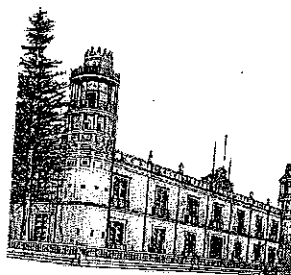


Universidad Autónoma Chapingo

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

13

USO DE LOS MARCADORES GENÉTICO MOLECULARES EN LA
SELECCIÓN DE VARIEDADES DE FRIJOL RESISTENTES A
Fusarium oxysporum (SCHLECHT.) SNYDER Y HANSEN f.sp.
phaseoli KENDRICK Y SNYDER



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL

P R E S E N T A:

José Cruz Jiménez Galindo

Chapingo, Estado de México
Abril del 2005



**USO DE LOS MARCADORES GENÉTICO MOLECULARES EN LA SELECCIÓN
DE VARIEDADES DE FRIJOL RESISTENTES A *Fusarium oxysporum*
(SCHLECHT.) SNYDER Y HANSEN f.sp. *phaseoli* KENDRICK Y SNYDER**

Tesis realizada por José Cruz Jiménez Galindo bajo la dirección del comité indicado,
aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

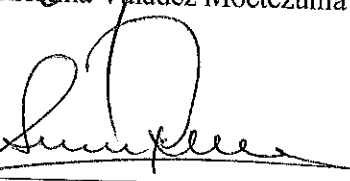
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Directora:



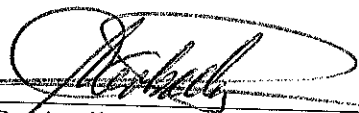
Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

Asesora:



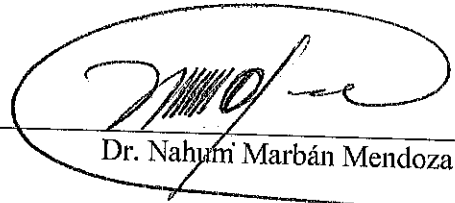
Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

Asesor:



Dr. Aquiles Carballo Carballo

Asesor:



Dr. Nahum Marbán Mendoza

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente a la Maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola por su excelente formación académica.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por su constancia y excelente dirección del presente trabajo en general, pero especialmente en la parte de biología molecular.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por su excelente corrección y sugerencias respecto al trabajo de investigación realizado en la parte de fitopatología.

Al Dr. Nahum Marban Mendoza por sus sugerencias y excelente amistad brindada.

Al Dr. Aquiles Carballo Carballo por sus sugerencias y correcciones sobre la parte de genética.

DEDICATORIA

A Dios por darnos una nueva oportunidad de existir.

A mis abuelitos: Juanita Valenzuela †, Ricardo Galindo †, Guadalupe Ibarra, Francisco Jiménez †. En especial a mi abuelita Guadalupe Ibarra y Sr. Asunción Benavente.

A mis padres: Graciela Galindo Valenzuela y José Cruz Jiménez Ibarra.

A mis hermanos: Patricia Jiménez, Yesenia Jiménez, América Jiménez, Francisco Jiménez, Gastón Jiménez y Marcos Jiménez.

Muy en especial a mi esposa: Cecilia Vega Mayen por su excelente amistad, respeto, confianza y cariño.

A mis amigos: Juan Manuel Bravo García y Raul Canales Escobedo.

A mis compañeros de Maestría: Hilda Garnica Tapia, Georgina Margarita Beltran Rios y Luis Manuel Espinoza Mendoza.

A mis compañeros de Licenciatura: Monica Yolanda Santiago Rafael, Telesforo Mancillas Navarro, Juan Manuel Martinez, Jaime Elíberio Hernández e Israel Angeles Estrada.

DATOS BIOGRAFICOS DEL AUTOR

José Cruz Jiménez Galindo nació el 24 de Octubre de 1977, en Emiliano Zapata, Cuencamé, Durango.

En 1993, ingresó a la Preparatoria de la Universidad Autónoma Chapingo egresando de la misma en 1996.

En 1997, ingresó a la licenciatura de la carrera de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo, de donde egresa obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas Agrícolas de Zonas Áridas en el año 2001.

De agosto del 2001 a julio de 2003, cursó la Maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

ÍNDICE

Índice.....	i
Índice de cuadros.....	iv
Índice de figuras.....	v
Resumen y abstract.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos particulares	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 Características generales del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	4
3.1.1 Antecedentes.....	4
3.1.2 Importancia internacional	4
3.1.3 Importancia nacional	5
3.1.4 Clasificación taxonómica	7
3.1.5 Diversidad genética	7
3.1.6 Características botánicas	8
3.1.7 Desarrollo y crecimiento	9
3.1.7.1 Hábitos de crecimiento.....	9
3.1.7.2 Ciclo Biológico	10
3.1.8 Valor nutritivo	10
3.1.9 Requerimientos climáticos y edáficos	10
3.2 Principales enfermedades que afectan el cultivo del frijol.....	10
3.2.1 Características del género <i>Fusarium</i>	10
3.2.1.1 Pudriciones de raíz causadas por <i>Fop</i> en frijol	10
3.2.1.2 Importancia de <i>Fusarium</i> como hongo fitopatógeno	11
3.2.1.3 Clasificación taxonómica y características morfológicas de <i>Fusarium</i>	12
3.2.1.4 Descripción del género <i>Fusarium</i>	13
3.2.1.5 Ciclo de vida de <i>Fop</i> y <i>F. solani</i>	14
3.2.1.5.1 Germinación	14
3.2.1.5.2 Desarrollo y penetración	14
3.2.1.5.3 Invasión y colonización.....	15
3.2.1.5.4 Sintomatología.....	16
3.2.1.5.5 Diseminación	17
3.2.1.5.6 Control	17
3.2.1.5.6.1 Practicas culturales	17

3.2.1.5.6.2 Control químico	18
3.2.1.5.6.3 Resistencia genética	18
3.2.1.5.7 Manejo de enfermedades del frijol.....	19
3.2.1.5.8 Uso de variedades resistentes.....	19
3.2.2 Definición de resistencia	19
3.2.2.1 Resistencia de plantas no hospedantes	20
3.2.2.2 Resistencia verdadera.....	20
3.2.2.2.1 Resistencia horizontal.....	20
3.2.2.2.2 Resistencia vertical	20
3.2.2.2.3 Resistencia aparente	21
3.2.2.2.3.1 Escape a la enfermedad.....	21
3.2.2.2.3.2 Resistencia moderada a la enfermedad	21
3.3 Estudios a nivel molecular	21
3.3.1 PCR y síntesis de DNA	22
3.3.2 Componentes de la PCR.....	22
3.3.3 Marcadores basados en la PCR	23
3.3.4 Amplificación Aleatoria de Marcadores del DNA Polimórfico (RAPD)	23
3.3.5 Amplificación de huellas del DNA con la Técnica DAF	24
3.4 Uso de los marcadores moleculares en frijol.....	25
3.4.1 Búsqueda de marcadores para características agronómicas en frijol	26
3.4.2 Búsqueda de marcadores para resistencia a enfermedades en frijol.....	27
3.4.3 El uso de los marcadores genético moleculares en la búsqueda de resistencia en frijol para <i>Fop</i> f. <i>sp. phaseoli</i>	31
4. MATERIALES Y METODOS.....	33
La metodología utilizada en la presente investigación se realizó en tres fases.....	33
4.1 Fase 1.....	33
4.1.1 Progenitores de frijol y cruas realizadas	33
4.1.1.1 Pinto americano.....	33
4.1.1.2 Bayo blanco.....	34
4.1.1.3 Tepary	34
4.1.1.4 Cruas realizadas.....	35
4.2 Fase 2 Colecta del patógeno e identificación morfológica.....	36
4.2.1 Colecta del patógeno y aislamiento	36
4.2.2 Identificación morfológica	36
4.3 Fase 3.....	37
4.3.1 Análisis moleculares.....	37
4.3.2 Extracción de DNA	37
4.3.3 Estimación de la cantidad y calidad del DNA.....	38

4.3.4 Selección de iniciadores	39
4.3.5 Estandarización de las condiciones de reacción de DAF-PCR.	40
4.3.6 Aplicación de la técnica DAF-PCR.....	41
4.3.7 Separación de productos amplificados con la técnica DAF-PCR	42
4.3.8 Precauciones para trabajar acrilamida y bromuro de etidio	45
4.3.9 Análisis estadístico de bandas	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Fase 1.....	46
5.1.1 Progenitores de frijol y cruas realizadas	46
5.2 Fase 2. Colecta del patógeno e identificación morfológica.....	46
5.2.1 Colecta y aislamiento del patógeno	46
5.2.1.1 Identificación morfológica	47
5.3 Fase 3 Análisis moleculares.....	48
5.3.1 Selección de iniciadores	48
5.3.2 Estandarización de las condiciones de reacción para DAF en DNA de frijol ..	48
5.3.2.1 Estandarización de DNA.....	48
5.3.2.2 Estandarización de $MgCl_2$	49
5.3.2.3 Estandarización de <i>Taq</i> DNA polimerasa	50
5.3.3 Análisis con la técnica DAF-PCR	51
5.3.3.1 Evaluación de la variabilidad genómica de progenitores.....	51
5.3.3.1.1 Gel de calidad	51
5.3.3.1.2 Análisis genómico.....	51
5.3.3.2 Análisis genómico de la progenie F1	52
5.3.3.2.1 Gel de calidad	52
5.3.3.2.2 Análisis genómico.....	53
5.3.3.3 Análisis genómico de plantas susceptibles y plantas resistentes a <i>Fop</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	55
5.3.3.3.1 Gel de calidad	55
5.3.3.3.2 Análisis genómico.....	56
6. DISCUSIÓN.....	62
7. CONCLUSIONES.....	64
8. LITERATURA CITADA	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Superficie, producción y rendimiento de frijol para consumo en los principales países productores en el periodo 1993-1995.	5
Cuadro 2	Superficie sembrada, cosechada y rendimiento de frijol en México durante el periodo 1990-2003.	7
Cuadro 3	Hábitos de crecimiento del frijol de acuerdo al CIAT.	9
Cuadro 4	Genes para caracteres de importancia en el frijol y marcadores asociados.	26
Cuadro 5	Secuencia de bases de los iniciadores evaluados para el establecimiento de la técnica DAF.	40
Cuadro 6	Programa de amplificación utilizado en la técnica DAF.	41
Cuadro 7	Relación de plantas de frijol seleccionadas para el análisis de huellas de DNA de plantas resistentes o susceptibles a <i>Fop</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	42
Cuadro 8	Mezcla utilizada para la preparación de los geles de acrilamida.	44
Cuadro 9	Polimorfismos y pesos moleculares indicando susceptibilidad o resistencia a <i>Fop</i> .	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Muestra de semilla de los progenitores Bayo blanco, Tepary y Pinto americano en orden respectivo	46
Figura 2	Raíces de plantas de frijol común con síntomas de <i>Fop</i> f. sp. <i>phaseoli</i> colectadas en el campo INIFAP-CEVAMEX	47
Figura 3	Crecimiento sobre PDA de <i>Fop</i> f. sp. <i>phaseoli</i> obtenido de raíces de plantas de frijol común con síntomas de Fusariosis	47
Figura 4	Estructuras propagativas micro y macroconidios de <i>Fop</i> f. sp. <i>phaseoli</i> observadas en microscopio compuesto (40X)	48
Figura 5	Huellas de DNA tipo DAF de la variedad Bayo obtenidas con 20 iniciadores de la serie A de ROTH.	48
Figura 6	Huellas de DNA tipo DAF en gel de agarosa al 1.2% con diferentes concentraciones de DNA (0, 10, 15, 20, 30 y 40 ng por reacción) de la variedad Bayo y los iniciadores A-03 y A-16 de ROTH.	49
Figura 7	Huellas de DNA tipo DAF en gel de agarosa 1.2% con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1, 2, 3, 4 y 5 mM) con los iniciadores A-03 y A-16.	49
Figura 8	Huellas de DNA tipo DAF en gel de agarosa al 1.2% con 25 ng de DNA de la variedad Bayo con el iniciador A-16, dos concentraciones de $MgCl_2$ (1 y 2 mM) y 0.5, 1.0 y 1.5 U. de enzima.	50
Figura 9	DNA de alto peso molecular en gel de agarosa al 0.8% para variabilidad, de 10 plantas representantes de los progenitores.	51
Figura 10	Perfiles de DNA tipo DAF en gel de agarosa 1.2% para variabilidad, de 10 plantas de las variedades Tepary, Bayo y Pinto obtenidas con los iniciadores A-01 y A-04 de la serie ROTH.	52
Figura 11	DNA de alto peso molecular en gel de agarosa al 0.8% para el análisis de progenitores y plantas F1. Tepary (T) (carril 1), Bayo	

	(B) (carril 2), Pinto (P) (carril 3), T♀ x P♂ (a) (carril 4), T♀ x P♂ (b) (carril 5), P♀ x B♂ (a) (carril 6) y P♀ x B♂ (b) (carril 7).	53
Figura 12	Huellas de DNA tipo DAF en gel de acrilamida 5% de progenitores y plantas F1 con los iniciadores A-01, A-04 y A-13. Tepary (T) (carril 1), Bayo (B) (carril 2), Pinto (P) (carril 3), T♀ x P♂ (a) (carril 4), T♀ x P♂ (b) (carril 5), P♀ x B♂ (a) (carril 6) y P♀ x B♂ (b) (carril 7).	54
Figura 13	Relación genómica de huellas tipo DAF de progenitores y plantas F1, con los iniciadores A-01, A-04 y A-13. Tepary (T), Bayo (B), Pinto (P), T♀ x P♂ (a), T♀ x P♂ (b), P♀ x B♂ (a) y P♀ x B♂ (b)	55
Figura 14	DNA de alto peso molecular en gel de agarosa 0.8% de plantas susceptibles y resistentes a <i>Fop</i> .	55
Figura 15	Huellas de DNA tipo DAF en gel de acrilamida 5% de plantas susceptibles y resistentes de progenitores y plantas F2 con los iniciadores A-01, A-04 y A-13.	57
Figura 16	Relación genómica de huellas tipo DAF de plantas susceptibles y resistentes de progenitores y plantas F2 con los iniciadores A-01, A-04 y A-13.	59

USO DE LOS MARCADORES GENÉTICO MOLECULARES EN LA SELECCIÓN DE
VARIEDADES DE FRIJOL RESISTENTES A *Fusarium oxysporum* (SCHLECHT.) SNYDER Y
HANSEN f. sp. *phaseoli* KENDRICK Y SNYDER

GENETIC USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE SELECTION OF BEAN VARIETIES
RESISTANT TO *Fusarium oxysporum* (SCHLECHT.) SNYDER AND HANSEN f. sp. *phaseoli*
KENDRICK AND SNYDER

M. C. José Cruz Jiménez Galindo¹

Dra. Ernestina Valadez Moctezuma²

Resumen

Con base a la relación que algunos marcadores presentan con caracteres fenotípicos de interés, el presente trabajo tuvo como objetivo buscar marcadores de DNA asociados a resistencia o susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) en frijol.

Se realizaron cruzamientos de frijol, común bayo blanco (*Phaseolus vulgaris* L.) y tepary (*Paseolus acutifolius* Asa Gray) con pinto americano, que presentan fenotipos contrastantes de resistencia y susceptibilidad a *Fop*. Tanto los progenitores como las progenies F1 y F2 expuestos al ataque de *Fop* fueron analizados con la técnica DAF-PCR. Los productos de PCR se separaron en geles de acrilamida 5% y los genotipos bajo estudio se compararon en función de los polimorfismos que exhibieron.

La comparación de las huellas de DNA permitió detectar polimorfismos nuevos y compartidos en la progenie F1, indicando el éxito de las cruza realizadas. Respecto al análisis tanto de los progenitores y progenies F1 y F2 expuestos al ataque de *Fop*, se detectaron bandas polimórficas de DNA asociadas a resistencia y susceptibilidad al hongo fitopatógeno. Este último tipo de resultados concuerda con lo que señalan Micheltore *et. al.* (1991), quienes mencionan que una población F2 provee mayor amplitud genética que una población derivada de un retrocruce. También los resultados están de acuerdo con Beebe y Pedraza (1998), quienes señalan al frijol como un cultivo tractivo para marcar genes de resistencia ya que exhiben bastante polimorfismo para estudios de DNA.

Palabras clave: Marcadores moleculares, Frijol, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Abstract

Based on the relation that some markers have with phenotypic characters of interest, the present research has as its objective the search for DNA markers associated with resistance or susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) in beans.

Crossbreeding was carried out between different varieties of beans. The common white bayo (*Phaseolus vulgaris* L.) and tepary (*Paseolus acutifolius* Asa Gray) were crossed with the American pinto, which present contrasting phenotypes of resistance and susceptibility to *Fop*. Both, progenitors and F1 and F2 offspring exposed to *Fop*'s attack were analyzed with DAF-PCR technology. PCR products were separated in 5 % acrylamide gels and the genotypes studied were compared depending on the polymorphisms exhibited

Comparison of DNA traces made it possible to detect new and shared polymorphisms in F1 offspring, indicating the success of the crossbreeding carried out. The analysis showed that bands associated with resistance and susceptibility to pathogenic fungi were detected in progenitors and F1 and F2 offspring exposed to *Fop*'s attack.

These results agree with Micheltore *et. al.* (1991), who mentions that an F2 population provides more genetic range than a population derived from backcrossing. Results also agree with Beebe and Pedraza (1998), who indicate beans as an attractive crop to mark gene resistance since they exhibit enough polymorphism for DNA research.

Key Words: Molecular markers, Beans, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

¹ Tesista

² Director de tesis

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común *Phaseolus vulgaris* L. es la leguminosa de grano más importante utilizado para consumo humano en el mundo. Su cultivo está extendido en todos los continentes especialmente en América Latina y el Caribe bajo un amplio rango de ambientes y sistemas de producción (Lepiz, 2000).

El rendimiento promedio de frijol obtenido en el país durante el periodo 1990-2003, fue de 638.28 kg·ha⁻¹ (SAGARPA, 2004), cifra que se ve afectada al igual que la producción por factores de diversa índole como son: la precipitación, temperaturas extremas y enfermedades (Muñoz, *et al.* 1995).

Para el desarrollo de variedades resistentes de frijol a patógenos a través de mejoramiento genético, se requiere del conocimiento de la etiología, epidemiología y sintomatología de las enfermedades, la variabilidad patogénica y distribución de los agentes causales, la herencia de la resistencia de los genes involucrados y las fuentes de resistencia (Lepiz, 2000).

Una enfermedad vascular del frijol común descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1929 (Harter, 1929), fue conocida como amarillamiento del frijol causado por el hongo *Fusarium oxysporum* (Schecht.) (*Fop*) f. sp. *phaseoli* Kendrick y Snyder (Kendrick y Snyder, 1942; Armstrong y Armstrong, 1963).

Esta enfermedad no ha alcanzado aparentemente una significancia económica en los Estados Unidos. Sin embargo, en Brasil el amarillamiento por *Fusarium* está reconocido como una enfermedad importante, especialmente en áreas del sudeste (Cruz *et al.*, 1974). Las formas especiales de *Fop* no son morfológicamente distinguibles y la subdivisión subespecífica está usualmente basada sobre reacciones patogénicas o fisiológicas de las razas en plantas diferenciales (Snyder y Hansen, 1940), o por la determinación de grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) (Puhalla, 1985).

La desventaja de estas técnicas es que se llevan mucho tiempo y trabajo, y están sujetas a la variación del medio ambiente o condiciones de crecimiento del cultivo durante los experimentos. En teoría, las técnicas de biología molecular tales como RFLPs y la PCR con sus diferentes métodos superan todas estas limitaciones y proveen información adicional para la caracterización del hongo (Ouellett y Seifert, 1993; Williams *et al.*, 1990).

Los marcadores moleculares ofrecen nuevas oportunidades para incrementar la resistencia a enfermedades. La piramidación de genes de resistencia en un cultivar como una estrategia para la obtención de resistencia durable, puede ser facilitado por la selección asistida por marcadores (MAS) (Geffroy *et al.*, 1997).

En regiones templadas, las especies de *Fusarium*, incluyendo *F. culmorum* (que parasita generalmente raíces de cereales en regiones templadas), *F. graminearum* Schwabe (teleomorfo *Giberella zeae*) Petch, y *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. (teleomorfo *G. avenaceae* R. S. Cooke), son los patógenos más abundantes y agresivos en diferentes cultivos de importancia alimenticia (Nelson *et al.*, 1981).

Por otra parte, es de suma importancia satisfacer la creciente demanda de alimentos y otros productos agrícolas; ya que se ha estimado que para el año 2025, la cifra de habitantes en el mundo será de 8,500 millones respecto a 5,500 millones en 1993; y de estos, el 83 % vivirá en los países en desarrollo (Centro para Nuestro Futuro Común, 1993).

Con base a la problemática planteada, además de la desventaja que presenta la producción de frijol en México, comparada por ejemplo con la de Estados Unidos; en esta investigación se estableció el inicio de la búsqueda de marcadores genéticos en frijol común asociados con resistencia y/o susceptibilidad a *Fop*, lo que involucró la selección de tres variedades de frijol con diferentes niveles de resistencia al patógeno, el establecimiento de cruza dirigidas, la evaluación de la resistencia/susceptibilidad de los progenitores y de la progenie F2; así como la tipificación con huellas de DNA de los genotipos de frijol contrastantes, lo que marca el principio en la búsqueda de marcadores asociados a algún carácter de resistencia y/o susceptibilidad.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Tipificar con huellas de DNA el genoma de progenitores de plantas de frijol común resistentes y susceptibles a *Fop* f. sp. *phaseoli* así como de la progenie F1 y F2 de cruas específicas.

2.2 Objetivos particulares

1. Realizar cruas específicas entre variedades de frijol tolerantes y susceptibles a *Fop* f. sp. *phaseoli*.
2. Evaluar mediante pruebas de patogenicidad a los progenitores así como a las plántulas F2 de las cruas realizadas.
3. Caracterizar el genoma de los progenitores y de las progenies respectivas F1 y F2 utilizando la técnica DAF-PCR.
4. Intentar asociar algún marcador genético-molecular a las características de resistencia y/o susceptibilidad a *Fop* f. sp. *phaseoli*.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Características generales del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

3.1.1 Antecedentes

El frijol común es originario de la zona comprendida entre México y Guatemala del continente Americano, siendo nuestro país el centro de diversificación primario (Ortubé *et al.*, 1996). Los restos más antiguos de esta leguminosa ya domesticada tienen una antigüedad aproximada de cinco mil años y fueron localizados en Coxcatlán, Puebla (SAGAR, 1998).

En la época prehispánica, el maíz y otros cultivos incluyéndose al frijol, fueron base en la dieta de aquellos pueblos, quienes domesticaron y cultivaron frijoles de diferentes tamaños, colores y características (Ortiz, 1998; Ortubé *et al.*, 1996).

Hay informes de que en esa época la siembra se efectuaba bajo condiciones de temporal en la mayoría de los pueblos indígenas. En el centro de México se realizaba bajo condiciones de riego en las chinampas o en terrazas, utilizando como abono cenizas o lodo con materia orgánica, modalidad que cambió después de la conquista, donde las tierras de riego se destinaron al cultivo del trigo y las de temporal se dejaron para el frijol y el maíz (SAGAR, 1998).

3.1.2 Importancia internacional

El frijol tiene un diferente valor socioeconómico para cada país. En algunos países como México, Brasil e India, es básico en la alimentación, y en otros como Estados Unidos su importancia radica en la generación de divisas (Ortiz, 1998). El frijol tiene una amplia demanda en poblaciones de América Latina, China, Asia y Sur de Estados Unidos.

Los principales países productores de esta leguminosa a nivel mundial son: India, Brasil, China, México y Estados Unidos, que en su conjunto cosecharon una superficie equivalente al 70.9 % del total mundial en el periodo 93-95, siendo la India el principal productor. Aunque la India aportó para ese periodo el 23.92 % de la producción total mundial, Brasil el 16.6 %, China el 10.95 %, México el 7.5 % y Estados Unidos el 7.1%; los mejores rendimientos los obtuvo Estados Unidos con 1705 kg·ha⁻¹, superando la media mundial de 659 kg·ha⁻¹; mientras que la India mostró los rendimientos mas bajos,

de 423 kg·ha⁻¹. Nuestro país por su parte ocupó el tercer lugar en rendimientos con 655 kg·ha⁻¹ (Cuadro 1).

El hecho de que la India tenga rendimientos tan bajos trae como consecuencia que deba importar frijol para satisfacer su demanda. Por su parte México y Brasil son los principales productores en América Latina con 1.2 y 2.8 millones de ton·año⁻¹; sin embargo, sus rendimientos se consideran bajos, 655 y 660 kg·ha⁻¹ respectivamente, destinando el total de su producción al autoconsumo; mientras que China se coloca como el principal exportador del mundo, teniendo como destino de la producción a Asia del Sur. En nuestro continente el mayor exportador es Estados Unidos y sus importadores son Inglaterra, Japón y principalmente México, que en 1990 importó 330,000 toneladas y en 1997 importó 54,915 toneladas (Ortiz, 1998).

Cuadro 1. Superficie, producción y rendimiento de frijol para consumo en los principales países productores en el periodo 1993-1995.

País	Superficie cosechada (miles de ha)	Producción (miles de ton)	Rendimiento (kg·ha ⁻¹)
India	9,865	4,176	423
Brasil	4,772	2,897	607
China	1,406	1,911	1,359
México	2,000	1,310	655
E. U. A.	723	1,232	1,705
Otros	7,716	5,936	
Total	26,482	17,461	(mundial) 659

Fuente: FAO, citado por Ortiz, 1998.

3.1.3 Importancia nacional

En México el frijol es muy importante, pues constituye un alimento básico para un alto porcentaje de la población y en muchos casos es una de las pocas fuentes de proteínas, su consumo es tal que durante el periodo 1990-1997 fue de 14.5 kg·persona⁻¹ (Ortiz, 1998). Las principales variedades comerciales de frijol que se consumen son: Flor de Mayo, Flor de Junio, Azufrado, Pinto, Bayo y Negro (Acosta y Rosales, 1998).

El cultivo de esta leguminosa está distribuido por todo el país, ocupando grandes superficies de siembra; situación que además del aporte alimenticio que tiene, lo coloca como el segundo cultivo más importante de México (SAGARPA, 2004).

La superficie nacional destinada para siembra en el periodo 1990-2003 fue de 2'167,907.8 hectáreas, siendo los principales productores los estados de Zacatecas (30.1 % de la producción nacional), Durango (10.7 %), Chihuahua (6.8 %), San Luis Potosí (3.9 %) y Guanajuato (4.4 %), que en su conjunto aportaron el 55.9 % de la producción total nacional (SAGARPA, 2004). La producción nacional es netamente temporalera y eso se constata al observar que de las 2'167,907.8 hectáreas sembradas en el periodo 90-03, el 84.6 % corresponden a la producción de temporal y el resto, 15.4 % es de riego. Así que de 1'170,572.5 toneladas totales, 380,045.4 fueron de riego y 790,526.4 de temporal, destacando Zacatecas con la mayor producción en temporal con 274,446 toneladas, que representó el 23.44 % de la producción total y en riego, Sinaloa con 138,585 toneladas. La superficie cosechada para el mismo periodo fue de 1'828,185.63 hectáreas, 339,717 menos de las que se sembraron; esto debido a múltiples factores como la presencia de plagas, periodos de sequía, inundaciones, enfermedades, lluvias, etc., que afectaron a las diversas entidades productoras, su impacto depende de la variedad de frijol de que se trate (SAGARPA, 2004; Muñoz *et al.*, 1995). El rendimiento promedio del periodo 1990-2003 fue de 638.28 kg·ha⁻¹ (Cuadro 2). El rendimiento del frijol al igual que la producción, están influenciados por una gran cantidad de factores entre los que se encuentran la precipitación y la evaporación, que en su conjunto determinan el 80 % del rendimiento (Ortiz, 1998).

Cuadro 2. Superficie sembrada, cosechada y rendimiento de frijol en México durante el periodo 1990-2003.

Años	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada(ha)	Rendimiento (kg·ha ⁻¹)
1990	2'271,620	2'094,017	615.0
1991	2'198,857	1'988,981	693.0
1992	1'860,880	1'295,588	555.0
1993	2'151,020	1'873,862	687.0
1994	2'385,562	2'086,687	654.0
1995	2'353,750	2'040,447	623.0
1996	2'195,839.7	2'048,397.7	659.0
1997	2'319,561.0	1'615,057.0	600.0
1998	2'376,317.7	2'146,472.10	590.0
1999	2'401,364.11	1'705,456.71	620.0
2000	2'098,802.74	1'482,215.39	590.0
2001	1'881,335.28	1'640,125.98	620.0
2002	2'027,401.79	1'862,767.48	710.0
2003	1'828,397.37	1'714,524.41	720.0
Promedio	2'167,907.8	1'828,185.626	638.28

Fuente: SAGARPA. Centro de estadística Agropecuaria. 2004. Serie Histórica de superficie sembrada, cosechada y rendimiento de los principales cultivos. México.

3.1.4 Clasificación taxonómica

El frijol común está clasificado taxonómicamente de la siguiente forma (CIAT, 1985).

Reino	Plantae
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotiledónea
Orden	Rosales
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Papilionoideae
Tribu	Phaseolae
Subtribu	Phaseolinae
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

3.1.5 Diversidad genética

El género *Phaseolus* cuenta con 52 especies debidamente identificadas y probablemente algunas más por definir. Únicamente cinco son domesticadas: *P. vulgaris* (la más importante), *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus* y *P. polyanthus*.

Dentro del género *Phaseolus* existen diferentes grupos naturales o acervos genéticos, principalmente tomando en cuenta su compatibilidad hibridológica. El acervo primario, de cruces e intercambio de genes sin ninguna barrera genética, lo forman *P. vulgaris*

cultivado y *P. vulgaris* silvestre. El acervo genético secundario incluye a *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. costaricensis* y *P. polyanthus*; las cruas de *P. vulgaris* con estas especies se realizan con relativa facilidad y no hay necesidad de utilizar el rescate de embriones. Miembros del acervo terciario, son *P. vulgaris*, *P. acutifolius*, *P. parvifolius*, entre otros; siempre se requiere rescate de embriones para desarrollar las plantas F1 y los híbridos iniciales son machos estériles (Gepts y Debouck, 1991).

3.1.6 Características botánicas

El frijol es una planta C3 que fija el CO₂ y lo reduce directamente en el ciclo de Calvin; es principalmente autógama, aunque también llega a presentar polinización cruzada; su emergencia es epigea, es decir, que los cotiledones están sobre el suelo (Escalante y Kohashi, 1993). Presenta un fotoperiodo de día corto, ya que días largos retardan la floración.

Tiene una raíz típica y ligeramente fibrosa, con presencia de nódulos bacterianos (*Rhizobium phaseoli*), que realizan la fijación del nitrógeno atmosférico.

Su tallo funciona como el eje central de la planta, puede ser corto y robusto, o de guía y voluble con pubescencias cortas y rígidas, está formado por una sucesión de nudos y entrenudos.

Presenta dos tipos de hojas: simples y compuestas. Las simples o cotiledonares sólo están presentes en las primeras etapas de desarrollo de la planta, las compuestas están conformadas por tres folíolos (trifoliados) de diversos tamaños, alternos, peciolados y con nervadura reticulada.

Sus flores, hermafroditas con forma amariposada, presentan varios colores que por lo general son blanco o lila y están agrupadas en racimos (Ortiz, 1998; Ortubé *et. al.*, 1996).

El fruto es una vaina cilíndrica de tamaño variable, formada por dos carpelos carnosos y dehiscentes que contienen de cinco a seis semillas.

Las semillas de forma arriñonada, también de diferentes tamaños presentan una amplia gama de colores: blancos, amarillos, crema, rosa, rojos, negros, pintos, entre otros. Pueden ser planos o bolas de superficie opaca o brillante (Escalante y Kohashi, 1993).

3.1.7 Desarrollo y crecimiento

3.1.7.1 Hábitos de crecimiento

Para clasificar a estas plantas de acuerdo a su hábito de crecimiento se consideran diversas características como: el tipo de desarrollo de la parte terminal del tallo, el número de nudos, la longitud de los entrenudos, la altura de la planta, la aptitud para trepar, el grado y tipo de ramificación.

En plantas de frijol se observan dos hábitos de crecimiento: determinado e indeterminado (Cuadro 3). Las plantas de hábito determinado también denominadas de mata, se caracterizan por ser arbustivas y presentar racimos florales axilares en la etapa de floración y un racimo terminal en el tallo principal y en las ramificaciones. En las plantas de hábito de crecimiento indeterminado, los racimos son únicamente axilares; en este hábito se pueden encontrar dos modalidades: 1) el tallo principal y las ramas crecen en forma limitada y dan la apariencia de tipo mata o arbusto, 2) el tallo principal y las ramas tienen la capacidad de trepar sobre un soporte, en este último se distinguen las variedades de media guía, guía larga y trepadora (CIAT, 1987).

Cuadro 3. Hábitos de crecimiento del frijol de acuerdo al CIAT

Tipo	Hábito de crecimiento	Descripción
I	Determinado arbustivo	Ia- Tallo y ramas fuertes y erectas Ib- Tallo y ramas débiles
II	Indeterminado, arbustivo: tallos y ramas erectas	IIa- Tallo erecto sin guías IIb- Tallo erecto con pequeñas guías
III	Indeterminado arbustivo: (con tallos y ramas débiles, de consistencia rastreros)	IIIa- Guías cortas sin habilidad de trepar IIIb- Guías largas con habilidad para trepar
IV	Voluble (con tallos y ramas débiles, largos y torcidos)	Su tallo desarrolla doble capacidad de torsión, favoreciendo su habilidad trepadora; es el tipo que se utiliza en asociación maíz-frijol

Fuente: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987.

En las variedades de hábito determinado, la floración se presenta de la parte superior del tallo o de las ramas hacia abajo y en las de hábito indeterminado, de abajo hacia arriba.

3.1.7.2 Ciclo Biológico

De acuerdo a la duración de su ciclo biológico el frijol se puede dividir en: variedades precoces con duración de 100 días a madurez; intermedias de 100 a 115 días y tardío con más de 115 días (Acosta *et al.*, 1998).

3.1.8 Valor nutritivo

El grano de frijol seco es 100 % comestible y contiene 8.0 % de proteínas y carbohidratos (Ortiz, 1998); además está compuesto por 4.30 g de fibra, 1.80 g de grasas y 7.90 % de humedad por cada 100 g de alimento crudo en peso neto; adicionalmente aporta diversos minerales y vitaminas. Los valores varían de acuerdo al tipo de frijol de que se trate (Flor de Mayo, Negro, Azufrado, Blanco) (Muñoz *et al.*, 1996).

3.1.9 Requerimientos climáticos y edáficos

Clima: a esta leguminosa se le encuentra tanto en regiones templadas como tropicales, para su desarrollo requiere de precipitaciones equivalentes a 1000 y 1500 mm anuales en promedio. No resiste heladas ni lluvias excesivas.

Suelo: se cultiva en suelos de franco-limosos a ligeramente arenosos, tolerando también suelos franco-arcillosos (SAGAR, 1998). Según Ortiz (1998) el cultivo requiere de una temperatura de 15-27 °C y una precipitación en temporal de 300 a 500 mm. El pH del suelo más adecuado es de 5.5-7.0, aunque la SAGAR (1998) maneja un rango de 5.5-6.5.

3.2 Principales enfermedades que afectan el cultivo del frijol

3.2.1 Características del género *Fusarium*

3.2.1.1 Pudriciones de raíz causadas por *Fop* en frijol

En el frijol, generalmente se le ha dado mayor importancia a las enfermedades foliares que a las pudriciones de raíz debido básicamente a la rápida detección de los síntomas; sin embargo, las pudriciones de raíz también pueden retrasar y disminuir el desarrollo de las plantas, ocasionando además pérdidas en la producción (Keenan *et al.*, 1974 citado por Sánchez y Cárdenas, 1988; Schwarts y Gálvez, 1980). Dentro de los patógenos que

inducen este tipo de enfermedades se encuentran los hongos de los géneros *Fusarium* y *Rhizoctonia*.

Las pudriciones radiculares producidas por los patógenos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp. y *Fusarium solani* causan pérdidas en el rendimiento del frijol superiores al 50% (Sánchez, 1983). Este impacto es debido a la mortandad de las plantas que causan y a la reducción del potencial productivo de las plantas que subsisten.

Varios factores han sido relacionados con la magnitud del daño que producen estos hongos, como la temperatura y humedad del suelo (Van Bruggen *et al.*, 1986), estrés hídrico en la planta (Díaz y Teliz, 1991) y fertilización nitrogenada (Reyes y Mendoza, 1991), la calidad, estado físico y ausencia de compuestos fenólicos también juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Rodríguez, 1997).

3.2.1.2 Importancia de *Fusarium* como hongo fitopatógeno

La pudrición de raíz ocasionada por *F. solani* (Mart.) Appel and Wollenw., f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder y Hansen, es una de las más extendidas a nivel mundial, aunque básicamente se le encuentra en zonas templadas (Smith y Dunez, 1992). La severidad del daño que ocasiona depende de la ocurrencia de otros factores que afectan a la planta. En frijol, *Fop* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) y *F. solani* f. sp. *phaseoli*, están considerados como los principales patógenos que causan las pudriciones de raíz en América Central, América del Sur, África y otras áreas. En Nicaragua, Valles Altos de México, Venezuela, Noreste de Brasil y regiones andinas del Perú, se han presentado severos daños al cultivo y pérdidas económicas considerables, aunque desafortunadamente no existen datos cuantitativos de estas (Pastor-Corrales y Abawi, 1990).

F. solani f. sp. *phaseoli* es el responsable de la enfermedad conocida como pudrición seca de la raíz del frijol. En 1962, la entonces Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, señaló a *F. solani* como un problema de producción en los estados de Sinaloa, Tamaulipas, Durango, Jalisco, Veracruz, Guanajuato y Chiapas.

Se ha encontrado que *F. solani* está afectando en mayor proporción a cultivos como el frijol y la papa, ocasionando una pudrición seca en raíz y tubérculos, respectivamente. Esta es una situación grave porque en general se observa que las pudriciones causadas por hongos son las mas generalizadas, en parte debido a que las poblaciones de los

hongos se han incrementado al ser favorecidas por múltiples factores, entre ellos la práctica del monocultivo (Romero, 1993).

La enfermedad que causa este patógeno (*Fop*) se conoce como “marchitamiento o amarillamiento por *Fusarium*” y se presenta como un problema crítico en zonas del país donde prevalecen temperaturas altas (20 a 28 °C) y períodos de sequía durante el ciclo del cultivo (SARH, 1992).

Este patógeno se encuentra dentro de los hongos que causan pudriciones de raíz, su distribución es muy amplia y el número de hospedantes también. La marchitez es un síntoma típico de las plantas afectadas por la enfermedad, donde los restos de vegetales infectados son la principal fuente de inóculo. Dentro de las diez especies que afectan el cultivo, sin duda alguna la más perjudicial es *Fop* pues entre sus hospedantes figuran cultivos con alto valor económico como: jitomate (*Lycopersicum esculentum*), papa (*Solanum tuberosum*), chícharo (*Pisum sativum*), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), cebolla (*Allium cepa*), col (*Brasica oleraceae*), melón (*Cucumis melo*), sandía (*Citrillus vulgaris*), plátano (*Musa spp.*), café (*Coffea arabica*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), algodón (*Gossypium spp.*), etc.

En muchos casos el hongo no ataca de manera individual, si no que lo hace con otros patógenos (Parry, 1990). Esto demuestra su capacidad para adaptarse a la interacción con otros organismos fitopatógenos para obtener un beneficio mutuo.

3.2.1.3 Clasificación taxonómica y características morfológicas de *Fusarium* (Kendrick, 2000).

Phyllum	Dikaryomicota
Subphyllum	Ascomicotina
Clase	Ascomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Nectria</i>
Especies	<i>F. oxysporum</i>

Las especies *oxysporum* y *solani*, cuentan con formas especiales (f. sp.), es decir formas que atacan a una especie vegetal en particular, y que en el caso de frijol se les ha denominado forma especial *phaseoli*.

3.2.1.4 Descripción del género *Fusarium*

Según la descripción que hace Link en 1915 (citado por Romero, 1993), *Fusarium* presenta conidióforos alargados en forma de botella, con ramas a intervalos regulares o verticiladas, septados, individuales o agrupados en esporodoquios; conidios de dos tipos: a) microconidios elípticos o piriformes, unicelulares o bicelulares, no curvados en cabezuelas o en cadenas, b) macroconidios falcados en forma de media luna o elípticos, de hasta nueve septas, ápice puntiagudo, romo o en forma de gotero, base puntiaguda o en forma de pie, c) clamidosporas si se producen, globosas, ovales o piriformes, individuales o en grupos, intercalares o terminales, uni o bicelulares, lisas o rugosas y generalmente de color café. No todas las especies se reproducen sexualmente, las que si lo hacen producen peritecios del tipo *Nectria*, *Hypomices*, *Gibberella* o *Calonectria* (Romero, 1993).

F. solani f. sp. *phaseoli* produce los dos tipos de esporas asexuales (macro y microconidios), además de estructuras de conservación (clamidosporas). Sus macroconidios tienen forma de "hoz" son multiseptados, gruesos, no puntiagudos, con pared gruesa, anchura máxima de 4.5-5.5 micras. Los microconidios son pequeños y elípticos producidos en conidioforos alargados y las clamidosporas son de redondas a ovales o piriformes con diámetro de 6-16 micras. Generalmente se producen de manera individual, pero también se les puede encontrar en pares o formando grandes masas. Las masas de esporas son de color crema amarilla, azul-verde o violeta (Schwartz y Morales, 1989).

Fop f. sp. *phaseoli* produce macroconidios finos, alargados, puntiagudos, de pared delgada, anchura máxima 3-4.5 micras y 25 a 35 micras de largo, de 3 a 5 septas, a menudo tienen una célula basal pedicelada, se forman al principio en fiálides individuales y luego en esporodoquios. Los microconidios siempre están presentes son oval elipsoides mono o bicelulares y se forman en fiálides cortas no ramificadas, nunca en cadena, pero agrupadas en falsos capítulos. Las clamidosporas son hialinas sin septos, solitarias o pueden estar en cadenas cortas (Smith y Dunez, 1992; SARH, 1992) y las masas de esporas son color rosa, púrpura o violeta. Hasta 1992 se conocían dos razas fisiológicas del patógeno (Abawi y Pastor-Corrales, 1990).

3.2.1.5 Ciclo de vida de *Fop* y *F. solani*

3.2.1.5.1 Germinación

Las clamidosporas y macroconidios actúan como inóculo primario. Las clamidosporas se forman cuando las condiciones no son favorables para el crecimiento activo del hongo; estas esporas requieren de nitrógeno, carbohidratos y una humedad relativa superior al 96 % (N.A.S., 1980). El micelio del hongo no crece a través del suelo; está limitada a los tejidos de los hospedantes. Blakeman y Williamson (1994) mencionan que la germinación de las clamidosporas de *F. solani* f. sp. *phaseoli* puede estimularse por diversos aminoácidos como asparagina, glutamina, glicina, entre otros, y por los azúcares glucosa, sacarosa y fructuosa tanto en el suelo como “*in vitro*”. El estímulo se da por exudados de raíces de plantas hospedantes o por contacto con residuos de material contaminado.

Los macroconidios están eventualmente atrapados entre las paredes de los vasos xilemáticos, aquí germinan y posteriormente penetran a las células produciendo microconidios (Schwartz y Morales, 1989).

Tanto las clamidosporas de *Fop* como de *F. solani* pueden persistir en forma inactiva durante varios años y germinar al disponer de nutrientes y de las condiciones adecuadas, como cuando se localizan en las partes jóvenes de las raíces.

3.2.1.5.2 Desarrollo y penetración

Con la germinación de las clamidosporas se inicia la elongación de las hifas, la penetración tiene lugar principalmente en la zona de elongación de la raíz, puede ser también a través del meristemo apical y de los pelos radicales, aunque esta vía no es muy común, también utilizan las heridas o ataques de otros organismos como los nematodos de los géneros *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. Las lesiones de las plantas son muy importantes para la infección inicial, ya que estas incrementan la ocurrencia de una infección exitosa. Los factores que favorecen su germinación y desarrollo son: la compactación del suelo, exceso de humedad, sequías que causen estrés a las plantas, altas densidades de población, daños por herbicidas, nitrógeno en su forma amoniacal, metabolitos tóxicos de los residuos de los cultivos y temperaturas del suelo favorables (SARH, 1992).

Según Campos (1991) el desarrollo de *F. solani* se puede producir a partir de los 22 °C, mientras que Smith y Dunez (1992) mencionan que los óptimos térmicos para su desarrollo son de 26-28 °C, favoreciéndose por déficit hídricos en el suelo. En el caso de *Fop*, el óptimo de temperatura para su desarrollo es de 20 °C (Schwartz y Morales, 1989).

3.2.1.5.3 Invasión y colonización

El patógeno invade el xilema de la planta, pues el fluido xilemático es un medio perfecto de desarrollo, ya que cuenta con pH de 5.0 en promedio.

Desde el punto de penetración, el hongo se extiende hacia arriba por los vasos xilemáticos mediante crecimiento micelial y formación de microconidios que se transportan en la corriente transpiratoria (Smith y Dunez, 1992). En el interior de su hospedante el hongo establece una relación parasítica y se forman estructuras de infección específicas como apresorios. Su desarrollo es acompañado por un incremento en su actividad metabólica que implica un rápido aumento en la síntesis de macromoléculas, parcialmente de RNA y proteínas (Sussan, 1992). La patogénesis está relacionada con el bloqueo de los vasos y con la formación de enzimas y toxinas.

Cuando la colonización se lleva a cabo en raíces jóvenes, el hongo se mueve intercelularmente o intracelularmente en los vasos del xilema en desarrollo y los invade antes de que logren su madurez (Marshall *et al.*, 1981).

En sus etapas iniciales el hongo generalmente es confinado a los elementos de los vasos del xilema, pero también puede invadir las células del parénquima xilemático, después el micelio en desarrollo y los conidios se expanden por la planta. Conforme la enfermedad avanza puede invadir tejidos adyacentes como el cambium y floema.

En grados más severos de infección, además de invadir los tejidos ya mencionados, los esporodoquios forman grandes cantidades de macroconidios sobre la superficie de las partes afectadas. Para sobrevivir en condiciones adversas producen clamidosporas; éstas regresan al suelo cuando la planta muere, persistiendo en los residuos de cosecha, para posteriormente reiniciar el ciclo (Marshall *et al.*, 1981).

3.2.1.5.4 Sintomatología

La aparición de síntomas ocurre después de que el patógeno se ha establecido en el interior de los tejidos del huésped, el marchitamiento que el hongo ocasiona en las porciones aéreas de la planta es un efecto subsecuente de la infección que logró invadir a la raíz (N.A.S., 1980). En *F. solani* f. sp. *phaseoli* los síntomas se observan en el hipocótilo y la raíz, inicialmente en forma de franjas o puntos alargados de color rojizo cuando la planta tiene de 8-15 días de nacida. A medida que la enfermedad avanza las lesiones se unen y se tornan de color marrón (SARH, 1992), extendiéndose hasta el cuello de la raíz sin una forma definida; las raicillas mueren por el ataque, pero permanecen adheridas a la planta. En las plantas atacadas se desarrollan raíces adventicias que les permiten continuar vivas e incluso producir grano, pero si las condiciones favorecen el desarrollo del hongo, éste puede llegar a matarlas (Campos, 1991). Por otro lado, la parte aérea tiene un crecimiento lento, presenta síntomas de marchitamiento, clorosis y una defoliación prematura. Cuando la raíz muere, el interior del tallo se hace hueco (Schwartz y Gálvez, 1980).

Fop ataca a la planta durante las etapas fenológicas V4, R5 y R6. Los síntomas de las plantas susceptibles atacadas aparecen a los 7-9 días después de la inoculación las hojas primarias muestran epinastia y áreas cloróticas blandas y húmedas en sus márgenes. La expresión de los síntomas progresan rápidamente y casi todas las hojas muestran epinastia, clorosis y pudriciones a los 14 días después de la inoculación. Y en ataques severos la planta afectada puede morir a los 21 días aproximadamente. Dichos síntomas consisten en una pudrición seca de la porción superior de la raíz pivotante y del cuello del tallo al nivel del suelo o justo por encima de éste; el tejido del tallo toma una coloración rojiza que puede oscurecerse gradualmente y necrosarse eventualmente (Smith y Dunez, 1992; Pastor-Corrales, 1987).

La severidad de la enfermedad es proporcional a la temperatura de incubación y a la densidad de inóculo, los síntomas aéreos iniciales aparecen en la hojas inferiores de la planta (hojas mas viejas), las cuales presentan amarillamiento y marchitamiento debido a la reducción de la absorción de agua por la raíz; posteriormente, las hojas jóvenes también presentan estas características, pero de manera más pronunciada. En las hojas infectadas también se pueden observar márgenes necróticos. La clorosis va cubriendo

progresivamente toda la planta. Las plantas severamente afectadas muestran marchitez permanente y defoliación prematura (SARH, 1992; Abawi y Pastor-Corrales, 1990).

Las masas de esporas rosadas que son típicas de esta forma especial de *Fusarium*, pueden hacerse visibles en el tallo. Es muy característica también la coloración vascular, evidente después de la aparición inicial de los síntomas foliares.

Cuando el frijol es sembrado por varios años consecutivos en un mismo terreno se incrementan las pudriciones causadas por hongos como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Thielaviopsis*, obteniéndose bajos rendimientos (N.A.S., 1980).

3.2.1.5.5 Diseminación

El hombre transmite al patógeno a través del manejo de material vegetal infectado y la maquinaria e implementos de trabajo, que muchas veces conservan residuos de suelo donde se encuentra el hongo, ocasionando la expansión de la enfermedad.

Este patógeno tiene diferentes medios de diseminación por agentes abióticos (agua, viento, suelo) y transmisión por agentes bióticos (animales, incluyendo al hombre, plantas infectadas); sin embargo, los agentes más importantes en la práctica son el suelo y el material de multiplicación. Esta forma se da cuando los propágulos del hongo (conidios y clamidosporas) se encuentran en la superficie de semillas infectadas o en el interior de las mismas, o bien si las semillas permanecen en los residuos de cosecha contaminados. En la semilla el hongo puede mantenerse viable por 7 meses o más, lo que le permite sobrevivir de una estación a otra (Marshall *et. al.*, 1981).

3.2.1.5.6 Control

Las formas de controlar el hongo pueden ser a través de: a) prácticas culturales, b) control químico y c) aprovechamiento de variedades que presentan resistencia genética.

3.2.1.5.6.1 Prácticas culturales

Mantener un adecuado drenaje y fertilización para promover el desarrollo vigoroso de la planta. Rotaciones de 6-8 años en las que no se cultive ninguna especie de leguminosa o bien la rotación de cultivos como frijol-cebada-frijol, incorporando la paja o rastrojo de la cebada antes de sembrar frijol. Con esta práctica se disminuye la población de

Fusarium spp., con la descomposición lenta del rastrojo, pues esto liga los nutrientes del terreno particularmente el nitrógeno soluble, a tal grado que interfiere en la germinación de las clamidosporas y en el desarrollo de los tubos germinativos de las esporas que si germinan (N.A.S., 1980). En terrenos con problemas críticos de *Fop* se debe implementar una rotación de cultivos de cereales por periodos largos de tiempo, como mínimo 5 años (SARH, 1992).

3.2.1.5.6.2 Control químico

Se refiere al uso de distintos tratamientos fungicidas, los cuales se aplican tanto al suelo como a las semillas, reduciendo los daños ocasionados por *Fusarium*. Los fungicidas protectores aplicados como recubrimiento de la semilla, pueden destruir o inactivar al inóculo transportado en la misma o bien protegerla al igual que a la plántula contra las esporas que germinan en el suelo.

Los productos más usados son: Metacid 400 TS (i. a. Thiram), Pentaclor 600 F (i. a. Quintozeno) y Quifolatan 4 F (i. a. Captafol). El tratamiento a semillas es más efectivo cuando se aplica como "slurry" o "garapiñado", que consiste en empapar las semillas con solución fungicida. Otros de los fungicidas que se pueden utilizar son Promyl 50 PH (i. a. Benomyl) y Captan 400 (i. a. Captan). Benomyl es un producto sistémico con movilidad local, se dice que es un fungicida con sitio específico, con un alto riesgo de desarrollo de resistencia, por lo cual se recomienda mezclarlo con fungicidas de diferente modo de acción, como el Captán o el Manzate 200 (i. a. Mancozeb). Captán por su parte es un fungicida de contacto, muy utilizado en la desinfección de semillas y tubérculos; en semillas se recomienda usar una dosis de 1-3 g de ingrediente activo por kilogramo de semilla, por lo general es aplicado antes o durante la siembra (Schwartz y Gálvez, 1980; Díaz, 1993; De la Garza, 1996).

3.2.1.5.6.3 Resistencia genética

Se pueden obtener variedades resistentes, como resultado de los trabajos de mejoramiento y manejo del cultivo, a través de la selección de material potencialmente resistente al ataque del hongo.

3.2.1.5.7 Manejo de enfermedades del frijol.

El uso de variedades moderadamente resistentes a las enfermedades con prácticas de cultivo adecuadas como parte del manejo de enfermedades, ha mostrado ser una alternativa eficaz y de bajo riesgo en la alteración del agroecosistema (Sukla, 1981). De las prácticas agrícolas más comúnmente usadas tanto de beneficio agronómico como fitosanitario son: la rotación de cultivos (Aceves, 1988; Campos, 1991), y el manejo adecuado de la humedad del suelo (Aceves, 1989; Stepen, 1984).

3.2.1.5.8 Uso de variedades resistentes

El largo proceso de domesticación y la alta diversidad de condiciones ecológicas en las que se cultiva, han permitido una gran diversidad genética en México, de manera que actualmente son reportadas más de 70 especies de frijol entre silvestres y cultivadas (Reyes, 1985). Robinson (1987) justamente consideró al frijol como un cultivo particularmente apto para mejoramiento por resistencia horizontal a enfermedades, como una necesidad de revalorar la resistencia intrínseca de los materiales criollos en beneficio de una producción más estable y sostenida.

3.2.2 Definición de resistencia

La resistencia se puede definir como el conjunto de mecanismos que brindan la capacidad a las plantas para evadir, retardar, inhibir o escapar al desarrollo de la infección causada por un patógeno. Los niveles de resistencia van desde la inmunidad, cuando los patógenos no causan daño alguno a las plantas, hasta la susceptibilidad, cuando los patógenos causan diversos grados de daño en las plantas (Dickinson y Lucas, 1997; Agrios, 1995).

La resistencia genética se define como la habilidad de la planta hospedante para impedir el crecimiento y/o desarrollo del patógeno (Parlevliet, 1979, citado por Beebe y Pastor-Corrales, 1991).

De acuerdo a Agrios (1995) existen diferentes tipos de resistencia, como se indica a continuación:

3.2.2.1 Resistencia de plantas no hospedantes

Sólo en estos casos se puede hablar de inmunidad, pues aunque se presenten las condiciones ambientales adecuadas para el ataque del patógeno, al no haber una compatibilidad con la planta, ésta no sufre daño alguno.

3.2.2.2 Resistencia verdadera

Es cuando la planta cuenta con diversos mecanismos de defensa que actúan contra el ataque del patógeno; estos pueden formar parte de la estructura y composición de la planta: ceras, cutícula, paredes celulares, endodermis, estomas o lenticelas, nutrientes, pH, compuestos tóxicos e inactivadores de enzimas, o bien pueden ser inducidos en el momento que el patógeno inicia su ataque: lignificación, capas de abscisión, barreras entre las heridas, tálides, fitoalexinas y mecanismos de destoxificación (Dickinson y Lucas, 1997).

Este tipo de resistencia a su vez se divide en:

3.2.2.2.1 Resistencia horizontal

Está controlada por diversos genes: poligénica o de genes múltiples, que se encargan de los procesos fisiológicos de la planta y además generan las estructuras y sustancias de los mecanismos de defensa. Es efectiva contra todas las razas de un patógeno y se ve afectada por las condiciones ambientales.

Resistencia horizontal (RH) es la resistencia no específica para una raza y se caracteriza por la ausencia de interacción genética entre el huésped y el patógeno (Robinson, 1987, citado por Beebe y Pastor-Corrales, 1991). A la resistencia horizontal se le identifica también como poligénica, no específica, de genes menores, resistencia duradera o resistencia de campo.

3.2.2.2.2 Resistencia vertical

Esta confiere la protección a la planta contra razas específicas de patógenos. Es controlada por uno o algunos genes: resistencia monogénica u oligogénica. Inhibe o limita el establecimiento del inóculo inicial del patógeno.

La resistencia vertical (RV) es la resistencia específica para una raza y se caracteriza por la presencia de una interacción genética entre el huésped y el patógeno. Implica que hay un rango variable de genotipos resistentes diferentes. También se le identifica como resistencia monogénica, de genes mayores o de raza específica.

3.2.2.2.3 Resistencia aparente

De esta podemos encontrar: escape a la enfermedad y resistencia moderada a la enfermedad.

3.2.2.2.3.1 Escape a la enfermedad

Se presenta cuando por alguna razón, uno a más de los tres elementos para el desarrollo de la enfermedad: hospedante susceptible, condiciones ambientales favorables y un patógeno virulento, no interactúa en el momento adecuado o bien su duración es insuficiente. Se controla totalmente por el ambiente.

3.2.2.2.3.2 Resistencia moderada a la enfermedad

Es cuando a pesar de que las plantas están infectadas por un patógeno, tienen la capacidad de producir una buena cosecha.

Otro término de uso frecuente y no siempre bien empleado para el caso de hongos es el de tolerancia. Se acepta que un cultivar tiene “verdadera tolerancia” a una enfermedad, si presenta síntomas típicos de susceptibilidad y soporta la misma cantidad de inóculo del patógeno que otro cultivar, pero produce significativamente más grano y calidad; o también, que tiene el mismo rendimiento y calidad que otro, pero soporta significativamente más incidencia (presencia, ataque) del patógeno. En muchos casos los agrónomos utilizan el término de tolerancia, para referirse a un grado intermedio de resistencia (Robinson, 1987, citado por Beebe y Pastor-Corrales, 1991).

3.3 Estudios a nivel molecular

Estos estudios se han empleado en diferentes campos del conocimiento, tales como la medicina, taxonomía, biología, agronomía, área forense y criminalística, principalmente.

3.3.1 PCR y síntesis de DNA

La PCR es una metodología que se ha venido utilizando con bastante éxito desde que fue patentada en 1985. Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de DNA, moléculas iniciadoras llamadas “primers”, una enzima *Taq* DNA polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), un amortiguador apropiado y un equipo llamado “termociclador”. La PCR consiste de tres pasos esenciales: el primero es la desnaturalización y sirve para separar mediante temperatura (94 °C) la molécula doble de DNA a cadenas sencillas, que servirán como moldes para la síntesis de los fragmentos respectivos. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el alineamiento (o reconocimiento) de las moléculas iniciadoras a la secuencia blanco del DNA molde. Las moléculas iniciadoras son lineales que pueden variar en longitud, composición de bases nitrogenadas y especificidad para parearse con la secuencia blanco y dependiendo de esto, la temperatura de alineamiento puede variar desde 25 °C a 65 °C. En el tercero, se lleva a cabo el alargamiento o extensión de la molécula iniciadora mediante la enzima *Taq* DNA polimerasa a 72 °C, la mayoría de *Taq* DNA polimerasa proviene de la bacteria termófila *Termus aquaticus*, que tolera la temperatura de desnaturalización sin alterar su función de polimerización. Estos 3 pasos (ciclos) se repiten en el termociclador, permitiendo obtener de manera exponencial el fragmento o fragmentos discretos sintetizados a partir del molde de DNA; así que, en una reacción de 30 a 35 ciclos se acumularán alrededor de 10^6 a 10^8 moléculas de DNA, estas secuencias amplificadas (sintetizadas de *novo*), pueden ser visualizadas en un gel de agarosa o acrilamida con técnicas de tinción convencionales (Valadez y Kahl, 2000).

3.3.2 Componentes de la PCR

Debido al complejo de interacciones entre los componentes de la PCR y la amplia variedad de aplicaciones en las que este método se ha usado, no hay un listado único de condiciones que puedan ser las óptimas para todas las posibles reacciones; sin embargo, aquí se citarán los componentes más comúnmente utilizados.

La mayoría de los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la PCR, tienen una longitud de 10 a 30 bases. Se les usa generalmente a concentraciones de 0.2 a 1.0 μ M,

pero la concentración óptima, así como la concentración del DNA se determina empíricamente. El amortiguador estándar para la PCR contiene 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl y 1.5 mM MgCl₂. En particular, la concentración de MgCl₂ puede tener un efecto marcado sobre la especificidad y los productos que se amplifican.

La enzima *Taq* DNA polimerasa que se requiera en la reacción de PCR se utiliza generalmente a la concentración de 2.5 unidades por 100 µL de reacción. Los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) se usan normalmente de 50 a 200 µM cada uno, pero si las concentraciones son altas es posible que se promuevan falsas incorporaciones por la polimerasa, lo que debe evitarse. El segmento de DNA que se amplificará a partir del molde puede tener hasta 5 kb de longitud, aunque lo más típico y sencillo son amplificaciones de 100 a 1000 pares de bases (bp) (Valadez y Kahl, 2000).

3.3.3 Marcadores basados en la PCR

Los marcadores principales basados en PCR son STSP (Sequence Tagged Sites Polymorphisms, por sus siglas en inglés), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA por sus siglas en inglés) y DAF (DNA Amplification Fingerprinting, por sus siglas en inglés) los cuales se describen a continuación:

Recientemente se han diseñado iniciadores que son complementarios a clones de copias únicas o a regiones que delimitan las secuencias repetidas continuas en el genoma, es decir a los microsatélites y se usan para la detección de los STSP. Esta última técnica, permite sintetizar secuencias específicas de microsatélites y es muy utilizada para el análisis de marcadores de especies cuyos genomas tienen relativamente poco polimorfismo. Esta clase de marcadores pertenecen a los “marcadores de segunda generación” (o marcadores tipo II) y se tiene confianza de que puedan acelerar el análisis de genomas de especies cultivadas, particularmente de aquellas que presentan poco polimorfismo (Valadez y Kahl, 2000).

3.3.4 Amplificación Aleatoria de Marcadores del DNA Polimórfico (RAPD)

Williams *et al.* (1990) modificaron los componentes para PCR, utilizando sólo nanogramos del DNA genómico total con la finalidad de detectar polimorfismos entre diferentes genotipos. El DNA es amplificado empleando iniciadores cortos y arbitrarios.

Ellos denominaron a este método RAPD. Los cuales son fáciles de utilizar, son económicos y es un método que se ha utilizado para detectar y construir mapas genéticos. Una población F2 provee mayor amplitud genética de la región a ser detectada que una población derivada de un retrocruce (Michelmore *et al.*, 1991).

Los marcadores tipo STSP también tienen limitaciones en el sentido de que se requiere al menos, una mínima cantidad de datos acerca de la secuencia genómica del *loci* de interés que permita el diseño de los iniciadores apropiados. Estas limitaciones se han superado con el uso de iniciadores de tipo aleatorio en la PCR, que se utilizan en la metodología llamada RAPD, que permite la síntesis de diferentes fragmentos pequeños del DNA. El procedimiento de RAPD es relativamente rápido, puesto que solamente se utilizan pequeñas cantidades de ácido nucleico y no involucra transferencia tipo Southern, ni el uso de radioactividad. Usualmente esta técnica provee marcadores dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas que resultan de inserciones o deleciones en las regiones amplificadas, o a partir de cambios de bases en el DNA que alteran la unión del iniciador (Valadez y Kahl, 2000).

3.3.5 Amplificación de huellas del DNA con la Técnica DAF

Otro método similar RAPD para identificar polimorfismos genómicos es la técnica DAF. Este método se caracteriza porque en la PCR se utilizan moléculas iniciadoras pequeñas (5 a 15 nucleótidos), pero a concentraciones altas (de 3 a 30 μM) respecto a las otras metodologías reportadas en donde la concentración es de alrededor de 0.3 a 3 μM . La concentración de DNA molde es muy baja (alrededor de 2 ng por reacción), así como la temperatura de alineamiento (para permitir la unión no perfectamente homóloga al sitio blanco). Los productos de amplificación son analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida y son detectados por tinción sensitiva con plata. La alta resolución del gel de poliacrilamida y la alta sensibilidad de la tinción con plata, producen más bandas que la técnica de RAPD y dependiendo de la especie permite detectar más polimorfismos. Un experimento DAF toma más o menos el mismo tiempo que uno de RAPD: un día (Valadez y Kahl, 2000).

3.4 Uso de los marcadores moleculares en frijol

No obstante que el frijol es un cultivo de poca importancia en los países desarrollados, ha recibido mucha atención en investigación sobre marcadores moleculares, debido a que es de ciclo corto y fácil manejo en condiciones de invernadero y laboratorio; es susceptible a numerosos patógenos y atractivo para marcar genes de resistencia. Los acervos y razas de frijol exhiben polimorfismo para estudios de DNA. Los marcadores moleculares basados en DNA como RFLP, RAPD, SCAR y ASAP son la herramienta más novedosa para el mejoramiento de cultivos (Lépiz, 2000).

En el caso del frijol, la selección asistida por marcadores moleculares (MAS), puede realizarse por lo menos en los siguientes casos: a) hibridación y producción de cruzamientos con padres múltiples y finales; b) en retrocruzas, inclusive por caracteres controlados hasta por cuatro genes; c) en selección gamética; y d) generaciones tempranas para selección negativa (eliminación de plantas con alelos no deseables) (Beebe y Pedraza, 1998).

Según Lépiz (2000) algunas ventajas del uso de los marcadores moleculares en el mejoramiento de cultivos, son las siguientes: la selección de caracteres sin necesidad de evaluar los materiales en campo; selección segura de caracteres de baja heredabilidad que en el campo presentan gran variabilidad por efecto ambiental; selección de varios caracteres difíciles de reconocer por el fenotipo. Se han identificado más de 30 marcadores RAPD ligados a 17 genes principales que controlan la resistencia a cuatro patógenos de frijol (Cuadro 4).

Cuadro 4. Genes para caracteres de importancia en el frijol y marcadores asociados.

Caracteres	Genes ²	Genes Marcados	Marcadores SCARs	No. mínimo de genes necesarios
Factores Bióticos				
Hongos				
Roya	9	4	1	1
Antracnosis	7	4	2	2
Mancha Angular	-	-		2
<i>Macrophomina</i>	2	2		1
Mustia	5	5		
<i>Fop</i>	2	-		
Bacteria				
<i>Xanthomonas</i>	8	8	2	2
Virus				
VMCF	5	2	2	1
VMDF	4	3	1	3
Rugoso	2	-		
Nematodos	3	-		
Insectos				
<i>Zabrotes subfascians</i>	1	1		1
<i>Apion godmani</i>	1	1	1	1
Factores Abióticos				
Nodulación	7	7		
Fijación biológica de Nitrógeno	5	5		3
Raíces/absorción P.	7	7		4
Eficiencia P	-	-	2	
Sequía	9	9		2
Fotoperiodo	2	2		
Tolerancia bajo hierro	2	-		
Eficiencia Potasio	1			
Total	82	60	9	25

² Número de genes identificados, incluyendo QTL.

Fuente: Beebe y Pedraza, 1998.

SCAR (Sequense Characterized Amplified Region, por sus siglas en inglés).

3.4.1 Búsqueda de marcadores para características agronómicas en frijol

La selección para rendimiento y otras características agronómicas, incluyendo resistencia a estrés biótico y abiótico, arquitectura vertical de la planta, hábito de crecimiento, resistencia y maduración han sido muy utilizados por mejoradores de frijol para desarrollar variedades con rendimiento superior; o desarrollar variedades adaptadas a medios ambientes específicos y/o sistemas de cultivo (Singh y Muñoz, 1999).

Otros estudios identificaron marcadores específicos para resistencia a enfermedades (Schneider *et al.*, 2001), características morfológicas (Jung *et al.*, 1996), tamaño de

semilla (Park *et al.*, 2000), tolerancia al estrés por sequía (Schneider *et al.*, 1997) y características que son afectadas por procesos de domesticación en frijol común (Koinange *et al.*, 1996), características responsables de rendimiento de semilla, arquitectura de la planta y desarrollo de la planta (Bunyamin *et al.*, 2002).

En frijol común la respuesta de la floración al fotoperiodo es afectada por dos genes mayores, Ppd y Hr, los cuales muestran epistasis recesiva (Kornegay *et al.*, 1993; Wallace *et al.*, 1993). Aunque esta es una tendencia general para sensibilidad del frijol de bajar en temperaturas frías (White y Laing, 1989; Kornegay *et al.*, 1993). Acosta y White (1995) mostraron que las variedades o cultivares varían en la sensibilidad a la temperatura de acuerdo a la respuesta al fotoperiodo. Los germoplasmas sensibles al fotoperiodo de latitudes medias, tales como México y Perú, parecen mostrar baja sensibilidad a la temperatura. Argumentan que esto podría ser ventajoso para tales regiones donde el régimen de lluvia y temperatura son impredecibles de año a año, pero la variación en el fotoperiodo es larga y predecible.

3.4.2 Búsqueda de marcadores para resistencia a enfermedades en frijol

Algunas de las razones para el desarrollo y uso de variedades resistentes, como componente principal en el manejo de las enfermedades son: a) daño de enfermedades, problema de producción importante en frijol; b) existencia de variabilidad genética para resistencia a enfermedades en frijol; c) método de control práctico, económico y de fácil adopción por los productores; d) método de obtención de variedades resistentes relativamente sencillo, cuando se trata de resistencia monogénica; y e) resistencia de duración aceptable en tiempo (Lépiz, 2000).

El control químico de las enfermedades es caro y la generación de semilla libre de patógenos es a menudo difícil en países en desarrollo; de esta forma la resistencia genética representa la más confiable estrategia de control (Pastor-Corrales y Tu, 1989).

En Brasil la variedad EMGOPA 201 Ouro (línea A 295), tiene resistencia múltiple a enfermedades: antracnosis, roya, mosaico común y mancha angular (CIAT, 1996).

El INIFAP ha liberado el Bayo Zacatecas, Bayo Madero, y Pinto Villa que también es resistente a roya, y es la variedad de más éxito en este grupo y se está sembrando en más de 350 000 ha en Chihuahua, Durango y Zacatecas (Cuellar, 1999).

Estudios genéticos indican que la resistencia al tizón común del frijol (Common Bacterial Blight) es diferente, dependiendo del origen de la resistencia, y puede ser determinado por genes mayores y menores (Musaana *et al.*, 1993). El número de genes de resistencia para CBB va de un rango de uno (Adams *et al.*, 1988) a cuatro (Musaana *et al.*, 1993). Mc Elroy (1985) reportó que la resistencia al tizon común en *P. acutifolius*, accesión PI 319443 mostró herencia cuantitativa, y predominó un efecto aditivo de genes y dominación parcial para resistencia al tizon común. Los datos fueron encontrados consistentes con la hipótesis de un gen mayor predominante y otros dos genes de bajo efecto controlando la resistencia.

La herencia cuantitativa de reacción al moho blanco en frijol común, fue destacado por algunos investigadores (Kolkman y Kelly, 1999), mientras que un gen singular dominante controlando resistencia al moho blanco (WM) en una cruza de *P. vulgaris* x *P. coccineus* L. fue reportado por Abawi *et al.* (1978).

Miklas y Beaver (1994) determinaron que la resistencia en campo a *M. phaseolina* es controlada por más de un gen. La base poligénica aparente de resistencia en frijol a *M. phaseolina*, combinado con las dificultades del trabajo con enfermedades del suelo, ha impedido el progreso en el desarrollo de germoplasma y variedades resistentes.

Olaya *et al.* (1996) encontró consistencia con la hipótesis de que la resistencia a *M. phaseolina* en frijol es controlado por dos genes dominantes complementarios (designados como Mp-1 y Mp-2); ambos genes deben estar presentes aunque no necesariamente como homocigotos, para producir la resistencia del genotipo.

La existencia de numerosas razas fisiológicas de *C. lindemutianum* reduce el uso de genes de resistencia singulares. La mayor preocupación en los Estados Unidos es la falta de resistencia brindada por el gen "A" a la raza 7, ya que la mayoría de los cultivares de frijol de temporal solo tienen este gen singular de resistencia (Kelly *et al.*, 1994).

Debido al acontecimiento dado de dos nuevas razas de *C. lindemutianum* en Norte América, la más efectiva estrategia de control de la enfermedad podría ser la piramidación de los genes "A" y "Are" de resistencia dentro de nuevos cultivares. La combinación de los genes A/Are podría condicionar la resistencia a todos los aislamientos conocidos en Norte América de *C. lindemutianum* incluyendo las razas 7,

73, alpha-Brasil y delta. El MAS ha sido demostrado en mejoramiento para resistencia en virus del mosaico común del frijol (BCMV), donde la combinación de los genes I/bc-3 permite piramidar la resistencia a todos los aislamientos de BCMV conocidos (Haley *et al.*, 1994). Actualmente un marcador RAPD ha sido ligado fuertemente (2.0 cM) al gen “Are” que ha sido identificado (Young y Kelly, 1994), pero otro marcador ligado al gen “A” necesita ser identificado.

La variabilidad genética de *C. lindemutianum* ha sido observada en diferentes partes del mundo donde el frijol es cultivado (Beebe y Pastor-Corrales, 1991) y muchas razas del patógeno han sido caracterizadas (Balardin *et al.*, 1997).

Un alto nivel de diversidad molecular en *C. lindemutianum* fue observado dentro de la República Mexicana. Muchos alelos fueron encontrados solo en México, así como también aquellos reportados en Ecuador y Argentina (Sicard *et al.*, 1997).

Dos variantes independientes de genes dominantes condicionando la resistencia a antracnosis fueron identificados en una población F2 derivados de un cultivar diferencial de frijol de enorme resistencia “G 2333”. Un gen fue alelo al gen Co-4 en el cultivar diferencial “TO” y fue nombrado Co.4; mientras que a un segundo gen le fue asignado el nombre temporal de Co-7 (Young *et al.*, 1997).

Pastor-Corrales *et al.* (1994) demostró que la resistencia a antracnosis en el cultivar diferencial “G 2333” fue controlada por dos genes de resistencia desconocidos.

En frijol, los marcadores RFLP o RAPD han sido identificados y ligados a genes de resistencia a las siguientes enfermedades: roya (Miklas *et al.*, 1993), tizón común (Nodari *et al.*, 1993) y antracnosis (Adam-Blondon *et al.*, 1994).

En forma específica para México, sería muy útil conocer los genes que confieren resistencia a las razas de antracnosis y roya prevalentes en las áreas frijoleras del norte-centro del país, lo que facilitaría y haría más eficiente el trabajo de incorporación de resistencia a estos patógenos en las nuevas variedades (Lépiz, 2000).

Igualmente Lépiz (2000) argumenta que deberá procurarse la implementación de la selección asistida por marcadores moleculares, herramienta que está disponible para algunos genes de roya, antracnosis y mosaico dorado; y también reconoce que la mejor estrategia para el combate de las enfermedades es el manejo integrado, y que el

componente principal que se ha utilizado por la mayoría de los programas de frijol, es el uso de las variedades resistentes.

En Europa según Fouilloux (1979) la antracnosis ha sido controlada por 30 años por un gen singular dominante llamado "Are" (Mastenbroek, 1960) y recientemente renombrado Co-2 (Kelly y Young, 1996). Recientemente Kelly *et al.* (1994) han reportado el acontecimiento de razas que superan cualquiera de los dos Co-1 ó Co-2.

El gen "Are" es importante porque este representa uno de los mayores orígenes genéticos de resistencia para la antracnosis en áreas no tropicales donde el frijol común es cultivado (Pastor-Corrales y Tu, 1989).

La línea de frijol A193 ha mostrado amplia resistencia a *C. lindemutianum*, incluyendo a la raza 1472, una de las razas más virulentas de *C. lindemutianum* caracterizadas. La resistencia a la raza 1472 en la línea de frijol A193 fue determinada para ser condicionada por un gen singular dominante. La inoculación de cruas entre A193 y cultivares Michigan Dark Red Kidney y Perry Marrow con la raza 1472 sugiere que la resistencia en A193 es condicionada por el gen Co-1. El genotipo A193 fue resistente a todas las razas probadas (0, 2, 256, 264, 320, 392, 448, 1088 y 1472) con excepción de la raza 2 (Mendoza *et al.*, 2001).

La variabilidad patogénica de la roya (*Uromyces appendiculatus*) es amplia (Mmbaga *et al.*, 1996) y más de 250 razas han sido reportadas en todo el mundo (Stavely y Mc Millan, 1992).

El método más económico y ecológicamente sostenible para controlar la roya es el uso de plantas hospedantes resistentes (Coyne y Schuster, 1975).

La piramidación monogénica de genes resistentes ha sido propuesta como una estrategia económica y efectiva para el desarrollo de resistencia a la roya estable y duradera (Park *et al.*, 1999).

Kelly (1995) reportó que piramidando tres genes mayores (Ur-3, Ur-4 y Ur-5) resultó una resistencia a 63 de 65 razas de roya del frijol reportadas en Estados Unidos. Sin embargo, debido a la epistasis entre genes de resistencia a la roya (Kolmer y Groth, 1984), la piramidación de genes monogénicos de resistencia pueden llevar algo de tiempo y ser un procedimiento caro (Melchinger, 1990). Para superar esta limitación, los marcadores RAPD ligados a genes mayores para resistencia a roya pueden ser

efectivamente usados cuando algunos genes de resistencia de diferentes orígenes son transferidos dentro de un cultivar susceptible (Kelly, 1995).

Algunos reportes indican que la resistencia a la roya del frijol es controlada por genes mayores singulares dominantes (Faleiro, 1997; Park *et al.*, 1999). Sin embargo, hay también reportes de que la resistencia es determinada por un gen recesivo singular (Zarter *et al.*, 1989), por dos genes (Finke *et al.*, 1986) por dos genes dominantes complementarios (Grafton *et al.*, 1985), y por dos genes independientes (Grafton *et al.*, 1985).

Los marcadores moleculares basados en DNA han incrementado el potencial para detectar y medir la variabilidad entre individuos. Estos marcadores son casi ilimitados en número y no son afectados por el medio ambiente (Williams *et al.*, 1990).

3.4.3 El uso de los marcadores genético moleculares en la búsqueda de resistencia en frijol para *Fop f. sp. phaseoli*

Ribeiro y Hagedorn (1979) indican que un solo gen controla la resistencia de cada raza de *F. oxysporum*. La resistencia a la raza de Brasil parece ser controlada por un gen dominante tentativamente designado como *Fop* 1. Este gen está presente en las variedades Tenderete, Pintado y posiblemente Early Gallatin. La resistencia a la raza de Estados Unidos parece estar controlada por un gen dominante incompleto tentativamente designado como *Fop* 2. Los heterocigotos de la progenie F1 de la cruce de la variedad resistente (Oreto Uberabinha) y variedades susceptibles demuestran un grado de resistencia a la raza de Estados Unidos más baja que la resistencia de los padres. La resistencia a ambas razas del hongo es expresado por una restricción de distribución y/o desarrollo del patógeno en el sistema vascular de plantas inoculadas.

Los resultados indican que la resistencia a ambas razas del hongo es expresado como una restricción notable de la distribución del patógeno en las plantas infectadas. Este tipo de resistencia ha sido asociado con otras pudriciones por *Fusarium* (Beckman *et al.*, 1972); en tales casos la resistencia fue parcialmente atribuida a la rápida formación de oclusiones en el xilema (geles, gomas, etc), que reducen o previenen la distribución del patógeno en el hospedante.

La reacción de variedades de frijol a la cepa de *Fop* de Brasil es altamente influenciada por la temperatura de incubación y concentración de esporas en el inóculo; la severidad de la enfermedad es inversamente proporcional a la temperatura de incubación y directamente proporcional a la dosis del inóculo (Ribeiro y Hagedorn, 1979).

Distintos tipos de resistencia en especies hospedantes singulares a otras formas especiales de *Fop* que provocan pudriciones, existen y son controladas genéticamente (Henderson y Winstead, 1961).

4. MATERIALES Y METODOS

La metodología utilizada en la presente investigación se realizó en tres fases.

4.1 Fase 1

4.1.1 Progenitores de frijol y cruas realizadas

Progenitores

Los progenitores de frijol usados fueron las variedades Bayo blanco (B), Pinto americano (P) (*Phaseolus vulgaris* L.) y Tepary (T) (*Phaseolus acutifolius* Asa Gray); de los cuales el Bayo y el Tepary fueron considerados como resistentes y el Pinto americano como susceptible a *Fop*. No existe mucha información sobre la resistencia o susceptibilidad a *Fop* de las variedades de frijol utilizadas en la presente investigación. Sin embargo se les asignó ese calificativo de acuerdo con ensayos preliminares realizados en presencia del patógeno a concentraciones altas, y en donde se tomaron en cuenta el porcentaje de germinación y la altura de plantas (variables). Las variedades seleccionadas se destacan por las siguientes características:

4.1.1.1 Pinto americano

Por ser una de las variedades de frijol más importantes comercialmente a nivel nacional, sobre todo para la parte norte del país, y además porque presentó mayor susceptibilidad a *Fop* en los ensayos preliminares de patogenicidad con respecto a las variedades Bayo y Tepary. Además, según la PRONASE y SAGARPA, (2004) la variedad Pinto americano se adapta bien en primavera-verano en los Estados de Baja California Sur, Coahuila, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas. En otoño-invierno en Baja California Sur, Sonora, Tamaulipas y Nuevo León. Es susceptible a la antracnosis, a la roya o chauixtle, al tizón común y al tizón de halo. Se adapta a siembras de temporal y de riego. Su densidad de siembra es para otoño-invierno de 50 Kg·ha⁻¹ y para primavera-verano de 45 a 70 Kg·ha⁻¹. Su hábito de crecimiento es indeterminado de semiguía corta. Los días a floración van de los 36 a los 39 días dependiendo de las condiciones ambientales y manejo del cultivo. Su madurez fisiológica es de 78 a 80 días. Sus flores son de color blanco, el color del grano es pinto (crema y café) y las plantas alcanzan una altura promedio de 49 cm.

4.1.1.2 Bayo blanco

Las variedades utilizadas Bayo y Pinto americano fueron colectadas en el ejido Emiliano Zapata en el estado de Durango. La variedad de Bayo se siembra junto con la variedad Pinto americano y en plántula es difícil diferenciarlas, ya que son muy parecidas; los días a floración de ambas son de alrededor de 40 días, por lo que al Bayo se le denomina en la región "Bayo cuarentero" (comunicación personal del productor que proporcionó la semilla de Pinto americano y Bayo blanco).

Esta variedad se ha mantenido en la región debido a su alto rendimiento y a su buena adaptación con riego mínimo. Su madurez fisiológica va de los 78 a los 80 días, sus flores son de color blanco, el color del grano es crema claro (casi blanco) con algunas rayas amarillas poco visibles.

4.1.1.3 Tepary

Existen referencias no específicas acerca de la resistencia del frijol Tepary al tizón común del frijol. N.A.S., (1979) afirma que algunas selecciones se han utilizado para incrementar la resistencia de otras variedades cultivadas por hibridación interespecífica; sin embargo, aparentemente este tipo de frijol es medianamente resistente a otras enfermedades.

Algunas variedades de Tepary están próximas a la extinción, por lo que se ha recomendado hacer colectas de germoplasma en las áreas primitivas de crecimiento, particularmente en México y Guatemala. El uso de Teparis silvestres y domesticados en nuevos esfuerzos de mejoramiento podría producir cultivares con mayores rendimientos y mayor resistencia a enfermedades de raíz particularmente y mayor tolerancia al ambiente. El frijol Tepary presenta ventajas con respecto a las variedades Pinto y Bayo; por ejemplo su ciclo de producción es de 60 días, mientras que el de las otras rebasa los 80 días (N.A.S., 1979). Además se necesita suficiente humedad para la germinación de la semilla y adelantar su crecimiento hasta la floración, pero después de eso, la escasa lluvia del desierto -en donde crece en forma silvestre- o aún sin ésta, puede ser suficiente para madurar la cosecha. Flujos de agua de una sola lluvia son suficientes para completar el proceso total si el suelo es profundo y retiene humedad. Por lo tanto los

Teparis están adaptados a la agricultura semiárida con riego mínimo o agricultura de esorrentía, así como a la agricultura de secano (N.A.S., 1979).

Sobre suelo y ambiente seco los Teparis parecen superar a la mayoría de las otras variedades. Hoy utilizando la fertilización y métodos moderados de riego, los agricultores comerciales de Tepary han cosechado 1100-1200 Kg·ha⁻¹; pero el rendimiento record es mayor de 4000 Kg·ha⁻¹ en California bajo riego mínimo (N.A.S 1979), respecto al rendimiento promedio de las variedades cultivadas a nivel nacional de 638.28 Kg·ha⁻¹ (SAGARPA, 2004).

4.1.1.4 Cruzas realizadas

Se realizaron cruzamientos específicos con la finalidad de dar lugar a la expresión de la herencia del caracter de resistencia a *Fop* en la descendencia F2 de cruzas entre la variedad Pinto y las variedades resistentes. Los cruzamientos fueron los siguientes:

Cruza 1: T♀ x P♂ (a), T♀ x P♂ (b); en donde el Tepary es resistente y el Pinto es susceptible a *Fop*.

Cruza 2: P♀ x B♂ (a), P♀ x B♂ (b); en donde el Pinto es susceptible y el Bayo es resistente a *Fop*.

Cabe señalar que lo ideal habría sido utilizar en lugar del Bayo el mismo Tepary, pero debido a que existe poca compatibilidad genética entre las especies *acutifolius* con *vulgaris*, se llevó a cabo de esta manera utilizando también una variedad compatible de la misma especie que el Pinto. Entra también en juego el efecto materno ya que en las dos cruzas donde se utiliza el Tepary como progenitor femenino, quizá se obtenga más rápido la resistencia requerida del Tepary (por efecto materno), pero quizá sería necesario mediante retrocruzas obtener el color y tamaño del Pinto, que es el de más interés comercial. La variedad Pinto se utilizó como progenitor masculino y femenino con la finalidad de evaluar la forma de conferir la resistencia más fácilmente.

Las semillas F1 obtenidas de cada craza fueron tres para la craza T♀ x P♂ (a); dos para la craza T♀ x P♂ (b), haciendo un total de 5 semillas; dos para la craza P♀ x B♂ (a) y cinco para la craza P♀ x B♂ (b), haciendo un total de 7 semillas. Para obtener la generación F2 se sembraron todas las semillas F1.

Tanto progenitores, como las progenies F1 y F2 se mantuvieron en condiciones de invernadero en macetas de 10 y 1 kg respectivamente con tierra de monte previamente desinfectada con bromuro de metilo, sembradas a una profundidad de 4 cm.

4.2 Fase 2 Colecta del patógeno e identificación morfológica

4.2.1 Colecta del patógeno y aislamiento

Fop se aisló de raíces de plantas de frijol colectadas en el Campo Experimental del Valle de México (INIFAP-CEVAMEX) Texcoco México.

Las raíces de las plantas muestreadas se lavaron con agua para eliminar la tierra y se tomaron porciones de tejido vegetal de aproximadamente 2 mm de longitud con síntomas de necrosis vascular. Los cortes se colocaron en hipoclorito de sodio al 1% durante 2 minutos con agitación continua, luego se eliminó el hipoclorito enjuagando los cortes con agua destilada estéril; posteriormente se colocaron en papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua. Pequeñas porciones de tejido se sembraron en cajas de Petri con PDA y se incubaron durante 5 a 7 días a 24 °C. Todas aquellas colonias que mostraron características de *Fop*, se reaislaron en cajas de Petri con PDA para purificarlas. Se usó PDA modificado (150 g de papa, 10 g de dextrosa y 20 g de agar·L⁻¹). *Fop* fue aislado y purificado de acuerdo a Silva Rojas (com. personal). Una vez que *Fop* estuvo puro, se incrementó el inóculo para la producción de conidios los que fueron inoculados en invernadero.

4.2.2 Identificación morfológica

Se realizó de acuerdo a la descripción dada por Snyder y Hansen (citados por Romero, 1993), los cuales describen a *Fop* con macroconidios finos, alargados puntiagudos de pared delgada, anchura máxima 3.0-4.5 μ , masa de conidios con pigmento violeta (ver Figura 3).

Para las categorías inferiores a la especie, estos mismos autores sugieren la denominación de formas especiales (f. sp.) y razas, según se trate de sub-grupos semejantes morfológicamente, pero con diferente patogenicidad hacia determinados hospedantes o variantes de un mismo hospedante, respectivamente.

4.3 Fase 3

4.3.1 Análisis moleculares

Se utilizó la técnica DAF-PCR para analizar el genoma de las plantas de las variedades de frijol y cruza respectivas con dos finalidades principales: a) estimar la variabilidad genómica de los progenitores y de la progenie F1; y b) perfilar el genoma de aquellas plantas que mostraran resistencia o susceptibilidad a *Fop* y tratar de identificar alguna banda de DNA asociada a cualquiera de estos dos caracteres tanto en los progenitores como en la descendencia.

a) Para la estimación de la variabilidad genómica de los progenitores se utilizaron 10 plantas de cada uno de ellos; mientras que para la variabilidad de F1 se consideraron muestras compuestas de todas las plantas resultantes de los cruzamientos.

b) Para perfilar el genoma de las plantas resistentes y susceptibles a *Fop*, se consideraron plántulas inoculadas de los tres progenitores utilizados y de la descendencia F2 que mostraron síntomas severos a los 25 días después de la inoculación o muerte postemergente. Se consideró una planta susceptible y una resistente de cada progenitor y dos plantas F2 de cada cruzamiento.

Para la toma de muestras de DNA de plantas susceptibles y resistentes a *Fop* de las 3 variedades y progenie F2 de frijol, se inocularon semillas de acuerdo al método utilizado por Punja y Parker (2000). Este método consistió en sumergir por 5 minutos en una solución de 2.5×10^5 conidios·mL⁻¹ (ambos macro y microconidios) del aislamiento de *Fop*, las semillas correspondientes (40/ variedad o progenie F2). El experimento completamente al azar con cuatro repeticiones, se realizó en invernadero con una temperatura media de 20-24 °C en macetas de 1 kg con tierra de monte previamente desinfectada con bromuro de metilo. Se sembraron 10 semillas por maceta a una profundidad de 4 cm. Las semillas que se utilizaron como control fueron manipuladas de la misma forma, pero fueron sumergidas en agua destilada estéril.

4.3.2 Extracción de DNA

Para la estimación de la variabilidad genómica de progenitores y plantas F1, se utilizaron hojas jóvenes y sanas para obtener el DNA; pero en el caso de las plantas que fueron inoculadas (progenitores y F2), se utilizaron hojas o tejido de la planta disponible

después de la inoculación. El material vegetal seleccionado fue sumergido en un recipiente con etanol 70% para eliminar polvo y otros contaminantes ambientales. La extracción de DNA se realizó de acuerdo a Dellaporta *et al.* (1983), que consistió en moler 1.4 g de hoja o tejido en un mortero con N₂ líquido. Posteriormente el tejido pulverizado se pasó a un tubo estéril de 35 mL que contenía 15 mL de buffer de extracción precalentado a 65 °C (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA.Na₂ pH 8.0, 500 mM Na Cl, 10 mM β-mercaptoetanol, 1.3% SDS) y 30 µL de β-mercaptoetanol. El tubo se cubrió con parafilm, se mezcló su contenido y se incubó a 65 °C en baño de agua por 10 minutos con inversión ocasional del mismo; luego se añadieron 5 mL de acetato de potasio 5 M, se mezcló por inversión y se mantuvieron a 0 °C por 30 minutos. Los tubos fueron equilibrados debidamente con agua destilada estéril y se centrifugaron a 4000 xg por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró con una tela de gasa estéril a un tubo que contenía 10 mL (un volumen) de isopropanol frío, se mezcló lentamente por inversión y se incubó 30 minutos a -20 °C. Posteriormente el DNA (nube blanquecina), se transfirió con un asa de vidrio estéril a un tubo de microcentrifuga que contenía 700 µL de buffer de dilución (50 Mm de Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM de EDTA); una vez disuelto el DNA se añadieron 4 µL de RNAasa (10 mg·mL⁻¹) y se incubó a 37 °C por 1 hora. Después se adicionaron 50 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 500 µL de isopropanol frío, se mezcló nuevamente y se mantuvieron a -20 °C por 2 horas. Por último se centrifugó a 15 000 xg por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de DNA se lavó con etanol 70 %, se volvió a centrifugar por 5 min más y se secó por inversión del tubo durante 15 min. Finalmente el DNA se resuspendió en 100 µL de buffer TE (10 Mm de Tris-HCl, 1 mM de EDTA.Na₂ pH 8.0) y se almacenó a 4 °C.

4.3.3 Estimación de la cantidad y calidad del DNA

El DNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro PERKIN-ELMER modelo Lambda BIO. La lectura se realizó a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. La primera longitud permite estimar la presencia de ácidos nucleicos (Sambrook *et al.* 1989). La medición a 280 nm permite estimar la presencia de contaminantes en la muestra, tales como fenol o proteínas. La concentración de DNA se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de DNA } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{DO 260} \times \text{Factor de dilución} \times 50}{1000}$$

Las preparaciones puras de ácidos nucleicos (DNA y RNA) tienen valores entre 1.8 a 2.0; pero si hay contaminación con proteínas o fenol, el valor obtenido de la relación puede ser significativamente diferente (Sambrook *et al.*, 1989).

Para estimar la calidad del DNA, normalmente se recurre a la electroforesis en gel de agarosa; este método es de utilidad para conocer el nivel de degradación o fragmentación que sufrió el DNA durante el proceso de extracción. Para esto se preparó un gel de agarosa al 0.8% disuelto en TAE 1X (40 mM de Tris-HCl pH 8.0; 20 mM de acetato de sodio; 2 mM de EDTA). En los pozos se colocaron 1 μg del DNA y 0.1 volumen de amortiguador de carga 10 X (0.1% de azul de bromofenol (p/v); 0.1% de xileno cianol (p/v); 40% de glicerol y 60 mM de EDTA pH 8.0). La electroforesis se corrió a 70-80 volts, cuando ésta concluyó el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (0.4 a 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 15 min para tefir el DNA. Después se documentó con el sistema Kodak Digital Science 1D 2.0 sobre un transiluminador de luz uv Upland modelo TS-20.

4.3.4 Selección de iniciadores

Para el establecimiento de la técnica en el laboratorio, se seleccionaron previamente los iniciadores más apropiados y capaces de funcionar a 40 °C. Para esta selección se utilizó DNA de la variedad Bayo que fue amplificado con los 20 iniciadores referidos en el Cuadro 5. La mezcla de reacción estuvo compuesta de 200 μM de dNTPs, 1X de amortiguador para *Taq* DNA polimerasa, 2 mM de MgCl_2 , 20 pmol del iniciador correspondiente, 2 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa y 40 ng de DNA en un volumen final de 25 μL . Los tubos de reacción siempre fueron cubiertos con el mismo volumen de aceite mineral estéril para evitar la evaporación de la muestra durante el termociclaje. Las condiciones de amplificación están referidas en el Cuadro 6.

La separación de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa Ultra Pure TM de GIBCO BRL al 1.2% con amortiguador TAE 1X; para lo cual se cargaron 10 μL de cada producto con 0.1 volumen de amortiguador de carga 10X en los pozos respectivos

del gel. La electroforesis se corrió de 70 a 80 volts. Para estimar el peso molecular de los productos amplificados, se incluyó en el gel el marcador de peso molecular de 1 kb de GIBCO BRL. Una vez que finalizó el corrimiento, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 15 min y la imagen fue documentada para su posterior análisis. La selección se realizó considerando aquellos iniciadores que amplificaron la mayor cantidad de bandas nítidas y reproducibles.

Cuadro 5. Secuencia de bases de los iniciadores evaluados para el establecimiento de la técnica DAF-PCR.

INICIADOR	SECUENCIA	INICIADOR	SECUENCIA
ROTH-A 01	5' CAG GCC CTT C 3'	ROTH-A 11	5' CAA TCG CCG T 3'
ROTH-A 02	5' TGC CGA GCT G 3'	ROTH-A 12	5' TCG GCG ATA G 3'
ROTH-A 03	5' AGT CAG CCA C 3'	ROTH-A 13	5' CAG CAC CCA C 3'
ROTH-A 04	5' AAT CGG GCT G 3'	ROTH-A 14	5' TCT GTG CTG G 3'
ROTH-A 05	5' AGG GGT CTT G 3'	ROTH-A 15	5' TTC CGA ACC C 3'
ROTH-A 06	5' GGT CCC TGA C 3'	ROTH-A 16	5' AGC CAG CGA A 3'
ROTH-A 07	5' GAA ACG GGT G 3'	ROTH-A 17	5' GAC CGC TTG T 3'
ROTH-A 08	5' GTG ACG TAG G 3'	ROTH-A 18	5' AGG TGA CCG T 3'
ROTH-A 09	5' GGG TAA CGC C 3'	ROTH-A 19	5' CAA ACG TCG G 3'
ROTH-A 10	5' GTG ATC GCA G 3'	ROTH-A 20	5' GTT GCG ATC C 3'

4.3.5 Estandarización de las condiciones de reacción de DAF-PCR.

Una vez seleccionados los iniciadores que se utilizarían para el establecimiento de la técnica DAF, fue necesario estandarizar también las concentraciones óptimas de DNA, $MgCl_2$ y *Taq* DNA polimerasa; ya que estos componentes de la reacción afectan significativamente la resolución y cantidad de bandas dependiendo del genoma a amplificar. En estos casos lo ideal es amplificar con una muestra del DNA problema y con un solo iniciador algunas combinaciones entre estos componentes. Para este trabajo se consideraron 0, 10, 15, 20, 30, y 40 ng de DNA; 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM de $MgCl_2$ y 0.5, 1.0 y 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa por reacción, seleccionando en cada etapa aquellas concentraciones que resultaron más eficientes.

Para este propósito se utilizaron los iniciadores ROTH A-03 y ROTH A-16 con el DNA del progenitor Bayo con diferentes concentraciones de los tres componentes antes referidos. Todas las amplificaciones se realizaron con el mismo programa de termociclaje utilizado para la selección de los iniciadores (ver cuadro 6). Los productos

amplificados fueron separados en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio y documentados después de las electroforesis respectivas.

4.3.6 Aplicación de la técnica DAF-PCR

Los iniciadores que se seleccionaron y emplearon en la técnica DAF-PCR para analizar la variabilidad genómica de progenitores y plantas F1; así como de las poblaciones de plantas de frijol con síntomas y sanas después de la exposición al hongo *Fop* f. sp. *phaseoli* fueron el ROTH A-01, ROTH A-04 y el ROTH A-13.

Para el análisis de la variabilidad genómica de los progenitores y de las plantas F1 se utilizó el DNA de 30 plantas (10 muestras simples por cada progenitor) y para F1 se utilizaron siete muestras compuestas como ya se indicó anteriormente y en las figuras correspondientes aparecen en orden como: (1) Tepary, (2) Bayo, (3) Pinto, (4) T♀ x P♂ (a), (5) T♀ x P♂ (b), (6) P♀ x B♂ (a) y (7) P♀ x B♂ (b). La mezcla de reacción contenía 200µM de dNTPs, 1X de amortiguador para *Taq* DNA polimerasa, 2 mM de MgCl₂, 20 pmol del iniciador respectivo, 1 U de enzima *Taq* DNA pol y 25 ng del DNA correspondiente. El programa de amplificación utilizado fue el mencionado en el siguiente Cuadro:

Cuadro 6. Programa de amplificación utilizado en la técnica DAF-PCR

	Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
Predesnaturalización	1'	94	1
Desnaturalización	20''	94	38
Alineamiento	15''	40	
Extensión	1'	72	
Extensión final	2'	72	1
		4	α

Para perfilar el DNA de progenitores y plantas F2 susceptibles y resistentes a *Fop* f. sp. *phaseoli*, se consideraron 24 plantas de frijol tanto de progenitores como de la población F2 referidas en el Cuadro 7. Las características consideradas fueron plantas sanas y con síntomas severos o muerte postemergente a los 25 días después de la inoculación con el patógeno bajo condiciones de invernadero.

Las condiciones de reacción y de amplificación de DAF fueron las mismas que se utilizaron para el análisis del DNA de progenitores y población F1 mencionadas en la sección 4.3.6.

Cuadro 7. Relación de plantas de frijol seleccionadas para el análisis de huellas de DNA de plantas resistentes o susceptibles a *Fop* f. sp. *phaseoli*.

(1)	planta susceptible del progenitor Bayo
(2)	planta resistente del progenitor Bayo
(3)	planta susceptible del progenitor Tepary
(4)	planta resistente del progenitor Tepary
(5)	planta susceptible del progenitor Pinto
(6)	planta resistente del progenitor Pinto
(7)	planta 1 susceptible de la cruza 1 (a) T♀ x P♂ (susceptible C1 P1 (a))
(8)	planta 1 resistente de la cruza 1 (a) T♀ x P♂ (resistente C1 P1 (a))
(9)	planta 2 susceptible de la cruza 1 (a) T♀ x P♂ (susceptible C1 P2 (a))
(10)	planta 2 resistente de la cruza 1 (a) T♀ x P♂ (resistente C1 P2 (a))
(11)	planta 1 susceptible de la cruza 2 (b) T♀ x P♂ (susceptible C2 P1 (b))
(12)	planta 1 resistente de la cruza 2 (b) T♀ x P♂ (resistente C2 P1 (b))
(13)	planta 2 susceptible de la cruza 2 (b) T♀ x P♂ (susceptible C2 P2 (b))
(14)	planta 2 resistente de la cruza 2 (b) T♀ x P♂ (resistente C2 P2 (b))
(15)	planta 1 susceptible de la cruza 1 (a) P♀ x B♂ (susceptible C1 P1 (a))
(16)	planta 1 resistente de la cruza 1 (a) P♀ x B♂ (resistente C1 P1 (a))
(17)	planta 2 susceptible de la cruza 1 (a) P♀ x B♂ (susceptible C1 P2 (a))
(18)	planta 2 resistente de la cruza 1 (a) P♀ x B♂ (resistente C1 P2 (a))
(19)	planta 1 susceptible de la cruza 2 (b) P♀ x B♂ (susceptible C2 P1 (b))
(20)	planta 1 resistente de la cruza 2 (b) P♀ x B♂ (resistente C2 P1 (b))
(21)	planta 2 susceptible de la cruza 2 (b) P♀ x B♂ (susceptible C2 P2 (b))
(22)	planta 2 resistente de la cruza 2 (b) P♀ x B♂ (resistente C2 P2 (b))
(23)	planta susceptible a sequía progenitor Tepary (susceptible a sequía)
(24)	planta resistente a sequía progenitor Tepary (resistente a sequía)

4.3.7 Separación de productos amplificados con la técnica DAF-PCR

Los geles de poliacrilamida (PAA) se utilizan principalmente para separar fragmentos de DNA de bajo peso molecular (de 50 a 1000 bp), como son los productos de reacciones de amplificación o productos de digestión con enzimas de restricción que requieren de una mayor definición. Dependiendo de la longitud del producto a separar, la concentración de poliacrilamida en el gel puede ser variable; por ejemplo, para resolver fragmentos de 80 a 500 bp la concentración utilizada normalmente es de 5 %; para fragmentos de 40 a 200 bp, la concentración es de 12 %; para fragmentos de 6 a 100 bp se utiliza 20 % de poliacrilamida. Los geles PAA no desnaturizantes se utilizan para la

separación de fragmentos de DNA de doble cadena con amortiguador TBE 1X y bajos voltajes (de 1 a 8 V/cm); pero si se requiere de separar fragmentos de DNA de cadena sencilla (geles de secuenciación) o moléculas de DNA en donde la movilidad pudiera verse afectada por la composición de bases, se recurre a los geles PAA desnaturalizantes que contienen UREA o formaldehído (Valadez y Kahl, 2000). Los geles de poliacrilamida son corridos en sistemas de electroforesis vertical. Sin embargo, tienen tres grandes ventajas sobre los geles de agarosa: (1) su poder de resolución es mayor, ya que pueden separar moléculas de DNA que difieran en 1 bp, (2) pueden alojar cantidades de DNA mucho más grandes que los geles de agarosa: Arriba de los 10 ng de DNA pueden ser aplicados en una sola ranura de (1cm x 1 mm) de un gel de poliacrilamida típico sin bajar la resolución significativamente. (3) El DNA recuperado de geles de poliacrilamida es extremadamente puro y puede ser usado para otros propósitos (Sambrook *et. al.*, 1989).

La técnica DAF puede generar huellas de DNA de origen viral, bacterial, fungico, plantas y animales. Iniciadores cortos de 5-12 nucleótidos de longitud pueden producir patrones de bandas complejas que pueden ser visualizadas en electroforesis en geles de acrilamida y tinción con plata. Con dicha técnica se utilizan pocos reactivos y poco tiempo de reacción (Anolles *et. al.* 1991).

Mediante la técnica DAF es posible identificar hibridación en la progenie F1 en ausencia de marcadores fenotípicos o fisiológicos y constituye la base para el mapeo genético futuro y selección asistida por marcadores (Anolles *et. al.* 1999).

Como ya se mencionó anteriormente en la revisión de literatura, que aunque los productos amplificados DAF-PCR pueden ser analizados en geles de agarosa, el uso de geles de poliacrilamida permite detectar más bandas de DNA e incrementa la posibilidad de detectar también más polimorfismos. La única desventaja de este tipo de geles respecto a los de agarosa es que son más laboriosos y requieren de más tiempo de corrimiento. Los geles PAA se preparan a partir de una mezcla de monoacrilamida, bisacrilamida, TEMED y persulfato de amonio. La proporción de las dos primeras sustancias influyen en el tamaño del poro; el persulfato de amonio y el TEMED inician la polimerización (Valadez y Kahl, 2000). Las muestras DAF amplificadas para el análisis de variabilidad genómica de progenitores fueron separadas en geles de agarosa

al 1.2%, y para el análisis de F1 y plantas resistentes y susceptibles a *Fop. f. sp. phaseoli*, fueron separadas en geles de acrilamida al 5% con las concentraciones que se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 8. Mezcla utilizada para la preparación de los geles de acrilamida.

	5 % (para 10 mL)	5% (para 17 mL)
Acrilamida 30% (acrilamida 29%, NN bisacrilamida 1%)	1.66 mL	2.8 mL
Agua deionizada	6.27 mL	10.6 mL
TBE 5X	2.0 mL	3.4 mL
Persulfato de amonio 10%	70 μ L	190 μ L
TEMED	3.5 μ L	8.0 μ L

La preparación de los geles de acrilamida consistió en lavar con alcohol 70% las dos piezas cuadradas de vidrio, se enjuagaron con agua bidestilada (ddH₂O). Se colocaron las barras espaciadoras a los lados de los vidrios y se armó el sistema de electroforesis. Se mezclaron 2.8 mL de acrilamida al 30%, 10.6 mL de agua deionizada, 3.4 mL de amortiguador TBE 5X, 190 μ L de persulfato de amonio al 10% y 8.0 μ L de TEMED, para preparar 17 mL de solución (dos geles de 10 x 10 cm con capacidad de 10 muestras cada uno). Esta se mezcló bien con ayuda de una jeringa succionando y expulsando tres veces. Se tomó la solución de acrilamida con la misma jeringa y se colocó entre los vidrios y el peine en el lugar correspondiente. Las burbujas de aire se evitaron inclinando el molde del gel y vaciando la solución por uno de los lados. La polimerización tarda aproximadamente 1 hora, pero como en la presente investigación se aumentó la cantidad de persulfato de amonio y TEMED esta tardó aproximadamente media hora. Las cantidades de TEMED y persulfato se incrementaron de 5.9 μ L y 119 μ L respectivamente recomendadas por Sambrook *et. al.*, (1989) a 8 μ L y 190 μ L en la presente investigación. Cuando el gel polimerizó se colocaron las placas de vidrio con el gel en el sistema de electroforesis. Se llenó con amortiguador TBE 1X el tanque del sistema y se removieron los peines. Se mezclaron 10 μ L de las muestras amplificadas de DNA con 1/10 de volumen del amortiguador de carga y se colocaron en los pozos ayudados de la micropipeta. Se incluyó en los extremos del gel el marcador de peso molecular. Se corrieron los geles a 70-80 voltios y la cámara de electroforesis fue

cubierta hasta la parte media con hielo. Después de la electroforesis, el gel se removió y se tiñó con bromuro de etidio por 15 minutos. Posteriormente fue observado y documentado.

4.3.8 Precauciones para trabajar acrilamida y bromuro de etidio

La acrilamida y bisacrilamida son potentes neurotóxicos y son absorbidas a través de la piel. Sus efectos son acumulativos. Se deben usar guantes y una mascarilla cuando se este pesando acrilamida y bisacrilamida (Sambrook *et. al.*, 1989). El bromuro de etidio (bromuro de 3, 8 diamina-6-etil-5-fenilfenantridio) es un colorante fluorescente y cancerígeno que se intercala entre los pares de bases de la doble cadena del DNA ó del RNA. La cantidad de DNA que puede visualizarse dependerá del grosor del gel y del tamaño del pozo. También es posible la detección de los ácidos nucleicos cuando esta sustancia se incorpora a la muestra antes de la electroforesis. El bromuro de etidio es un poderoso mutagénico y es moderadamente tóxico. Al trabajar con esta sustancia se recomienda mantener las mismas recomendaciones que para la acrilamida.

4.3.9 Análisis estadístico de bandas

Las bandas amplificadas y separadas en los diferentes geles fueron sujetas a un análisis estadístico multivariado con el programa NTSyS pc. 2.0, para lo cual se construyó una matriz binaria de datos con la información de cada uno de los geles, se consideró el dígito “1” para señalar la presencia de una banda de DNA particular o el dígito “0” para referir la ausencia de dicha banda. Los agrupamientos se realizaron considerando el coeficiente de Dice que sólo toma en cuenta los valores positivos (presencia de bandas). Con la matriz de similitud se realizó el análisis de conglomerados utilizando el método del promedio aritmético de pares no ponderados (UPGMA).

5. RESULTADOS

5.1 Fase 1

5.1.1 Progenitores de frijol y cruzas realizadas

Progenitores

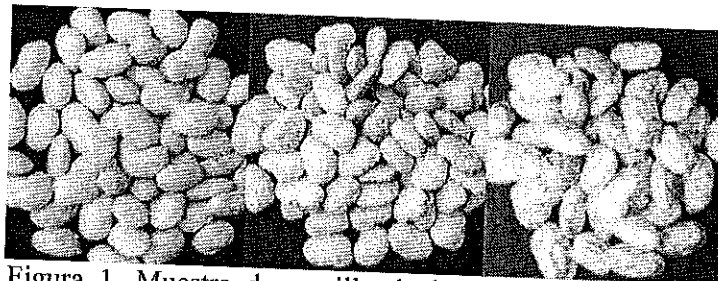
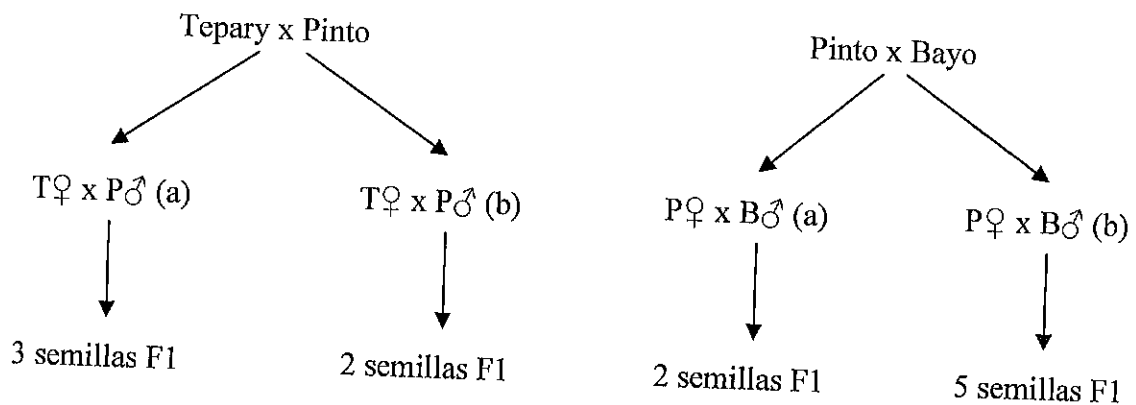


Figura 1. Muestra de semilla de los progenitores Bayo blanco, Tepary y Pinto americano en orden respectivo.

Cruzas realizadas



5.2 Fase 2. Colecta del patógeno e identificación morfológica

5.2.1 Colecta y aislamiento del patógeno

La colecta de raíces de frijol común con síntomas de Fusariosis de donde se obtuvo *Fop* fue realizada en el campo INIFAP-CEVAMEX; estas estructuras de la planta presentaron ahuecamiento y manchas longitudinales de color rojizo a lo largo del sistema vascular.

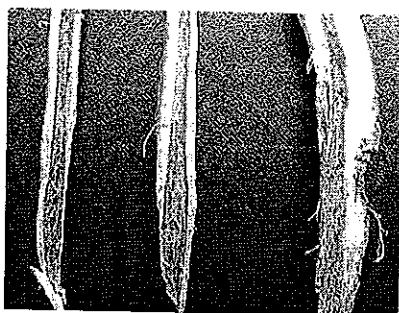


Figura 2. Raíces de plantas de frijol común con síntomas de *Fop* f. sp. *phaseoli* colectadas en el campo INIFAP-CEVAMEX.

5.2.1.1 Identificación morfológica

Después del aislamiento y purificación del hongo se observó el crecimiento del micelio característico color violáceo de *Fop* así como formación de macro y microconidios.

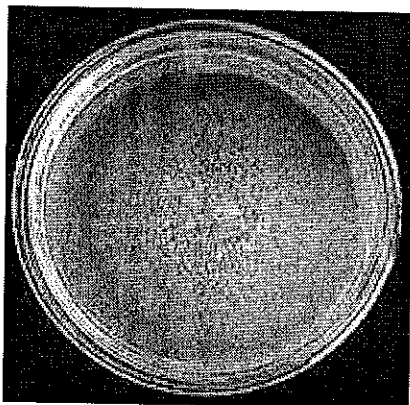


Figura 3. Crecimiento sobre PDA de *Fop* f. sp. *phaseoli* obtenido de raíces de plantas de frijol común con síntomas de Fusariosis.

La identificación de las estructuras reproductivas de *Fop* se realizó en un microscopio compuesto a 40X en donde fue posible observar macroconidios finos, alargados puntiagudos, pared delgada; así como la presencia de microconidios (Figura 4). Con estas características, fue posible determinar que el hongo patógeno aislado de raíces de plantas de frijol, correspondía a *Fop* f. sp. *phaseoli* de acuerdo a la descripción dada por Snyder y Hansen (citados por Romero, 1993).

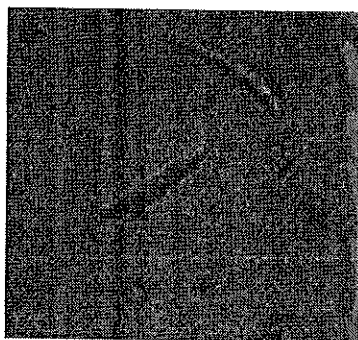


Figura 4. Estructuras propagativas micro y macroconidios de *Fop* f. sp. *phaseoli* observadas en microscopio compuesto (40X).

5.3 Fase 3 Análisis moleculares

5.3.1 Selección de iniciadores

Al observar en el gel las diferentes amplificaciones de DNA de la variedad Bayo realizadas con las 20 secuencias citadas en el Cuadro 5, se consideró conveniente utilizar para los análisis planteados los iniciadores 01, 04 y 13 de la serie ROTH A; ya que fueron los que mostraron mejores resultados sobre el genotipo evaluado (Figura 5).

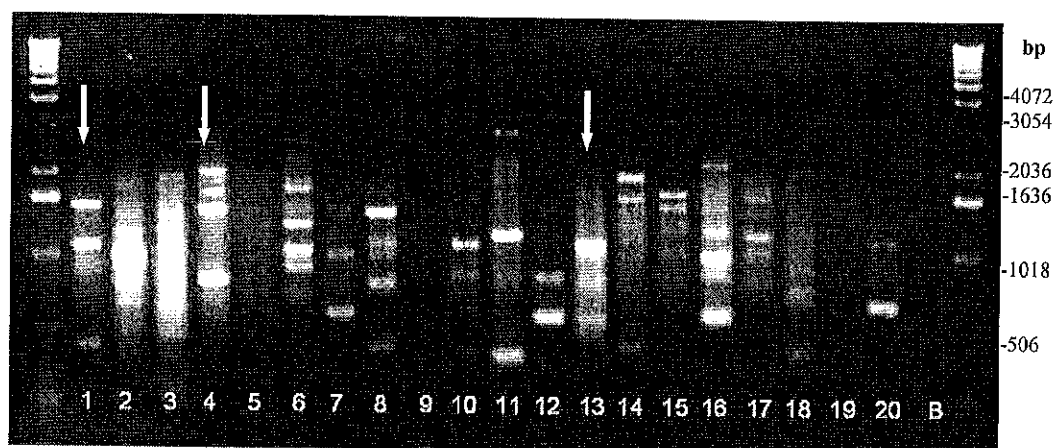


Figura 5. Huellas de DNA tipo DAF de la variedad Bayo obtenidas con 20 iniciadores de la serie A de ROTH. B representa la muestra blanco. Los iniciadores seleccionados para los análisis definitivos se señalan con flechas. El marcador de peso molecular 1 kb se ubica en los extremos.

5.3.2 Estandarización de las condiciones de reacción para DAF en DNA de frijol

5.3.2.1 Estandarización de DNA

La cantidad óptima de DNA de frijol de acuerdo a la calidad de bandas amplificadas DAF con los iniciadores A-03 y A-16, indicó que el uso desde 10 ng hasta 40 ng de

DNA es aceptable para trabajar con las especies *P. vulgaris* y *P. acutifolius*. Para los análisis posteriores de la presente investigación se seleccionó la cantidad de 25 ng de DNA por reacción. Las amplificaciones respectivas para esta estandarización se muestran en la Figura 6.

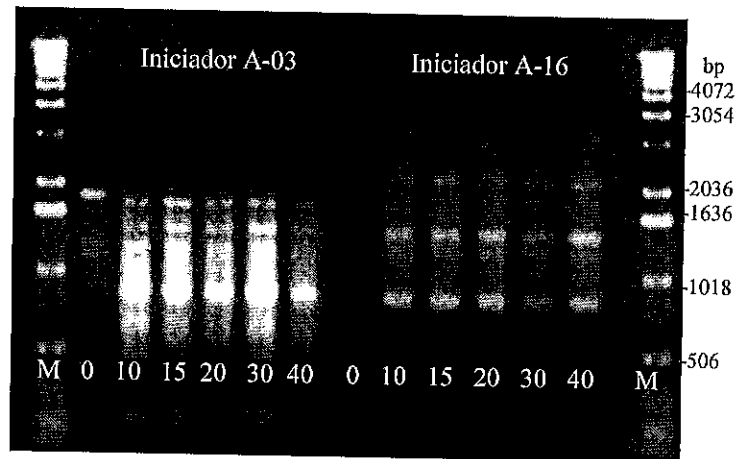


Figura 6. Huellas de DNA tipo DAF en gel de agarosa al 1.2% con diferentes concentraciones de DNA (0, 10, 15, 20, 30 y 40 ng por reacción) de la variedad Bayo y los iniciadores A-03 y A-16 de ROTH. M es el marcador de peso molecular 1kb.

5.3.2.2 Estandarización de $MgCl_2$

Las muestras de DNA de frijol Bayo amplificadas con DAF-PCR (25 ng por reacción) con los iniciadores A-03 y A-16 de ROTH y diferentes concentraciones de $MgCl_2$, indicaron que la cantidad óptima de $MgCl_2$ fue de 2 Mm. Esta concentración se dedujo de la calidad de las bandas de DNA amplificadas con ambos iniciadores.

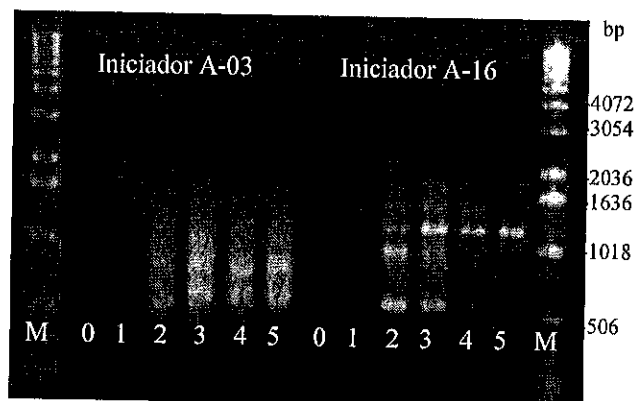


Figura 7. Huellas de DNA tipo DAF en gel de agarosa 1.2% con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1, 2, 3, 4 y 5 mM) con los iniciadores A-03 y A-16. de la variedad Bayo. M es el marcador de peso molecular 1kb.

5.3.2.3 Estandarización de *Taq* DNA polimerasa

Para la estandarización de la cantidad óptima de *Taq* DNA polimerasa, se consideraron amplificaciones con 25 ng de DNA de frijol Bayo, 1mM y 2 mM de $MgCl_2$ y el iniciador A-16, el cual presentó mejores resultados en la evaluación anterior. De acuerdo a los resultados del gel se decidió utilizar 2 mM de $MgCl_2$ y se consideró que una unidad de la enzima era suficiente; sin embargo, 1.5 U también mostró buenos resultados; no obstante, con la finalidad de optimizar la cantidad de *Taq* DNA polimerasa, puesto que es uno de los reactivos más costosos utilizados en PCR, se optó por utilizar para el resto de los análisis 1 U de enzima por reacción. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.

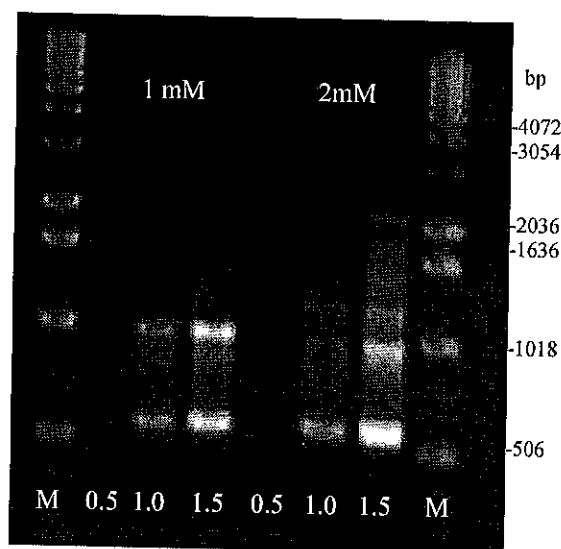


Figura 8. Huellas de DNA tipo DAF en gel de agarosa al 1.2% con 25 ng de DNA de la variedad Bayo con el iniciador A-16, dos concentraciones de $MgCl_2$ (1 y 2 mM) y 0.5, 1.0 y 1.5 U. de enzima. M es el marcador de peso molecular 1kb.

De acuerdo a la estandarización de las cantidades óptimas a utilizar en DAF para frijol se concluyó utilizar 25 ng de DNA, 2 mM de $MgCl_2$ y 1 Unidad de *Taq* DNA polimerasa, tal como se indicó en cada uno de los tres geles de las figuras anteriores.

5.3.3 Análisis con la técnica DAF-PCR

5.3.3.1 Evaluación de la variabilidad genómica de progenitores

5.3.3.1.1 Gel de calidad

El DNA obtenido de las plantas de los progenitores se observó en el gel de agarosa como una banda de alto peso molecular definida y compacta. La calidad observada en el gel se consideró como aceptable ya que no se apreció en ningún caso fragmentación marcada de la molécula (Figura 9).

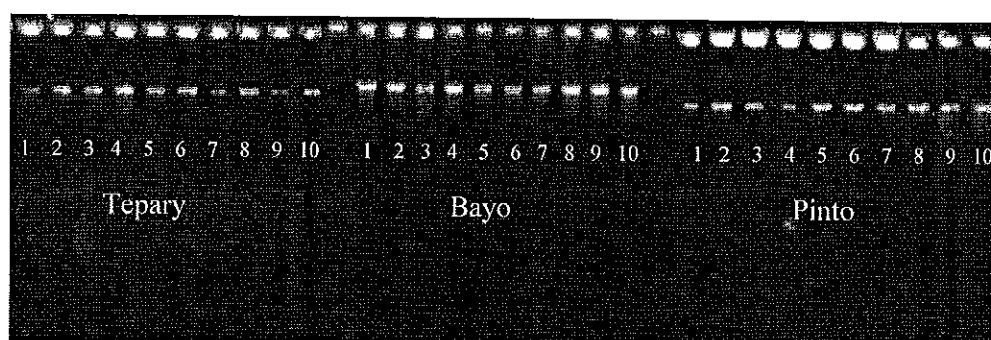


Figura 9. DNA de alto peso molecular en gel de agarosa al 0.8% para variabilidad de 10 plantas representantes de los progenitores.

5.3.3.1.2 Análisis genómico

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la estandarización de las concentraciones óptimas de DNA, $MgCl_2$ y *Taq* DNA Polimerasa, así como los iniciadores seleccionados; se procedió al análisis genómico de las diferentes variedades de frijol referidas en el capítulo 4.1.1.

Previo a la realización de las cruzas se analizó la variabilidad genómica de cada progenitor mediante huellas de DNA con la finalidad de detectar el grado de variación intrapoblacional. Los resultados que se obtuvieron indicaron una estabilidad genómica alta; es decir, con nula o mínima variabilidad entre las 10 plantas analizadas de cada progenitor. Es posible que este comportamiento se deba al alto nivel de endogamia característica del género *Phaseolus*. La nula variabilidad se presentó principalmente en los genotipos de Pinto americano y Bayo blanco; pero la variedad Tepary presentó diferencias entre los genotipos posiblemente a que es una forma silvestre que ha sido mejorada sólo por selección. En la Figura 10 se muestran los perfiles de DNA separados en geles de agarosa obtenidos con DAF de las 30 muestras representantes de los tres

progenitores; como puede observarse, los perfiles de las variedades Bayo blanco y Pinto americano prácticamente se mantienen homogéneos, aunque en algunos carriles de estas variedades no es muy clara esta conclusión; la diferencia se debió muy probablemente a un error de pipeteo durante la carga de las muestras en el gel (datos corroborados al contrastar la imagen en la computadora), sin embargo, la variedad Tepary mostró variabilidad genómica de acuerdo a los perfiles detectados con los iniciadores utilizados.

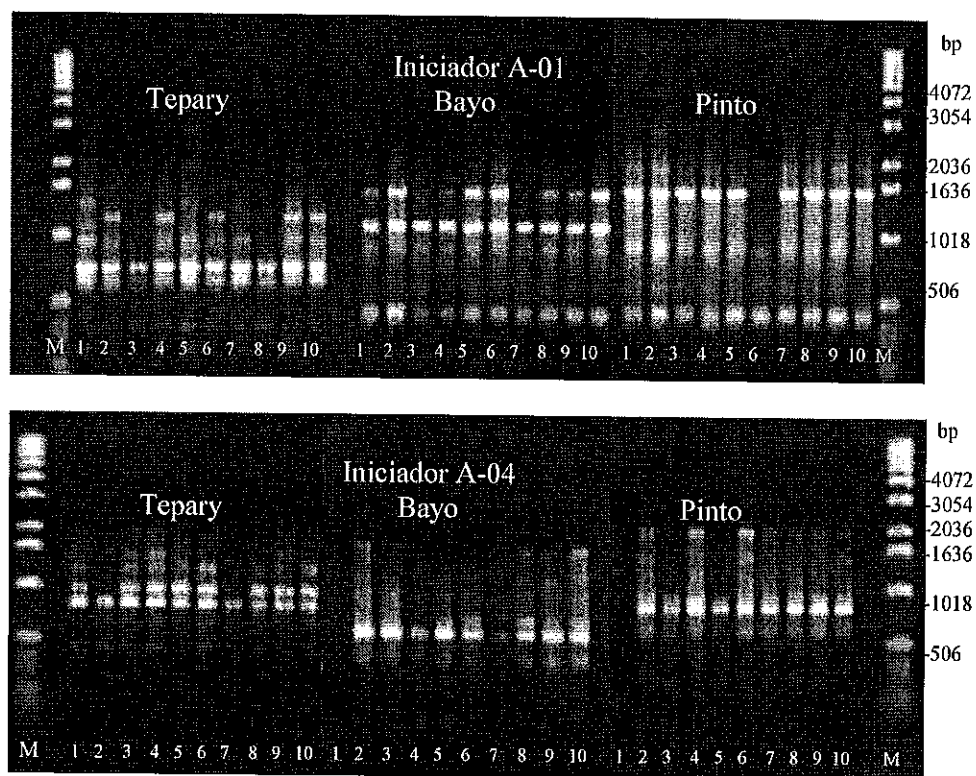


Figura 10. Perfiles de DNA tipo DAF en gel de agarosa 1.2% para variabilidad de 10 plantas de las variedades Tepary, Bayo y Pinto obtenidas con los iniciadores A-01 y A-04 de la serie ROTH. M es el marcador de peso molecular 1kb.

5.3.3.2 Análisis genómico de la progenie F1

5.3.3.2.1 Gel de calidad

Para estimar la calidad del DNA se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. El DNA se observó como una banda de alto peso molecular definida y compacta que corresponde al DNA de las muestras compuestas del análisis de progenitores y progenie F1. La calidad observada fue aceptable ya que en el gel no hubo presencia de barridos, lo cual indica que la molécula no estaba fragmentada (Figura 11).

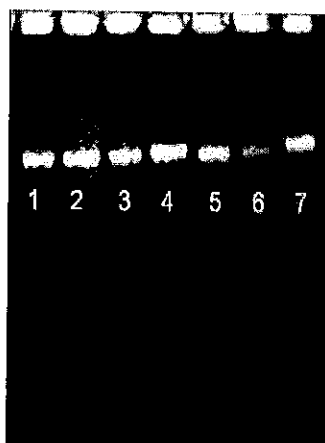


Figura 11. DNA de alto peso molecular en gel de agarosa al 0.8% para el análisis de progenitores y plantas F1. Tepary (T) (carril 1), Bayo (B) (carril 2), Pinto (P) (carril 3), T♀ x P♂ (a) (carril 4), T♀ x P♂ (b) (carril 5), P♀ x B♂ (a) (carril 6) y P♀ x B♂ (b) (carril 7).

5.3.3.2.2 Análisis genómico

El objetivo de este análisis fue demostrar mediante huellas de DNA obtenidas con DAF y separadas en geles de acrilamida al 5%, que los híbridos F1 contenían material genético de los progenitores utilizados en las cruza respectivas; para lo cual se realizó una comparación de las huellas de cada progenitor con la cruza respectiva. Para el caso de los progenitores, como ya se mencionó, se utilizó una “mezcla de DNA” que contenía DNA de las 10 plantas consideradas, mientras que para la progenie F1 se utilizó también una mezcla del DNA de todas las plantas F1 obtenidas en cada cruzamiento (las cuales fueron 3, 2, 2 y 5 semillas F1 de cada cruzamiento).

En la Figura 12 por ejemplo, en la cruza de T♀ x P♂ (b) (carril 5 en la figura de la izquierda) aparecen dos bandas nuevas; esto se debe posiblemente a una nueva combinación genética debido a la cruza. En las cruza (a) y (b) de P♀ x B♂ (carriles 6 y 7 en la misma figura izquierda) puede observarse una banda completamente definida heredada del Bayo (carril 2); todas las bandas referidas se encuentran señaladas con una flecha. En los geles con los iniciadores 04 y 13 no se observaron bandas claras que fueran heredadas a la progenie F1 de sus respectivos progenitores (Figura 12).

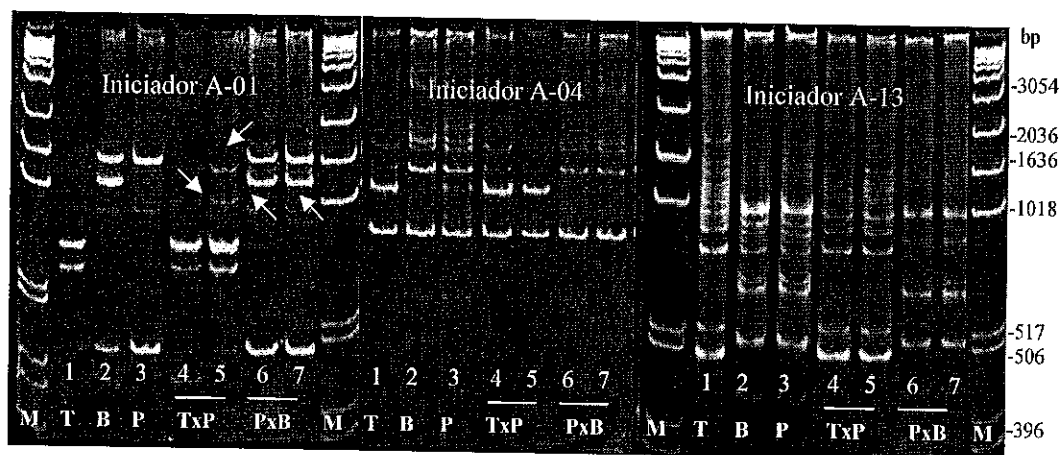


Figura 12. Huellas de DNA tipo DAF en gel de acrilamida 5% de progenitores y plantas F1 con los iniciadores A-01, A-04 y A-13. Tepary (T) (carril 1), Bayo (B) (carril 2), Pinto (P) (carril 3), T♀ x P♂ (a) (carril 4), T♀ x P♂ (b) (carril 5), P♀ x B♂ (a) (carril 6) y P♀ x B♂ (b) (carril 7). El marcador de peso molecular se ubica en los extremos.

El dendrograma se construyó con el programa NTSYS pc 2.0 utilizando el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento del promedio (UPGMA). Contiene seis grupos conformados a partir de 161 datos moleculares que provienen del análisis de tres iniciadores A-01, A-04 y A-13. Con un porcentaje de similitud de 63 a 82 se conforman dos grupos, el primero de ellos contiene al progenitor Tepary y dos cruza TxPa y TxPb y el segundo a los progenitores Bayo y Pinto más las cruza PxBa y PxBb. Todos los genotipos se asocian a una similitud del 27 % lo que significa que presentan bandas en común. Con una similitud del 94 % se conforman cuatro grupos el primero contiene al progenitor Tepary y a la cruza TxPa, significando que el 94 % de las bandas estudiadas son las mismas en ambos, el segundo contiene sólo a la cruza TxPb, lo que significa una menor relación, asociándose a un 92 % de similitud de bandas, el tercero contiene a los progenitores Bayo y Pinto y el cuarto a las cruza PxBa y PxBb. Con una similitud del 100% se conforman 6 grupos el primero contiene al progenitor Tepary, el segundo a la cruza TxPa, el tercero a la cruza TxPb, el cuarto al progenitor Bayo, el quinto al progenitor Pinto y el sexto a las cruza PxBa y PxBb lo que significa que sus bandas son 100 % similares en número y tamaño (Figura 13).

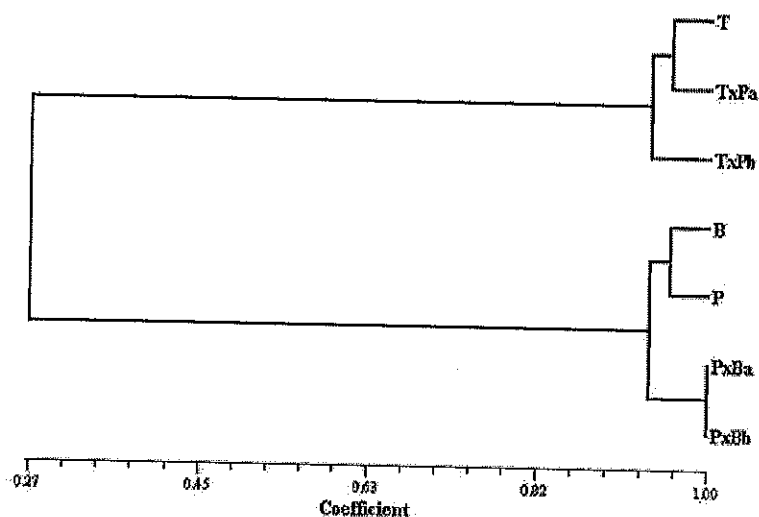


Figura 13. Relación genómica de huellas tipo DAF de progenitores y plantas F1, con los iniciadores A-01, A-04 y A-13. Tepary (T), Bayo (B), Pinto (P), T♀ x P♂ (a), T♀ x P♂ (b), P♀ x B♂ (a) y P♀ x B♂ (b).

5.3.3.3 Análisis genómico de plantas susceptibles y plantas resistentes a *Fop* f. sp. *phaseoli*

5.3.3.3.1 Gel de calidad

El DNA obtenido a partir de las plantas susceptibles y resistentes a *Fop* fue en cantidad y calidad adecuadas como se puede apreciar en la Figura 14. Nótese una banda de alto peso molecular definida, compacta y sin barrido en cada uno de los carriles, que corresponden tanto a las plantas de progenitores y progenie F2 expuestas a *Fop*.

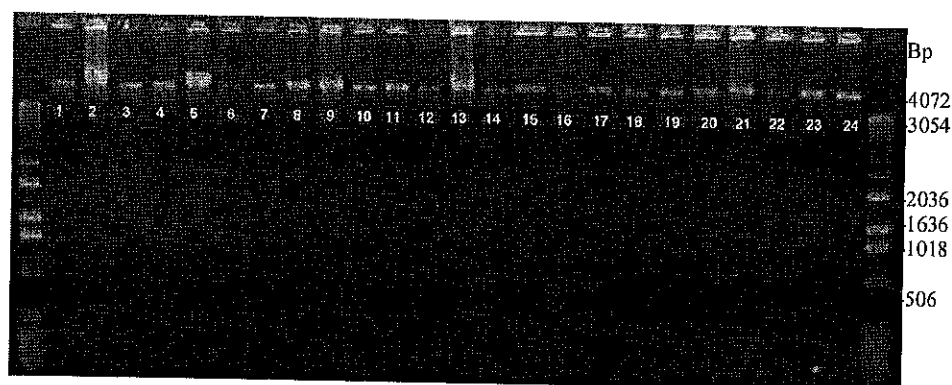


Figura 14. DNA de alto peso molecular en gel de agarosa 0.8% de plantas susceptibles y resistentes a *Fop*. El significado completo y la abreviación de las 24 muestras se encuentran en el cuadro 7. El marcador de peso molecular 1kb se ubica en los extremos.

5.3.3.2 Análisis genómico

El análisis DAF en este tipo de plantas fue realizado con los iniciadores A-01, A-04 y A-13. La mezcla de reacción de los carriles donde no se observaron bandas fue preparada nuevamente sin obtener resultado por lo que se concluyó que los iniciadores no reconocieron ninguna parte del genoma en esas muestras (carriles 7 y 10 del iniciador A-01, carriles 4 y 14 del iniciador A-04 y carril 15 del iniciador A-13), o probablemente algunos de los componentes de la reacción estuvo dañado.

El iniciador A-01 detectó un polimorfismo en el carril 4, el cual esta presente en el progenitor resistente Tepary. En los carriles 15, 16, 17 y 18 que corresponden a la cruza 1 (a) de $P\varnothing \times B\sigma^{\uparrow}$ (planta 1 susceptible, planta1 resistente, planta 2 susceptible y planta 2 resistente respectivamente), se detectaron dos bandas polimórficas en los carriles 16 y 18 (marcadas con flechas) que también están asociadas a plantas resistentes y son quizá polimorfismos nuevos que aparecen debido a la combinación genética, que no están presentes en los progenitores pero que sin embargo también indican resistencia. En los carriles 15 y 17 que corresponden a las plantas susceptibles, se detectó un polimorfismo resaltado también con flecha el cual es también un polimorfismo nuevo que no esta presente en los progenitores.

El iniciador A-04 no detectó ningún polimorfismo asociado con las características de resistencia o susceptibilidad; pero el iniciador A-13 detectó cinco polimorfismos que corresponden a plantas resistentes a *Fop* del progenitor Tepary en el carril 4 (cuatro de ellos señalados con una línea y uno con una flecha). Si se comparan los carriles 5 y 6 que corresponden la planta susceptible y resistente respectivamente del progenitor Pinto, se pueden observar en el carril 6 dos polimorfismos marcados con flechas que están asociados a la planta resistente. En los carriles del 7 al 14 que contienen las muestras de las cruza de $T\varnothing \times P\sigma^{\uparrow}$, se observan los cuatro polimorfismos superiores marcados con líneas asociados a plantas resistentes de dicha cruza (son los mismos polimorfismos heredados de la planta resistente del progenitor Tepary del carril 4). En los carriles 15, 16, 17 y 18 que corresponden a la cruza de $P\varnothing \times B\sigma^{\uparrow}$ (a) (planta 1 susceptible, planta 1 resistente, planta 2 susceptible y planta 2 resistente respectivamente) se encuentra un polimorfismo en los carriles 16 y 18 indicando resistencia señalados con flechas los cuales al parecer son el mismo polimorfismo superior indicando resistencia en el

progenitor Pinto (indicado en el carril 6). Sólo los polimorfismos anteriormente señalados fueron encontrados indicando susceptibilidad o resistencia tanto en los progenitores como en la progenie F2 (Figura 15).

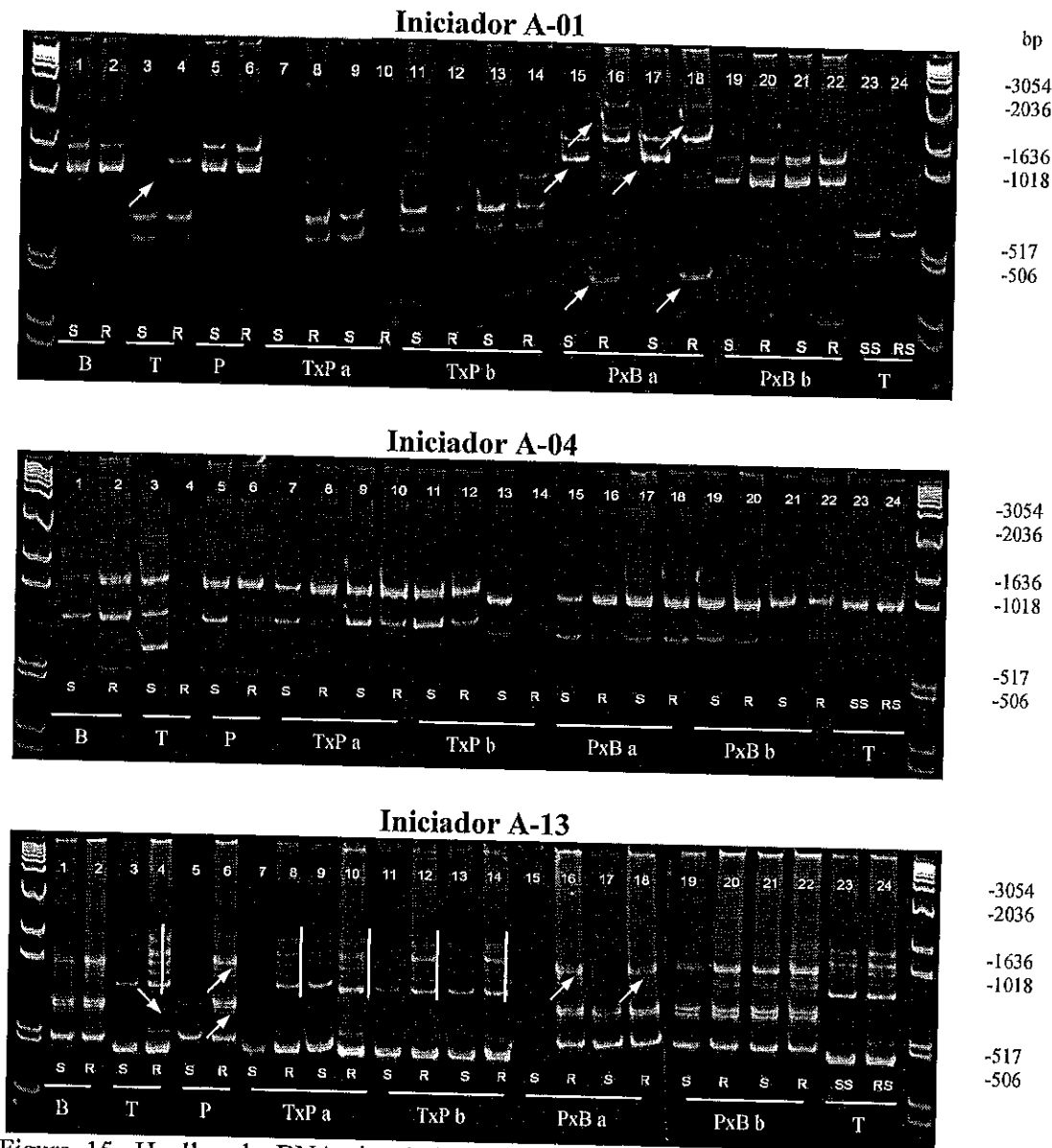


Figura 15. Huellas de DNA tipo DAF en gel de acrilamida 5% de plantas susceptibles y resistentes de progenitores y plantas F2 con los iniciadores A-01, A-04 y A-13. El marcador de peso molecular 1kb se ubica en los extremos. El significado completo y la abreviación de las 24 muestras se encuentran en el cuadro 7.

Con una similaridad del 58 % se conforman dos grupos, el primero contiene a los progenitores Pinto y Bayo susceptibles y resistentes a *Fop* y a todas las cruas Px B susceptibles y resistentes, el segundo contiene al progenitor Tepary susceptible y

resistente y a todas las cruzas TxP indicando la poca relación con el progenitor Pinto asociándose con este a una similaridad del 45 %, y contiene también a los genotipos 23 y 24 correspondientes a Tepary susceptible a sequía y resistente a sequía respectivamente. Con una similaridad del 79 % se conforman cuatro grupos el primero contiene a los progenitores Pinto y Bayo susceptibles y resistentes y a las cruzas PxB exceptuando a las cruzas 16 y 18 correspondientes a PxB resistentes, indicando la existencia de algún polimorfismo de resistencia, el tercer grupo contiene al progenitor Tepary susceptible y a las cruzas TxP susceptibles, indicando la existencia de polimorfismos indicando susceptibilidad o simplemente conformación de un genoma diferente y el cuarto contiene al progenitor Tepary resistente, a todas las cruzas TxP resistentes indicando la presencia de polimorfismos ligados a resistencia.

Con una similaridad del 91 % se conforman nueve grupos el primero contiene a los progenitores Bayo susceptible, Pinto resistente, Bayo resistente y a las cruzas PxB susceptible y PxB resistente (1, 6, 19, 20, 21, 22, 2), el segundo contiene al progenitor Pinto susceptible (5), el tercero agrupa a las cruzas PxB susceptibles (15 y 17), indicando algún polimorfismo de susceptibilidad, el cuarto a las cruzas PxB resistentes, indicando algún polimorfismo de resistencia, el quinto contiene al progenitor Tepary susceptible y a las cruzas TxP susceptibles (3, 9, 11, 13), indicando sólo polimorfismos comunes al genoma, el sexto contiene a la craza TxP susceptible indicando que es diferente, ya que no presenta bandas con el iniciador A-01, el séptimo contiene al progenitor Tepary resistente y a la craza TxP resistente (4, 14), indicando la existencia de algún polimorfismo de resistencia, el octavo contiene a la craza TxP resistente y a los progenitores Tepary susceptible y resistente a sequía (8, 23, 24) y el noveno contiene a las cruzas TxP resistentes (10,12) (Figura 16).

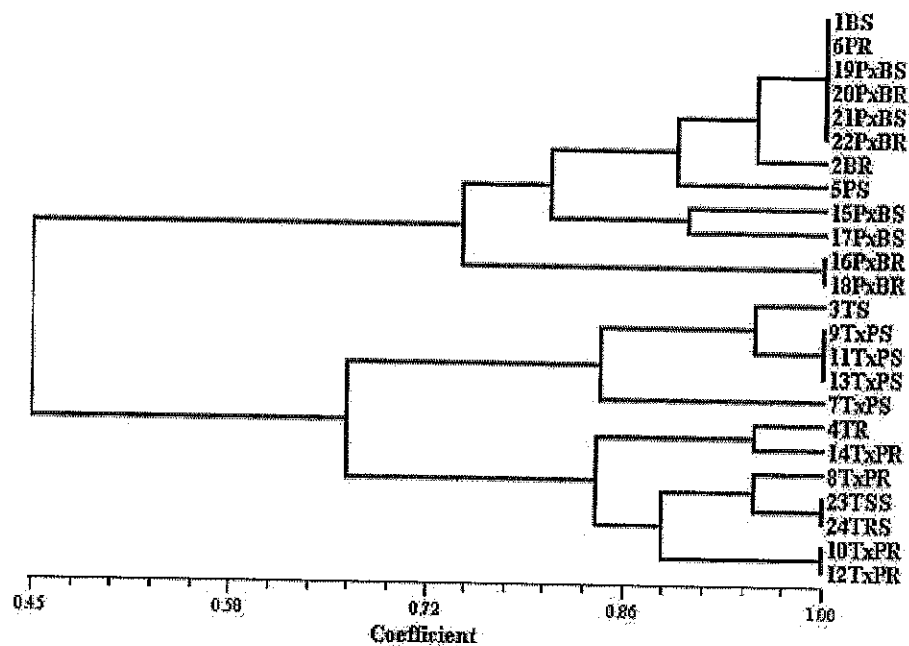


Figura 16. Relación genómica huellas tipo DAF de plantas susceptibles y resistentes de progenitores y plantas F2 con los iniciadores A-01, A-04 y A-13. El significado completo y la abreviación de las 24 muestras se encuentran en el cuadro 7.

Con el iniciador A-01 en el genotipo 4 (TR) se encontró un polimorfismo de aproximadamente 1327 bp indicando resistencia, sin embargo no está presente en ninguno de sus descendientes F2 por lo que posiblemente es conformación común del genoma de dicho genotipo. Encontramos también dos polimorfismos en los genotipos 16 y 18 de aproximadamente 500 y 2040 bp indicando resistencia los cuales no aparecen en sus respectivos progenitores ni en la craza PxBb, lo que significa que son polimorfismos potenciales indicando resistencia a *Fop* para la combinación genética dada en dicha craza (PxBa). En esta misma craza en los genotipos 15 y 17 encontramos un polimorfismo de aproximadamente 1636 bp indicando susceptibilidad, más sin embargo esta también presente en sus progenitores correspondientes susceptibles y resistentes por lo que sólo se considera conformación del genoma. Con el iniciador A-13 en el genotipo 4 (TR) se encontraron cinco polimorfismos de aproximadamente 517, 1010, 1015, 1020 y 1636 bp indicando resistencia y posiblemente son polimorfismos potenciales indicando resistencia a *Fop*, ya que también están presentes en todas las cruza TxPa y TxPb resistentes (genotipos 8, 10, 12, y 14), excepto el polimorfismo de 517 bp el cual se consideró sólo como un polimorfismo más del genoma.

En el genotipo 6 (PR) se encuentran dos polimorfismos de aproximadamente 767 y 1018 bp indicando resistencia. El polimorfismo de 767 no se encuentra en ninguno de los descendientes de PR por lo que se consideró como un polimorfismo común del genoma de dicho genotipo. El polimorfismo de 1018 bp se encontró también en los genotipos 16 y 18 (PxBa resistentes), por lo que se consideró como un polimorfismo potencial para resistencia a *Fop* (Cuadro 9).

Cuadro 9. Polimorfismos y pesos moleculares indicando susceptibilidad o resistencia a *Fop*.

No.	Genotipo	Iniciador A-01		Iniciador A-04		Iniciador A-13	
		Marcador distintivo en plantas resistentes	Marcador distintivo en plantas susceptibles	Marcador distintivo en plantas resistentes	Marcador distintivo en plantas susceptibles	Marcador distintivo en plantas resistentes	Marcador distintivo en plantas susceptibles
1	B S	-	-	-	-	-	-
2	B R	-	-	-	-	-	-
3	T S	-	-	-	-	-	-
4	T R	1327	-	-	-	517 1010 1015 1020 1636	-
5	P S	-	-	-	-	-	-
6	P R	-	-	-	-	767 1018	-
7	TxP S	-	-	-	-	-	-
8	TxP R	-	-	-	-	1010 1015 1020 1636	-
9	TxP S	-	-	-	-	-	-
10	TxP R	-	-	-	-	1010 1015 1020 1636	-
11	TxP S	-	-	-	-	-	-
12	TxP R	-	-	-	-	1010 1015 1020 1636	-
13	TxP S	-	-	-	-	-	-
14	TxP R	-	-	-	-	1010 1015 1020 1636	-
15	PxB S	-	1636	-	-	-	-
16	PxB R	500 2040	-	-	-	1018	-
17	PxB S	-	1636	-	-	-	-
18	PxB R	500 2040	-	-	-	1018	-
19	PxB S	-	-	-	-	-	-
20	PxB R	-	-	-	-	-	-
21	PxB S	-	-	-	-	-	-
22	PxB R	-	-	-	-	-	-
23	T SS	-	-	-	-	-	-
24	T RS	-	-	-	-	-	-

6. DISCUSIÓN

Los iniciadores primeramente seleccionados mostraron buen número de bandas y de buena resolución quizá debido a que en la mezcla de reacción se utilizó una muestra compuesta de DNA. Pero como en los análisis de variabilidad a progenitores y análisis genómico de progenitores y F2 de plantas susceptibles y resistentes a *Fop* f. sp. *phaseoli* se utilizaron muestras simples, fueron eliminados la mayoría de estos iniciadores por no presentar buen número y resolución de bandas quedando sólo los iniciadores 01, 04 y 13.

Los resultados en el análisis de variabilidad a progenitores indican que fue posible detectar varios grupos genómicos en un mismo progenitor (Tepary), coincidiendo con Williams *et. al.* (1990) que señala que los marcadores moleculares basados en DNA han incrementado el potencial para detectar y medir la variabilidad entre individuos, estos marcadores son casi ilimitados en número y no son afectados por el medio ambiente.

En los resultados obtenidos en el análisis genómico de los progenitores y progenie F1 fue posible detectar polimorfismos nuevos en la progenie F1 de T♀ x P♂ y polimorfismos heredados de la variedad Bayo a la progenie de P♀ x B♂, siendo resultados satisfactorios, ya que se demuestra que las cruas o combinación genética se realizaron.

Los resultados del análisis genómico de progenitores y progenie F2 de plantas susceptibles y resistentes a *Fop* f. sp. *phaseoli* indican que fue posible encontrar polimorfismos ligados a resistencia heredados de los progenitores resistentes a sus respectivas progenies (Figura 15 con el iniciador 13); así como polimorfismos nuevos que aparecen quizá debido a la combinación genética, que no están presentes en los progenitores pero que sin embargo también indican resistencia o susceptibilidad (Figura 15 con el iniciador 01). Estos resultados indican que es posible detectar polimorfismos relacionados con resistencia o susceptibilidad a *Fop* f. sp. *phaseoli* y que se presentan buena cantidad de polimorfismos coincidiendo con Michelmores *et. al.* (1991) Señalando que una población F2 provee mayor amplitud genética de la región a ser detectada que una población derivada de un retrocruce, y que todos los ligamientos así detectados deben ser confirmados por el análisis de poblaciones segregantes, el método del BSA conducido con un pequeño número de individuos por grupo todavía podría ayudar a

detectar marcadores ligados a los genes que se desea detectar. Estos resultados están de acuerdo también con el reporte de Beebe y Pedraza (1998) quienes señalan al frijol como un cultivo atractivo para marcar genes de resistencia ya que exhiben bastante polimorfismo para estudios de DNA.

Los polimorfismos potenciales encontrados indicando resistencia a *Fop* con el iniciador A-01 fueron los de aproximadamente 500 y 2040 bp en las cruas PxB (líneas 16 y 18). Con el iniciador A-13 se encontraron polimorfismos también indicando resistencia los cuales fueron de aproximadamente 1010, 1015, 1020 y 1636 bp presentes en las líneas 4, 8, 10, 12 y 14 (TR, TxPa R, TxPa R, TxPb R, y TxPb R), y también el polimorfismo de 1018 bp encontrado en las líneas 6, 16 y 18 (PR, PxBa R y PxBa R).

De acuerdo a los resultados y en función tanto de las huellas polimórficas distintivas asociadas a resistencia o susceptibilidad en los materiales bajo estudio, así como del esquema de cruzamiento y evaluación de las plantas expuestas al patógeno; pudiera ser que los polimorfismos referidos, estén asociados a los caracteres mencionados; sin embargo, esta información deberá ser corroborada mediante evaluaciones similares en otros esquemas de cruzamiento en donde se involucren progenitores con niveles de resistencia o susceptibilidad equivalentes para el mismo patógeno. De manera que los análisis que se hagan en estas nuevas poblaciones, permitirán descartar si los polimorfismos encontrados en la presente investigación están o no asociados los caracteres de interés (resistencia o susceptibilidad a *Fop*), o solamente son polimorfismos que hacen referencia a otras conformaciones del genoma detectadas por los iniciadores utilizados.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados y a la discusión de los mismos se llegó a las siguientes conclusiones: 1) La identificación morfológica de *Fop* fue posible gracias a la descripción hecha por Smith y Dunez (1992) y Snyder y Hansen. 2) La selección de iniciadores y la estandarización de DNA, Mg Cl₂, y *Taq* DNA polimerasa se llevó a cabo satisfactoriamente aunque no es el método más recomendado debido a que pudiera haberse establecido un experimento factorial con los tres factores a estandarizar, dando buenos resultados en los análisis siguientes. 3) El análisis de variabilidad a progenitores permitió diferenciar varios grupos genómicos en un mismo progenitor corroborando así la variación dentro de la misma variedad (Tepary). 4) El análisis genómico de los progenitores y la progenie F1 permitió comprobar la combinación genética dada durante las cruas con la detección de polimorfismos encontrados en la progenie F1 heredados de ambos de sus dos progenitores correspondientes. 5) Con el análisis genómico de progenitores y progenie F2 de plantas susceptibles y resistentes a *Fop* f. sp. *phaseoli* fue posible encontrar polimorfismos asociados a resistencia o susceptibilidad tanto en los progenitores como en las progenies F2, siendo heredados de los progenitores o bien siendo polimorfismos nuevos debido quizá a la combinación genética.

8. LITERATURA CITADA

- ABAWI, G. S., and PASTOR-CORRALES, M. A. 1990.** Root rots of beans in Latin America, Research, Methodologies and Management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia pp. 7-12.
- ABAWI, G. S., PROVIDENTI, R., CROSIER, D. C., and HUNTER J. E. 1978.** Inheritance of resistance to white mold disease in *Phaseolus coccineus*. Heredity 6: 200-202.
- ACEVES, R. J. J. 1988.** El cultivo del frijol en México. In: Antracnosis del frijol común en América Latina. Reunión de Trabajo. Cali Colombia. pp. 14.
- ACEVES, R. J. J. 1989.** Enfermedades del frijol en México. Enfermedades del maíz, frijol, trigo y papa. Centro de Fitopatología Colegio de Postgraduados. México. 84 pp.
- ACOSTA G. J. A. y ROSALES S. R. 1998.** Nuevas alternativas para producir frijol en el Estado de México. Demostración de tecnologías agrícolas. INIFAP-SAGAR. No. 17: 15-16.
- ACOSTA G. J. A., ROSALES S. R. y ALVARADO M. S. 1998.** Tecnología de producción de frijol para el Estado de México. INIFAP-SAGAR. Desplegable Técnica No. 1 Estado de México.
- ACOSTA G. J. A., and WHITE, J. W. 1995.** Phenological plasticity as an adaptation y common bean to ranfed environments. Crop Sci. 35: 199-204.
- ADAM-BLONDON, A. F. SEVIGNAC, M., DRON, M., and BANNEROT, H. 1994.** A genetic map of common bean to localize specific resistance genes against anthracnose. Genome. 37: 915-924.
- ADAMS, M. W., KELLY, J. D., and SAETTLER, A. W. 1988.** A gene for resistance to common bligth (Xcp). Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, No. 31: 73-74.
- AGRIOS, N.G. 1995.** Fitopatología. Segunda edición. Editorial UTEHA. México, D. F. pp. 838.
- ANOLLES, G. C., BASSAM, B. J., and GRESSHOFF P. M. 1991.** DNA Amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 6:553-557 and Crop Sci. 45:772-777.
- ANOLLES, G. C., SCHLARBAUM S. E., and TRIGIANO R. N. 1999.** DNA amplification fingerprinting and marker screening for pseudo-testcross snapping of flowering dogwood (*Cornus florida* L.). Euphytica 106:209-222.
- ARMSTRONG, G. M., and ARMSTRONG, J. K. 1963.** Fusarium wilt of bean in South Carolina and some host relations of the bean Fusarium. Plant Dis. Rep. 47: 1088-1091.
- BALARDIN, R. S., JAROSZ A. M., and KELLY J. D. 1997.** Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemutianum* from South, Central y North America. Phytopathology 87: 1184-1191.

- BECKMAN, C. H., ELGERSMA, D. M., and MAC HARDY, W. E. 1972.** The localization of fusarial infections in the vascular tissue of single-dominant-gene resistant tomatoes. *Phytopathology* 62:1256-1260.
- BEEBE, S., and PASTOR-CORRALES, M. 1991.** Breeding for disease resistance. In: Van Schoonhoven, A. and Voysest, O. (eds.). 1991. common beans research for crop improvement. CIAT, CAB. Cali, Colombia.
- BEEBE, S. y PEDRAZA, F. 1998.** Perspectivas para el uso de marcadores moleculares. in: Lépiz-Ildefonso, R. (ed.). 1998. Taller internacional de mejoramiento genético de frijol negro mesoamericano. Memoria PROFRIJOL, Veracruz, México.
- BLAKEMAN, J.P., and WILLIAMSON, B. 1994.** Ecology of plant pathogens. CAB International. pp. 42-45.
- BUNYAMIN TAR'AN, THOMAS E. M., and PAULS, K. P. 2002.** Genetic mapping of agronomic traits in common bean. *Crop Sci.* 42: 544-556.
- CAMPOS, A. J. 1991.** Enfermedades del frijol. Ed. Trillas. México. pp. 154-167.
- CENTRO PARA NUESTRO FUTURO COMÚN. 1993.** Cumbre para la tierra. Programa el cambio. El programa 21 y los demás acuerdos de Río de Janeiro. Ginebra, Suiza. 70 p.
- CIAT. 1996.** Bean program annual report. Working document No. 161. CIAT, Cali Colombia. 298 p.
- CIAT. 1985.** Frijol: Investigación y Producción. Referencia de los cursos de capacitación sobre frijol dictados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT, Cali Colombia. 417 p.
- CIAT. 1987.** Standard system for the evaluation of bean germplasm. CIAT, Cali, Colombia. 2 pp. In press.
- COYNE, D. P., and SCHUSTER, M. L. 1975.** Genetic and breeding strategy for resistance to rust [*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint] in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*. 24: 794-803.
- CRUZ, B. P. B., TERANISHI, J., ISSA, E., BERNARDI, J. B., and ARRUDA, H. V. 1974.** Resistencia cultivares de feijão-avagem a murcha de *Fusarium*. *O Biológico*. 40:25-32. Sao Paulo, Brazil.
- CUELLAR, E. I. 1999.** Transferencia de tecnología y producción de semilla de frijol en Durango. In: Lépiz-Ildefonso R. (ed.). 1999. producción de semilla de frijol en Centro América. Experiencias y planteamientos para el futuro. Memoria taller regional de semillas. PROFRIJOL/PITA- Frijol. San José, Costa Rica. 148 p.
- DE LA GARZA, G. J. L. 1996.** Fitopatología General. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey Nuevo León. pp. 515.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J., and HICKS, J. B. 1983.** A plant DNA miniprep. Versión II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.

- DIAZ, P. R. y TELIZ, O. D. 1991.** Evaluación de la interacción sequía-patógeno en frijol. XVIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Puebla, Méx. (Resumen) pp:115.
- DIAZ, F. A. 1993.** Enfermedades infecciosas de los cultivos. Ed. Trillas. México. pp. 60-61.
- DICKINSON, C. H. y LUCAS, J. A. 1997.** Patología vegetal y patógenos de plantas. Editorial Limusa. México. pp. 229-275.
- ESCALANTE, E. J. E. y KOHASHI-SHIBATA, J. 1993.** El rendimiento y crecimiento del frijol, manual para la toma de datos. Primera edición. Colegio de Postgraduados. Texcoco México. pp. 84.
- FALEIRO, F. G. 1997.** Identificacao de racas, diversidade genetica de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e heranca da resistencia no feijoeiro. M. S. Thesis Federal University of Vicosa, Vicosa, MG Brazil.
- FINKE, M. L., COYNE, D. P., and STEADMAN, J. R. 1986.** The inheritance and association of resistance to rust common bacterial blight, plant habit and foliar abnormalities in *Phaseolus vulgaris* L. Euphytica. 35: 969-982.
- FOUILLOUX G. 1979.** New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. In: Maraite H. Meyer, J. A. (eds.). Diseases of tropical food crops. Universite Catholique de Louvain-la-Neuve, Belgium. 221-235.
- GEFFROY, V., CREUSOT, F., FALQUET, J., and SEVIGANAC, M. 1997.** A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. Theoretical and Applied Genetics. 96: 3-4, 494-502.
- GEPTS, P., and DEBOUCK, D. 1991.** origin domestication, and evolution of common bean. In: Van Schoonhoven, A. y Voysest, O (eds.). 1991. common beans research for crop improvement. CIAT, CAB. Cali, Colombia.
- GRAFTON, K F., WEISTER, G. C., LITTLEFIELD, L. J., and STAVELY, J.R. 1985.** Inheritance of resistance to two races of leaf rust in dry edible bean. Crop Sci. 25: 537-539.
- HALEY, S. D., AFANADOR, L., and KELLY J. D. 1994.** Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for I gene (potyvirus resistance) in common bean. Phytopathology. 84: 157-160.
- HARTER, L. L. 1929.** A Fusarium disease of beans (Abstr.) Phytopathology. 19: 82.
- HENDERSON, W. R., and WINSTEAD, N. N. 1961.** Reaction tomato varieties and breeding lines to *Fop lycopersici* race 1. Plant Dis. Rep. 45: 272-273.
- JUNG, G., COYNE, D. P., SKROCH, P. W., NIENHUIS, J., ARNAUD-SANTANA, E., BOKOSI, J., ARYARATHNE, H. M., STEADMAN, J. R., BEAVER, J. S., and KAEPLER, S. M. 1996.** Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common beans. J. Am. Soc. Hort. 121: 794-803.

- KELLY J. D., and YOUNG R. A. 1996.** Proposed symbols for anthracnose resistance genes. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 39: 20-24.
- KELLY J. D., AFANADOR L., and CAMERON L. S. 1994.** New races of *Colletotrichum lindemutianum* in Michigan and applications in dry bean resistance breeding. Plant Dis. 78: 892-894.
- KELLY, J. D. 1995.** Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. Hort. Sci. 30: 461-465.
- KENDRICK, J. B., and SNYDER, W. C. 1942.** Fusarium yellows bean. Phytopathology. 32: 1010-1014.
- KENDRICK, J. B. 2000.** The fifth kingdom. Third edition. Focus Publishing. USA. 374 p.
- KOINANGE, E. M. K., SINGH, S. P., and GEPTS, P. 1996.** Genetic control of the domestication syndrome in common bean. Crop Sci. 36: 1037-1045.
- KOLKMAN J. M. and KELLY, J. D. 1999.** Inheritance of resistance to white mold in common bean. Annu. Rpt. Bean Improv. Coop. 42: 47-48.
- KOLMER, J.A., and GROTH, J. V. 1984.** Inheritance of a minute uredinium infection type of bean rust in bean breeding line 814. Phytopath. 74: 205-207.
- KORNEGAY, J., WHITE, J. W., DOMINGUEZ, J. R., TEJADA, G., and CAJIA, C. 1993.** inheritance of photoperiod response in Andean and Mesoamerican common bean. Crop. Sci. 33: 977-984.
- LÉPIZ-ILDEFONSO, R. 2000.** Simposio: Contribución de la Fitopatología al mejoramiento de los cultivos agrícolas. El caso del frijol. Revista Mexicana de Fitopatología. 17: 54-72.
- MARSHALL, E. M., ALOIS, A. B., and BECKMAN, H. C. 1981.** Fungal wilt diseases of plants. Academic Press. USA. pp. 51-64.
- MASTENBROEK, C. 1960.** A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans based on a new gene. Euphytica. 9: 177-184.
- MC ELROY, J. B. 1985.** Breeding dry beans, *Phaseolus vulgaris* L., for common bacterial blight resistance derived from *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Ph. D. Dissertation. Cornell Univ., Ithaca, N. Y.
- MELCHINGER, A. E., 1990.** Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. Plant Breeding 104: 1-9.
- MENDOZA, A., HERNÁNDEZ, F., HERNÁNDEZ, S., RUÍZ, D., MARTINEZ DE LA VEGA, O., MORA, G., ACOSTA, J., and SIMPSON, J. 2001.** Identification of Co-1 anthracnose resistance and linked molecular markers in common bean line A193. Plant Dis. 85: 252-255.
- MICHELMORE, R. W., PARAN, I., and KESSELI, R. V. 1991.** identification of marker linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 9828-9832.

- MIKLAS, P. N., STAVELY, J. R., and KELLY, J. P. 1993. Identification and potential use of molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85: 745-749.
- MIKLAS, P. N., and BEAVER, J. S. 1994. inheritance of field resistance to ashy stem blight in dry bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 37: 233-234.
- MMBAGA, M. T., STEADMAN, J. R., and ESKIDGE, K. M. 1996. virulence patterns of *Uromyces appendiculatus* from different geographicals areas and implications for finding durable resistance to rust of common bean. *Phytopath.* 144: 533-541.
- MUÑOZ de CH. M., CHAVEZ, V. A., ROLDAN, A. J. A., LEDESMA, S. J. A., MENDOZA M. E. y PEREZ-GIL, R. F. 1996. Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México. Primera edición. Editorial Pax. México. D. F. México. pp. 38.
- MUÑOZ-OROZCO, A., MIRANDA-COLIN, S. y SERRANO-COVARRUBIAS, L. M. 1995. Diversidad genética y resistencia a factores adversos en frijol. En: *Diversidad genética y patología del frijol*. Editado por: PEREZ, M. J., FERRERO, C. R. y GARCIA, E. R. Colegio de postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. pp. 1-9.
- MUSAANA, S. M., MWANDEMALE, O. D., and KAPUYA, J. A. 1993. The number of genes controlling resistance in beans to common blight. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, No. 36: 156-157.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (N.A.S). 1980. Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Vol. 1. Editorial LIMUSA. México. pp. 223.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (N.A.S). 1979. Tepary Bean. *Tropical Legumes, Resource for The Future*. Washington D. C. pp. 331.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN. T. A., and COOK, R. J. , (EDS.). 1981. *Fusarium: Disease, biology and taxonomy*. The Pensnsylvania State University Press, University Prak.
- NODARI, R. O., TSAI, S. M., GUZMÁN, P., GILBERSTON, R. L., and GEPTS, P. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetics factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics*. 134: 341-350.
- OLAYA, G., ABAWI, G. S., and WEEDEN, N. F. 1996. Inheritance of the resistance to *Macrophomina phaseolina* and identification of RAPD markers linked to the resistance genes in beans. *Phytopathology*. 86: 674-679.
- ORTIZ, V. M. 1998. El frijol en el Estado de Zacatecas. Primera edición. Gobierno del Estado de Zacatecas. México. pp. 11-41.
- ORTUBE, J., RIVADENERA, C., KORIYAMA, M., y ANZOATEGI, T. 1996. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). En: *Las leguminosas en la agricultura Boliviana*. Editado por MENESES, R., WAAIJENBERG, H. y PIEROLA, L. Proyecto Rhizobiología. Bolivia. pp. 227-233.

- OUELLETT, T., and SEIFERT, K. A. 1993. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology* 83: 1003-1007.
- PARK, S. O., COYNE, D. P., JUNG, G., SKROCH, P. W., ARNAUD-SANTANA, E., STEADMAN, J. R., ARYARATHNE, H. M., and NIENHUIS, J. 2000. Mapping of QTL for seed size and shape traits in common bean. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 125: 466-475.
- PARK, S. O., COYNE, D. P., BOKOSI, J. M., and STEADMAN, J. R. 1999. Molecular markers linked to genes for specific rust resistance and indeterminate growth habit in common bean. *Euphytica*. 105: 133-141.
- PARRY, W. D. 1990. Plant pathology in agriculture. Cambridge University Press. N. Y., U. S. A. pp. 250-252.
- PASTOR-CORRALES M. A. 1987. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fop* f. sp. *phaseoli*. *Plant Dis.* 71: 990-993.
- PASTOR-CORRALES M. A., ERAZO O. A., ESTRADA E. I., and SINGH S. P. 1994. Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G2333. *Plant Dis.* 78: 959-962.
- PASTOR-CORRALES M.A., and TU, J. C. 1989. Anthracnose. In: Schwartz H. F., Pastor-Corrales M.A. (eds.). *Bean production problems in the tropics*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. pp.77-104.
- PASTOR-CORRALES, M. A., and ABAWI, G. S. 1990. Root rots of beans in Latin America: Diagnosis, Research, Methodologies and Management strategies. Centro internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. pp. 7-12.
- PRONASE y SAGARPA, 2004. Información agronómica de las principales variedades de frijol. http://www.sagarpa.gob.mx/Pronase/productos/ind_frijol.html
- PUHALLA, J. E. 1985. Classification of strains of *Fop* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63: 179-183.
- PUNJA, Z. K., and PARKER, M. 2000. Development of *Fusarium* root and stem rot, a new disease on greenhouse cucumber in British Columbia, caused by *Fop* f.sp. *radicis-cucumerinum*. Centro for Environmental Biology, Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, Burnaby, BC V5A 1S6, Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 22:349-363 (2000)
- REYES, C. M. y MENDOZA, Z. C. 1991. Efecto de los fertilizantes nitrogenados sobre *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* y *Rhizoctonia solani* en frijol *Phaseolus vulgaris* L. En Chapingo México. XVIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Puebla Méx. (Resumen). pp.163.
- REYES, C. P. 1985. Fitogenotécnica Básica y Aplicada. AGT Editor, S. A. México, D. F. 460 p.
- RIBEIRO R. L. D., and HAGEDORN D. J. 1979. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fop* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean yellows. *Phytopathology* 69: 272-276.

- ROBINSON, A. R. 1987.** Manejo del hospedante en Patosistemas Agrícolas (Trad. García, E. R.). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 281 p.
- RODRIGUEZ G. R. 1997.** Calidad sanitaria y física de la semilla de frijol utilizada por los agricultores para la siembra de temporal en Durango. En: Resultados de investigación en frijol 1994-1995. Publicación especial No. 11. INIFAP-SAGAR.1997.
- ROMERO, C. S. 1993.** Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 309-317.
- SAGAR. 1998.** Situación actual y perspectivas de la producción de frijol en México. Editado por: GALARZA, M. J. M. México D. F. pp. 67.
- SAGARPA. Centro de Estadística Agropecuaria. 2004.** Serie Histórica de superficie sembrada, cosechada y rendimiento de los principales cultivos. México. http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comanuar.html
- SAMBROOK, J., FRITCH, E. F., and MANIATIS, T. 1989.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Segunda edición Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- SÁNCHEZ A. H. 1983.** Etiología y daño de las pudriciones radicales del frijol en el estado de Durango. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.
- SANCHEZ, A. J. H. y CARDENAS, A. M. 1988.** Etiología y daños de las pudriciones radicales del frijol *Phaseolus vulgaris* L. en el Estado de Durango. Revista Chapingo No. 58-59:43-49.
- SARH. 1992.** Guía fitosanitaria para el cultivo del frijol. Serie Sanidad Vegetal. pp. 9-5, 9-7, 9-15.
- SCHNEIDER, K. A., GRAFTON, K. F., and KELLY, J. D.. 2001.** QTL analysis of resistance to Fusarium root rot in bean. Crop Sci. 41: 535-542.
- SCHNEIDER, K. A., BROTHERS, M. E., and KELLY, J. D. 1997.** marker-Assisted selection to improve drought resistance in common bean. Crop Sci. 37: 51-60.
- SCHWARTZ, H. F., and MORALES, F. J. 1989.** Bean production problems in the tropics. CIAT. Cali, Colombia. pp. 114-125.
- SCHWARTZ, H. F. y GALVEZ, G. E. 1980.** Problemas de producción de frijol. CIAT. Cali, Colombia. pp. 67-77.
- SICARD, D., MICHALAKIS, Y., DRON, M., and NEEMA, C. 1997.** Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemutianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology. 87: 807-813.
- SINGH, S. P., and MUÑOZ, C. G. 1999.** resistantance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvement. Crop Sci. 39: 80-89.
- SMITH, I. M. y DUNEZ, J. 1992.** Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-prensa-Madrid, España. p. 30-31, 328-337.

- SNYDER, W. C., and HANSEN, H. N. 1940.** The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27: 64-67.
- STAVELY, J. R., and MC MILLAN, R. T. 1992.** BARC-rust resistant, bush market green bean germplasm lines. *Hort. Sci.* 27: 1052-1054.
- STEPHEN, B. 1984.** Pudriciones radicales del frijol y su control. CIAT, Cali, Colombia. 52 p.
- SUKLA, V. D., and ANJANEYULU, A. 1981.** Plant spacing to reduce rice tungro incidence. *Plant Disease* 65: 584:586.
- SUSSAN, Y. 1992.** Fungal plant interactions. 3th. Edition. Chapman and Hall p. 171-173, 228-237.
- VALADEZ, M. E y KAHL, G. 2000.** Huellas de DNA en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Editorial Mundi-Prensa México, S. A. de C. V.
- VAN BRUGGEN, A. H. C., WHALEN, C. H., and ARNESON, P. A. 1986.** Emergence, growth, and development of dry bean seedlings in response to temperature, soil moisture, and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76:568-572.
- WALLACE, D. H., YOURSTONE, K. S., MASAYA, P. N., and ZOBEL, R. W. 1993.** Photoperiod gene control over partining between reproductive and vegetative growth. *Theor. Appl. Genet.* 86: 6-16.
- WHITE, J. W., and LAING, D. R. 1989.** Photoperiod response of flowering in diverse genotypes of common bean (*P. vulgaris*). *Field Crops Resp.* 22: 113-128.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., and TINGEY, S. V.. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- YAP, I. V., and NELSON, R. J. 1996.** Winboot: Aprogra, for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. International Rice Research Institute.
- YOUNG, R. A., and KELLY, J. D. 1994.** A RAPD marker for the Are antracnose resistance gene in beans. *Annu. Rep. Bean. Improv. Coop.* 37: 77-78.
- YOUNG, R. A., MELOTTO, M., NODARI, R.O., and KELLY, J. D. 1997.** Marked-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, "G2333". *Theoretical and Applied Genetics.* 96: 87-94.
- ZARTER, H. Z., COYNE, D. P., and STEADMAN, J. R. 1989.** Inheritance of resistance to a rust isolate in beans. *Annu. Rep. Bean. Improv. Coop.* 32: 126-127.