



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

PERFIL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

FECHA DE PRESENTACIÓN: 2010-05-03

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA / DEPARTAMENTO: Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV).

PROYECTO: Bioersity
"Conservación y uso de la diversidad genética cultivada para el control de plagas en apoyo a la agricultura sostenible".

RESULTADO: Caracterización de la resistencia a antracnosis y roya en el germoplasma de fréjol de Cotacachi y Saraguro.

ACTIVIDAD: Evaluación de la resistencia a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y roya (*Uromyces appendiculatus*) de poblaciones locales de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) de Cotacachi y Saraguro.

UBICACIÓN: Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglahua

AUTOR (ES): Egda. Laura Elizabeth Vega Jiménez

COAUTORES: Ing. José Ochoa

COLABORADORES: Asociación Interparroquial de Comunidades Indígenas de Tenta (AICIT).
Unión de Organizaciones Campesinas e Indígenas de Cotacachi (UNORCAC).
Estación Experimental del Austro.

FECHA DE INICIO: 2010-05-03

FECHA DE TERMINACIÓN: 2011-01-03

PRESUPUESTO: USD 4208,89

FUENTE (S) DE FINANCIAMIENTO:

| | | |
|--------------------|---------|---------|
| Proyecto Bioersity | 3367,11 | 80,00 % |
| INIAP | 841,78 | 20,00 % |
| Total | 4208,89 | |

1. ANTECEDENTES

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano de mayor consumo en el mundo y además provee una dieta equilibrada. Su mayor área de producción se encuentra concentrada en América Latina, donde se localiza cerca del 45% de la producción mundial, y representa, además, la región de mayor consumo del grano (CIAT, 1993). En Ecuador, el fréjol ocupa el primer lugar en producción y consumo entre las legumbres de grano comestible para consumo humano directo (INIAP, 2010).

Formas cultivadas de fréjol estuvieron presentes hace 7 000 años en su lugar de origen en los valles de Tehuacan y Oaxaca, en México. El fréjol fue un componente importante de la dieta de los Aztecas y los Incas lo introdujeron en Sudamérica (Araya, 2003).

En el país los tipos arbustivos se cultivan en monocultivo en áreas de valle y estribaciones comprendidas entre los 1 000 y 2 500 m de altitud, mientras que los tipos volubles se cultivan en asociación con maíz en las praderas interandinas entre 2 000 y 3 000 m de altitud. La superficie cultivada de esta leguminosa es de 113 212 ha sembradas anualmente, de las cuales el área sembrada en monocultivo es de 16 000 ha, mientras que en cultivo asociado el área alcanza 97 212 ha, con una producción total de 22 090 t (Peralta *et al*, 2007).

La superficie promedio que emplean los agricultores para el cultivo de fréjol es relativamente pequeña; el 39% de los agricultores poseen menos de una hectárea, mientras que el 64% posee entre una y dos hectáreas (Ernest *et al*, 2008). Aunque la superficie promedio por finca es baja, el fréjol aporta entre el 40% y el 70% del ingreso familiar de agricultores dedicados a este cultivo (Peralta, citado por Parra, 2010).

Las enfermedades son limitantes importantes del cultivo en Ecuador, y las más importantes son la roya (*Uromyces appendiculatus*) y la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) que llegan a causar pérdidas del 30 al 46% (Ochoa *et al*, 1999) y del 90% (Balardin *et al*, 1997) respectivamente, en cultivares susceptibles y cuando las condiciones climáticas favorecen el desarrollo de estas enfermedades.

La roya es un patógeno que presenta una gran variabilidad de virulencias. Hasta 1996, se reportaron más de 300 razas fisiológicas de roya en todo el mundo (Araya *et al*, 2004). En Ecuador se han identificado 21 razas fisiológicas en 26 aislamientos analizados (Cruz, 2000). Hasta el momento, los genes Ur-5, Ur-CNC, Ur-11 del acervo mesoamericano continúan siendo resistentes a todas las razas caracterizadas, seguidas por Ur-7, Ur-3+; y Ur-13 del grupo andino (INIAP, Informe Anual del Programa de Leguminosas, 2007).

La antracnosis también constituye una limitante importante del fréjol y su diversidad patogénica es relativamente amplia, se han reportado alrededor de 100 razas alrededor del mundo (Sánchez *et al*, 2009). En el País es también una enfermedad importante y se han reportado hasta el momento 20 razas. Los genes que continúan siendo los más eficientes para conferir resistencia a todos los aislamientos evaluados al momento en Ecuador corresponden a los genes co-1² y co-4² (INIAP, Informe Anual del Programa de Leguminosas, 2007).

La mejor alternativa para el control de estas enfermedades es la resistencia genética por ser la más eficiente y duradera y por tanto más sostenible; es compatible con todos los sistemas de siembra y puede reducir el abuso de los agroquímicos empleados comúnmente en los sistemas tradicionales de fréjol (INIAP, Informe Anual del Programa de Leguminosas, 2007). La herencia dominante es la que más se ha utilizado en mejoramiento genético, por lo que es la que más se conoce. Se han identificado diez genes mayores independientes para antracnosis y para roya, numerados de Co-1 a Co-11 (Nayibe *et al*, 2007) y de Ur-1 a Ur-11 (Araya, 2003) respectivamente.

Tanto las pérdidas de rendimiento como la evolución del patógeno se derivan de estudios de sistemas comerciales de cultivo y no se conocen estos aspectos en sistemas tradicionales de cultivo, donde la diversidad genética intra específica es amplia y el cultivo generalmente está asociado con maíz. La presente investigación se orienta a identificar las fuentes de resistencia presentes en las poblaciones de fréjol de Cotacachi (Imbabura) y Saraguro (Loja), lo que ayudará a comprender mejor la contribución de la resistencia presente en estas poblaciones en el manejo de estas enfermedades.

2. JUSTIFICACIÓN

La conservación de la biodiversidad agrícola es esencial para la producción agrícola y la seguridad alimentaria de la población ecuatoriana. La pérdida de la biodiversidad favorecería la homogeneidad genética incrementando la vulnerabilidad de los cultivos principalmente a enfermedades, lo que puede afectar seriamente la producción, es por ello que se debe promover la conservación de la diversidad genética cultivada lo que permitirá incrementar la sustentabilidad de los cultivos.

La roya y antracnosis son enfermedades que disminuyen significativamente el rendimiento de cultivos comerciales de fréjol, sin embargo no se conoce el grado de importancia de estas enfermedades en sistemas tradicionales de cultivo. La resistencia genética presente en las poblaciones locales de fréjol y el manejo de estas poblaciones, están probablemente contribuyendo significativamente al manejo sustentable de estas enfermedades, aspecto que se estudiará en esta investigación. Este conocimiento permitirá a su vez definir estrategias de uso, manejo y conservación de la diversidad, lo que ayudará a garantizar la seguridad alimentaria. Eventualmente, las fuentes de resistencia que se identifiquen podrían ser también útiles en programas de mejoramiento de fréjol.

En la presente investigación se caracterizará la resistencia de poblaciones locales de fréjol de Cotacachi y Saraguro a roya y antracnosis, lo que se logrará mediante la caracterización de la variabilidad genética del patógeno, por lo que se establecerá la interacción planta/patógeno en sistemas tradicionales de cultivo.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

- Evaluar la resistencia a antracnosis y roya presentes de la variabilidad genética intra específica de fréjol de Cotacachi y Saraguro.

3.2. ESPECÍFICOS

- Identificar la variabilidad de virulencias representativas de *U. appendiculatus* y *C. lindemuthianum* de Cotacachi y Saraguro.
- Identificar y caracterizar la resistencia de las poblaciones de fréjol de Cotacachi y Saraguro a antracnosis y roya.

4. HIPÓTESIS

Ho 1: La composición de las poblaciones de fréjol que se cultivan en Cotacachi y Saraguro difieren en resistencia a roya y antracnosis.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Materiales de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Cajas Petri de plástico
- Incubadora
- Microscopio
- Hematocímetro
- Cajas Petri de vidrio
- Pinzas anatómicas
- Aislamientos de *Colletotrichum lindemuthianum*.
- Aislamientos de *Uromyces appendiculatus*.

Reactivos empleados en laboratorio

- Alcohol antiséptico y potable
- Agua esterilizada y destilada
- Hipoclorito de sodio al 1%
- Ácido giberélico
- Ácido láctico
- Medio de cultivo PDA y Mathur's

Materiales de invernadero

- Cámara húmeda
- Cámara de inoculación
- Bomba de vacío
- Bandejas plásticas
- Sustrato PILVICSA; descripción:
5% Cascarilla de arroz.
5% Pomina.
60% Tierra negra.
20% Humus.
10% Turba.

Materiales de oficina

- Computador
- Cámara fotográfica
- Libro de campo
- Lápices
- Hojas de papel bond formato A 4.

5.2. Metodología

5.2.1 Características del sitio experimental.

Ubicación política

Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglahua
Sitio: INIAP Estación Experimental Santa Catalina

5.2. Metodología

5.2.1 Características del sitio experimental.

Ubicación política y geográfica

Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglahua
Sitio: INIAP Estación Experimental Santa Catalina
Longitud: 78°33'00" O
Latitud: 00°22'00" S

Condiciones climáticas del sitio experimental

Temperatura Promedio Anual: 11.37 ° C
Precipitación anual: 1500 mm
Humedad Relativa: 83.62 %
Altitud: 3058 m

Fuente: Estación Meteorológica INIAP - Santa Catalina. 2010.

5.3. ESTUDIOS DE RESISTENCIA A ANTRACNOSIS

FASE I

5.3.1. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS

5.3.1.1. Factores en estudio

Aislamientos

Se procederá a seleccionar diez aislamientos de Cotacachi y diez aislamientos de Saraguro.

Set de Variedades Diferenciales para *C. lindemuthianum*

Cuadro 1. Set de variedades diferenciales utilizadas para la determinación de razas de *C. lindemuthianum*

| Variedades Diferenciales | Origen Geográfico | Gen (es) de Resistencia | Origen Genético | Valor Binario |
|--|-------------------|--|-----------------|---------------|
| 1. Michelite | U.S.A | Co-11 | Meso América | 1 |
| 2. Michigan Dark Red Kidney (M.D.R.K.) | U.S.A. | Co-1 | Andino | 2 |
| 3. Perry Marrow | U.S.A. | Co-1 ³ | Andino | 4 |
| 4. Cornell 49242 | U SA | Co-2 | Meso América | 8 |
| 5. Widusa | Hungría | Co-1 ⁵ | Andino | 16 |
| 6. Kaboon | México | Co-1 ² | Andino | 32 |
| 7. México 222 | México | Co-3 | Meso América | 64 |
| 8. PI 207262 | México | Co-4 ³ ; Co-9 | Meso América | 128 |
| 9. To | México | Co-4 | Meso América | 256 |
| 10. Tu | Costa Rica | Co-5 | Meso América | 512 |
| 11. AB 136 | Colombia | Co-6; co-8 | Meso América | 1024 |
| 12. G 2333 | México | Co-4 ² ; Co-5 ² ; Co-7 | Meso América | 2048 |

Fuente: Awala, H.; *et al.* 2008

5.3.1.2. Tratamientos

Se evaluarán 20 aislamientos de *C. lindemuthianum*.

5.3.1.3. Unidad Experimental

Una plántula en estado fenológico V2 (Anexo 2).

5.3.1.5. Variables

Tipo de reacción

El tipo de reacción corresponderá a los de la escala 1-9 establecida por el Centro de Agricultura Tropical (Pastor – Corrales, M. 1992).

Cuadro 2. Escala desarrollada por el Centro de Agricultura Tropical para la evaluación de la resistencia a antracnosis de fréjol.

| Nivel | Síntomas |
|-------|---|
| 1 | Plantas sin síntomas visibles |
| 2 | Pocas lesiones pequeñas aisladas en la nervadura principal del envés |
| 3 | Lesiones pequeñas frecuentes en la nervadura principal del envés |
| 4 | Lesiones presentes en la nervadura central y ocasionalmente en las nervaduras secundarias |
| 5 | Muchas lesiones esparcidas en la nervadura principal y en las nervaduras secundarias |
| 6 | Muchas lesiones pequeñas como se describen en el grado 5 en el haz, el envés, tallos y peciolo |
| 7 | Lesiones grandes acompañadas por tejido muerto roto, crecimiento reducido de las plantas y muchas lesiones de los tallos y peciolo |
| 8 | Muchas lesiones grandes acompañadas por tejido muerto y roto, crecimiento reducido de las plantas y muchas lesiones de los tallos y peciolo |
| 9 | Plantas severamente enfermas ó muertas |

Fuente: Pastor - Corrales. 1992.

El tipo de reacción se clasificará como incompatibilidad (resistencia) en caso de que la planta presente los síntomas de los niveles 1, 2, 3, y la reacción será clasificada de compatibilidad (susceptibilidad) cuando la planta presente los síntomas de los niveles 4-9.

Período de incubación

Se determina a través del registro del número de días que transcurren desde la inoculación del patógeno hasta la aparición de los primeros síntomas (necrosis en hojas y/o tallos). A través de esta variable se evaluará la agresividad del patógeno.

5.3.1.6. Manejo Específico del Experimento

Se colectarán muestras de tejido enfermo (tallos, hojas o vainas) que presenten los síntomas de la enfermedad. Las muestras se transportarán envueltas en papel periódico húmedo y en fundas plásticas.

El hongo se aislará de las muestras, para lo que se prepararán pequeñas secciones de tejido semiafectado de aproximadamente 0,3 cm², las que se desinfectará con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante dos minutos para luego lavar con agua destilada estéril. A continuación se depositará cinco pedazos en forma equidistante en cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) que contendrá un pH 5.6. Las cajas petri se transferirán a una cámara de crecimiento a 24 °C durante 5-8 días. Apenas se haya producido la esporulación se realizará un cultivo monospórico sembrando en una caja con PDA una suspensión diluida de conidias para obtener colonias que se originan de una sola conidia, lo que se logrará seleccionando a través de un estereomicroscopio esporas individuales. Los

aislamientos monospóricos se multiplicarán para la inoculación en plantas diferenciales. Los aislamientos se conservarán en papel filtro colocados en tubos eppendorf a -5° C (Balardin *et al*, 1997).

El inóculo se preparará añadiendo agua destilada a las cajas petri y raspando las conidias con una espátula, luego se determinará la concentración de esporas de la suspensión en una cámara de Neubauer. Antes de la inoculación se ajustará la suspensión de conidias a $1,2 \times 10^6$ conidias por mililitro de agua

La inoculación se realizará en plántulas de 12 días de edad contenidas en bandejas plásticas de 49 x 34 x 7 cm. En cada bandeja se sembrarán las 12 variedades diferenciales que corresponden al set utilizado para la identificación de razas de *C. lindemuthianum*.

Una vez realizada la inoculación las plántulas se colocarán por un día en cámara de incubación a una temperatura de 18-22 °C y a una humedad relativa del 100%. Luego se transportarán a una cámara de 25 °C y una humedad relativa superior a 90% Siete días después de la inoculación se realiza la evaluación (Santana y Mahuku, 2002).

Técnica de Evaluación: Sistema binario

En la identificación de razas se usará el set estándar de variedades diferenciales (Cuadro 1) que se usa internacionalmente. Si la reacción del aislamiento en una diferencial es compatible (susceptible), el aislamiento tendrá virulencia para el gen de esa diferencial. La raza se identificará dependiendo del número de virulencias que presente el aislamiento, lo que consiste en un sistema de nomenclatura binaria en el cual cada cultivar diferencial presenta un número establecido a partir de la fórmula 2^{n-1} , donde "n" es el lugar ocupado por la variedad dentro del set de diferenciales; es decir, corresponde a un número comprendido entre el 1 y el 12. Se designa el número de la raza mediante la sumatoria de los valores establecidos en cada cultivar que presenta reacción de compatibilidad a los aislamientos inoculados. Se designa la raza "0" cuando el aislamiento inoculado no presenta compatibilidad con ningún diferencial (Falconí, 2002; Rodríguez *et al*, 2006).

FASE II

5.3.2. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE PLÁNTULA

En este estudio se identificará la presencia de genes mayores en los fenotipos de fréjol de Cotacachi y Saraguro.

5.3.2.1. Factores en estudio

Razas del hongo

La selección se realizará en base a las razas identificadas en la fase I.

r1= Raza más virulenta (Varios genes de virulencia)

r2= Raza menos virulenta (Avirulenta o pocos genes de virulencia).

Poblaciones de fréjol

La descripción y el origen de los fenotipos que conforman las poblaciones se presentan en el Anexo 1.

Cuadro 3. Poblaciones de fréjol de Cotacachi y Saraguro.

| POBLACION | NOMBRE DE LA POBLACION | COMPOSICION * |
|------------------|--------------------------------|----------------------|
| P 1 | Chacra Cotacachi | 18 fenotipos |
| P 2 | Mixturiado zona media Saraguro | 10 fenotipos |
| P 3 | Mixturiado zona baja Saraguro | 5 fenotipos |
| P 4 | Allphas Cotacachi | 9 fenotipos |
| P 5 | Canario Cotacachi | 5 fenotipos |
| P 6 | Canario Saraguro | 4 fenotipos |

** La composición de cada una de las poblaciones presenta números diferentes de fenotipos; este inventario es manejado por el Departamento Nacional de Protección Vegetal en la colección de fréjol de Cotacachi y Saraguro.*

5.3.2.2. Tratamientos

Corresponde a la interacción entre las razas y los fenotipos de fréjol; por tanto, se evaluarán 102 tratamientos.

5.3.2.3. Unidad Experimental

Una plántula en estado fenológico V2. Se evaluarán 5 plantas de cada fenotipo.

5.3.2.4. Variables

Tipo de reacción

Para la evaluación de esta variable se utilizará la escala desarrollada por el Centro de Agricultura Tropical para la evaluación de la resistencia a antracnosis de fréjol (Cuadro 2).

Período de incubación

Número de días desde la inoculación del patógeno hasta la aparición de los primeros síntomas (necrosis en hojas y/o tallos).

5.3.2.5. Manejo específico del experimento

Se empleará el mismo método descrito en el experimento de identificación de razas.

5.4. ESTUDIO DE RESISTENCIA A ROYA

5.4.1. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS

5.4.1.1. Factores en estudio

Aislamientos

Se procederá a seleccionar diez aislamientos de Cotacachi y diez aislamientos de Saraguro.

Variedades Diferenciales para *U. appendiculatus*

Cuadro 4. Set de variedades diferenciales empleadas para la determinación de razas de *U. appendiculatus*

| Variedades Diferenciales | Origen Geográfico | Gen (es) de Resistencia | Origen Genético | Valor Binario |
|-----------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------|---------------|
| 1. Early Gallatin | Andino | Ur-4 | Andino | 1 |
| 2. Redland Pioneer | | Ur-13 | | 2 |
| 3. Montcalm | | | | 4 |
| 4. PC 50 | | Ur-9; Ur-12 | | 8 |
| 5. Golden Gate Wax (GG Wax) | | Ur-6 | | 16 |
| 6. PI 260418 | | Ur-260 | | 32 |
| 7. GN 1140 | Meso América | Ur-7 | Meso América | 1 |
| 8. Aurora | | Ur-3 | | 2 |
| 9. México 309 | | Ur-5 | | 4 |
| 10. México 235 | | Ur-3+ | | 8 |
| 11. CNC | | Ur-CNC | | 16 |
| 12. PI 181996 | | Ur-11 | | 32 |

Fuente: Jochua, C.; *et al.* 2008.

5.4.1.2. Tratamientos

Se evaluarán 20 aislamientos de *U. appendiculatus*.

5.4.1.3. Unidad Experimental

Una plántula en estado fenológico V2 (Anexo 2).

5.4.1.4. Variables

Tipo de reacción

La evaluación del tipo de reacción a roya será efectuada según la escala Stavely desarrollada en la Universidad de Puerto Rico por la reunión Internacional de Trabajo en 1983.

Cuadro 5. Escala Stavely empleada para la evaluación de los tipos de reacción de roya del fréjol (*U. appendiculatus*)

| Tipos de infección | Síntomas |
|---|--|
| 1 | Sin síntomas visibles de la enfermedad, inmunidad |
| 2 | Manchas necróticas sin esporulación |
| 3 | Pústulas de 300 μm con esporulación |
| 4 | Pústulas con esporulación de 300-500 μm de diámetro a veces redondeados con halos cloróticos |
| 5 | Pústulas de esporulación de 500-800 μm de diámetro, frecuentemente rodeada por halos cloróticos |
| 6 | Pústulas con esporulación > de 800 μm de diámetro, rodeado por halos cloróticos |
| El tipo de reacción 2 presenta variables: | |
| 2 | Manchas necróticas de < de 300 μm de diámetro |
| 2+ | Manchas necróticas de 300 a 1000 μm de diámetro |
| 2++ | Manchas necróticas de 1 a 3 mm de diámetro |
| 2+++ | Manchas necróticas de más de 3 mm de diámetro |

Fuente: CIAT. 1987

Período de incubación

Se determina a través del registro del número de días que transcurren desde la inoculación del patógeno hasta la aparición de los primeros síntomas (presencia de primeras pústulas). A través de esta variable se evaluará la agresividad del patógeno.

5.4.1.6. Manejo Específico del Experimento

Se colectarán muestras de plantas infectadas con el patógeno que presenten claramente los síntomas de la enfermedad.

De cada planta infectada se tomará de una a tres hojas; estos materiales se colocarán en toallas de papel y serán introducidas posteriormente en bolsas plásticas.

Las muestras serán trasladadas al laboratorio, las esporas serán recolectadas manualmente, para ello se lavarán las hojas utilizando cotonetes y agua destilada estéril. La extracción de esporas se efectuará de una hoja representativa que contenga la mayor cantidad de pústulas.

Las esporas obtenidas se inocularán en plantas susceptibles (variedad Red Small Garden) con la ayuda de microaspersores con los cuales se realizará la dispersión del inóculo.

Una vez que se desarrollen las pústulas se seleccionará una sola de ellas y sus esporas serán inoculadas nuevamente en Red Small Garden para la purificación del aislamiento; con este procedimiento se obtiene un cultivo monopustular, del cual se recolectarán las esporas con un cotonete y agua para ser asperjadas posteriormente sobre una planta susceptible y asegurar de esta forma la multiplicación de esporas.

La conservación de estas esporas se realizará sometiendo a las mismas a deshidratación, baja temperatura y vacío (liofilización). Con esta técnica ocurre menos variación y por lo tanto menos pérdida de patogenicidad (Cruz, 2000)

Las esporas que provienen de la multiplicación del patógeno serán inoculadas en el set de variedades diferenciales establecido.

Todas las semillas serán sembradas en bandejas plásticas de 49 x 34 x 7 cm; y el procedimiento de inoculación una vez que está preparada la suspensión de esporas será el siguiente:

Cuando las plántulas tengan 12 a 14 días de edad las esporas se esparcen con agua destilada o con aceite mineral sobre el envés de las hojas primarias distribuyendo uniformemente el inóculo, el cual debe ajustarse a 30000 esporas por mililitro.

Una vez efectuada la inoculación de las plántulas se colocarán en una pequeña cámara de plástico, con una humedad relativa superior al 90% por 15 horas a 18-24°C luego se ubicarán en un invernadero.

Las evaluaciones de roya se realizarán en hojas primarias a los 12 a 14 días después de exponer las plantas en el campo (Steadman, 2001).

Técnica de Evaluación: Sistema binario

Para la identificación de razas de roya presentes se utilizará un set de variedades diferenciales (Cuadro 4). Si la reacción del aislamiento en una diferencial es compatible se asume que el aislamiento tiene la virulencia para el gen de esa diferencial. Las razas de roya se designan en secuencia mediante códigos numéricos empleando el valor binario de cada diferencial. Es importante diferenciar las variedades diferenciales de origen andino y las variedades de origen mesoamericano para designar dicho valor.

El número de raza o código está únicamente relacionado con el juego o grupo de hospedero utilizado. El número de la raza se designa mediante la sumatoria de los valores establecidos en cada cultivar que presenta reacción de compatibilidad a los aislamientos inoculados. Se designa la raza "0" cuando el aislamiento inoculado no presenta compatibilidad con ningún diferencial (BIC, 2006).

FASE II

5.4.2. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE PLÁNTULA

5.4.2.1. Factores en estudio

Razas del hongo

Selección de las razas más representativas caracterizadas en la Fase I.

r1= Raza más virulenta (Varios genes de virulencia)

r2= Raza menos virulenta (Avirulenta o pocos genes de virulencia).

Poblaciones de fréjol

La descripción de las poblaciones se encuentra en el Cuadro 3, mientras que el origen y descripción de los fenotipos dentro de las poblaciones seleccionadas se encuentra en el Anexo 1.

5.4.2.2. Tratamientos

Se evaluarán 102 tratamientos correspondientes a la interacción entre los factores en estudio.

5.4.2.3. Unidad Experimental

Una plántula en estado fenológico V2. Se evaluarán 5 plantas de cada fenotipo.

5.4.2.4. Variables

Tipo de reacción

Similar al experimento de identificación de razas de *U. appendiculatus*. La escala que se empleará en la evaluación de esta variable está descrita en el Cuadro 5.

Período de incubación

Número de días desde la inoculación del patógeno hasta la aparición de los primeros síntomas (aparición de las primeras pústulas).

5.4.2.5. Manejo específico del experimento

Se empleará el mismo procedimiento descrito en identificación de razas del patógeno.

7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

| Actividades | Tiempo en meses | | | | | | | |
|--|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Revisión bibliográfica | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Elaboración de la propuesta de tesis | ■ | ■ | | | | | | |
| Aprobación de la propuesta de tesis | | ■ | | | | | | |
| Siembra de semillas para reproducción | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Recolección de aislamientos. | ■ | ■ | | | | | | |
| Manejo de los patógenos en laboratorio (purificación y multiplicación) | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | |
| Selección de aislamientos a través de la identificación de razas y evaluación de germoplasma con los aislamientos escogidos (laboratorio – invernadero). | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Elaboración del informe final (Tesis de grado) | | | | | | | ■ | ■ |
| Presentación de la tesis de grado realizada. | | | | | | | ■ | ■ |

8. PRESUPUESTO ESTIMADO DEL ENSAYO

| Rubro | Unidad | Cantidad | \$/unit | \$Total |
|---|---------|----------|---------|---------|
| I. Gastos Directos | | | | |
| 1. Mano de obra | | | | |
| Becario | mensual | 8 | 200,00 | 1600,00 |
| 2. Insumos y materiales invernadero | | | | |
| Fertilizante foliar | Kg. | 2 | 7,00 | 14,00 |
| Pesticidas | Varios | 1 | 20,00 | 20,00 |
| Bandejas plásticas | Unidad | 100 | 1,00 | 100,00 |
| 3. Materiales y herramientas laboratorio | | | | |
| Acido giberélico (Giberelín) | g | 2 | 2,20 | 4,40 |
| Alcohol industrial | Galón | 3 | 10,00 | 30,00 |
| Alcohol antiséptico | Galón | 3 | 10,00 | 30,00 |
| Cajas petri plásticas | Unidad | 500 | 0,21 | 105,00 |
| Hipoclorito de sodio | Galón | 3 | 3,50 | 10,50 |
| Medio de cultivo PDA | g | 500 | 0,14 | 69,90 |
| Dextrosa | g | 500 | 0,09 | 45,00 |
| Sulfato de magnesio (MgSO4) | g | 500 | 0,09 | 45,00 |
| Fosfato ácido de potasio (KHPO4) | g | 500 | 0,09 | 45,00 |
| Peptona | g | 500 | 0,30 | 150,00 |
| Extracto de levadura | g | 500 | 0,12 | 60,00 |
| Bacto Agar | g | 500 | 0,23 | 115,00 |
| Micropipeta de 100 a 1000 ul marca BOECO | Unidad | 1 | 196,00 | 196,00 |
| Tubo fusible | Unidad | 3 | 3,00 | 9,00 |
| Cubre objetos 22x22 | Unidad | 50 | 0,06 | 2,80 |
| Algodón 500 g | Funda | 3 | 4,50 | 13,50 |
| Piseta de polietileno | Frasco | 2 | 3,30 | 6,60 |
| Papel aluminio | Rollo | 5 | 3,90 | 19,50 |
| Papel toalla | Rollo | 30 | 1,17 | 35,10 |
| Papel parafilm | Rollo | 1 | 43,00 | 43,00 |
| Frasco graduado tapa rosca de 1000 ml | Unidad | 1 | 9,00 | 9,00 |
| Cinta adhesiva | Rollo | 5 | 0,75 | 3,75 |
| Cinta maskin | Rollo | 5 | 1,50 | 7,50 |
| Marcador permanente punta gruesa | Unidad | 4 | 0,40 | 1,60 |
| Marcador permanente punta fina | Unidad | 4 | 0,58 | 2,32 |
| Sustrato | qq | 10 | 6,00 | 60,00 |
| 4. Suministros de oficina | | | | |
| Impresiones | Hojas | 100 | 0,05 | 5,00 |
| Impresiones y empastado | Textos | 4 | 20,00 | 80,00 |
| Otros materiales | Varios | 1 | 10,00 | 10,00 |
| II. Otros | | | | |

| | | | | |
|----------------------------------|---------|------|--------|---------|
| Movilización del vehículo | Km. | 2000 | 0,25 | 500,00 |
| Subsistencia | Día | 10 | 25,00 | 250,00 |
| Gastos trámite tesis Universidad | | 1 | 300,00 | 300,00 |
| Teléfono, fax | Minutos | 50 | 0,20 | 10,00 |
| SUBTOTAL | | | | 4008,47 |
| Imprevistos 5% | | | | 200,42 |
| COSTO TOTAL DEL PROYECTO | | | | 4208,89 |

9. BIBLIOGRAFÍA

1. ARAYA, C. 2003. Coevolución de interacciones hospedante – patógeno en frijol común. *Fitopatología Brasileira* 28 (3):0100 – 4158.
2. _____; ALLEYNE, T.; STEADMAN, R.; ESKRIDGE, K.; COYNE, D. 2004. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Uromyces appendiculatus* from *Phaseolus vulgaris* in the Americas. *Plant Disease* 88 (8): 830-836.
3. BALARDIN, R. S.; JAROSZ A.M.; KELLY, J.D. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. *Phytopathology* 87 (12):1184-1191.
4. BIC (BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE). 2006. Annual report. Department of Crop & Soil Sciences, Michigan State University, U.S.A. p. 303.
5. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Variación patogénica y fuentes de resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn) Scrib, Patógeno de la antracnosis del frijol, en Colombia. *Acta Agron.* Vol.37 (1) p. 36-47.
6. _____ 1987. Sistema estándar par la evaluación de germoplasma de frijol. Eds. SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. Cali, Colombia. p. 30-34.
7. _____ 1993. Trends in CIAT commodities. Cali, Colombia. p. 221 (Documento de Trabajo No. 128).
8. CRUZ, E. 2000. Variabilidad fisiológica de *Uromyces phaseoli* (Reben) Wint en Ecuador y Evaluación del Germoplasma de Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) del Germoplasma Nacional de Leguminosas del INIAP. Santa Catalina - Pichincha. Tesis de Ingeniería Agronómica. Quito, Universidad Central del Ecuador. p.102.
9. CRUZ, E.; OCHOA, J.; MURILLO, A. 1999. Caracterización de la variación fisiológica de roya del fréjol en Ecuador. In Daniai, D. Tercer taller de Producción en Resistencia duradera en cultivos altos en la Zona Andina. Cochabamba, Bolivia. p. 206 – 211.
10. _____. 1999. Resistencia parcial y pérdidas de rendimiento de variedades de fréjol arbustivo en Ecuador. In Daniai, D. Tercer taller de Producción en Resistencia duradera en cultivos altos en la Zona Andina. Cochabamba, Bolivia. p. 220 – 224.
11. ERNEST, G.; FALCONI, E.; PERALTA, E.; JAMES, K. 2008. Encuesta a productores para orientar el fitomejoramiento de frijol en Ecuador. *Agronomía Mesoamericana*. 19 (1). 07-18.
12. FALCONI, E. 2002. Determinación de Razas Fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.- Magn) Scrib. en el Ecuador y Evaluación de la Resistencia de Veinticinco Genotipos del Germoplasma de Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) del INIAP Sta. Catalina – Pichincha. Tesis de Ingeniería Agronómica. Quito. Universidad Central del Ecuador. p. 57.
13. INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina). 2007. Informe Anual 2007. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Quito, Ecuador p. 68-73, 74-77.

14. _____. 2010. Fréjol con resistencia a la sequía (en línea). Quito, Ecuador. Consultado 14 mayo 2010. Disponible en: http://www.iniap-ecuador.gov.ec/noticia.php?id_noticia=204.
15. JOCHUA, C.; AMANE, J. R.; STEADMAN, X.; XUE Y K. M. ESKRIDGE. 2008. Virulence diversity of the common bean rust pathogen within and among individual bean fields and development of sampling strategies. *Plant Disease* 92(3): 401-408.
16. NAYIBE, L.; BLAIR, M.; LIGARRETO, G. 2007. Uso de selección asistida con marcadores para resistencia a antracnosis en frijol común. *Agronomía Colombiana* 25 (2):207 – 214.
17. PARRA, G. 2010. El fréjol, muy importante para la seguridad alimentaria (en línea). Quito, Ecuador. Consultado 10 mayo 2010. Disponible en: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/el-frejol-muy-importante-para-la-seguridad-alimentaria-401684.html>.
18. PASTOR-CORRALES, M 1992. La Antracnosis del fréjol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Cali, Colombia. CIAT. p. 212-239, 240-251. (Documento de trabajo No. 113).
19. PERALTA, E.; MURILLO, A.; MAZÓN, N.; FALCONI.; MONAR, C.; PINZÓN, J.; RIVERA, M. 2007. Manual Agrícola de fréjol y otras leguminosas. Cultivos, variedades y costos de producción. Publicación Miscelánea No. 135. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación. Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador. p. 2, 4, 16.
20. RODRÍGUEZ, R.; ACOSTA, J.; GONZÁLEZ, M.; SIMPSON, J. 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agricultura Técnica en México*. 32 (1):101-114.
21. SÁNCHEZ, B.; FLORES, A.; SÁNCHEZ, A.; PIMEDA, S.; LÓPEZ, G. 2009. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* en Oaxaca y San Luis Potosí, México, y resistencia en genotipos de frijol. *Agricultura Técnica en México* 35 (1):49-60.
22. SANTANA, E.; MAHUKU, G. 2002. Diversidad de razas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Antioquia y evaluación de germoplasma de fréjol crema-rojo por resistencia a antracnosis. *Agronomía Mesoamericana* 13 (2):95-103.
23. STEADMAN, J.; GODOY, G.; ROSAS, J.; BEAVER, J. 2001. Uso de un vivero móvil para desplegar genes de resistencia a roya de fréjol común. Manuscrito Serie Jornales, Revisión Agrícola de Nebraska, Lincoln, Nebraska. p. 8.
24. WARNOCK, R.; GARCÍA, J. 2008. Sistema para la identificación de fenología en variedades determinadas e indeterminadas de caraota. *Agronomía Tropical*. 58 (2):163 – 173.

10. ANEXOS

Anexo 1. Poblaciones de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) y sus respectivos fenotipos que serán evaluados bajo condiciones de invernadero. INIAP – Sta. Catalina. 2010.

| Población | Variedad | Nombre | Fenotipos | Origen geográfico | Origen por agricultor |
|-------------|----------|-----------------|--|--|------------------------|
| TIPO CHACRA | | | | | |
| P 1 | 41 | Chacra 9 | 11 12 13 25 29 41 43 44 45 53 54 56 63 85 | Morochos | María Rosa Guitarra |
| P 2 | 38 | Chacra poroto 7 | 1 7 21 26 | Cumbas Conde | José Manuel Díaz |
| P 3 | | Mixturiado | 6 11 52 83 113 | Saraguro Comunidad Gañil (Zona Media) | |
| P 4 | | Mixturiado | 87 96 103 102 113 | Zona Media Saraguro | |
| P 6 | | Mixturiado | 89 90 91 92 100 | Zona Baja Saraguro | |

Continuación Anexo 1

| TIPO ALLPHA | | | | | |
|--------------|----|-----------|----------------------------|--|------------------|
| P 7 | 49 | Allpha 10 | 13 34 33 35 | Cumbas Conde | Martha Gualsaquí |
| P 8 | 51 | Allpha 12 | 38 37 40 61 81 | Cumbas Conde | Joaquín Pichamba |
| TIPO CANARIO | | | | | |
| P 9 | 44 | Canario 5 | 43 | Cumbas Conde | Martha Gualsaquí |
| P 10 | 43 | Canario 4 | 43 | Cumbas Conde | Camilo Flores |
| P 11 | 52 | Canario 7 | 43 | Cumbas Conde | Joaquín Pichamba |
| P 12 | 43 | Canario 4 | 43 | Morochos | Camilo Flores |
| P 13 | 43 | Canario 4 | 43 | Sobrante de la primera colecta Cotacachi | |
| P 14 | | Canario | 43 | Cuenca Cantón Paute | |
| P 15 | | Canario | 43 | Saraguro | |
| P 16 | | Canario | 43 | Saraguro | |
| P 17 | | Canario | 43 | Saraguro | |

Anexo 2. Estados fenológicos de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) utilizados en el análisis de las variables en los estudios de antracnosis y roya. INIAP – Sta. Catalina. 2010.

| ETAPA | DENOMINACIÓN | DESCRIPCION |
|-------|-------------------------|---|
| V0 | Germinación | Desde la siembra hasta que los cotiledones se observan a simple vista a nivel del suelo en el 50% de las plántulas. |
| V1 | Emergencia | Desde que los cotiledones se observan a simple vista a nivel del suelo hasta que están por encima del nivel del suelo y comienzan a separarse sus bordes en el 50% de las plántulas. |
| V2 | Hojas primarias | Desde que el 50% de las plántulas presenta los protófilos (hojas primarias unifoliadas) desplegados en el segundo nudo del tallo principal, comenzando por el nudo cotiledonal, hasta que los folíolos se despliegan completamente y se extienden en un solo plano. |
| V3 | Primera hoja trifoliada | En el 50% de las plántulas la primera hoja trifoliada está completamente abierta y plana. |
| V4 | Tercera hoja trifoliada | En el 50% de las plántulas la tercera hoja trifoliada está completamente abierta y plana. |
| R5 | Prefloración | Aparición del primer botón o primer racimo en el 50% de las plantas. |
| R6 | Floración | Aparición de la primera flor abierta en el 50% de las plantas. |
| R7 | Formación de vainas | Aparición de la primera vaina con la corola de la flor colgada o recién desprendida en el 50% de las plantas. |

Continuación Anexo 2

| | | |
|----|-------------------|---|
| R8 | Llenado de vainas | Cuando se empieza a llenar la primera vaina en el 50% de las plantas. |
| R9 | Maduración | Inicio de decoloración y secado de vainas en el 50% de las plantas. |

Fuente: Warnock, R; García, J. 2008.