



Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

FECHA DE PRESENTACIÓN:	Noviembre 2010
ESTACIÓN EXPERIMENTAL:	Santa Catalina
DEPARTAMENTO:	Biología
PROYECTO:	Conservación y uso de la diversidad genética cultivada para el control de plagas y enfermedades en apoyo a la agricultura sostenible (BIOVERSITY)
RESULTADO:	Caracterización molecular de germoplasma
ACTIVIDAD:	Estudio de la variabilidad genética de cultivares locales de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) colectado en dos agroecosistemas andinos (Cotacachi y Saraguro), y su relación con la resistencia genética a antracnosis y roya
UBICACIÓN:	Estación Experimental Santa Catalina
AUTOR:	Egda. Carla Catalina Torres Ruiz
COAUTORES:	Ing. José Ochoa Dr. Eduardo Morillo
COLABORADORES:	PRONALEG
FECHA DE INICIO:	Octubre 2010
FECHA DE TERMINACIÓN:	Septiembre 2011
PRESUPUESTO:	6.787,20 USD
FUENTE DE FINANCIAMIENTO:	Proyecto BIOVERSITY (90%) Tesista (10%)

ANTECEDENTES

La pérdida de la biodiversidad constituye una amenaza grave para la agricultura y por lo tanto para la subsistencia de millones de personas, debido a que es fuente primaria de germoplasma, de la cual los pequeños agricultores en los países en desarrollo continúan dependiendo para mantener la producción de sus cultivos de una manera sostenible y satisfacer sus necesidades básicas. La potencial pérdida de estos cultivares disminuiría la capacidad de los agricultores en general para afrontar su seguridad alimentaria, la habilidad para manejar los cambios en las poblaciones de enfermedades y mantener la estabilidad de los rendimientos y adaptación a cambios ambientales, como el calentamiento global (Espinoza, 2010). Adicionalmente, el uso de la diversidad es la mejor forma de conservarla. Hay muchas iniciativas para promocionar el uso tradicional, crear nuevos usos y dar valor agregado a la diversidad agrícola. Sin embargo, la conservación de la diversidad en la agricultura tradicional no ha sido casual y se considera que está asociada con la estabilidad del agro ecosistema. Al respecto, la diversidad podría disminuir el efecto negativo de los estreses bióticos y abióticos, y por lo tanto reduce la vulnerabilidad del agro ecosistema (Jarvis et ál., 2006).

El estudio y entendimiento de la biodiversidad es una de las herramientas para su conservación; con este propósito el fréjol común ha sido caracterizado anteriormente por autores como Becerra (1994), Bebee (2000, 2001), Blair (2007), Duarte (1999), Durán (2005), Kwak (2009) con distintos marcadores moleculares como RFLPs, RAPDs, AFLPs, SRS, tanto en la región andina, mesoamericana y del Caribe (Bonilla, 2010). Estos resultados coinciden en que las variedades cultivadas actualmente son el resultado de la evolución y domesticación de una forma silvestre, *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineous*. Para fréjol se han identificado dos centros de origen: Mesoamérica (México y América Central) y Suramérica, dando como resultado dos grupos genéticos marcados, el Centroamericano y Andino, los cuales presentan una gran diversidad genética principalmente por su aislamiento geográfico. Además se distinguen cuatro centros primarios de diversidad: el andino, el colombiano, el ecuatoriano junto con el norte del Perú y el mesoamericano (Gepts, 1986). Adicionalmente Bebee determina que existe mayor diversidad genética en poblaciones silvestres y cultivadas en el sur de Los

Es de importancia recolectar más cultivos silvestres de fréjol en las regiones del sur de Colombia, Ecuador y Norte del Perú, ya que recientemente se reporto la presencia de fréjol silvestre, también es necesario determinar la relación de estos cultivos silvestres con otras poblaciones silvestres de fréjol y además en Colombia y en menor medida en Ecuador se encuentran los acervos genéticos mesoamericano y andino (Debouck, 1993).

Los trabajos previos de caracterización molecular de fréjol con microsatélites (SSRs) son los realizados por autores como: Díaz (2006), Ponciano (2009), Gómez (2004), Maras (2006), Blair (2003) y Gaitán (2002), determinaron gran riqueza alélica, alto nivel polimórfico de discriminación, por lo que estos marcadores moleculares son empleados en estudios de variabilidad genética, análisis fitogenéticos, estudios de poblaciones (Bonilla, 2010).

En el Ecuador el INIAP ha realizado la caracterización molecular de 740 accesiones de fréjol arbustivo de la colección del Banco Nacional de Germoplasma, la que posee accesiones nacionales, accesiones internacionales (García, 2010) incluyendo la

colección lojana de fréjol, esta caracterización fue realizada empleando 8 marcadores microsatélites (SSRs) (Bonilla, 2010).

Relacionar la diversidad genética con la resistencia a enfermedades puede ser la base para encontrar nuevas fuentes de resistencia y establecer el grado de diversidad de la resistencia, al momento en el país no existen trabajos previos que realizan esta relación.

En estudios genéticos se ha logrado discriminar 9 diferentes genes de resistencia dominantes independientes (Co-1 - Co-9) ante antracnosis Co-1 en el cromosoma 1H, Co-2 en el cromosoma 11J, Co-3/Co-9 en el cromosoma 4B, Co-4 en el cromosoma 8F y Co-6 en el cromosoma 7A (Méndez, 2001).

La resistencia del frijol a la infección de Roya por *U. appendiculatus* está regulada por al menos 11 genes denominados Ur-3, Ur-4, Ur-5, Ur-6, Ur-7, Ur-9, Ur-11, Ur-12, Ur-Ouro Negro, más otros dos aún no denominados, los cuales confieren resistencia a múltiples razas en función de la combinación presente, lo cual indica que están organizados en grupos y que el tipo de resistencia es específica de razas (Montero, 2010).

Según Engleman (1979) como resultado del cambio evolutivo en la genética de la planta que se da por medio del proceso de domesticación promovido por el ser humano y como respuesta a una selección automática como resultado a la modificación humana y medioambiental, los caracteres que han aumentado su diversidad en fréjol común con la domesticación han sido la resistencia a enfermedades, la fibrosidad de la vaina, la forma de la semilla.

Los agrosistemas tradicionales son fuente de una interesante variabilidad genética que es necesaria caracterizar y evaluar. En el caso del fréjol, las zonas en estudio son poseedoras de una amplia diversidad fenotípica, y posiblemente genética, que podría potencializarse en mejoramiento y uso de estos recursos genéticos. El análisis de variabilidad genética a nivel molecular de variedades criollas y mejoradas permitirá determinar si los cultivares tradicionales son eventualmente poseedores de otras fuentes de resistencia a las utilizadas en los programas de mejoramiento, lo que sin duda, aportará a la valorización de estos recursos genéticos, y a las perspectivas de uso de estos materiales en los programas de mejora genética.

2. JUSTIFICACIÓN

En el país existe una gran diversidad fenotípica de variedades tradicionales o criollas de fréjol, estas variedades requieren ser evaluada genéticamente para establecer estrategias de valoración y utilización. En el catálogo del Banco de Germoplasma están reportadas 1353 accesiones de fréjol, de las cuales 740 pertenecen a fréjol arbustivo y han sido caracterizadas molecularmente mediante SSRs.

En agroecosistemas tradicionales como los de Cotacachi (Imbabura) y Saraguro (Loja), la diversidad juega un rol importante en la reducción de los efectos negativos de los patógenos. A su vez la resistencia genética debe ser el mecanismo de defensa más útil.

En estudios de resistencia genética de la diversidad de fréjol de las zonas en estudio a la roya y la antracnosis realizados por el Departamento Nacional de Protección Vegetal

(DNPV) como parte del proyecto BIOVERSITY, se han identificado fuentes de resistencia a estas enfermedades. Sin embargo, aunque estas fuentes de resistencia son de diferente naturaleza epidemiológica, los métodos convencionales no permiten establecer el grado de diversidad de la resistencia. La caracterización molecular en estos casos es una herramienta importante para complementar la caracterización fenotípica y relacionar la diversidad genética con las fuentes de resistencia disponibles.

Este estudio contribuirá a entender de manera más objetiva como la diversidad esta contribuyendo al manejo de plagas. Con el desarrollo de este trabajo, se conocerá la diversidad real existente, promoviendo su uso para reducir la amenaza de plagas, lo que conjuntamente permitirá tomar acciones que mitiguen los daños causados por plagas basados en el conocimiento de la diversidad, y adaptar estrategias de mejoramiento genético a nivel nacional para que se incluya el conocimiento del agricultor y el uso de materiales locales. A través de la determinación de la diversidad genética de estas regiones se podrá alcanzar entre otros beneficios, el incremento de la posibilidad de mantener un número de variedades locales, a través de una base genética más amplia para el mejoramiento y conservación.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Caracterizar la variabilidad genética de cultivares locales de fréjol colectados en dos agro ecosistemas andinos (Cotacachi y Saraguro) y relacionar la variabilidad genética con el grado de resistencia genética a antracnosis y roya.

3.2 ESPECÍFICOS

- ❖ Identificar duplicados genotípicos en 207 fenotipos análogos de colectas de fréjol de las zonas de Cotacachi y Saraguro y 33 accesiones adicionales que incluyen 10 Líneas Promisorias, 7 Progenitores fuentes de resistencia genética y 16 Variedades mejoradas, con cinco marcadores microsatélites (SSRs) polimórficos y de alto poder discriminante.
- ❖ Caracterizar el polimorfismo de cinco marcadores microsatélites (SSRs) en genotipos originales de fréjol provenientes de los cantones Cotacachi, Saraguro, variedades comerciales y líneas elite de mejoramiento.
- ❖ Relacionar la variación genética de los materiales con sus niveles de resistencia a antracnosis y roya determinada en trabajos previos, mediante técnicas de análisis de agrupamiento y multivariado.

4. HIPÓTESIS

H₀ (1): No existe variabilidad genética a nivel de marcadores neutros en las variedades locales de fréjol de Cotacachi y Saraguro, Líneas Promisorias, Progenitores fuentes de resistencia genética y Variedades mejoradas

H₀ (2): La variabilidad genética a nivel de marcadores neutros de variedades locales de fréjol de Cotacachi y Saraguro, variedades comerciales y líneas elite de mejoramiento, no está relacionada con los niveles de resistencia a antracnosis y roya.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. MATERIAL VEGETAL

Muestreo: Una fase inicial comprende la entrega de las semillas previamente clasificadas, codificadas y evaluadas su nivel de resistencia genética a antracnosis y roya por el DNPV como parte del proyecto BIOVERSITY (Anexo1) y el Programa Nacional de Leguminosas y Granos andinos (PRONALEG-GA) (Anexo2).

El DNPV realizó la siembra de las poblaciones de fréjol (*Phaseolus vulgaris L.*) colectadas en las zonas de Cotacachi y Saraguro, la siembra se realizó en campo en asociación con maíz (*Zea mays*); cuando está asociado el fréjol con el maíz sembraron dos semillas de fréjol y maíz en el mismo sitio, a una distancia de 60 a 80 centímetros entre plantas; cuando se asocia con fréjol arbustivo y maíz, sembraron dos semillas de maíz a una distancia de 80 centímetros entre plantas y sembraron dos semillas de fréjol entre las plantas de maíz.

El nivel de resistencia a antracnosis fue evaluado por el DNPV cuando las plantas presentaron la primera hoja verdadera, contaron todas aquellas que presenten síntomas de antracnosis y se expreso en porcentaje en relación a todas las plantas de la población. En este estado las lesiones de antracnosis se presentan como necrosis de las nervaduras de color café oscuro, observadas en el envés de las hojas primarias.

En el caso de roya el DNPV evaluó el tipo de pústula de Roya en cada planta seleccionada de acuerdo a la escala desarrollada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical. La evaluación se realizo cada 15 días a partir de la etapa de desarrollo R6 (Floración) hasta el final de R8 (Llenado de vainas).

5.1.2. REACTIVOS, EQUIPOS E INSTALACIONES

Los reactivos, equipos e instalaciones necesarios para la realización de esta investigación se hallan descritos en el Anexo 3.

5.1.3. RECURSOS:

- Humanos
- De oficina
- Laboratorio

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. ANALISIS MOLECULAR

La caracterización molecular se realizará en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP.

5.2.2. TRATAMIENTOS

Se utilizarán como tratamientos los 207 fenotipos locales de *Phaseolus vulgaris* L. colectadas en el cantón Cotacachi (Imbabura) y Saraguro (Loja) descritas en la sección material vegetal y 33 accesiones adicionales que incluyen 10 Líneas Promisorias, 7 Progenitores fuentes de resistencia genética y 16 Variedades mejoradas

5.2.3. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

5.2.3.1 Germinación de semilla: Serán sembradas dos plantas de cada fenotipo por duplicado en bandejas de germinación en turba y se rotularán adecuadamente. Se colectarán hojas jóvenes, dos plantas de cada fenotipo, para la posterior extracción de ADN. Cada accesión conservará la codificación establecida por el proyecto. Se fotodocumentará adecuadamente las semillas. Se sembrarán 97 fenotipos correspondientes al cantón Cotacachi y 110 fenotipos del cantón Saraguro, de colectas realizadas por el DNPV como parte del proyecto BIOVERSITY, además de 33 accesiones adicionales que incluyen 10 Líneas Promisorias, 7 Progenitores fuentes de resistencia genética y 16 Variedades mejoradas de fréjol desarrolladas por el INIAP

5.2.3.2 Extracción y Cuantificación de ADN: Se utilizará el protocolo de extracción reportado por Colombo *et ál.* 1998 (Anexo 4). El ADN se cuantificará en geles de agarosa al 1% con tampón TAE 1X comparándolo con un marcador de peso (Low Mass Ladder).

5.2.3.3 Amplificación de SSR: El protocolo de amplificación a utilizarse se describe en el Anexo 5, el ADN total de las muestras será homogenizado a una concentración de aproximadamente 5 ng/ul. Los productos de amplificación serán visualizados en geles de agarosa al 2%. Se manejarán 10 microsatélites (SSRs) aislados de *P. vulgaris* seleccionados por su secuencia SSR (motif) simple (dinucleótidos y sin secuencias intermedias a nivel del motif SSR) y reportados como polimórficos por Gaitán *et ál.* (2002), además empleados en trabajos previos realizados por el DNB. Los primers seleccionados se presentan en el Anexo 6.

5.2.3.4 Genotipaje de SSR: El proceso de caracterización de las accesiones de fréjol comprende dos fases metodológicas.

- ✓ **Primera fase:** Identificación de la variabilidad genética para identificación de duplicados, utilizando los primers SSR reportados como polimórficos (García, 2010) y presentes en una combinación multiplex establecidas en la fase de estandarización en el secuenciador ABI-310. El marcador de talla que se utilizará en el secuenciador ABI-310 para la asignación de tamaños a los picos generados es el Gene Scan ROX-500 de Applied Biosystems.
- ✓ **Segunda fase:** Una vez que las muestras han sido sometidas a identificación y discriminación de duplicados en la primera fase, estas son sometidas un genotipaje en serie complementario, proceso que se realizará en el secuenciador LI-COR 4300, con 5 primers descritos en el Anexo 6. IRDye 700 u 800 nm. es el marcador de peso molecular que se empleará en el secuenciador LI-COR 4300.

5.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El registro de datos se realizará mediante la asignación de un tamaño específico en pares de bases a los picos y bandas generados para cada SSR, esta asignación será realizada por los softwares empleados, GENE MAPPER en el secuenciador ABI-PRISM 310 y SAGA^{GT} MICROSATELLITE en el secuenciador LI-COR 4300. De esta manera se dispondrá de una matriz binaria donde cada alelo será considerado una variable, y una matriz genotípica donde cada individuo estará identificado por su genotipo para cada locus SSR empleado. Estas matrices (genotípica y binaria) serán analizadas con diversos programas que utilizan información proporcionada por los microsatélites (SSRs), estos son: POWER MARKER, NTSYS, FSTAT, GENALEX, GENEPOP.

Los parámetros de diversidad a determinarse son: porcentaje de loci polimórficos, riqueza alélica, número efectivo de alelos, heterocigosis observada y esperada al equilibrio de Hardy-Weinberg, parámetros F (índice de fijación F_{is} y de diferenciación genética entre poblaciones, F_{st}). Adicionalmente se realizarán análisis de agrupamiento o Cluster analysis y análisis multivariados (PCO y AFC) e identificación de duplicados mediante comparación de genotipos multilocus SSR. Al finalizar la determinación de parentesco genético estos datos se relacionarán con los resultados obtenidos en proyectos previos acerca de la resistencia genética a antracnosis y roya por las accesiones de fréjol analizadas, mediante técnicas de análisis de agrupamiento y multivariados, por medio de un análisis factorial múltiple con el programa SPSS 18.

6. CRONOGRAMA DE TRABAJO

ACTIVIDAD	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Entrenamiento y capacitación	X	X	X									
Revisión bibliográfica y preparación anteproyecto			X	X	X							
Aprobación anteproyecto						X						
Muestreo y siembra material				X	X	X						
Extracción y Cuantificación de ADN				X	X	X						
Estandarización de las condiciones de genotipificación automatizada para SSR para <i>P. vulgaris</i> en el secuenciador ABI-310.				X	X							
Discriminación de duplicados en el secuenciador ABI-310						X	X	X				
Genotipaje complementario de SSR en el secuenciador LI-COR 4300								X	X	X		
Análisis estadístico e interpretación										X	X	
Redacción de Tesis									X	X	X	X

7. PRESUPUESTO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

RUBRO	Unidad	Cantidad	\$/Unit	\$/Total
Extracción de ADN (Método convencional)	Muestra (1x18)	23	15,00	345,00
Cuantificación de ADN (gel)	Muestra (1x20)	21	15,00	315,00
Amplificación SSR	Rx (1x96)	5	191,00	955,00
Estandarización	Técnica Rx	1	150,00	150,00
SSR ABI -310 (genotipaje)	(1x96)	4	339,00	1.356,00
SSR LI-COR 4300 (genotipaje)	Rx(1x96)	3	191,00	573,00
TOTAL				3.694,00

PUBLICACIÓN

RUBRO	Unidad	Cantidad	\$/Unit	\$/Total
Fotocopias, impresión y otros	Unidad	500	0,50	250,00
Empastados.	Unidad	6	20,00	120,00
TOTAL				370,00

RECURSO HUMANO

RUBRO	Unidad	Cantidad	\$/Unit	\$/Total
Becario	1 mes	12	200,00	2.400,00
TOTAL				2.400,00

RUBRO	COSTO
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	3.694,00
PUBLICACION	370,00
RECURSO HUMANO	2.400,00
SUBTOTAL	6.464,00
IMPREVISTOS (5%)	323,20
COSTO TOTAL	6.787,20

FUENTE DE FINANCIAMIENTO	% Aporte
Tesista	10.00
Proyecto BIOVERSITY	90.00
TOTAL	100.00

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Becerra, L. y Gepts, P. (1994). RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centers of origin. *Genome*, 37, 256–263.
- Beebe, S. (1988). Temas actuales de mejoramiento genético del frijol común. Memorias del taller internacional de mejoramiento genético del frijol. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Beebe, S., Skroch, P., Tohme, J., Duque, M., Pedraza, F. y Nienhuis, J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*, 40, 264–273.
- Beebe, S., Rengifo, J., Gaitán, E., Duque, M. & Tohme, T. (2001). Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), A.A. 6713, Cali, Colombia. *Crop Science*, 41, 854–862.
- Blair, M., Pedraza, F., Buendía, H., Gaitán, E., Beebe, S., Gepts, P., Tohme, J. (2003). Development of a genome-wide anchored microsatellite for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical Applied genetics*, 107, 1362–1374.
- Blair, M., Díaz, J., Duque, M., Hidalgo, R. (2007a). Evidencia molecular de diferenciación genética e introgresión entre razas de frijol común del acervo andino. *Acta Agronómica*, 56 (4).
- Bonilla, V. (2010). Caracterización molecular de la colección lojana de frejol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP- Ecuador
- Colombo, C., Second, G., Losada Valle, T., Charrier, A. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 11: 105-113.
- Debouck, D., Toro, O., Paredes, O.M. Johnson, W.C. y Gepts, P. (1993). Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. *Economic Botany* 47:408-423.
- Díaz, L., Blair, M. (2006). Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theoretical Applied genetics*, 114, 143–154.
- Duarte, J., Dos santos, J., Melo, L. (1999). Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 22 (3), 419-426.
- Durán, L., Blair, M., Giraldo, M., Macchiavelli, R., Prophete, E., Nin, J., Beaver, J. (2005). Morphological and Molecular Characterization of Common Bean Landraces and Cultivars from the Caribbean. *Crop Sci.*, 45, 1320–1328.
- Engleman, E. (1979). Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Institución de enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Chapingo, México.
- Espinoza, Í. (2010). Estudio de la resistencia y tolerancia de poblaciones locales de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) de Cotacachi y Saraguro a las principales enfermedades. Cotacachi, Imbabura.
- Gaitán-Solís, E., Duque, C., Edwards, K., Tohme, J. (2002). Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Science Society of America*. 42: 2128-2136.
- García, K. (2010). Informe técnico de la caracterización molecular de 740 accesiones de fréjol arbustivo conservadas en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP. Departamento Nacional de Biotecnología. INIAP-EESC.

- Gepts, P., Osborn, T., Rashka, K. y Bliss, F. (1986). Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40(4), 451-468.
- Gómez, O., Blair, M., Frankow, B. y Gullberg, U. (2004). Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Science*, 44, 1412-1418.
- Jarvis, D. y Dindo, M. (2006). La diversidad genética de cultivos para reducir la amenaza de plagas en finca: Protocolos de diagnóstico participativo. Versión I.
- Kwak, M. y Gepts, P. (2009). Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theor Appl Genet*, 118, 979-992.
- Maras, M., Sušnik, S., Meglič, V. y Šuštar, J. (2006). Characterization and genetic diversity changes in the slovenian common bean, cešnjevce landrace. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48(2), 39-47.
- Méndez, B. Mapa Genético de *Phaseolus Vulgaris* L. y Resistencia a Antracnosis en Faba Granja Asturiana. (2001). Universidad OVIEDO. http://www.cibernetia.com/tesis_es/ciencias_de_la_vida/genetica/genetica_molecular_de_plantas/1
- Montero, V., Acosta, J., Guerrero, B., Sánchez, B., y González, M. (2010) Combinación de genes de Frijol que le confieren resistencia contra *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 33 (Núm. Especial 4): 111 – 115, 2010. Guanajuato, México. <http://www.revfitotecmex.org/documentos/33-3%20Especial%204/20a.pdf>
- Ponciano, K., Villatoro, J. y Molina, L. (2009). Caracterización preliminar con microsatélites de la colección guatemalteca de Frijol Común Trepador. *Agronomía mesoamericana*, 20(2), 245-254.

Anexo 1. Accesiones de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) clasificadas y codificadas por el PRONALEG-GA

1. TRM 1	Línea Promisoria ¹
2. AMPR 3	Línea Promisoria
3. AMPR 5	Línea Promisoria
4. RMC 59	Línea Promisoria
5. RMA 26	Línea Promisoria
6. INIAP Rocha	Variedad mejorada
7. INIAP Portilla	Variedad mejorada
8. INIAP Jema	Variedad mejorada
9. Calia 3	Progenitor fuente de resistencia genética para Mancha angular ²
10. Poa 10	Progenitor fuente de resistencia genética para Mancha angular
11. G 2333	Progenitor fuente de resistencia genética para Antracnosis y Roya
12. Catrachita	Progenitor fuente de resistencia genética para Antracnosis y Roya
13. Beldakmi RMR 21	Progenitor fuente de resistencia genética para Roya y BCMV
14. TB2	Línea Promisoria
15. VAX 2	Progenitor fuente de resistencia genética para Bacteriosis común
16. RMC 20	Línea Promisoria
17. PJ 1	Línea Promisoria
18. SEA 3	Progenitor fuente de resistencia genética para Mancha angular
19. L 88-63	Línea Promisoria
20. G 21212	Línea Promisoria
21. INIAP Afroandino	Variedad mejorada
22. Canario del Chota	Variedad mejorada
23. INIAP Concepción	Variedad mejorada
24. INIAP Boliche	Variedad mejorada

25. INIAP Chaupeño	Variedad mejorada
26. INIAP Vilcabamba	Variedad mejorada
27. INIAP Imbabello	Variedad mejorada
28. INIAP Cargabello	Variedad mejorada
29. INIAP Fanesquero	Variedad mejorada
30. INIAP Blanco Belén	Variedad mejorada
31. INIAP Yunguilla	Variedad mejorada
32. INIAP Paragachi andino	Variedad mejorada
33. INIAP Rojo del valle	Variedad mejorada

¹Es el resultado de la evaluación en un programa de mejoramiento de algunos años y ha sido seleccionada como la mejor por características sobresalientes de adaptación, resistencia y calidad de grano, estas son asignadas con una codificación. Poseen potencial para convertirse en variedades comerciales. No son comerciales.

²Son empleadas para generar líneas promisorias y variedades mejoradas con resistencia genética a enfermedades.

Anexo 2. Reactivos y Equipos

Reactivos	Equipos e Instalaciones	Materiales
Tris HCl	Invernadero	Cajas petri
NaCl	Baño maría	Papel filtro
EDTA PH8,0,5M	Centrífuga	Turba
PVP	Vórtex	Bandejas de germinación
CTAB	Refrigerador	Tubos Eppendorf
b-mercaptoetanol	Transiluminador UV	Hielo
CIA	Termociclador	Maceradores
Etanol	Cámaras electroforéticas	Puntas 1 ml, 200 ul y 1000 ul
Bromuro de etidio	Agitador	Papel parafilm
Blue juice	Estufa	Pipetas
Agarosa	Sorbona	Papel absorbente
TAE	Balanza analítica	Separadores, peines
MgCl ₂		
5XPCR buffer		
dNTP's		
Primers		
Taq polimerasa		
Agua ultrapura		
Aceite mineral		
Marcador de peso molecular		

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN para *Phaseolus vulgaris* L. (Colombo *et ál.*, 1998)

Soluciones necesarias:

- **Buffer de extracción** (para 100 ml)

Componentes	Cantidad (100 ml)	Concentración final
Tris HCl 1M pH 8	5 ml	50 mM
NaCl 5M	20 ml	1 M
EDTA 0.5M pH 8	4 ml	20 mM
CTAB	1 gr	1 %
PVP	1 gr	1 %

PROTOCOLO:

Para la extracción de ADN utilizar 1 hoja joven de cada muestra y colocar en un tubo Eppendorf de 2 ml con 200 µl de buffer de extracción. Añadir una pequeña cantidad de metabisulfito de sodio en cada Eppendorf y macerar hasta que la muestra esté completamente molida. Añadir 800 µl de buffer de extracción y 12 µl de b-mercaptoetanol y mezclar en el vórtex. Incubar las muestras a 60°C en el baño maría de 1:30 a 2:00 horas con agitación cada 30 minutos, posteriormente centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos, luego recuperar el sobrenadante, y añadir 750 µl de CIA. Luego de agitar centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, y nuevamente añadir 750 µl de CIA, agitar en el vórtex y centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante transferir a un nuevo tubo, añadir 200 µl de etanol helado y incubar a -20°C por 30 minutos. Centrifugar a 5000 rpm por 1 minuto, posteriormente capturar el ADN extraído. Realizar un lavado del ADN obtenido con etanol al 70%, luego eliminar el etanol y secar el ADN primero a temperatura ambiente y luego en la microestufa a 37°C hasta que el ADN este seco y todo el alcohol se evapora. Resuspender la pastilla de ADN en 200 µl buffer TE. Incubar a 65°C en baño maría hasta que la pastilla se disuelva totalmente. Añadir 2 µl de RNAsa por cada 100 µl de ADN obtenidos. Las muestras conservarlas hasta su cuantificación a -20°C.

Anexo 5. Protocolo de amplificación de microsatélites (SSRs) para ABI-310 y LI-COR 4300 (García, 2010) (Bonilla, 2010)

❖ **ABI-310:**

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

- Para las reacciones en monoplex:

Reactivo	Cantidad
ADN (5ng/ul)	2
Buffer 5x	1,5
MgCl ₂ 25 Mm	0,6
dNTPs 10mM	0,15
Primer F 100µM	0,23
Primer R 100µM	0,23
Agua	2,67
Taq (5u/ul)	0,125
Total	7,505

- Para las reacciones en triplex PCR:

Reactivo	Cantidad
ADN (5ng/ul)	2
Buffer 5x	1,5
MgCl ₂ 25 mM	0,6
dNTPs 10mM	0,15
Primer F 100μM	0,3
Primer R 100μM	0,3
Primer F 100μM	0,23
Primer R 100μM	0,23
Primer F 100μM	0,23
Primer R 100μM	0,23
Agua	1,61
Taq (5u/ul)	0,125
Total	7,505

2. Dispensar en cada tubo Eppendorf 5.5 ul del mix preparado y 2 ul de ADN, añadir 10 ul de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.

3. Amplificar las muestras de acuerdo al siguiente programa:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min.
2	94	45 s.
3	56	45 s.
4	72	1 min.
5	30 veces el paso 2	
6	72	7 min.
7	4	5 min.

4. Visualizar los fragmentos amplificados en un gel de agarosa 2% utilizando siempre un marcador de peso molecular.

❖ LI-COR 4300

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

- Para las reacciones en monoplex:

Reactivo	Cantidad
ADN (5ng/ul)	1 ul
5x Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega)	1 ul
MgCl ₂ Promega (25mM)	0,5 ul
dNTP's Invitrogen (5mM)	0,2 ul
M13 700-800 LI- COR (1uM)	0,5 ul
Primer 1 F-M13 (1uM)	0,05 ul
Primer 1 R (10 uM)	0,08 ul
GoTag DNA Polymerase Promega (5U/ul)	0,05 ul
Agua	1,62ul
Total	5,0 ul

- Para las reacciones en duplex PCR:

1. Dispensar en cada tubo Eppendorf 4,0 ul del mix preparado y 1 ul de ADN, añadir 10 ul de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.
2. Amplificar las muestras de acuerdo al siguiente programa:
- 3.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	10 min.
2	95	4 min.
3	95	1 min.
4	Temperatura reportada de cada primer	2 min.
5	72	2 min.
6	25 veces el paso 3	
7	72	10 min.

Reactivos	Cantidad
ADN (5ng/ul)	1 ul
5x Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega)	1 ul
MgCl ₂ Promega (25mM)	0,5 ul
dNTP's Invitrogen (5mM)	0,2 ul
M13 700-800 LI- COR (1uM)	0,88 ul
Primer 1 F-M13 (1uM)	0,05 ul
Primer 1 R (10 uM)	0,08 ul
Primer 2 F-M13 (1uM)	0,05 ul
Primer 2 R (10 uM)	0,08 ul
GoTag DNA Polymerase Promega (5U/ul)	0,05 ul
Agua	1,11 ul
Total	5,0 ul

Visualizar los fragmentos amplificados en un gel de agarosa 2% utilizando siempre un marcador de peso molecular.

Anexo 6. Microsatélites (SSRs) y primers de *Phaseolus vulgaris* utilizados para el estudio de variabilidad genética en el secuenciador ABI-PRISM 310 y LI-COR 4300 (Gaitán-Solís *et ál.* 2002)

	Núm	Locus	Secuencia SSR	5' to 3'	Secuencia primer	Tm (°C)	Size(pb)
A B 1	1	BM 143	(GA)35	Left	GGGAAATGAACAGAGGAAA	55	143
				Right	ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG		
-	2	BM 156	(CT)32	Left	CTTGTTCCACCTCCCATCATAGC	52	267
				Right	TGCTTGCACTCAGCCAGAATC		
3 1 0	3	BM 211	(CT)16	Left	ATACCCACATGCACAAGTTTGG	52	186
				Right	CCACCATGTGCTCATGAAGAT		
	4	BM 140	(GA)30	Left	TGCACAACACACATTTAGTGAC	55	190
				Right	CCTACCAAGATTGATTTATGGG		
	5	BM 154	(CT)17	Left	TCTTGCGACCGAGCTTCTCC	50	218
				Right	CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG		
L 1 -	6	BM 160	(GA)15(GAA)5	Left	CGTGCTTGGCGAATAGCTTTG	52	211
				Right	CGCGGTTCTGATCGTGACTTC		
C O R 4 3 0 0	7	BM 139	(CT)25	Left	TTAGCAATACCGCCATGAGAG	50	115
				Right	ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC		
	8	BM 164	(CT)17	Left	CCACCACAAGGAGAAGCAAC	52	182
				Right	ACCATTTCAGGCCGATACTCC		
	9	BM 183	(TC)14	Left	CTCAAATCTATTCACTGGTCAGC	52	149
				Right	TCTTACAGGCTTGCAGACATC		
	10	BM 181	(CT)17	Left	ATGCTGCGAGTTAATGATCG	50	192
				Right	TGAGGAGCAAACAGATGAGG		