



FECHA DE PRESENTACIÓN: 09-2008

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA: Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos

PROYECTO: Selección de líneas de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) con resistencia a sequía y pudriciones de raíz mediante el uso de marcadores moleculares y métodos convencionales.

UBICACIÓN: Estación Experimental Santa Catalina y Granja Experimental Tumbaco. INIAP, Ecuador

AUTOR: Prisila Alexandra Castro Moreno

COAUTORES: Ing. Eduardo Peralta
Ing. Ángel Murillo
Ing. Alfredo Dávila

COLABORADORES: Departamento Nacional de Biotecnología

FECHA DE INICIO: Octubre del 2008

FECHA DE TERMINACIÓN: Junio del 2009

PRESUPUESTO: 5566.34 USD

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: PROYECTO MEF: 21.00.039.001 (100 %)

1. ANTECEDENTES

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.), también conocido como fríjol, habichuela o poroto, es la leguminosa de mayor distribución en el mundo, siendo cultivada en todos los continentes, a excepción del Antártico (Pañeda, 2005). Dentro de Ecuador, el fréjol está considerado como componente de la seguridad y soberanía alimentaria, debido a su aporte nutricional rico en proteínas, carbohidratos, hierro, fósforo, zinc y fibra, en comparación con otros alimentos de alto consumo. La explotación agrícola del fréjol en Ecuador está distribuida a lo largo de todo el callejón interandino, con variedades de tipo trepador en asociación con maíz y los de tipo arbustivo cultivados en los valles de las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Bolívar, Cañar, Azuay y Loja (Peralta *et al.*, 2007).

Al igual que todos los cultivos, el fréjol enfrenta problemas de carácter biótico y abiótico que perturban el desarrollo normal y la producción potencial del cultivo. En cuanto a problemas de carácter biótico, las enfermedades del follaje y pudriciones de raíz causadas por hongos son las más importantes (Subía *et al.*, 2007), mientras que, dentro de los problemas de carácter abiótico, uno de los más significativos en Ecuador es el estrés hídrico (Falconí, 2005). Dentro de las enfermedades a nivel de la raíz en las plantas de fréjol la más común en Ecuador y con mayor incidencia en los cultivos es la pudrición seca de raíz generada por el hongo *Fusarium solani* (Peralta *et al.*, 2007). Este hongo saprófito facultativo puede identificarse bajo el microscopio por sus macroconidias, microconidias, clamidósporas y microconidióforos, como por el color típico amarillento con pigmentos rojos en medio estándar PDA. *F. solani* afecta al hipocótilo y raíz de la planta de fréjol desarrollando lesiones o betas rojizas que llegan a unirse y cambian a un color café según avanza la infección, extendiéndose hasta la superficie (Acosta *et al.*, 2006). La severidad de la infección depende de factores externos, como humedad, textura, compactación y temperatura del suelo. Las pérdidas en rendimiento, bajo condiciones severas de infección, pueden alcanzar hasta el 53%, según la variedad sembrada (CIAT, 1990). Mientras que el factor abiótico más destacado en las zonas de cultivo del Ecuador es el estrés hídrico, producido por la falta de disponibilidad de agua en el suelo, afectando en mayor o menor grado a las plantas de fréjol dependiendo del nivel de resistencia del cultivar. La resistencia de un cultivar a la sequía puede

definirse como la capacidad para producir mayor cantidad de semilla y biomasa en comparación de otros cultivares que presentan menor rendimiento bajo condiciones limitadas de humedad del suelo. Varios estudios demostraron la presencia de adaptaciones para la resistencia a sequía en las razas de fréjol Durango y Mesoamericana que han sido empleadas para el desarrollo de líneas de fréjol resistente (Falconí, 2005).

Lamentablemente los métodos de selección tradicional aplicados para detectar líneas con resistencia a enfermedades o factores ambientales son muy extensos con respecto al tiempo, por lo cual algunos grupos de investigadores han propuesto o están recurriendo al uso de herramientas moleculares para la selección indirecta de líneas de fréjol, u otras especies, que presenten resistencia (Anderson, 1998 : Shneider *et al.*, 1997). Adicionalmente las características de resistencia son de naturaleza continua, o también conocidos como características cuantitativas difícilmente optimizadas por métodos convencionales de mejoramiento, pero asequibles por métodos moleculares siendo el estudio de QTLs (loci implicados en caracteres cuantitativos), el método específico para el análisis de estos caracteres al revelar el componente genético ya que implica la selección y el cruzamiento de líneas parentales que difieren en uno o más caracteres cuantitativos y el análisis de la segregación de la descendencia para relacionar cada QTL con un marcador de ADN conocido (Asíns *et al.*, 2003).

El poder relacionar el genotipo con la característica buscada es posible a través de marcadores moleculares (MM). El uso de los MM permite la identificación de secciones de la secuencia del genoma, un loci determinado, que codifica para alguna característica de interés en diferentes grados (Anderson, 1998). Dentro de los cuales los marcadores moleculares utilizados para identificar un QTL de resistencia incluyen a los RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), *primers* decámeros, que posibilitan amplificar mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Los RAPDs al ser marcadores pequeños (decámeros) y trabajar a una baja temperatura de unión, aseguran que se unan a infinidad de secuencias en el genoma, para conseguir amplificar muchos fragmentos de ADN. Estos fragmentos de ADN son separados en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos, que varían según el polimorfismo presente, proporcionando así una huella dactilar característica en el genoma de los

distintos genotipos o individuos. La técnica presenta como ventajas, la rapidez en la obtención de los resultados, no es necesario conocer la secuencia genética del ADN que se va a amplificar, requiere poca cantidad de ADN el cual no necesita ser de alta pureza y es relativamente de bajo costo en comparación con otros tipos de marcadores (Kelly *et al.*, 1994).

Gracias a estudios previos de QTLs se han podido identificar marcadores RAPDs relacionados a los mismos, tal como reportan Román y Kelly (2003) en la validación de marcadores RAPDs de tipo flanqueante, capaces de identificar QTLs para resistencia a *F. solani* al evaluar dos poblaciones IBL producto de cruzas entre los fréjoles de tipo Andino y de tipo Mesoamericano. Ubicando nueve QTLs significativamente asociados con la resistencia a *F. solani* y al mismo tiempo que explican desde el 5 hasta el 53 % de la variación fenotípica. De igual manera otro estudio realizado con marcadores RAPDs ligados a QTLs de resistencia a sequía fueron reportados por Shneider *et al.*, (1997), que consiguió relacionar líneas no resistentes con los marcadores OH19₆₉₀, OA04₅₆₀, OX11₆₈₀, OX18₉₈₀ así como detectar líneas portadoras de QTLs de resistentes a sequía con los marcadores OAB18₆₅₀, OF01₅₂₀, OH18₇₁₀.

2. JUSTIFICACIÓN

El fréjol común es un cultivo de gran relevancia para el Ecuador y el mundo, principalmente en el aspecto económico, social y nutricional; sin embargo, los cultivares de esta leguminosa están siendo afectados por factores abióticos y bióticos que reducen el rendimiento potencial del cultivo. En Ecuador un elevado porcentaje de las zonas de producción sufren en diferente grado de estrés hídrico durante, o determinado momento, del cultivo. Mientras que el patógeno con mayor incidencia en cuanto a pudriciones de raíz, es *F. solani*. Existen varias estrategias desarrolladas por el hombre para el control y atenuación de los efectos de estos problemas, pero es el control genético la estrategia más recomendada y viable tomando en cuenta que el cultivo de fréjol común es explotado mayormente por pequeños agricultores con limitados recursos económicos. Dentro del germoplasma de fréjol común, varios genotipos han sido identificados como fuentes de resistencia a estrés hídrico y a pudriciones de raíz, por poseer genes de interés y que pueden ser

transferidos a cultivares comerciales. Estos genotipos, fuentes de resistencia, a las que se refieren los resultados de las investigaciones previas, no presentan características comerciales. Por lo tanto el cruzamiento simple con genotipos resistentes a sequía y cultivares comerciales de fréjol no resulta en poblaciones con fenotipos deseados. Por esta razón, el Programa de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG) del INIAP ha iniciado el desarrollo de poblaciones de líneas endogámicas retrocruzadas (IBLs) ¹ que requieren ser evaluadas y, para aquellas que presenten resistencia a estrés hídrico y a pudriciones de raíz, juntamente con características de grano comercial, y ser seleccionadas para una eventual entrega a los agricultores ecuatorianos.

Debido a que el proceso de desarrollo de líneas de fréjol con características cuantitativas (QTLs) de resistencia a estrés hídrico y pudriciones de raíz resulta complejo, complicado y prolongado en el tiempo, es necesario el desarrollo de técnicas que permitan simplificar el proceso, aumentar la confiabilidad de selección y acortar el tiempo de obtención de líneas mejoradas. Dentro de las técnicas modernas de selección, son los marcadores moleculares una herramienta muy útil que deben ser evaluados para las condiciones propias de cada programa de mejoramiento. Actualmente, programas internacionales de investigación han desarrollado una serie de marcadores moleculares, producto de análisis de QTLs, que pueden ser validados para ser empleados en Ecuador.

El presente trabajo procura evaluar y seleccionar a través de métodos convencionales las líneas resistentes a sequía y pudrición individualmente, esperando que esta información sea corroborada con los análisis de marcadores moleculares RAPDS, específicos para cada característica de resistencia. De tal forma, que al final de la investigación se presenten resultados de la selección de una o varias líneas portadoras de la resistencia a sequía o a *F. solani*, así como también proveer información de la utilidad y

¹ Líneas endogámicas Retro cruzadas, (IBLs) del Inglés Inbred backcross lines; son líneas homocigóticas, productos de repetidas retro-cruzas de líneas recombinadas y de la auto polinización de cada una de las semillas de la F₂, descendientes únicos de semilla, bajo un tipo de selección fenotípica o a través de marcadores moleculares (Simmonds, 1981; Marieke, 2003).

aplicabilidad de los marcadores moleculares como herramientas en la selección asistida en Ecuador.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Seleccionar líneas de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) con resistencia a sequía y pudriciones de raíz mediante el uso de marcadores moleculares y métodos convencionales.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Validar la utilidad de los marcadores moleculares para seleccionar las líneas resistentes a sequía y pudrición radicular.
2. Seleccionar líneas de fréjol resistentes a sequía y pudrición de raíz mediante el uso de marcadores moleculares y método convencional (rendimiento).
3. Comparar el método convencional de selección y el de marcadores moleculares.

4. HIPÓTESIS

Ho1: Los marcadores moleculares ensayados no permiten identificar líneas resistentes a sequía y a pudrición de la raíz.

Ho2: Dentro de las poblaciones desarrolladas, no existen líneas de fréjol que presentan resistencia a sequía y a pudriciones de raíz.

Ho3: El método convencional de selección es menos eficiente que el uso de marcadores moleculares para la identificación de líneas de fréjol resistentes a sequía y pudrición de raíz.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

a. Campo

- ✓ semillas de líneas de estudio
- ✓ espeques
- ✓ piola
- ✓ estacas
- ✓ costales
- ✓ azadones
- ✓ rastrillos
- ✓ bomba de mochila
- ✓ herbicidas

b. Invernadero

- ✓ macetas
- ✓ semillas de líneas de estudio
- ✓ sustrato
- ✓ equipo de inoculación
- ✓ inóculo de *F. solani*

c. Laboratorio

Inoculación

- ✓ PDA (potato destroxa agar)
- ✓ Cajas petri
- ✓ Alcohol 70 %
- ✓ Bisturí y puntas

- ✓ matraces
- ✓ erlenmeyer

Extracción de ADN:

- ✓ β mercaptoetanol
- ✓ meta bisulfito de sodio
- ✓ etanol 100 %
- ✓ CIA cloroformo: alcohol
isoamilico 24:1
- ✓ hielo
- ✓ TE ph8 (tris-edta)
- ✓ ARNasa
- ✓ Buffer de extracción

Cuantificación

- ✓ agua destilada
- ✓ blue-juice
- ✓ marcador low mass ladder

Amplificación con RAPDS

- ✓ dntp mix (bases)
- ✓ taq-polimerasa invitrogen
- ✓ buffer 5x pcr
- ✓ primer
- ✓ agua ultrapura esteril
- ✓ agarosa
- ✓ tris
- ✓ EDTA

6. METODOLOGÍA

6.1 Características del sitio experimental

- Ubicación

La presente investigación se realizará en los invernaderos del PRONALE-GA y laboratorios del Dpto. de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC). Los ensayos en campo se realizaran en la Granja Experimental Tumbaco (GET), del INIAP.

- **Características del sitio experimental en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC)**

- Provincia: Pichincha
- Cantón: Mejía
- Parroquia: Cutuglagua
- Situación Geográfica:
 - Altitud: 3058 m
 - Longitud: 79°32'00" O
 - Latitud: 00°22'00" S

(Trujillo, 2006)

- **Características del sitio experimental en la Granja Experimental Tumbaco (GET)**

- Provincia: Pichincha
- Cantón: Quito
- Parroquia: Tumbaco
- Situación Geográfica;
 - Altitud: 2450 m
 - Longitud: 78° 22' O
 - Latitud: 00° 13' S
- Características Climáticas;
 - Temperatura media anual: 16.2 °C
 - Temperatura máxima anual: 23.1 °C
 - Temperatura mínima anual: 6.5 °C
 - Humedad relativa: 75.2%

- Precipitación anual: 950 mm / año
(Estrella, 2002)

6.2 VALIDACIÓN DE MARCADORES

El estudio comprende la validación de marcadores moleculares (Cuadros 6 y 7) en dos poblaciones, y seguidamente, el uso de los mismos para la identificación de plantas de fréjol con resistencia a sequía y a pudriciones de raíz en dos poblaciones F₂.

6.2.1 FASE DE CAMPO; Evaluación de líneas resistentes a sequía en GET, Tumbaco.

6.2.1.1 Factor en estudio

Los tratamientos en estudio son diecisiete líneas de fréjol (Cuadro 1), que se emplearán para la validación de los marcadores de los cuales trece corresponden a las IBLs de fréjol para la evaluación de resistencia a sequía, cuatro líneas de fréjol que incluyen a dos líneas padres de las cruzas y dos líneas de fréjol como controles; una resistente y una susceptible.

Cuadro 1. Líneas de fréjol para evaluar resistencia a sequía.

N°	Líneas	Característica	Cruza
1	INIAP -425 (Fanesquero)	Control susceptible	Padre Recurrente
2	INIAP -430 (Portilla)	Control resistente	Control
3	INIAP -424 (Concepción)	Líneas comerciales	Padre Recurrente
4	INIAP -420 (C. Chota)	Líneas comerciales	Control
5	A1P6	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
6	A1P11	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
7	A1P15	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
8	A1P20	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
9	A1P32	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
10	A1P44	Posible resistencia	ABE 4*2/L88-63
11	C1P22	Posible resistencia	Cocacho*2/L88-63
12	C1P23	Posible resistencia	Cocacho*2/L88-63
13	DP18	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
14	DP40	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
15	DP45	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
16	DP47	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651
17	DP48	Posible resistencia	INIAP -424 *2/RAB651

6.2.1.2 Condiciones bajo las cuales se manejarán los tratamientos para la validación de los marcadores moleculares para resistencia a sequía

La siembra se realizará en un campo protegido por una cubierta para replicar la sequía intermitente. Se aplicara riegos según el cronograma (Cuadro 3) controlando el ensayo con tres tensiómetros ubicados en distintos puntos a lo largo del ensayo.

6.2.1.3 Tipo de Diseño Aplicado

Se utilizará un DBCA (diseño en bloques completos al azar).

6.2.1.4 Repeticiones

Se utilizará cuatro repeticiones por tratamiento.

6.2.1.5 Unidad Experimental

Un surco de 4 m de largo con una separación de 0,6 m del siguiente, con 41 plantas que estarán separadas una de otra por 0,1 m. La parcela neta comprenderá de 39 plantas al eliminar los extremos para evitar el efecto borde.

6.2.1.6 Análisis de Variancia

Cuadro 2. Esquema del análisis de varianza del diseño experimental aplicado para la validación de marcadores de resistencia a sequía sobre 18 líneas de fréjol.

FUENTES DE VARIABILIDAD	GRADOS DE LIBERTAD
BLOQUES	3
TRATAMIENTOS	16
ERROR EXPERIMENTAL	48
TOTAL	67

Se realizaran las pruebas de Tukey con 0.05 de confianza y el coeficiente de varianza será calculado por la siguiente formula:

$$Cv = \frac{\sqrt{CMEE}}{\bar{x}} \times 100$$

6.2.1.7 Variables

- Vigor: se evaluará cada unidad experimental en el grado de vigor que presenten las plantas según la escala 1-9 (Anexo 1) del CIAT (1991) durante la etapa de madurez de la planta, de manera visual.
- Carga: se evaluará cada unidad experimental la carga que presenten las plantas según la escala 1-9 (Anexo 2) del CIAT (1991) una vez que más del 50% de las plantas presenten vainas maduras, de manera visual.
- Rendimiento (g/parcela): se determinará el peso en gramos de grano seco obtenido de las plantas de la unidad experimental neta y se transformará a kilogramos por parcela.
- Número de vainas/planta: se determinará en 10 plantas al azar contabilizando las vainas con grano y luego se obtendrá su promedio y transformará a número de vainas por planta.
- Número de semillas/vaina: se determinará en 10 plantas al azar contabilizando las semillas y transformando a semillas por parcela.
- Biomasa Total (g/parcela): serán extraídas de cada unidad experimental cinco plantas, las cuales serán pesadas y registrados los datos.
- Índice de cosecha: rendimiento (g/parcela) / Biomasa total (g / parcela).

6.2.1.8 Manejo del ensayo

6.2.1.8.1 Preparación del terreno

El terreno se preparará con una labor de arado y rastras hasta que este en buen estado para ser surcado a una distancia de 0.6 metros entre surcos.

6.2.1.8.2 Siembra

La siembra se realizará en forma manual ubicando una semilla por sitio, separada a diez centímetros de la siguiente semilla. Cada parcela comprenderá de un surco de cuatro metros de largo.

6.2.1.8.3 Control de malezas

Será realizado un control de malezas pre-emergentes con FLEX (Fomesafen 1l/hec).

6.2.1.8.4 Cosecha

Se realizará arrancando las plantas de la unidad experimental eliminando las plantas de los extremos de cada surco para evitar el efecto de borde.

Las plantas cosechadas serán contadas y depositadas en un saco con la correspondiente etiqueta para su posterior evaluación.

6.2.1.8.5 Trilla

La trilla se realizará a mano para evitar daños en el grano, posteriormente el grano será limpiado de impurezas y colocado en fundas de papel etiquetadas, para luego proceder a la toma de datos requeridos.

6.2.1.8.6 Riego

Se replicara la sequia intermitente controlando la cantidad de agua de lluvia que pueda ingresar al cultivo con una cubierta en el terreno y adicionalmente con un surcado de barrera en los bordes del ensayo. El riego del ensayo se realizara de acuerdo al cronograma (Cuadro 3) con la misma cantidad de agua que se brinda al cultivo naturalmente. El cronograma puede variar por las condiciones climáticas del medio, para lo cual se implementarán tensiómetros a lo largo del ensayo para controlar el mismo.

Cuadro 3. Cronograma de riego para ensayo de resistencia a sequía intermitente en la Granja Experimental Tumbaco (GET).

Cronograma de Riego				
Días	0	15	36	57
Estado de Cultivo	Siembra	Emergencia	Juvenil	Pre-floración

6.2.1.8.7 Análisis de Variables y resultados

Para considerar a una línea de fréjol como resistente esta deberá presentar resultados semejantes a los del control resistente, así como una línea de fréjol será considerado susceptible si refleja el mismo comportamiento que la línea control susceptible del ensayo. Estos resultados se utilizarán para seleccionar el marcador que refleje la característica de resistencia.

6.2.2 FASE DE INVERNADERO; Evaluación de líneas resistentes a *F. solani*

6.2.2.1 Factor de Estudio

Un total de diecinueve líneas de fréjol (Cuadro 4) se utilizarán para la validación de los marcadores de resistencia a *F. solani*, dentro de las cuales se incluyen; 14 IBLs con posible resistencia, dos de los padres de las cruzas y tres líneas de fréjol controles; dos resistentes y un susceptible.

Cuadro 4. Líneas de fréjol utilizadas para evaluar resistencia a *F. solani*

No.	Líneas	Característica	Cruza
1	INIAP-404 (Imbabello)	Control susceptible	
2	NLS (Negro San Luis)	Control resistente	Padre donador
3	C97407	Control susceptible	Padre recurrente
4	Negro bola Pallatanga	Control resistente	
5	Negro bola Chota	Control resistente	
6	CO3129	Posible resistencia	C97407*2/NSL
7	CO3123	Posible resistencia	C97407*2/NSL
8	CO3122	Posible resistencia	C97407*2/NSL
9	CO3119	Posible resistencia	C97407*2/NSL
10	CO3108	Posible resistencia	C97407*2/NSL
11	CO3104	Posible resistencia	C97407*2/NSL
12	CO3148	Posible resistencia	C97407*2/NSL
13	CO3131	Posible resistencia	C97407*2/NSL
14	CO3110	Posible resistencia	C97407*2/NSL
15	CO3157	Posible resistencia	C97407*2/NSL
16	CO3156	Posible resistencia	C97407*2/NSL
17	CO3164	Posible resistencia	C97407*2/NSL
18	CO3158	Posible resistencia	C97407*2/NSL
19	CO3160	Posible resistencia	C97407*2/NSL

6.2.2.2 Condiciones bajo las cuales se manejarán los tratamientos para la validación de los marcadores moleculares

Se realizará la siembra e inoculación con el patógeno *F. solani* en invernadero.

6.2.2.3 Tipo de Diseño Experimental

Se utilizará un DBCA (diseño en bloques completos al azar) para las evaluaciones en invernadero.

6.2.2.4 Repeticiones:

Se realizarán tres repeticiones para los tratamientos sometidos a la inoculación de *F. solani*.

6.2.2.5 Unidad Experimental

La unidad experimental comprenderá una maceta con suelo estéril y conteniendo cuatro semillas de cada tratamiento (línea de fréjol F5).

6.2.2.6 Análisis de Variancia

Cuadro 5. Esquema del Análisis de Varianza.

FUENTES DE VARIABILIDAD	GRADOS DE LIBERTAD
BLOQUES	2
TRATAMIENTOS	18
ERROR EXPERIMENTAL	36
TOTAL	56

Se realizaran las pruebas de Tukey con 0.05 de confianza y el coeficiente de varianza será calculado por la siguiente formula:

$$Cv = \frac{\sqrt{CMEE}}{\bar{x}} \times 100$$

6.2.2.7 Variables

- **Incidencia y Grado de infección:** se extraerán cuatro plantas de cada unidad experimental y se evaluará la raíz primero en incidencia de la infección, contabilizando cuantos individuos presentan síntomas. Luego se otorgará una calificación de 1 a 5 según el Anexo 3 a cada planta infectada.

6.2.2.8 Manejo del ensayo:

6.2.2.8.1 Siembra

De cada línea en estudio se plantarán cuatro semillas por maceta en 500 g de sustrato estéril.

6.2.2.8.2 Inoculación

El inóculo se preparará en una solución de PDA (agar papa dextrosa) a partir de uno de los aislamientos de *F. solani* provenientes de raíces de plantas de fréjol infectadas naturalmente en áreas con alta incidencia del patógeno de la Granja Experimental de Tumbaco de INIAP. La inoculación se realizará a los 10 días después de la siembra, donde todas las plantas de la unidad experimental serán extraídas del sustrato y aspergeadas en la radícula con el inóculo de *F. solani* (1×10^6 macroconidias por litro) según el protocolo basado en perlite empleado por Roman *et al.*, 2003.

6.2.2.8.3 Evaluación de Incidencia de Infección

Las 19 líneas de fréjol serán evaluadas en la incidencia de la infección una vez que terminen la etapa de floración. Y consistirá en extraer la planta sin dañarla, liberando a la raíz del sustrato, para luego ser lavada con agua y se registrará la incidencia de la infección de acuerdo a la escala numérica de incidencia de 1 a 5 indicada por CIAT (1987), (Anexo3).

6.2.2.8.4 Análisis de Variables y resultados

Para considerar a una línea de fréjol como resistente esta deberá presentar los mismos o aproximarse a los resultados del control resistente, así como una línea de fréjol será considerado como susceptible si refleja el mismo comportamiento que la línea control susceptible del ensayo.

6.2.3 FASE DE LABORATORIO

6.2.3.1 Toma de muestras

Una vez que las plantas sembradas tanto en campo como en invernadero presenten el segundo trifolio se colectará el mismo en tubos *Eppendorf* previamente etiquetados conteniendo 100 *ul* de solución *buffer* y se pondrán en hielo hasta llegar al laboratorio de Biotecnología para ser procesadas.

6.2.3.2 Extracción y Cuantificación del ADN

La extracción de ADN será realizada mediante el protocolo de Colombo (1998) modificado por Erazo (2006). Todas las muestras serán cuantificadas por comparación visual con un marcador de talla (Anexo 4), y diluidas a una concentración estándar (10ng/*ul*), para su posterior amplificación.

6.2.3.3 Amplificación de marcadores RAPDs

Utilizando el coctel detallado en (el Anexo 5) se realizará la reacción de amplificación con los marcadores RAPDs ligados a QTLs de resistencia a sequía (Cuadro 6) y de resistencia a pudrición seca de raíz por *F. solani* (Cuadro 7) se empleará la técnica de amplificación (Anexo 5) empleada por Shneider *et al.*, (1997). Una vez realizada la amplificación la visualización de las bandas se realizara con un marcador de talla en gel de agarosa (1,5%) por luz ultravioleta.

Cuadro 6. Marcadores RAPDS para resistencia a sequía

Marcadores	
OA08 780	OH19690
OZ08 750	OAB18650
OA04560	OF01520
OX11680	OH18710
OX18980	

Cuadro 7. Marcadores RAPDS para resistencia a *F. solani*.

Marcador
G6200–G17900
G17900-AL20350
AL20700-G6200
Al20850-G81400

6.2.3.4 Análisis de Datos

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

6.2.4 Selección de Marcador

Para la validación de marcadores moleculares los resultados de campo e invernadero serán comparados con la presencia o ausencia de bandas y así seleccionar los marcadores que identifiquen a las líneas de fréjol resistentes.

6.3 SELECCIÓN DE INDIVIDUOS DENTRO DE LAS POBLACIONES F_2

6.3.1 FASE DE CAMPO

6.3.1.1 Factores en estudio

- **Selección de individuos resistentes a sequía**

La selección de individuos resistentes a sequía se realizará sobre la población producto de la cruce INIAP-422 (Blanco Belén) 2*/NSL, donde el padre donador es NLS (Negro San Luis) y el padre recurrente con el cual se realizó dos retrocruzas es INIAP-422 (Blanco Belén).

Serán sembradas 100 semillas de la cruce INIAP-422 (Blanco Belén) 2*/NSL y 2 líneas de control (NLS y INIAP-422).

- **Selección de individuos resistentes a *F. solani***

La identificación de líneas resistentes a pudrición por *F. solani* se realizará en los individuos F_2 de INIAP-424 (Concepción)*2/L88-63, donde el padre recurrente es INIAP-424 y el donante de la resistencia es L88-63.

Serán sembradas 100 semillas de la cruce INIAP-424 (Concepción)*2/L88-63 y 2 líneas de control (L88-63 y INIAP-424).

6.3.1.2 Manejo del Ensayo

Un área de 74 m² (4mx8m) ubicada en la Granja Experimental de INIAP, Tumbaco será sembrada con las dos poblaciones en estudio y las líneas de control correspondientes.

La siembra consiste en ubicar 1 semilla por sitio, con una separación de 10 cm del siguiente, a lo largo de cada surco (4m).

6.3.2 FASE DE LABORATORIO

Las muestras serán colectadas y procesadas de la misma manera que en la fase de validación de los marcadores, pero aplicando solo aquellos funcionales, para seleccionar las líneas resistentes a sequía y a *F. solani*, en su orden.

6.3.2.1 Selección de individuos resistentes

Las líneas de fréjol que presenten la banda de resistencia con lo marcadores específicos, serán seleccionadas como resistentes sea el caso para sequia o pudrición radicular.

7. PRESUPUESTO

	UNIDAD	TOTAL	COSTO UNITARIO	SUBTOTAL	TOTAL
PRUEBAS CON MARCADORES MOLECULARES					
EXTRACCIÓN DE ADN	1	324	0,81	263,09	
CUANTIFICACIÓN DE ADN	1	324	0,95	307,99	
AMPLIFICACIÓN DE ADN	1	324	3,56	1154,55	
SUBTOTAL					1725,63
LABORATORIO PARA <i>F. solani</i>					
AISLAMIENTO y REPIQUES	1	40	1,43125	57,25	
PRUEBAS PREVIAS DE INOCULACIÓN	1	64	0,6	38,4	
INOCULACIÓN	1	80	0,75	60	
SUBTOTAL					155,65
TRABAJO DE CAMPO					
HERBICIDA / FERTILIZANTE				10	
MANO DE OBRA				20	
TRANSPORTE				20	
SEMILLAS				4	
SUBTOTAL					54
BECA					3366
TOTAL					5301,28
IMPREVISTOS (5%)					265,06
COSTO TOTAL					5566,34
FINANCIAMIENTO					
PROYECTO MEF: 21.00.039.001					5566.36

8. CRONOGRAMA

ACTIVIDAD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Revisión bibliográfica.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2. Pruebas preliminares en invernadero para inoculación.	■	■										
3. Siembra y crecimiento en campo e invernadero del material en estudio; líneas de fréjol F ₅ .												
4. Aplicación de protocolo de inoculación de <i>F. solani</i>			■	■	■	■	■					
5. Evaluación en campo de tratamientos de sequía.				■	■	■	■					
6. Validación de marcadores moleculares de sequía y pudrición.					■	■	■					
7. Siembra de líneas F ₂ para selección de resistentes para sequía y <i>F. solani</i> .							■	■	■	■		
8. Selección de líneas resistentes de F ₂ con los marcadores moleculares validados.										■	■	
9. Redacción del documento final						■	■	■	■	■	■	■

9. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson J. 1998. Marker Assisted Selection of Disease Resistance Genes in Wheat. International Workshop on the Application of Biotechnologies to Wheat Breeding.
- Acosta J., Cabral M., González F., Fraire S., Pons J., Rodríguez R., Sánchez B., & Simpson J. 2006. Fusarium lateritium; New pathogen of bean roots in Mexico. Agricultura Técnica en México. 32(3): 251-257
http://www.inifap.gob.mx/otros_sitios/vol32_num_3_2006.pdf
- Asíns M., Carbonell E. A., & Pérez P. 2003. Optimización del análisis de QTLs (*Quantitative trait loci*) en poblaciones de líneas recombinantes puras (*RILs*) IX Conferencia Española de Biometría:21-23
<http://www.udc.es/dep/mate/biometria2003/Archivos/aq60.pdf>.
- Brothers M., James D., Schneider K. 1997. Marker-Assisted Selection to Improve Drought Resistance in Common Bean. Crop Science. 37: 51-60.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. no35:12-15.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Sistema Estandar para la Evaluacion de germoplasma de frijol. Aart. van Schoonhoven y Marcial A. Pastor-Corrales (comps). Cali- Colombia p.56
- Erazo N., Murillo A., Estrella P., Vargas F., Peralta E. 2006. Evaluación de 214 líneas frèjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) para resistencia a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) mediante selección asistida por marcadores moleculares con fines de mejoramiento genético.
- Estrella P. 2002. Evaluación de cuatro líneas de frèjol arbustivo *Phaseolus vulgaris* L. de grano negro pajo tres formulas de fertilización química en Tumbaco-Pichincha. Pag 121
- Falconí E. 2005. Identification of drought resistance in large seeded common bean genotypes. Pag 154
- Falconí E., Murillo A., Vargas F., Peralta E., & Abawi G.S. 2008. Frequency of occurrence of root rot pathogens on beans in Ecuador. Anua report of the Bean Improvement cooperative (BIC). 51:28-29.

- Kelly J., Afanado L., Haley S., & Miklas P. 1994. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. *Agronomía Mesoamericana*. 5:1-7.
- Marieke J. & Pim L. 2003. Future perspectives of Backcross Inbred Lines for exploitation of wild germplasm: a case study on *Lactuca saligna* as a donor for quantitative resistance to lettuce downy mildew. *Eucarpia Leafy Vegetables* pag 69-74
- Miklas, P. N., Stavely J.N., & Kelly J. D., 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85:745-749.
- Murillo E., B. 2002. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agrícolas, INIAP. Departamento Nacional de recursos Filogenéticos y Biotecnología, DENAREF. Protocolos de Marcadores Moleculares compilados y editados.
- Pañeda, A. 2005. Desarrollo de herramientas moleculares para la localización de genes de interés en la mejora genética de *Phaseolus vulgaris* L. Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional, Área de Genética. 188 p.
- Peralta E. A., Murillo E., Falconí N., Mazón N., & Pinzón J. 2007. Manual de Campo para el reconocimiento y control de las enfermedades mas importantes que afectan al cultivo del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ecuador. Publicación Miscelánea Programa de leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador. No36:33.
- Roman B., Snap S., Kelly D. 2003. Assessing root traits associates with root rot resistance in common bean.
- Schneider K., Brothers M., & Kelly J. 1997. Marker assisted selection to improve drought resistance in common bean. *Crop Science* 37:51-60.
- Simmonds N., M. 1981. Principles of Crop Improvement: Breeding plans. Editorial Longman. cap (5): 123-130
- Singh SP., Gutiérrez AJ., Molina A., Urrea C., Gepts P. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean: Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Sci* 31: 23-29.
- Subía C., Peralta E., Falconí E., Pinzón J., Mooney D., & Swinton S. 2007. Diagnostico sobre el cultivo de fréjol arbustivo y el uso de pesticidas en el sistema de producción, en los valles del Chota y Mira. Provincias Imbabura y Carchi, Ecuador.

2000-2005. Publicación miscelánea. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos, INIAP. Quito, Ecuador no35:55.

Trujillo C. 2006. Estandarización del método de selección de gametos en la F1 de cruzas dobles para resistencia múltiple a enfermedades en fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). SANTA CATALINA, INIAP

ANEXO N°1

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

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

ANEXO N°2

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

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

ANEXO N°3

Escala de evaluación Visual de Pudrición Radical según CIAT 1987.

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

ANEXO N°4

Cuantificación y Dilución

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

ANEXO N°5

Protocolo de amplificación de marcadores moleculares RAPDs

1. Dispensar en cada posillo de la hilera la 1,25 ul de la muestra de ADN correspondiente y mantener cubierto en hielo.

1. Preparar una solución con los siguientes reactivos de acuerdo al número de muestras:

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

Fuente: Receta para 1 Rx (Murillo, 2002)

2. Dispensar en cada posillo de la hilera 5 ul del mix preparado, añadir 10 ul de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.

3. El programa de amplificación será el siguiente; 34 ciclos de; 1 min a 94 ° C, seguido por 1 min a 35 ° C y 2 min a 72 ° C. A continuación de 34 ciclos de; 1 min a 94 ° C, 1 min a 40 ° C y 5 min a 72 ° C (Shneider *et al.*, 1997).