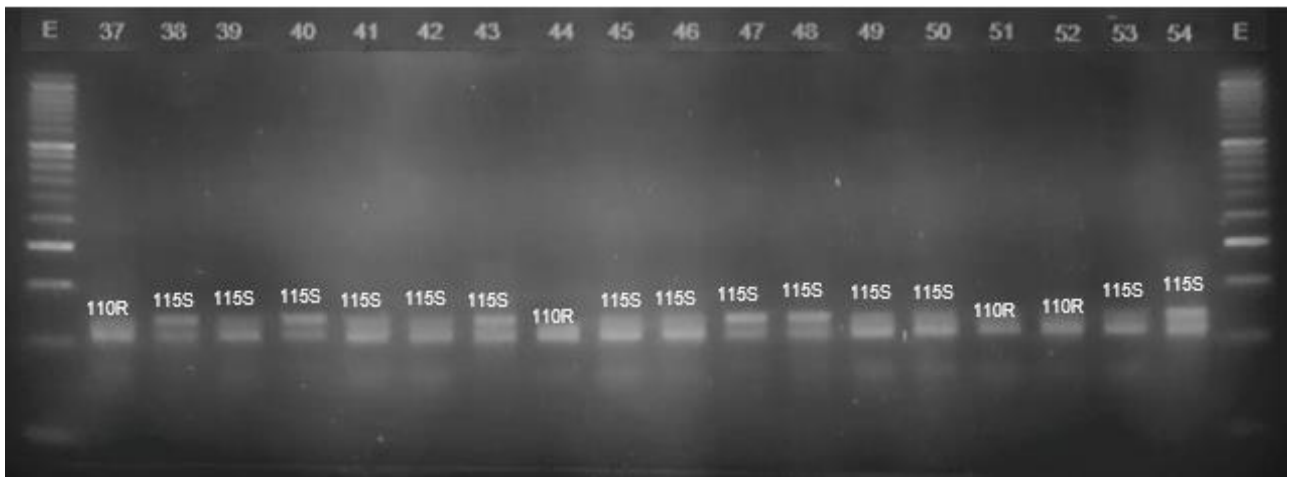


Figura 32. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

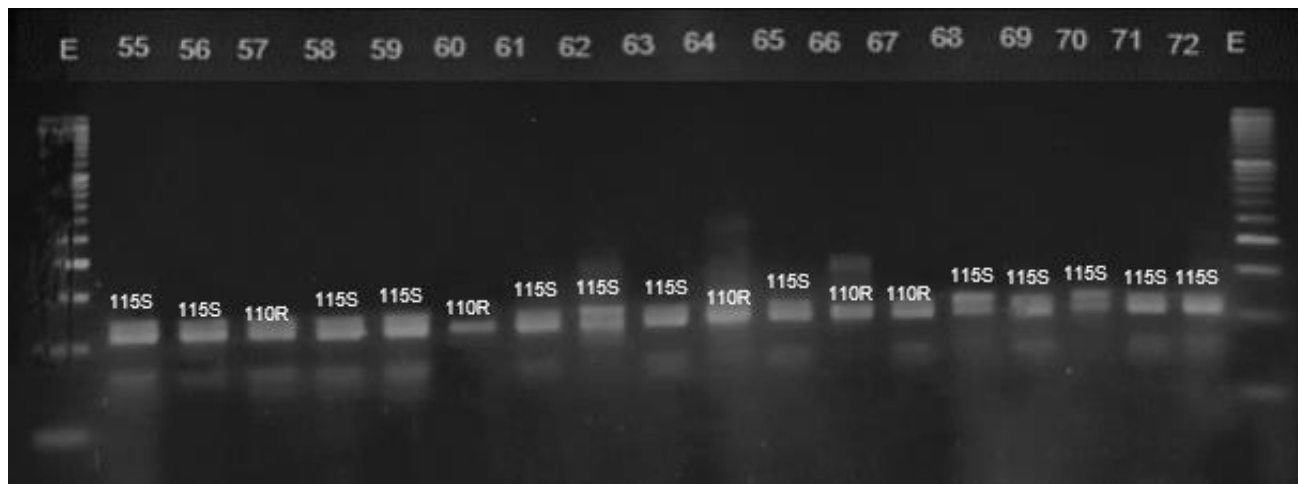


Figura 33. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

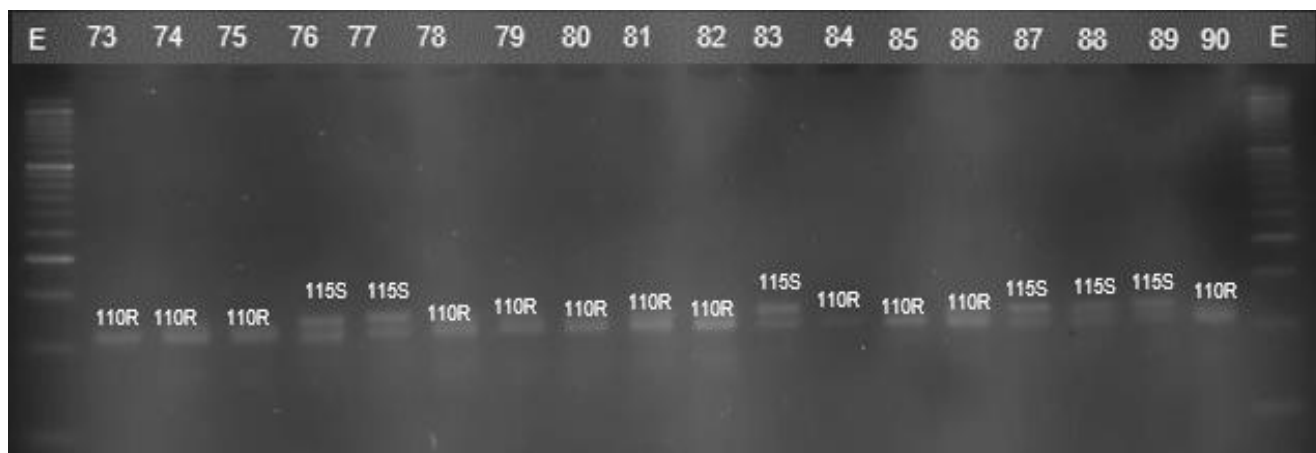


Figura 34. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

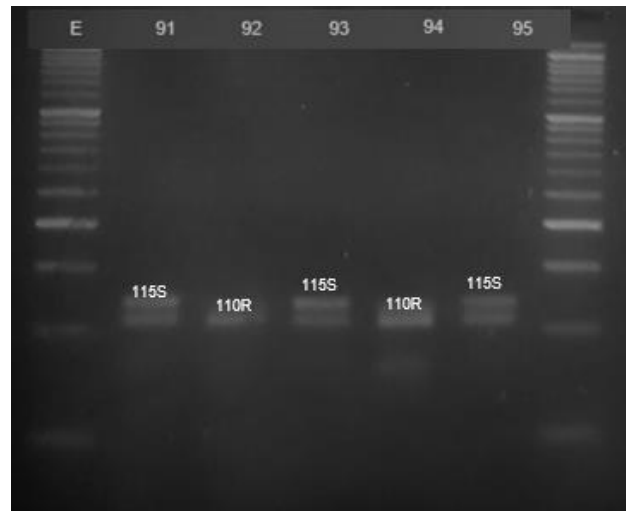


Figura 35. Amplificación del marcador STARP (110 pb / 115 pb) asociado al gen *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

6.3.3. Marcador molecular SCAR SW12

El marcador de tipo SCAR SW12 fue desarrollado del marcador RAPD SW12.700 ligado al QTL localizado en el grupo de ligamiento B04 (Miklas et al. 2000; Singh et al. 2000). Asimismo, este cebador complementa la resistencia para BGYMV, permitiendo identificar que 80 líneas de la población F2 amplificaron la banda a 700 pb que indica la presencia del marcador de resistencia al *QTL_{mayor}*.

En el cuadro 15 se presentan los resultados del marcador molecular de tipo SCAR SW12 para la identificación del *QTL_{mayor}* para la resistencia al BGYMV en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda. Las amplificaciones del marcador SW12 (700 pb) se muestran en las figuras 36 a 41.



Figura 36. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

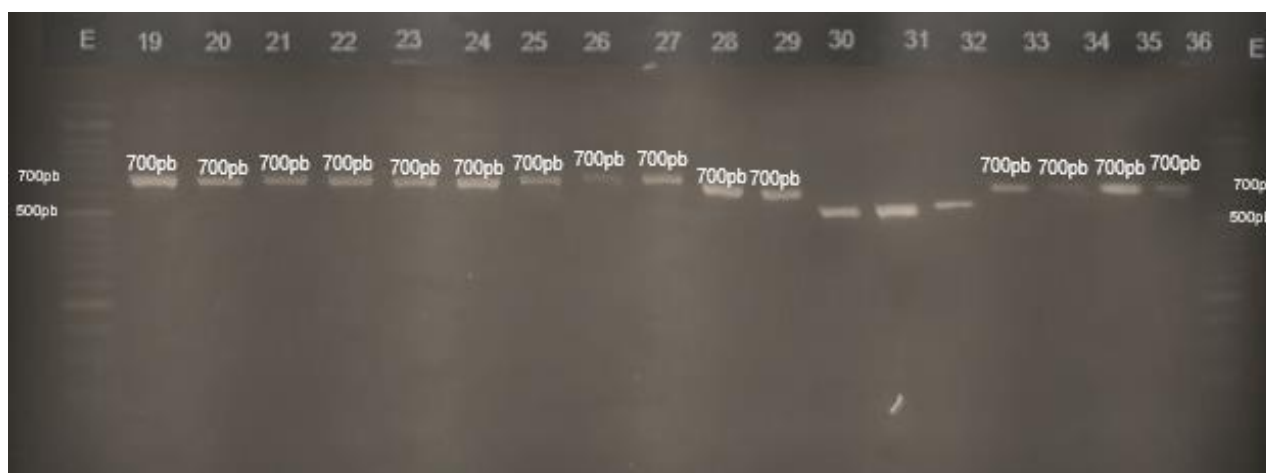


Figura 37. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

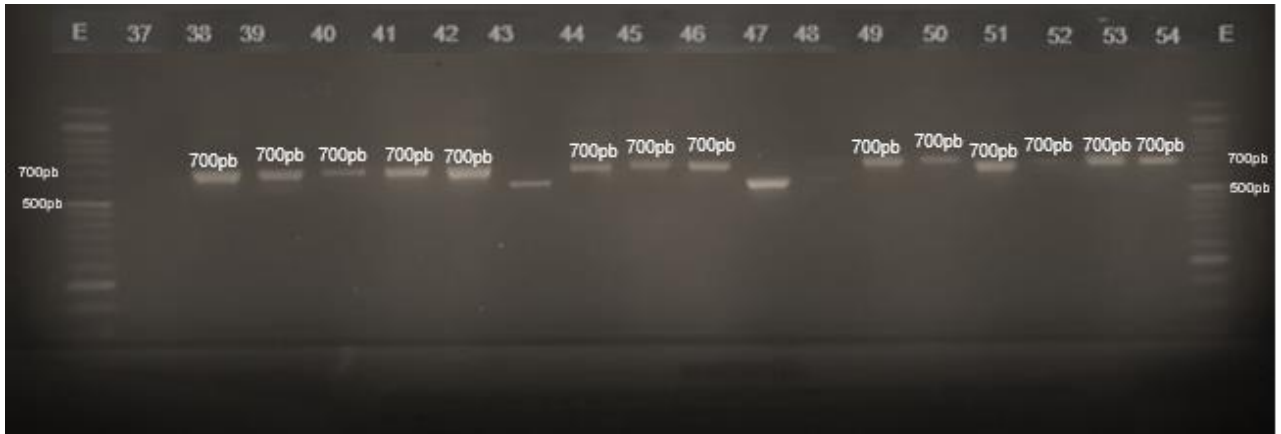


Figura 38. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

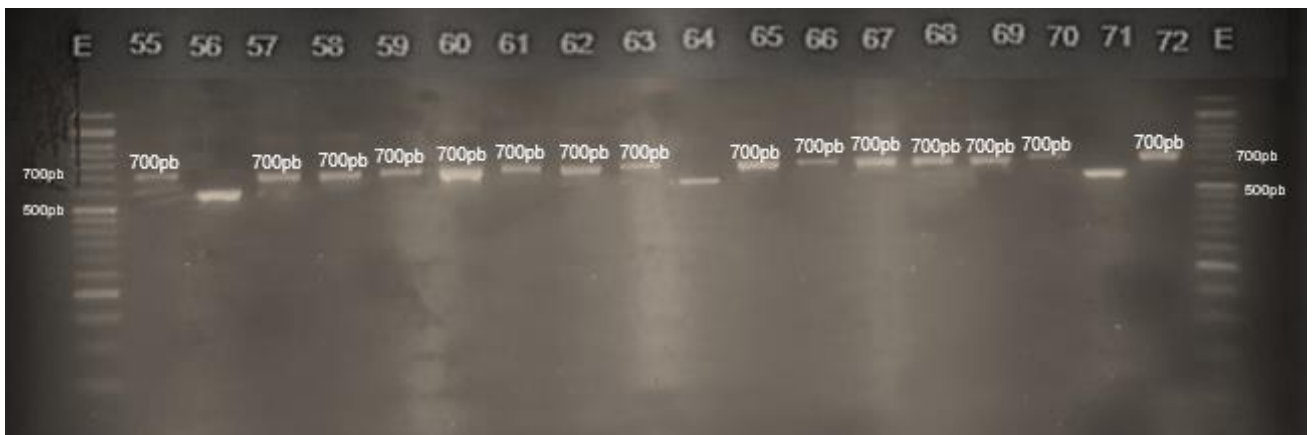


Figura 39. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligeró * Rojo de Papa e ICTA Ligeró x Rojo de Seda.

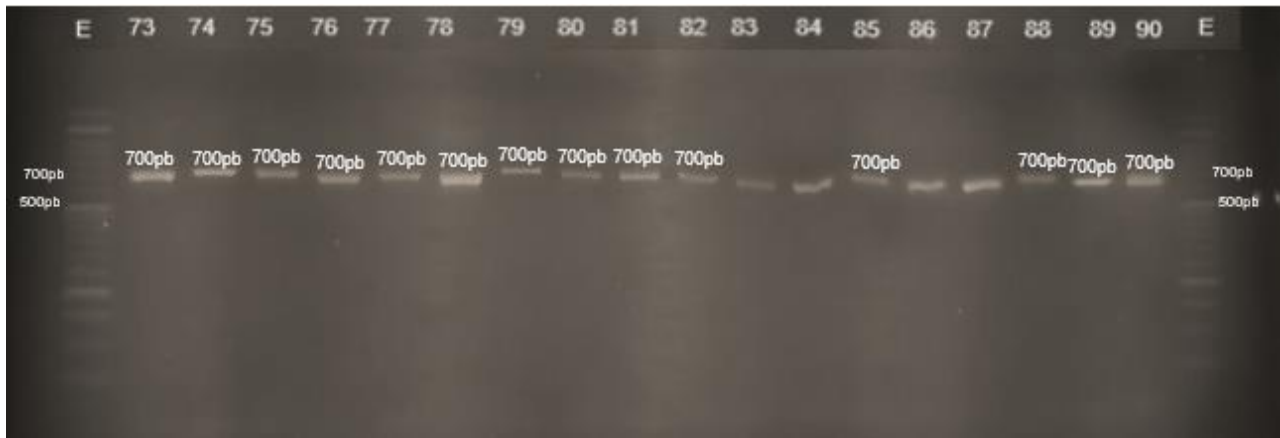


Figura 40. Amplificación del SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligero * Rojo de Papa e ICTA Ligero x Rojo de Seda.

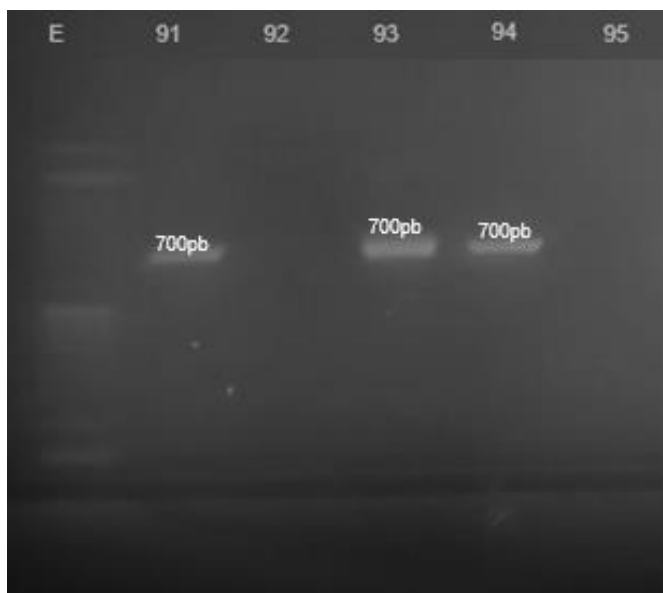


Figura 41. Amplificación con el marcador tipo SCAR SW12 (700 pb) asociado al QTL_{Mayor} de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) en líneas F2 de las poblaciones ICTA Ligero * Rojo de Papa e ICTA Ligero x Rojo de Seda.

Además, el marcador SW12 es usado como complemento del marcador SR2 ya que por sí solo no proveerá la protección adecuada contra el virus del mosaico dorado del frijol severo.

Una combinación de selección directa de la enfermedad y el uso de marcadores como SR2 y SW12 deberían facilitar la ampliación de la resistencia a BGMV. El marcador SCAR SW12 vinculado con el *QTL_{mayor}* y el marcador SCAR SR2 vinculado con el gen *bgm-1* fueron reportados como los únicos genes encontrados hasta la fecha que imparten resistencia contra el BGYMV susceptibles de SAM. (López et al. 2003)

La amplificación de un fragmento de diferente tamaño a partir del enlace de los cebadores para el SCAR SW12 (Singh et al. 2000) con el QTL de BGYMV localizado en los cromosomas Pv04 se reportó que cosegregaba de forma codominante con el gen Co-9 (Méndez-Vigo et al. 2005) y, por lo tanto, apoya la presencia del QTL de resistencia a BGYMV en el grupo de genes de resistencia B4.

Según Beebe et al., (1995); Singh et al., (2000), el gen *bgm-1* es el más importante para conferir resistencia a BGYMV, donde el cebador SR2 ligado a este gen se asocia con la resistencia a los síntomas generales de la enfermedad como el amarillamiento o clorosis, pero no con síntomas como el enanismo, que se relaciona con otros factores de resistencia como el gen *DWF* (Blair et al., 2007).

Otros genes de resistencia como *Bgp-1* se encuentran ligados al desarrollo normal de las vainas durante la infección (Acevedo-Román et al., 2004), o el marcador SW12 que está asociado a la resistencia a esta enfermedad cuando están presentes con el gen *bgm-1*. (Miklas et al. 2000; Singh et al. 2000)

Según Blair, Fregene, Beebe & Ceballos (2007) el *bgm-1* se comporta como un gen recesivo, por lo que la selección fenotípica en las primeras generaciones sería ineficiente en la recuperación del gen en el estado heterocigoto. En este caso, la selección de la generación temprana con SAM se limitaría a la selección negativa contra plantas homocigotas dominantes y heterocigotas, y esto eliminaría los genotipos portadores de alelos potencialmente útiles. De hecho, SAM es imposible en generaciones como la F1 o BC1F1 para el progenitor susceptible cuando no existen plantas homocigotas recesivas.

Según Goyzueta & Chicas (2014) la utilización de marcadores moleculares en poblaciones F2 facilita la caracterización en generaciones tempranas en una población con la presencia de genes asociados a la resistencia del virus del mosaico dorado del frijol, además esto permitirá el avance de la selección en campo e invernadero para el potencial desarrollo de líneas mejoradas y para la validación comercial.

Cuadro 15. Resultados de la evaluación de 95 líneas F2 de frijol con los marcadores moleculares SCAR que indican la presencia de los genes de resistencia al virus del mosaico dorado del Frijol (SR2, STARP y SW12 del gen *bgm-1* y *QTL mayor*, respectivamente).

| No | Enfermedad | Virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) | | | |
|--|------------|---|--------------|--------------|------------------|
| | | Gen | <i>bgm-1</i> | <i>bgm-1</i> | <i>QTL mayor</i> |
| | | Marcador molecular | SR2 (CD) | STARP (CD) | SW12 (D) |
| ICTA Ligero * Rojo de Papa (Resistencia en campo) | | | | | |
| 1 | 1-21 | - | - | + | |
| 2 | 2-2 | H | - | + | |
| 3 | 2-20 | - | + | + | |
| 4 | 2-23 | + | + | + | |
| 5 | 2-47 | H | + | + | |
| 6 | 2-54 | - | - | + | |
| 7 | 3-11 | H | + | + | |
| 8 | 7-8 | - | - | + | |
| 9 | 7-25 | H | + | + | |
| 10 | 7-41 | - | - | + | |
| 11 | 7-52 | H | + | + | |
| 12 | 9-45 | - | - | + | |
| 13 | 10-1 | - | + | + | |
| 14 | 10-19 | H | + | + | |
| 15 | 12-37 | H | + | + | |
| 16 | 13-5 | H | + | - | |
| 17 | 13-47 | H | + | + | |
| 18 | 15-22 | H | + | + | |
| 19 | 16-46 | - | - | + | |
| 20 | 48-14 | + | + | + | |
| 21 | 18-31 | H | + | + | |
| 22 | 19-4 | - | + | + | |
| 23 | 19-7 | - | + | + | |
| 24 | 20-3 | H | + | + | |
| ICTA Ligero * Rojo de Seda (Resistencia en campo) | | | | | |
| 25 | 1-7 | - | - | + | |
| 26 | 1-17 | + | + | + | |
| 27 | 3-18 | H | - | + | |
| 28 | 3-22 | H | - | + | |
| 29 | 5-13 | H | - | + | |
| 30 | 5-20 | H | - | - | |

Continuación cuadro 15.

| | | | | |
|--|-------|---|---|---|
| 31 | 5-25 | H | - | - |
| 32 | 7-8 | - | + | - |
| 33 | 7-16 | H | - | + |
| 34 | 7-24 | - | - | + |
| 35 | 8-4 | H | - | + |
| 36 | 10-28 | H | - | + |
| 37 | 10-21 | - | + | - |
| 38 | 12-9 | + | - | + |
| 39 | 15-10 | H | - | + |
| 40 | 15-27 | - | - | + |
| 41 | 17-26 | - | - | + |
| 42 | 18-14 | - | - | + |
| 43 | 18-15 | - | - | - |
| 44 | 19-19 | H | + | + |
| 45 | 21-3 | H | - | + |
| 46 | 21-5 | H | - | + |
| 47 | 23-6 | H | - | - |
| ICTA Ligero * Rojo de Seda (Suceptibles en campo) | | | | |
| 48 | 1-5 | - | - | - |
| 49 | 1-15 | - | - | + |
| 50 | 3-10 | H | - | + |
| 51 | 4-13 | + | + | + |
| 52 | 6-10 | + | + | + |
| 53 | 7-21 | H | - | + |
| 54 | 8-11 | H | - | + |
| 55 | 9-11 | - | - | + |
| 56 | 10-10 | H | - | - |
| 57 | 13-3 | + | + | + |
| 58 | 14-12 | H | - | + |
| 59 | 19-9 | H | - | + |
| 60 | 16-3 | H | + | + |
| 61 | 17-11 | H | - | + |
| 62 | 20-15 | H | - | + |
| 63 | 21-8 | - | - | + |
| 64 | 22-2 | + | + | - |
| 65 | 25-6 | H | - | + |
| 66 | 26-4 | H | + | + |
| 67 | 27-7 | + | + | + |
| 68 | 28-7 | H | - | + |

Continuación cuadro 15.

| | | | | |
|--|-------|---|---|---|
| 69 | 39-1 | - | - | + |
| 70 | 41-8 | H | - | + |
| 71 | 44-6 | - | - | - |
| ICTA Ligero * Rojo de Papa (Suceptibles en campo) | | | | |
| 72 | 1-2 | H | + | + |
| 73 | 1-9 | H | + | + |
| 74 | 3-21 | H | + | + |
| 75 | 4-18 | H | + | + |
| 76 | 5-6 | + | - | + |
| 77 | 6-4 | - | - | + |
| 78 | 6-12 | - | + | + |
| 79 | 7-3 | H | + | + |
| 80 | 9-1 | H | + | + |
| 81 | 11-9 | H | + | + |
| 82 | 12-11 | H | + | + |
| 83 | 13-2 | H | - | - |
| 84 | 14-8 | - | - | - |
| 85 | 19-14 | + | + | + |
| 86 | 20-19 | H | + | - |
| 87 | 21-3 | H | - | - |
| 88 | 24-2 | - | - | + |
| 89 | 26-13 | - | - | + |
| 90 | 34-11 | - | + | + |
| 91 | 36-10 | - | - | + |
| 92 | 40-9 | - | + | - |
| 93 | 43-11 | - | - | + |
| 94 | 43-14 | - | + | + |
| 95 | 16-14 | H | - | - |

NOTA:**D** = Marcador dominante.**CD** = Marcador codominante.

+ = Presencia de banda de 530 pb con el marcador SR2, lo que indica el genotipo resistente homocigota recesivo (bgm-1/bgm-1); presencia de banda de 110 pb con el marcador STARP, lo que indica el genotipo resistente homocigota recesivo (bgm-1/bgm-1); presencia de banda de 700 pb del marcador SW12 para la presencia del QTL mayor.

- = Ausencia de banda 530 pb, indica ausencia del marcador SR2 en plantas de genotipos susceptibles homocigotas dominante (Bgm-1/Bgm-1); ausencia de banda 110 pb, indica ausencia del marcador STARP en plantas de genotipos susceptibles homocigotas dominante (Bgm-1/Bgm-1) y heterocigota (Bgm-1/bgm-1); ausencia del marcador SW12 del QTL mayor.

H = Planta heterocigota (Bgm-1/bgm-1).

7. CONCLUSIONES

1. En las 80 líneas F3 de frijoles volubles evaluadas para identificar los genotipos que portan los marcadores asociados a los genes que confieren la resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS), se confirma que 37 líneas fueron resistentes al gen *Phg-2* y 17 líneas mostraron resistencia al gen *Phg-1*. Sin embargo, 16 líneas presentaron los dos genes que confieren resistencia a la ALS. La introducción y combinación de genes con resistencia de origen andino y mesoamericano, *Phg-1* y *Phg-2* respectivamente, deberá proporcionar una resistencia más eficiente y duradera a la enfermedad.
2. La evaluación de la presencia de los marcadores asociados a los genes que confieren la resistencia al virus del mosaico común del frijol (BCMV), permitió identificar que la línea NSMC17524-12 es positiva para el gen *I*, pero negativa para el gen *bc-3*. Mientras, que el ICTA Ligero tuvo presencia de ambos genes de resistencia al BCMV, *I* y *bc-3*, ya que la variedad presenta resistencia a la enfermedad.
3. En las 95 líneas F2 de la población ICTA Ligero x Rojo papa e ICTA Ligero x Rojo seda, con el marcador SR2 se identificaron 11 líneas resistentes al gen homocigota recesivo *bgm-1* y con el marcador STARP, se determinó 40 líneas presentan el gen *bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV). Además, con el marcador SW12 nos permitió identificar que 80 genotipos son portadores del *QTL_{mayor}* que confieren a la resistencia al virus.

8. RECOMENDACIONES

A continuación, en base a los resultados y metodología realizada se enumeran una serie de recomendaciones cuya implementación son de vital importancia para el potencial desarrollo de materiales cultivares con resistencias a las enfermedades evaluadas.

1. Continuar el avance por selección en campo e invernadero de las líneas de frijol que resultaron positivos para la presencia del marcador molecular asociado al gen que confiere resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS), para el potencial desarrollo de líneas mejoradas y para la validación comercial.
2. Continuar el avance por selección en campo e invernadero de las líneas de frijol que resultaron positivos para la presencia del marcador molecular asociado al gen que confiere resistencia al virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV) para el potencial desarrollo de líneas mejoradas y para la validación comercial.
3. Seguir validando marcadores moleculares de reciente publicación para realizar selección asistida y así poder sustituir a los marcadores que se encuentren desactualizados.
4. Se recomienda, para futuras investigaciones con los marcadores moleculares evaluados, contar con los genotipos testigos positivos. Esto ayudará para evitar falsos negativos y corroborar que la PCR se llevó a cabo en buenas condiciones.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M. (1950). Genetics of resistance to the common bean mosaic virus (bean virus I) in the bean (*Phaseolus vulgaris* L), *Phytopathology*, 40, pp. 69.
- Acevedo, R., Molina, C., Angel, S., Germán, M., & Beaver, J. (2004). Inheritance of normal pod development in bean golden yellow mosaic resistant common bean. *Soc. Hortic. Sci*, 129(4), pp. 549-552.
- Allorent, D., & Savary, S. (2005). Epidemiological characteristics of angular leaf spot of bean: a systems analysis. *Eur J Plant Pathol.*, 113(4), pp. 329-341. doi:10.1007/s10658-005-4038
- Álvarez, E. (2018). *Cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris L.)*. El Salvador: El Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA).
- American Phytopathological Society (APS). (1991). *Compendium of bean diseases*. (R. Hall, Ed.) Minnesota, St. Paul, EE.UU: APS Press.
- Anaya, J., Garrido, E., Chiquito, E., Tosquy, O., Ibarra, F., & López, E. (2018). Identificación de líneas recombinantes de frijol negro opaco resistentes a BCMV, BCMNV y BGYMV mediante marcadores moleculares. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3), pp. 601-614.
- Andersen, A., & Down, E. (1954). Inheritance of resistance to the variant strain of the common bean mosaic virus. *Phytopathology*, pp. 44 y 481.
- Araya, C., & Hernández, J. C. (2006). *Guía para la identificación de enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica*. Costa Rica: MAG.
- Arus, P., & Moreno, J. (1993). *Marker assisted selection* (Vol. 1). (N. Bosermark, & L. Romagosa, Edits.). Plant breeding: Principles and Prospects. Chapman & Hall.
- Bassi, D. (2014). Mapeamento de locos asociados à resistência à mancha angular e ao oídio em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). (Tesis de Maestría, Instituto Agronômico, Sao Paulo, Brasil). Repositorio Institucional: [Http://ciagro.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/posgraduacao/repositorio/storage/pb396012.pdf](http://ciagro.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/posgraduacao/repositorio/storage/pb396012.pdf)
- Beebe, S. (1997). *Marcadores Moleculares para brutos (y para frijoleros)*.
- Beebe, s., & Pedraza, F. (1998). Perspectivas para el uso de Marcadores Moleculares en el Mejoramiento del Frijol. *Profrijol*, pp. 129-139.
- Beebe, S., Ramirez, J., Jarvis, A., Rao, E. M., Mosquera, G., Bueno, J. M., & Blair, M. (2011). Genetic improvement of common beans and the challenges of climate change. (S.

Yadav, R. Redden, J. Hatfield, H. Lotze-Campen, & A. Hall, Edits.), *Crop adaptation to climate change*. (1ª ed., pp 356-369). United Kingdom: Wiley-Blackwell.

Bennink, M. (2005). *Eat beans for good health*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. (48), pp. 1-5

Blair, M., & Beaver, J. (1993). Inheritance of bean golden mosaic resistance from bean genotype A 429. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 36, pp. 143.

Blair, M., Fregene, A., Pedraza, F., Beebe, S., & Ceballos, H. (2007). Marker-assisted selection in common beans and cassava. *Marker-assisted selection – Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*- pp. 81-115.

Blair, M., Rodriguez, L., Pedraza, F., Morales, F., & Beebe, S. (2007). Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene bgm-1 and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 114(2), pp. 261-271.

Broughton, W., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., & Gepts, P. y. (2003). Bean (*Phaseolus* spp) - model food legumes. *Plant and soil*, 252, pp. 55-128.

Brown-Rytlewski, i. D., & Kirk, W. (2006). Insect, Nematode, and Disease Control in Michigan Field Crops MSU Bulletin. *Plant Pathology*.

Camera, F., Chura, J., & Blas, R. (2015). *Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas* (2ª ed.). Perú: Colección AGROSABER.

Campos-Ávila, J. (1991). *Enfermedades del frijol*. México: Trillas.

Cardona, C., Flor, C., Morales, F., & Pastor Corrales, M. (1995). *Problemas de campo en los cultivos de frijol en el trópico*. Colombia: CIAT.

La Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). (2011). *Escenarios futuros de los siete países de Centroamérica*. [Http://www.eclac.cl/id.asp?id=43925](http://www.eclac.cl/id.asp?id=43925)

Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia (CIAT). (1984). *Morfología de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Cali, Colombia: CIAT.

Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia (CIAT). (1986). *Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. (F. Fernández, Ed.). Cali, Colombia: CIAT.

Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia (CIAT). (1991). *Manual de recetas culinarias de frijol (Phaseolus vulgaris L.)*. (G. Gálvez., Ed.). Perú: CIAT- PROFRIZA

- Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia (CIAT). (1994). *La mancha angular del frijol y su control*. (H. Schwartz, M. Pastor-Corrales, & F. Correa, Edits.) Cali, Colombia.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia (CIAT). (1996). Taller de mejoramiento del frijol para el siglo XXI: Bases para una Estrategia para América Latina. (P. Shree, & O. Voysest, Edits.). Cali, Colombia: CIAT .
- Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia (CIAT). (1998). *Bean production problems in the tropics*. (H. Schwartz, M. Pastor-Corrales, & F. Correa, Edits.). Cali, Colombia: CIAT.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia (CIAT). (2000). Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): de las variedades de América Latina. (O. Voysest, Ed.). Cali, Colombia: CIAT.
- Conti, M., Gallitelli, D., Lisa, V., Lovisolo, O., Martelli, G., Ragozzino, A., . . . Vovlas, C. (2000). *Principales virus de las plantas hortícolas*. España: Mundi-Prensa.
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Martha, R. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1ª ed.). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat).
- Corporación para el Desarrollo, la Innovación y Soluciones Estratégicas, S.A. -AKIANTO-. (2012). *Impacto social y económico del sector agrícola guatemalteco sobre la economía nacional*. Asociación del Gremio Químico Agrícola –Agrequima-. Guatemala: CropLife. <https://agrequima.com.gt/site/wp-content/uploads/2017/01/160512vvff.pdf>
- Costa, A. (1965). Three Whitefly-Transmitted Virus Diseases of Beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bull.*, 13(6), pp. 1-12.
- Crous, P., Liebenberg, M., Braun, U., & Groenewald, J. (2006). Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. *Stud Mycol.*, 55, pp. 163-173. doi:10.3114/sim.55.1.163
- Díaz, M. G. (2001). *Caracterización genética de la resistencia del frijol común a la mancha angula*. (Tesis de Licenciatura, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras). Repositorio Institucional: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4605/1/CPA-2015-058>.
- De Jesus, W., do Vale, F., Coelho, R., Hau, B., Zambolim, L., Costa, L., & Filho, A. (2001). Effects of Angular Leaf Spot and Rust on Yield Loss of *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology.*, 91(11), pp. 1045-1053.

- Debouck, D., & Hidalgo, R. (1984). *Morfología de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Cali, Colombia: CIAT.
- Drijfhout, E. (1978). *Genetic Interaction between Phaseolous vulgaris and Bean Common Mosaic Virus with Implications for Strain Identification and Breeding for Resistance*. Wageningen: Agric.
- Ekpo, E., & Saettler, A. (1974). Distribution pattern of bean common mosaic virus in developing bean seed. *Phytopathology*, 64, pp. 269-270.
- FAO. (2018). *Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones*. Panamá: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.
- Ferreira, C., Borém, A., Carvalho, G., Neitsche, S., Paula, T., & Barros, E. (2000). Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. *Crop Science*, 40, pp. 1130-1133.
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1998). *Introdução au uso de marcadores moleculares em análise genética*. (3ª ed.). Brasil: Empraba-Cenargen.
- Gálvez, G., & Morales, J. (1989). Aphid-transmitted viruses. (H. Schwartz, & M. Pastor-Corrales, Edits.), *Bean production problems in the tropics* (2a ed., pp. 333-363). Colombia: CIAT.
- Gàmez, R. (1970). Transmisión por moscas blancas (*Bemisia tabaci* Gen.) y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado. *Los virus del frijol en Centroamérica*. (pp. 22-27). Turrialba.
- Gardner, E. (1988). *Principios de genética* (5ª ed.). México: Limusa.
- García-Mas, J., Graziano, E., Aranzana, M., Monforte, A., Oliver, M., Ballester, J., . . . Arús, P. (2003). *Marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos*. (N. Nuez & J. Carrillo Edits.). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal: Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. pp. 582.
- Garrido-Ramirez, E., Sudarshana, M., & Gilbertson, R. (2000). Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico: Characterization, Pseudorecombination with Other Bean-Infecting Geminiviruses and Germ Plasm Screening. *Phytopathology*, 90, pp. 1224-1232.
- Gepts, P. (2001). *Phaseolus vulgaris* (Beans). *Encyclopedia of Genetics*, pp. 1444-1445.
- Gepts, P., Kmiecik, K., Pereira, P., & Bliss, F. (1988). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. *The Americas Econ*, 42, pp. 73-85.

- Gillard, C., Ranatunga, N., & Conner, R. L. (2012). The effect of foliar fungicide application timing on the control of dry bean anthracnose. *Can. J. Plant Sci*, 92, pp. 109-118.
- Gillespie, L. (1999). *Icta Ligero, nueva variedad de frijol negro precoz y resistente a mosaico dorado*. Guatemala.
- Gonçalves-Vidigal, M., Cruz, A., Garcia, A., Kami, J., & Vidigal Filho, P. (2011). Linkage mapping of the Phg-1 and Co-1⁴ genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND277. *Theoretical and Applied Genetics*, 122, pp. 893-903.
- Goyzueta, M. & Chicas, S. (2014). *Selección de líneas de frijol con resistencia múltiple a enfermedades causadas por virus*. (Tesis de Licenciatura, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras). Repositorio Institucional: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3475/1/CPA-2014-038.pdf>
- Halbert, S., Mink, G., Silbernagel, M., & Mowry, T. (1994). Transmission of bean common mosaic virus by cereal aphids (Homoptera:Aphididae). *Plant Disease*, 78, pp. 983-985.
- Haley, S., Afanador, L., Miklas, P., Stavely, J., & Kelly, J. (1994). Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(3-4), pp. 337-342.
- Hoisington, D., Listman, G., & Morris, M. (1998). Varietal development: Applied biotechnology. (M. Morris, Ed.) *Lynne Rienner Publishers and Centro Internacional de Maíz y trigo*, pp. 77-102.
- Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). (1996). *Dos variedades de frijol negro para el altiplano de Guatemala: ICTA-Altense y ICTA-Hunapu*. Guatemala: ICTA
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., & White, T. (1990). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York, Estados Unidos de América: Academic Press.
- Johnson, W., Guzmán, P., Mandala, D., Mkandawire, A., Temple, S., Gilbertson, R., & Gepts, P. (1997). Molecular tagging of the bc-3 gene for introgression into Andean common bean. *Crop Science*, 37(1), pp. 248-254.
- Keller, B., Manzanares, C., Jara, C., Lobaton, J., Studer, B., & Raatz, B. (2015). Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 128(5), pp. 813-826.
- Kelly, J. (1992). Breeding strategies for genetic control of BCMV. *Annual report of the Bean Improvement Cooperative*, 35, pp. 60-61.

- Kelly, J., & Miklas, P. (1999). Marker-Assisted Selection. (S. Singh, Ed.), *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century* (pp. 93-124). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Kelly, J., & Vallejo, V. (2004). A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience*, 39(6), pp. 1196-1207.
- Kelly, J., Geps, P., Miklas, P., & Coyne, D. (2003). Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research*, 82, pp. 135-154.
- Kelly, J., Melotto, M., & Steban, E. (2000). Integrando la biotecnología con los métodos clásicos en la mejora de la judía. *Seminario de mejora genética vegetal. Servicio de publicaciones e intercambio científico*.
- Koinange, E., Singh, S., & Gepts, P. (1996). Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Science*, (36)
- Kour, B. (2010). *Biotechnological approach towards development of disease resistant phaseolus vulgaris l*. Jammu: University of Jammu.
- Lopez, C., Acosta, I., Jara, C., Pedraza, F., Gaitan-Solis, E., Gallego, G., Beebe, S., & Tohme, J. (2003) Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathol*, 93, pp. 88–95.
- Lee, P., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y.-H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments-JOVE-*, 62, pp. 1-5. doi:10.3791/3923
- Mahuku, G., Montoya, C., Henríquez, M., Jara, C., Terán, H., & Beebe, S. (2004). Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. *Crop Science*, 44(5), pp. 1817-1824.
- Mahuku, G., Henríquez, M., Montoya, C., Jara, C., Teran, H., & Beebe, S. (2011). Inheritance and development of molecular markers linked to angular leaf spot resistance genes in the common bean accession G10909n. *Molecular Breeding*, 28, pp. 57-71.
- Mahuku, G., Jara, C., Cajiao, C., & Beebe, S. (2003). Sources of resistance to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in common bean core collection, wild *Phaseolus vulgaris* and secondary gene pool. *Euphytica*, 130, pp. 303-313.
- Maldonado-Mota. (2017). *Identification of new sources of resistance to anthracnose in climbing bean germplasm from Guatemala*.
- Mastenbroek, C. (1960). A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. *Euphyta*, 9, pp. 177-184.

- Mendez-Vigo, B., Rodriguez-Suarez, C., Paneda, A., Ferreira, J., & Giraldez, R. (2005). Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. *Euphytica*, 141, pp 237–245.
- Melotto, M., Afanador, L., & Kelly, J. (1996). Development of a SCAR marker linked to the I gene in common bean. *Genome*, 39(6), pp. 1216-1219.
- Miklas, P. (2005). List of DNA SCAR markers linked with disease resistance traits in bean. *Phytopathology*.
- Miklas, N., Kelly, J., Beebe, S., & Blair, M. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica*, 147, pp. 105-131.
- Miklas, P., Delorme, R., & Riley, R. (2003). Identification of QTL conditioning resistance to white mold in snap bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. (128), pp. 564-570.
- Miklas, P., Delorme, R., Stone, V., Daly, M., Stavely, J., Steadman, J., & Beaver, J. (2000). Bacterial, fungal, and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population (Dorado'/XAN 176). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(4), pp. 476-481.
- Miklas, P., Pastor-Corrales, M., Jung, G., Coyne, D., Kelly, J., McClean, P., & Gepts, P. (2002). Comprehensive linkage map of bean rust resistance genes. *Annual Report-Bean Improvement Cooperative*, 45, pp. 125-129.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA). (2017). *Situación del Frijol*. Guatemala.
https://www.maga.gob.gt/sitios/diplan/download/informacion_del_sector/informes_de_situacion_de_maiz_y_frijol/2017/12%20Informe%20Situaci%C3%B3n%20Del%20Frijol%20Negro%20Diciembre%202017.pdf
- Morales, F. (1979). Metodología de Investigación y Técnicas de Control. En *El mosaico Comùn del frijol (Bean Common Mosaic Virus)* (pp. 10). Cali: CIAT.
- Morales, F. (2000). *El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en América Latina*. Colombia: CIAT.
- Muhamba, G., Amos, L., Protas, D., Mbogo, P., & Nchimbi-Msolla, S. (2013). Marker Assisted Selection for Common Bean Diseases Improvements in Tanzania: Prospects and Future Needs. *InTech*, pp. 121-137. doi:10.5772 / 52823
- Mukeshimana, G., Hart, L., & Kelly, J. D. (2003). Bean common mosaic virus and bean common mosaic necrosis virus. *Extension Bulletin E-2894.*, pp. 2.

- Nicolò, G., Escobar, E., García, G., & Ortiz, A. (2010). *Misión FAO/PMA de evaluación de Cosecha y Seguridad Alimentaria en Guatemala*. Guatemala: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). [Http://www.fao.org/giews/](http://www.fao.org/giews/)
- Nietsche, S.; Borém, A.; Carvalho, G.; Rocha, R.; 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), pp. 117-12
- Oblessuc, P., Baroni, R., Garcia, A., Chioratto, A., Carbonell, S., Camargo, L., & Benchimol, L. (2012). Mapping of angular leaf spot resistance QTL in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different environments. *BMC gen*, 13(1), pp. 50.
- Pastor-Corrales, M., Jara, C., & Singh., S. (1998). Pathogenic variation in, source of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. *Euphytica*, 103, pp. 161-167.
- Petersen, H. (1958). eiträge zur Genetik von *Phaseolus vulgaris* L. anf Infektion mit *Phaseolus Virus 1* Stamm Voldagsen. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 39, pp. 187.
- Pierce, W. (1935). The inheritance of resistance to common bean mosaic in field and garden beans, *Phytopathology*, 25, pp. 875.
- Promega Corporation. (2020). *Isolation of Genomic DNA from Yeast Cultures or Plant Tissue*. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-genomic-dna-purification-kit-quick-protocol.pdf?la=en>
- Queiroz, V.; De Sousa, C.; Costa, M.; Sanglad, D.; Arruda, K.; De Souza, T. L. P. O.; Moreira, M. A. (2004). Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. *Annual Report Bean Improvement Cooperative*, 47, pp. 237-238.
- Rincón., M. A. (2004). PCR. México: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez, I. Y. (2013). *Caracterización de razas y selección fenotípica y molecular de líneas de frijol común resistentes a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) Sacc. Ferrari*. (Tesis de Licenciatura, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras). Repositorio Institucional: <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/1730>
- Rodríguez, M., Faure, B., Benítez, A., & Beebe, S. (2007). Identificación de genotipos resistentes al virus de mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) mediante el uso del marcador molecular bgm-1. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 11, pp. 57-63.

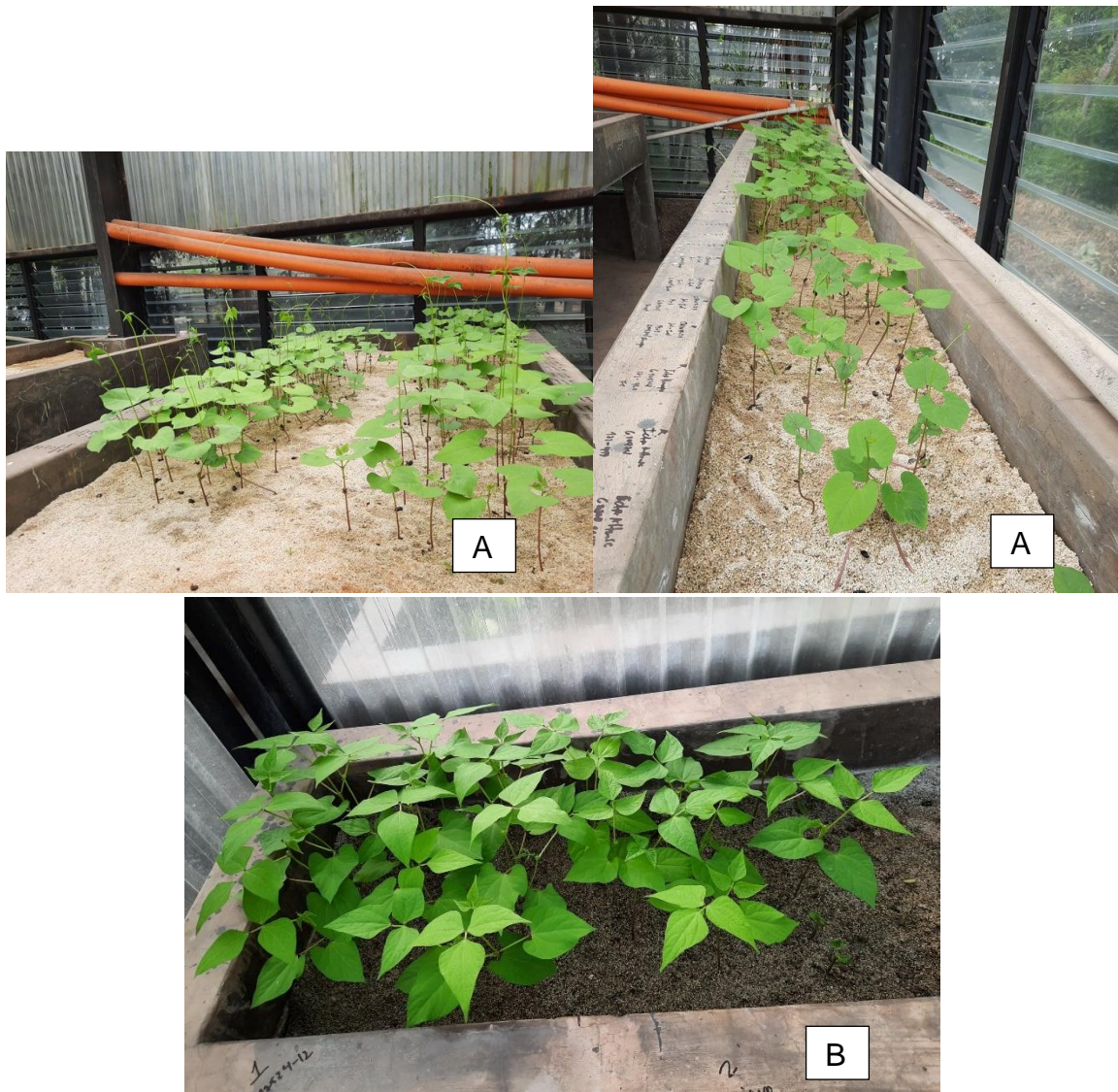
- Román, M., Castañeda, A., Sánchez, J., Muñoz, C., & Beaver, J. (2004). Inheritance of normal pod development in bean golden yellow mosaic resistant common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(4), pp. 549-552.
- Santos-Filho, H., & Ferraz, S. C. (1976). solamento e esporulac ~ ,ao "in vitro" de *Isariopsis griseola* Sacc. *Experientiae*, 7, pp. 175-193.
- Sartorato, A., Nietsche, S., de Barros, E., & Moreira, M. (2000). RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in. *Fitopatologia Brasileira*, 25, pp. 637-642.
- Sartorato, A. (2002). Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes in five States in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 27(1), pp. 78-81.
- Schwartz, H., & Gálvez, G. (1980). *Problemas de Producción del Frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de Phaseolus vulgaris*. Cali, Colombia: CIAT.
- Schwartz, H., Correa, V., Pineda, D., Otoya, M., & Katherman, M. (1981). Dry bean yield losses caused by *Ascochyta*, angular, and white leaf spots in Colombia. *Plant Dis*, 65(6), pp. 494-496. doi:10.1094/PD-65-494
- Schwartz, H., Pastor-Corrales, M., & Singh, S. (1982). New sources of resistance to anthracnose an angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Euphytica*, 31, pp. 741-754.
- Singh, S. (1996). Progreso, problemas y el futuro del mejoramiento de frijoles mesoamericanos y la mejora genética integrada. *Taller de Mejoramiento de Frijol para el siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina.*, pp. 334-350. (P. Singh, & O. Voysest, Edits.). Colombia: CIAT.
- Singh, S., & Muñoz, C. (1997). Resistance to common bacterial blight among *phaseolus* species and common bean improvement. *phaseolus species and common bean improvement*, (39), pp. 80-89.
- Singh, S., & Schwartz, H. (2010). Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science*, 50(6), pp. 2199-2223.
- Singh, S., Morales, F., Miklas, P., & Teran, H. (2000). Selection for bean golden mosaic resistance in intra-and interracial bean populations. *Crop Science*, 40(6), pp. 1565-1572.
- Stuber, C. (1989). Molecular markers in the manipulation of quantitative characters. (R. Phillips, & I. Vasik, Edits.), *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Netherlands: Sinauer Associates Inc. Publishers.

- Temple, S., & Morales, F. (1986). Linkage of dominant hypersensitive resistance to bean common mosaic virus to seed color in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*, 35, pp. 331.
- Terán, H. (2000). *Efectividad del método de selección por gametos en la F1 de cruces múltiples para resistencia a enfermedades en frijol común, Phaseolus vulgaris L.*
- The plant List. (2010). *Phaseolus vulgaris L.* The plant List: [Http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/ild-2934](http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/ild-2934)
- Tobar M., & Suchini, A. (2019). *Aplicación de la Biotecnología para la investigación en granos básicos y hortalizas.* Informe plan operativo anual 2019 (PIN-017-2019). Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas -ICTA-
- Trujillo, C. (2007). *Estandarización del método de selección de gametos en la f1 de cruces dobles para resistencia múltiple a enfermedades en fréjol común (phaseolus vulgaris l.).* (Tesis de Ing. Agropecuario, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí). Repositorio Institucional: [Http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2560](http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2560)
- Urrea, C., Miklas, P., B. J., & Riley, R. (1996). A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of BGMV resistance in common bean. *J Am Soc Hort Sci*, 112, pp. 1035-1039.
- Velez, J., Bassett, M., Beaver, J., & Molina, A. (1998). Inheritance of resistance to bean golden mosaic virus in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(4), pp. 628-631.
- Voysest, O. (1983). *Variedades de frijol en América Latina y su Origen.* Colombia: CIAT.
- Yu, Z., Stall, R., & Vallejos, C. (1998). Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans. *Crop Sci.*, 38, pp. 1290-1296.



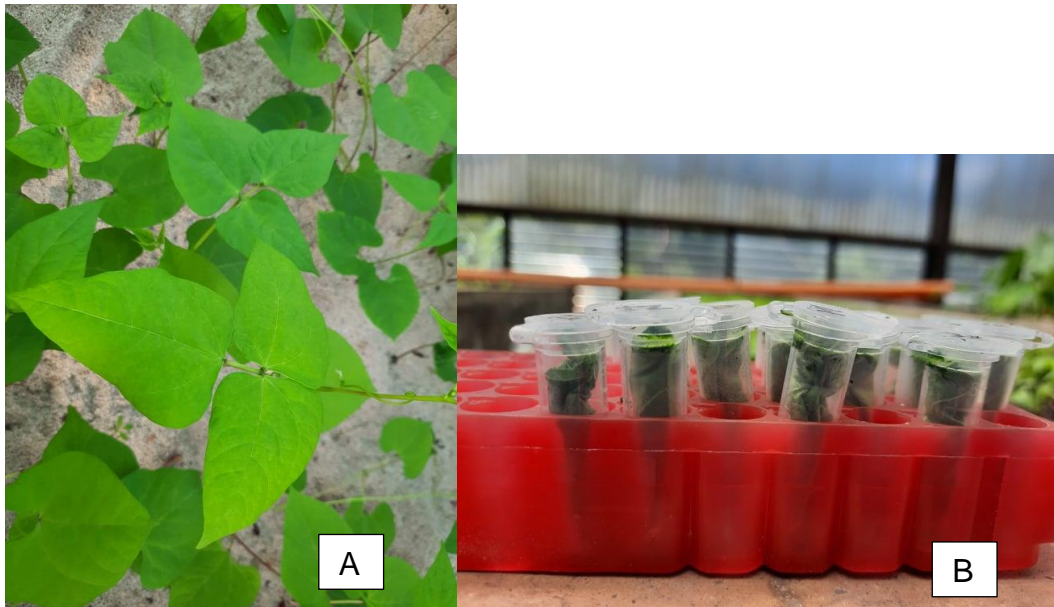
A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Velez", written over the stamp.

10. ANEXOS



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 42A. Líneas de frijol sembradas en el invernadero del laboratorio de Biotecnología del ICTA A. Líneas de frijol para la evaluación del gen de resistencia a la mancha angular de la hoja (ALS) B. Líneas de frijol para la evaluación del gen de resistencia al virus del mosaico común (BCMV).



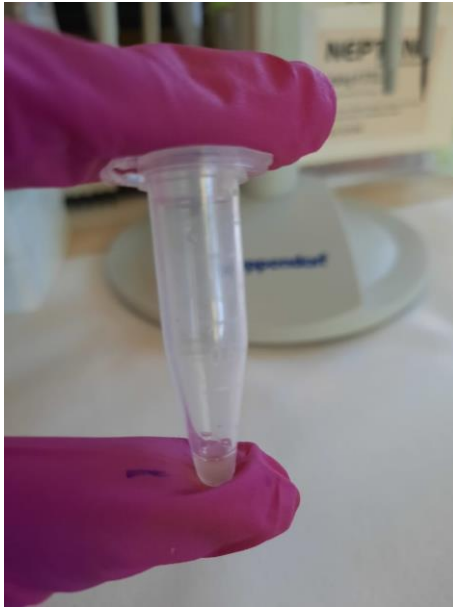
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 43A. Colección del tejido vegetal. A. Colección de la primera hoja trifoliada B. Tubos de microcentrífuga identificados.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 44A. Kit de extracción de ADN.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 45A. ADN extraído de las líneas de frijol.



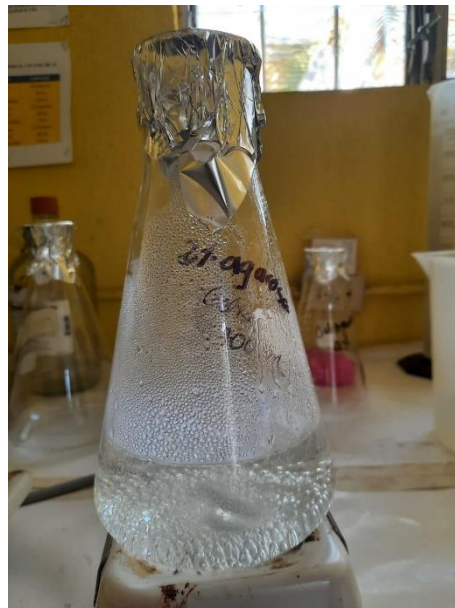
Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 46A. Mezcla de la reacción de los PCR.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 47A. Termociclador empleado en el proceso de PCR.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 48A. Preparación del gel de agarosa al 2 %.



Fuente: elaboración propia, 2021.

Figura 49A. Sistema de electroforesis horizontal empleado para la separación de fragmentos de ADN.



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



REF. Sem. 06/2021

LA TESIS TITULADA:

"IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.) PORTADORES DE MARCADORES LIGADOS A LA RESISTENCIA DE LA MANCHA ANGULAR (ALS), VIRUS DEL MOSAICO COMÚN DEL FRIJOL (BCMV) Y VIRUS DEL MOSAICO DORADO DEL FRIJOL (BGYMV) MEDIANTE SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES (SAM) MOLECULARES EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL ICTA, GUATEMALA, C.A."

DESARROLLADA POR LA ESTUDIANTE:

DENNISSE HONORIA LICARDÍE JERÉZ

CARNE:

201603303

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES: Dr. Luis Rodolfo Montes Osorio
Dr. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez
Dr. David Monterroso Salvatierra

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Dr. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez
A S E S O R

Dr. David Monterroso Salvatierra
A S E S O R

Ing. Agr. Carlos Fernando López Búcaro
DIRECTOR DEL IIA

IMPRIMASE

Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
D E C A N O



CFLB/nm
c.c. Archivo