

Informe final* del Proyecto G027

Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol, mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares

Responsable: Dra. Hilda Susana Azpíroz Rivero
Institución: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Centro de Investigación Regional del Centro
Campo Experimental Valle de México
Dirección: Apartado Postal 10, Chapingo, Texcoco, Mex, 56230 , México
Correo electrónico: ND
Teléfono/Fax: Tel: 01(595)4 2499, 01(595)4 2877 Fax: 01(595)4 6528
Fecha de inicio: Julio 15, 1995
Fecha de término: Noviembre 16, 2000
Principales resultados: Base de datos, Informe final
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Vargas Vázquez, P., Alvarado Mendoza, S., Muruaga Martínez, J. S., Guillén Andrade, H., Ortega Alcalá, J., Montero Tavera, V., Acosta Gallegos, J. y H. S. Azpíroz Rivero. 1998. Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol, mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. G027.** México D. F.

Resumen:

Se pretende lograr mediante un método que emplea las nuevas técnicas de la biotecnología, detectar entre los materiales silvestres de *Phaseolus vulgaris*, genes de resistencia a la roya. Se conoce de la existencia de materiales silvestres y cultivados con diferentes genes de resistencia genética a la roya; la detección de esos genotipos puede realizarse con mayor efectividad apoyándose en el uso de marcadores genéticos moleculares. Este tipo de herramienta biotecnológica puede permitir el conocimiento del comportamiento de materiales valiosos como son la colección de *Phaseolus vulgaris* que se encuentra en el Banco de Germoplasma del INIFAP y que cuenta con 200 poblaciones silvestres. Este conocimiento puede evitar la pérdida de material cuando se refrescan las semillas del banco ya que se planearía una estrategia de siembra en sitios adecuados para aquellos materiales con susceptibilidad. Por otro lado, las fuentes de resistencia destacadas en materiales silvestres podrán ser incorporadas a los Programas Nacionales de Mejoramiento Genético en Frijol, evitando así que las pérdidas de rendimiento en la producción comercial no sean drásticas.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

INFORME FINAL

PROYECTO CONABIO G27

EVALUACION DE LA RESISTENCIA A LA ROYA (*Uromyces apendiculatus*) EN POBLACIONES SILVESTRES Y CULTIVADAS DE FRIJOL MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES GENETICOS Y MOLECULARES.



AUTORES: M.C. Patricia Vargas Vázquez
M.C. Simón Alvarado Mendoza
Ing. José S. Muruaga Martínez
Dr. Héctor Guillén Andrade
M.C. Jorge Ortega Alcalá
Biol. Victor Montero Tavera
Dr. Jorge Acosta Gallegos
Dra. Hilda Susana Azpíroz Rivero

1. ANTECEDENTES

En México se siembra alrededor de 2.2 millones de hectáreas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de las cuales solamente el 12 % son de riego. El rendimiento promedio bajo condiciones de temporal es de 580 k/ha y con riego puede llegar hasta las 2.5 ton/ha. Los principales estados productores son Zacatecas, Durango, Chihuahua y Guanajuato en el ciclo primavera-verano, Nayarit y Sinaloa en el ciclo otoño-invierno. Los principales tipos son flor de mayo, peruanos, canarios, azufrados, garbancillos, bayos y negros (brillantes y opacos en cuanto a la testa de su semilla) así como otras variantes para autoconsumo como franelos, apetitos, morados de agua y canelos (Acosta Gallegos, J.A., comunicación personal 1996).

La producción de frijol en México está limitada por factores ambientales bióticos y abióticos tecnológicos y socioeconómicos. Los principales insectos que afectan la producción de esta leguminosa son el picudo del ejote (*Apion godmani*) conchuela (*Epilachma varivestis*) y *Zabrotes subfasciatus*; mientras que las principales enfermedades son las pudriciones radicales producidas por un complejo de hongos, la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), roya (*Uromyces appendicularis*), el virus del mosaico, y el tizón común (*Xantomonas campestris*) (Acosta, 1992). El principal factor abiótico es la sequía que afecta específicamente a la producción de temporal.

Desde la década de los cuarentas los trabajos de mejoramiento del frijol común han sido prioritarios en México. Principalmente los relacionados a la formación de variedades con resistencia a plagas y enfermedades en los principales tipos comerciales. De las

variedades generadas, 30 son las más utilizadas de un total de 200 tipos diferentes de frijol común apreciados en los sistemas tradicionales de producción en México (Muruaga, 1993).

A pesar de los relativos logros en el mejoramiento del frijol común, los investigadores están consientes de que la búsqueda de fuentes de resistencia a factores adversos bióticos y abióticos no debe concentrarse en las formas cultivadas, sino que también se deben evaluar y utilizar la contraparte y las demás especies relacionadas (Muruaga, *et al.*, 1992).

En el caso del frijol común se han definido 3 líneas prioritarias de investigación: 1) Eficiencia en el uso del agua; 2) Incremento del rendimiento; 3) Resistencia múltiple a plagas y enfermedades. Lo anterior implica intensificar los programas de mejoramiento genético para generar nuevos cultivares, lo que requerirá apelar al componente genético no explotado de los parientes silvestres del frijol.

Para ello será necesario estudiar primero los patrones de variación de las formas domesticadas y sus ancestros silvestres tal como lo hicieron Pickersgill *et al.*, (1979) con algunas especies domesticadas de *Capsicum* utilizando técnicas de taxonomía numérica como son el índice de similaridad de Gower, el análisis de conglomerado ("cluster analysis") y el análisis de componentes principales. Actualmente se tiene un conocimiento parcial de la diversidad genética presente en *P. vulgaris* por la falta de información relevante de su forma ancestral.

De acuerdo con varios autores [Muruaga *et al.*, (1992), Acosta *et al.*, (1996)] para poder utilizar en forma eficiente el potencial genético de las variantes del frijol común es necesaria una caracterización más rigurosa de la colección incluyendo

características agrobiológicas que aporten información útil sobre la arquitectura de la planta, la potencialidad de su rendimiento, su eficiencia fotosintética y su respuesta a los principales factores adversos. Así mismo, se requiere de suficiente cantidad de semilla disponible para los fitomejoradores, ya que un cuello de botella para su utilización es la limitada cantidad que se guarda en los bancos de germoplasma.

2. INTRODUCCION

Dentro del grupo de las especies leguminosas, el frijol común es una de las más importantes. Es originario de América, y México ha sido señalado como el más probable centro de origen, o al menos, como el centro de diversificación primaria. El cultivo del frijol es considerado como uno de los más antiguos; los hallazgos arqueológicos realizados en México y Sudamérica indican que era conocido unos 5,000 años antes de la era cristiana. Se ha podido deducir por los reportes arqueológicos que el frijol ha sido domesticado en América Latina hace un mínimo de 600 años (Kaplan y Kaplan 1988). Los cambios realizados durante este largo tiempo de domesticación se centraron en el color, dehiscencia y tamaño de la vaina así como en el tipo de hábito de crecimiento de la planta y su fisiología (Smartt 1969 y 1988).

En México, el ancestro del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre se encuentra desde el sur de Chihuahua hasta el sur de Chiapas. Este crece a lo largo de la Sierra Madre Occidental (Miranda, 1967). De acuerdo con las normas establecidas por DeCandolle (1986) y Vavilov (1949-50), citados por Miranda (1967); para determinar el centro de origen de las plantas cultivadas, la especie *P. vulgaris* procede del área de México y Guatemala por las siguientes razones: en México, dicha especie tiene una

amplia distribución de su forma silvestre, y además están presentes 50 especies de este género. Las formas silvestres de *P. vulgaris* se originaron en el Continente Americano (Arido América, Mesoamérica y Sur de América) las principales evidencias es la elocuente diversidad genética presente a la fecha y los restos arqueológicos que prueban la antigüedad de su cultivo en el Continente Americano.

Esta diversidad genética del género *Phaseolus* sin duda ha sido conservada a través de la domesticación realizada por las etnias americanas, así como por el tipo de distribución de la misma. Así *P. acutifolius* se reproduce en los climas de desierto; *P. lunatus* en las regiones de clima cálido seco y cálido humedo; *P. polyanthus* en las regiones de transición, entre climas templados y secos o húmedos; *P. vulgaris* tiene una adaptación en la mayoría de las regiones de México, y *P. coccineus* se encuentra principalmente en las regiones de Valles Altos entre 1800 y 2800 m.s.n.m. (Vargas V. P. et al. 1998).

El frijol es una planta anual, herbácea, intensamente cultivada desde el trópico hasta las zonas templadas, aunque es una especie que no soporta heladas. En general Las leguminosas de grano son una fuente importante y económica de proteína en la dieta de muchos pueblos tropicales y se usan como suplemento de alimentos ricos en carbohidratos como el arroz, el maíz y otros cereales. El grano de frijol tiene un alto contenido de proteínas, que varía alrededor de un 22%, las semillas pueden ser consumidas tanto inmaduras como secas, también puede consumirse la vaina entera inmadura. En general, el frijol es parte muy importante de la dieta alimenticia en México, Centro y Sur América.

3. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ESPECIES CULTIVADAS DEL GENERO *Phaseolus*

El frijol común desde el punto de vista taxonómico es el prototipo del género *Phaseolus* y su nombre científico completo es *Phaseolus vulgaris* L. asignado por Linneo en 1753. Pertenece a la tribu Phaseoleae de la subfamilia Papilionoideae dentro del orden Rosales. El género *Phaseolus* incluye aproximadamente 35 especies, de las cuales se cultivan cuatro: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L. y *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman.

En general, una especie puede tener subespecies y variedades que se pueden presentar en forma silvestre o en forma cultivada. De las especies cultivadas la más importante es, sin duda, el frijol común *Phaseolus vulgaris*. Es importante anotar que *Phaseolus coccineus* o frijol ayocote tiene dos subespecies cultivadas: *P. coccineus* subsp. *coccineus* y *P. coccineus* subsp. *polyanthus*. Además de las 4 especies cultivadas de *Phaseolus*, hay quizás entre 30 y 50 especies más de este género, que se encuentran en forma silvestre y que son de origen americano; algunas de ellas han sido colectadas y mantenidas en bancos de germoplasma mientras que otras sólo son ejemplares de herbario.

En contraste con la diversidad morfológica del frijol cultivado, existe mucha más diversidad genética en las formas silvestres, lo que indica que sólo una porción de esta variabilidad ha sido domesticada. El valor de la variabilidad en estado silvestre está demostrado, por ejemplo, por el hallazgo reciente de la arcelina en material silvestre de México, la cual es factor de resistencia a los brúquidos (CIAT Report/Informe CIAT 1988). Según Daniel Debouck, de la Unidad

de Recursos Genéticos, el "efecto fundador" explica el hecho de que las poblaciones domesticadas sólo presentan parte de la variabilidad genética original, esto es, aquella pequeña porción de interés para los cultivadores. La mayor variabilidad en la faseolina de las formas silvestres es prueba de ello.

Otra indicación de la variabilidad genética del material silvestre es el "complejo maleza-cultivo", todavía presente en lugares aislados de agricultura rudimentaria en Perú y Bolivia. Allí los aborígenes usan material silvestre para consumo y aprovechan los cruces naturales de aquél con material cultivado, variación que, según ellos, "resulta de la tierra". Investigadores peruanos y del CIAT encontraron recientemente en los Andes peruanos mezclas de semilla que contenían hasta 30 genotipos -muestra de que los agricultores conocen los materiales "maleza" y los usan para enriquecer sus mezclas de frijol cultivado.

4. OBJETIVO DEL TRABAJO

Caracterizar en atributos morfológicos fenológicos, fitopatológicos y moleculares 200 colectas de *Phaseolus vulgaris* tipo silvestre, repatriadas, que representan una parte de la colección mexicana de frijoles silvestres.

Identificar colectas a partir de las 200 repatriadas de silvestres, tolerantes a la enfermedad conocida como roya.

Analizar las relaciones existentes entre los materiales por agrupamientos derivados de sus atributos.

5. METAS ALCANZADAS

Con semilla obtenida en las diferentes fases del este proyecto se rejuveneció una parte de la colección mexicana de *P. vulgaris*, forma silvestre almacenada en el banco de germoplasma del INIFAP.

Se generó una metodología para la caracterización de germoplasma vegetal que involucra características agrobotánicas clásicas y atributos funcionales y moleculares para su posterior manejo agronómico en los sistemas de conservación *ex situ* y esquemas de mejoramiento genético.

6. REVISION DE BIBLIOGRAFIA

6.1. Origen

En general, se acepta que todas las especies del género *Phaseolus* se originaron en la América Tropical (México, Guatemala, Perú). Las principales evidencias de su origen son la diversidad genética de los materiales que existen en esta región, y los hallazgos arqueológicos que prueba la antigüedad de su cultivo en México y Perú (Cuadro 1).

6.2 Distribución geográfica

Phaseolus vulgaris

El frijol común además de cultivarse en el trópico también se produce en la zona templada de los hemisferios norte y sur. Su diseminación a las otras partes del mundo fue hecha después del descubrimiento de América. El mapa (Figura1) también muestra la distribución de las especies silvestres, y los

lugares donde se han hecho hallazgos arqueológicos.

Cuadro 1. Hallazgos arqueológicos de las especies cultivadas del género *Phaseolus*.

Especie	Edad arqueológica (años atrás)	Lugar de Excavacion
<i>P. vulgaris</i>	7,000	México (Tehuacán)
<i>P. lunatus</i>	5,300	Perú
Big lima	1,400	(Chilcas)
Tipo sieva		México (Tehuacán)
<i>P. coccineus</i>	2,200	México (Tehuacán)
<i>P. acutifolius</i>	5,000	México (Tehuacán)

Los frijoles silvestres tienen un rango de distribución continuo y variable (Debouck y Tohme, 1998). Esta variación puede medirse por el uso de criterios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos como se vera más adelante en capítulos posteriores. Delgado Salinas et al (1988) puntualizan que las formas silvestres mexicanas de *Phaseolus vulgaris* pueden colonizar algunas vegetaciones secundarias y podrían encontrarse más frecuentemente en diferentes hábitats. Pero si se aplica el criterio de poblaciones ya encontradas en América, el que se refiere a semillas con machas grises, cafés o con puntos negros, gran dehiscencia en las vainas, trepadoras, crecimiento indeterminado, y crecimiento libre, entonces se puede establecer la distribución de las formas silvestres (Fig. 1).



FIGURA 1. Distribución de *Phaseolus vulgaris* en América.

Se puede observar que la forma silvestre del género *Phaseolus* se extiende desde Durango, México o tal vez desde Chihuahua (Nabhan et al 1986) hasta San Luis, Argentina (Burkart y Bucher; 1953) bajo una distribución continua usualmente arriba de 1000 m.s.n.m. Se tiene una laguna sobre el conocimiento de la distribución evidente para Honduras, Nicaragua, Panamá y Venezuela, donde se están realizando esfuerzos de nuevos Investigadores. Se conoce sobre la existencia de frijoles silvestres en Honduras gracias a las muestras colectadas por el herbario de Molina en Venezuela, gracias a observaciones realizadas por los Bruchers (Berglund-Bucher and Bucher 1976). Dos poblaciones fueron

encontradas recientemente en Ecuador por Debouck y colaboradores (1989b). El reciente descubrimiento de 2 poblaciones más de frijol en Piuza, Perú (Debouck 1989c) confirma la hipótesis de la distribución continua a través de Sud América.

Los frijoles silvestres han sido encontrados en bosques de Mesoamérica los cuales se distribuyen en toda su extensión. Los árboles y arbustos dominantes son: Pinus, Buddleia, acacia, mimosa, bursera, opuntia y verbesina (Delgado Salinas et al 1988; Gentry 1968). En estos habitats es frecuente encontrarlo acompañado de especies como las compositae, solanaceae, y graminiae (algunas

veces con tripsacum y teozintle) todos son indicativos de ciertos disturbios en el habitat. En América del Sur y en especial el sur de Bolivia y Argentina es parte de la vegetación histórica de los bosques de Podocarpus pero también raramente de bosques de *Alnus conseltis*, *Datura isolanum* (Verglund-Brücher y Brücher 1976; Brücher 1988) en Perú se ha encontrado frecuentemente en una vegetación densa con *Schinus molle* (como árbol dominante), opuntia, cereus y salanum (Delgado, Salinas et al 1988) observaron que el frijol silvestre acompaña a diferentes especies que colonizan como pioneras destruyendo habitats de forma natural modificado por desviaciones de rios, fuego natural, volcanismo o espacios modificados por el hombre.

Se está necesitando información para el hueco existente de la distribución de los tipos maleza (Weedy), ya que la mayoría de este tipo de material no ha sido colectado. Es claro que este material no es vendido en los mercados y rara vez se ve en una vegetación natural, pero se encuentra en los jardines de traspatio de los agricultores. Las razas tipo maleza (Weedy) se cosechan raramente por los agricultores y no se encuentran en sus graneros como semilla. Sin embargo estas razas han sido vistas en México (Delgado Salinas et al 1988; Vanderbordth 1983), Guatemala (Debouck 1988^a) Costa Rica, Perú (Debouck 1987, Debouck Tohme 1988) y Bolivia (Debouck 1988b).

Durante exploraciones de germoplasma llevadas a cabo en Perú y Bolivia se observaron complejos mejorados entre silvestres y frijol cultivado común en ambos países 8 en Apurimac y Cusco pertenecientes a Perú y 8 en Cundinamarca y Boyaca pertenecientes a Colombia. La existencia de estos complejos fue evidente por la segregación de los caracteres morfológicos en

ciertas poblaciones tanto hacia el silvestre como al cultivado y por la presencia de los tipos estabilizados o malezas de los cuales se asumió que eran el resultado de hibridaciones pasadas. Se confirmó por la presencia de la proteína phaseolina el intercambio genético. Los tipos introducidos de phaseolina de otras regiones se presentaron en estados incipientes por introgresión en poblaciones locales. Por otro lado, los tipos locales de phaseolina se observaron en todas las fases de los complejos en la totalidad de los silvestres y en los frijoles cultivados, esto sugiere que los complejos han sido sometidos a una larga evolución.

Estos complejos podrían ser un efectivo medio para generar variabilidad genética, introgresión de genes de poblaciones silvestres a tipos cultivados y para complementar los programas de mejoramiento. La conservación de dichos complejos depende de la existencia continua de silvestres, tipos maleza (Weedy) y frijoles cultivados en estrecha proximidad; El mantenimiento de un ambiente de semidomesticación y la espontaneidad de los agricultores para dejar los tipos maleza (Weedy) en el campo.

Phaseolus lunatus

Se considera que el frijol lima es originario de México y Perú, y se cultiva en América del Norte, en América del Sur, en algunas regiones de Africa, como Liberia y Nigeria y además en Asia. Así mismo, la distribución por tamaño de los granos es importante ya que los grandes se encuentran distribuidos especialmente en la región de Perú; los granos de tamaño mediano en México y Guatemala y los pequeños y redondos en la zona del Caribe.

Phaseolus coccineus

En el trópico, el frijol ayocote se encuentra generalmente en las zonas altas; también es cultivado en la zona templada en donde se consume principalmente como habichuela. El cultivo de *Phaseolus coccineus* es tan antiguo como el del frijol lima, sin embargo, actualmente esta especie no se cultiva en forma tan amplia como el frijol común o el frijol lima. Este frijol tiene 4 subespecies, dos de las cuales presentan formas cultivadas: *Phaseolus coccineus* subsp. *coccineus* distribuida especialmente en la zona de México y Guatemala, y *P. coccineus* subsp. *polyanthus* que se encuentra tanto en México y Guatemala como en Colombia, Ecuador y Venezuela.

Phaseolus acutifolius

La distribución del frijol tepari está limitada al igual que la del frijol ayocote, a pesar de que su antigüedad como especie cultivada es de 5,000 años. Se ha determinado que esta especie se puede adaptar a regiones secas de tipo árido. Su cultivo fue relativamente intenso a principios de este siglo en algunas partes de los Estados Unidos, pero ahora solo la cultivan los nativos del sudoeste de Norte América. Los frijoles silvestres tienen todos los atributos de las legumbres silvestres: un fuerte mecanismo de dispersión de semilla y una habilidad para crecer libremente y mantenerse por ellas mismas con una vegetación exuberante.

6.3 MORFOLOGIA

Los caracteres morfológicos del frijol se agrupan en caracteres constantes y caracteres visibles; los constantes son aquellos que caracterizan el taxon, es decir la especie, o la variedad; Generalmente son caracteres altamente hereditarios. Los caracteres

variables de la morfología del frijol reciben la influencia de las condiciones ambientales; podrían ser considerados como la resultante de la acción del medio ambiente sobre el genotipo. Puede ser útil añadir que la baja o alta heredabilidad de un carácter, no tiene siempre correlación directa con su nivel de importancia o de utilidad. La descripción de la morfología de frijol, se hace normalmente tomando algunos o todos los caracteres en listados a continuación:

1. Raíz
2. Tallo principal
3. Ramas axilares y complejos axilares.
4. Hojas
5. Inflorescencias
6. Flor
7. Fruto
8. Semilla

Raíz

El sistema radical se concentra cerca de la base del tallo, casi en la superficie del suelo. En condiciones muy favorables, las raíces pueden alcanzar más de un metro de longitud. A los pocos días de la emergencia de la radícula es posible ver las raíces secundarias, que se desarrollan especialmente en la parte alta de la raíz principal (Figura 2); después aparecen las raíces terciarias y otras subdivisiones. Aunque generalmente se distingue la raíz primaria, el sistema radical tiende a ser fasciculado, fibroso en algunos casos, con una amplia variación, incluso dentro de una misma variedad. Como miembro de la subfamilia Papilionoideae, *Phaseolus vulgaris* L. presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radical. Estos nódulos tienen forma poliédrica y un diámetro aproximado de 2 a 5

mm. Son colonizados por bacterias del género *Rhizobium*, las cuales fijan nitrógeno atmosférico. Esta actividad bacteriana contribuye a satisfacer los requerimientos de nitrógeno de la planta.



FIGURA 2. Sistema radical fasciculado y fibroso en el género *Phaseolus* (tomado de Ciat 1978).

Tallo principal

El tallo principal de la planta de frijol, está formado por una sucesión de nudos y entrenudos. Un nudo es el punto de inserción en el tallo, de una hoja (o de los cotiledones) y de un grupo de yemas axilares, estas se encuentran en la axila de cada hoja. El tallo generalmente es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular, debido a pequeñas corrugaciones de la epidermis.

En el frijol silvestre existen 4 tipos de hábito de crecimiento donde la forma del tallo define diferentes tipos: el I, crecimiento determinado (tipo mata); el II, crecimiento indeterminado con ramas erectas; el III, crecimiento indeterminado postrado y el IV, crecimiento indeterminado trepador (Debouck e Hidalgo, 1984). Sin embargo, esta clasificación trata no solamente del hábito de

crecimiento, el cual involucra el desarrollo de los meristemas apicales, sino que también incluye la arquitectura de la planta.

En el caso de silvestres, la característica de ser perenne o habilidad para rebrotar durante el segundo año después de sembrar la semilla es una expresión de la lignificación de la parte baja del tallo diseminada por los materiales de México y Perú. También se ha encontrado que en Costa Rica existen formas silvestres con una iniciación de floración muy tardía. Evidencias adicionales de esta variación en poblaciones silvestres de frijol se han encontrado en rangos de fotosíntesis, contenido de proteína soluble, eficiencia del uso del nitrógeno y otros parámetros fotosintéticos relativos a la hoja (Lynch et al 1989).

La hoja

Las hojas en el género *Phaseolus* son generalmente trifoliadas (Figura 3) van de moderadamente lobuladas, a lobuladas y de divididas a muy divididas. El tamaño de los folíolos laterales y el central es muy variable sobre todo en las silvestres.



FIGURA 3. Hojas trifoliadas de frijol silvestre. Inflorescencia y Fruto

El color del estandarte de la corola varía dentro de la especie vulgaris y normalmente esta característica se registra en flores recién abiertas encontrando colores que van del blanco, verde, lila pálido, blanco con borde lila y morado (Figura 4), en otras especies como *coccineus* se presenta el blanco con líneas rojas, lila oscuro, carmín, anaranjado, morado, u otros.



FIGURA 4. Inflorescencia del frijol silvestre

Vaina

Las vainas de *P. vulgaris* son por lo general delgadas angostas y ovales y los colores de estas en forma inmadura pueden variar de morado oscuro a negro, rojo carmín, con manchas moradas sobre verde, manchas rojo carmín sobre verde, manchas rojo pálido sobre verde, rosa oscuro, verde normal, verde brillante, de verde opaco a gris plateado, manchas verde pálido sobre ante o café, dorado o amarillo fuerte, de ante/bronceado a café, de amarillo pálido a blanco.

Longitud de la vaina

La longitud promedio en centímetros de las vainas inmaduras varían de 1.5 a 7 en los silvestres, lo mismo que el ancho que varía de 0.2 a 0.8 cm.

Dehiscencia de la vaina y dispersión de la semilla

Por lo regular el frijol silvestre presenta durante la madurez total dos tipos de dehiscencia y por lo tanto de dispersión. En el primero las vainas secas se abren un poco a lo largo de la sutura, pero no se enroscarán permitiendo una dispersión moderada, en el segundo caso repentinamente las vainas se torcerán y abrirán lanzando las semillas provocando una dispersión explosiva.

Semilla

En el caso específico de los frijoles silvestres de *P. vulgaris* los patrones del color de la testa de la semilla son muy variados, originándose por ello una clasificación por color, moteado y brillantez.

Así el color de la testa de la semilla se clasifica del más oscuro al más claro en diferentes categorías específicas que van desde el negro, hacia los diferentes tonos de colores como: el café pálido a café oscuro, marrón, gris cafésoso o verdoso, amarillo o verde amarillo, de crema pálido a ante, blanco, blancuzco, blanco con matiz morado, verde clorofila, de verde a olivo, rojo, rosa y hasta morado.

En cuanto al moteado tenemos que la clasificación diferentes categorías que van desde la ausencia del moteado a las otras categorías como: moteado constante, vetado, con manchas romboides, salpicada de puntos, con manchas circulares, con un patrón de color en algún margen, con una mancha larga grande, bicolor, bicolor con manchas, con color alrededor del hilum (Figura 5).



FIGURA 5. Moteado presente en la semilla de frijol silvestre.

El brillo de la testa semilla también permite una diferenciación fenotípica de la misma en tres categorías: mate, media o brillante

Forma de la semilla

En general el frijol también presenta una gran variación en cuanto a la forma de la semilla y específicamente el silvestre puede clasificarse en diferentes categorías como son la redonda, ovalada, cuboide, arriñonada y truncado (Figura 6.).

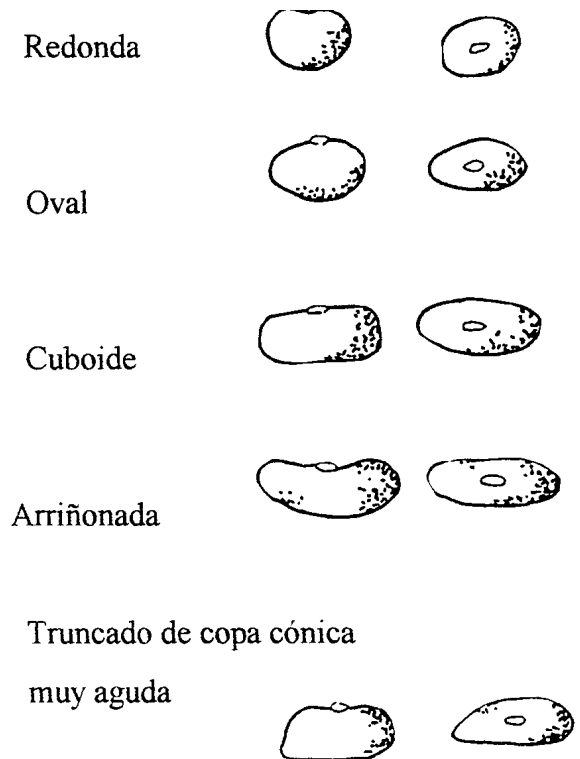


FIGURA 6. Diferentes categorías en cuanto a forma del frijol silvestre

Tamaño de la semilla

El tamaño de la semilla de frijol silvestre tiene una gran variación y esta determinada por la longitud, el ancho y grueso de las mismas. Estudiosos de esta especie han observado que dicho tamaño se incrementa conforme se mueve la distribución hacia el sur del continente americano. En base al tamaño de la semilla Gentry (1969) comentó que las formas silvestres mexicanas son ancestrales, por lo que las formas argentinas eran meramente formas escapadas de las cultivadas, una conclusión con lo que no estuvieron de acuerdo Berglund-Brucher y Brucher (1976). Esta discusión ha sido retomada por Kaplan 1981 así como por Debouck y Tohme 1989); al parecer los criterios morfológicos solos no son suficientes y de ambas formas existen en México y en los Andes.

6.4. DIVERSIDAD GENETICA

Diversidad Morfológica de *Phaseolus vulgaris*

Existen algunas características típicas de las plantas del género *Phaseolus* que permiten su identificación por especie; las principales para *P. vulgaris* son las siguientes:

- a) Las hojas son trifololiadas (en muy raros casos son unifoliadas), de estipelas pequeñas y foliolos casi siempre enteros.
- b) Las estípulas son persistentes y no se prolongan en la base.
- c) En la planta se presentan unos tricomas en forma de gancho llamados pelos uncinulados. Estos se encuentran especialmente en el tallo y en los pecíolos.
- d) Las flores, que pueden ser pocas o numerosas, están situadas en racimos axilares o terminales y poseen 2 bracteolas que persisten mínimo hasta la antesis.
- e) La corola puede ser blanca, o de color lila, púrpura o de una mezcla de estos colores, pero nunca amarilla.
- f) El estilo está envuelto por la quilla; tiene forma de espiral pronunciada y es caduco, es decir, cae después de la fecundación. Los estambres son diadelfos, o sea, unidos por sus filamentos en dos grupos, con la siguiente distribución: 9 de ellos soldados por la base y uno más que queda libre llamado estambre vexilar.
- g) Las vainas pueden ser rectas o curvas; en general sus lados son comprimidos.
- h) El número de semillas por vaina es variable, de 2 a 10; también hay variación en cuanto al tamaño, forma y color de las semillas.

Introgresión de genes de poblaciones silvestres a tipos cultivados.

En América se ha observado complejos mejorados entre silvestres y frijol común cultivado, especialmente en un estudio

realizado en Perú y Bolivia. La existencia de estos complejos fue evidente por la segregación de los caracteres morfológicos en ciertas poblaciones tanto hacia el silvestre como al cultivado y por la presencia de los tipos estabilizados o “malezas” de los cuales se asumió que eran el resultado de hibridaciones pasadas. Se confirmó por la presencia de la proteína phaseolina el intercambio genético. Los tipos introducidos de phaseolina de otras regiones se presentaron en estados incipientes por introgresión en poblaciones locales.

Por otro lado, los tipos locales de phaseolina se observaron en todas las fases de los complejos en la totalidad de los silvestres y en los frijoles cultivados, esto sugiere que los complejos han sido sometidos a una larga evolución.

Estos complejos podrían ser un medio efectivo para generar variabilidad genética, introgresión de genes de poblaciones silvestres a tipos cultivados y para complementar los programas de mejoramiento. La conservación de dichos complejos depende de la existencia continua de silvestres, tipos maleza (Weedy) y frijoles cultivados en estrecha proximidad; el mantenimiento de un ambiente de semidomesticación y la espontaneidad de los agricultores para dejar los tipos maleza (Weedy) en el campo.

6.5. ENFERMEDADES IMPORTANTES EN MEXICO

El frijol cultivado tanto en el trópico como en las zonas templadas del mundo, es atacado por enfermedades de naturaleza fungosa, bacteriana o viral así como por nemátodos.

Tanto en el trópico como en zonas templadas, los patógenos infectan la planta de frijol, debido a la falta de prácticas agronómicas mínimas como el distanciamiento entre fechas de siembra o falta de rotación de cultivos y claro las diversas condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la infección y la supervivencia del patógeno.

Existen algunos patógenos cuya presencia y actividad está restringida a ciertas regiones específicas, por ejemplo, el virus del mosaico dorado del frijol se encuentra en regiones de baja altitud, mientras que la antracnosis aparece en regiones de valles altos.

Por otra parte, existen algunos patógenos que se desarrollan en todas las regiones, por ejemplo, el virus del mosaico común del frijol y la roya.

Enfermedades Causadas por Virus

Virus Transmitidos por Afidos

Mosaico común

El virus del mosaico común del frijol (BCMV) ataca a este cultivo causando problemas que se expresan al través de síntomas con diferente intensidad dependiendo de la cepa viral, el grado de resistencia de la planta, la edad de la variedad y a las diferentes condiciones ambientales.

Los síntomas visibles se manifiestan en la hoja con la presencia de un moteado verde claro-oscuro o mosaico. Frecuentemente, los bordes de la hoja se enroscan hacia abajo y su tamaño es más pequeño de lo normal pudiendo presentar pequeñas ampollas sobre la superficie. Con frecuencia, las plantas presentan un enanismo y las vainas y botones florales se deforman. El BCMV puede ser transmitido mecánicamente, por la semilla o por áfidos.

Las temperaturas mayores a 26°C son favorables para el desarrollo de las lesiones locales necróticas en las hojas. En el caso de que plantas resistentes sean atacadas por cepas de BCMV normalmente se presenta necrosis sistémica. En plantas susceptibles, el virus causa una reacción de mosaico sistémico normal a altas temperaturas.

Mosaico amarillo

El virus del mosaico amarillo del frijol (BYMV) tiene un amplio rango de hospedantes incluyendo el frijol, la soya, el trébol y los gladiolos. Los síntomas se manifiestan en diferentes grados dependiendo de las cepas del virus más o menos patógenas y los niveles de resistencia de las variedades. Los síntomas que se manifiestan en la hoja del frijol consisten en moteado amarillo y verde de tipo mosaico, siendo estas afecciones más severas en su expresión que las producidas por BCMV. Las hojas tienden a adquirir una apariencia brillante, cóncava y lustrosa. Las vainas afectadas y las hojas pueden mostrar deformaciones y torcimientos. La planta manifiesta un severo enanismo, más pronunciado que las atacadas por BCMV. Las cepas específicas del virus pueden causar una coloración púrpura de las bases de las hojas, y posteriormente la muerte de la planta. El BYMV no se transmite por la semilla pero si es mecánicamente y por áfidos.

Virus Transmitidos por Mosca Blanca

Mosaico dorado

El virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) es un problema de áreas tropicales. Los síntomas manifestados en la hoja consisten en la presencia de un mosaico amarillo y verde, con enroscamiento hacia abajo. Las hojas trifolioladas recién emergidas muestran un amarillo brillante o un mosaico general, el cual puede contrastar marcadamente con las hojas más viejas, las cuales exhiben síntomas de mosaico menos severo. Las plantas infectadas son detectadas fácilmente en el campo por su apariencia amarilla. Algunas variedades quedan enanas y producen vainas deformes.

El insecto vector de esta enfermedad es la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Genn.), sin embargo el BGMV puede ser transmitido mecánicamente pero nunca por semilla.

Virus Transmitidos por Crisomélidos.

Mosaico rugoso

El virus del mosaico rugoso del frijol (BRMV) produce síntomas que son semejantes a los causados por el mosaico común del frijol. En la hoja se manifiesta como un mosaico verde y oscuro, frecuentemente acompañado por un severo ampollamiento, enrollamiento y deformación, con una apariencia gruesa y coriácea. Frecuentemente, las plantas presentan un fuerte enanismo, especialmente si la infección ocurre durante la época de plántula. Las vainas pueden mostrar deformación así como un mosaico. Esta enfermedad es transmitida mecánicamente, por especies de *Cerotoma* y *Diabrotica*.

Mosaico sureño

El virus del mosaico sureño del frijol (BSMV) puede producir lesiones locales circulares, pardo-rojizas, de 1-3 mm de diámetro, o un moteado sistémico y bandas verdes a lo largo de las venas. Los síntomas de moteado son similares a los producidos por BCMV y BYMV pero menos intensos. Las hojas pueden mostrar ampollamiento y deformaciones. Las vainas presentan manchas de color verde oscuro. El (BSMV) es transmitido por la semilla y su presencia generalmente es comprobada por técnicas de serología.

Medidas de Control para Enfermedades Virales

Las medidas de control de todas estas enfermedades consisten en la siembra de semilla libre del virus, el empleo de variedades resistentes, y el control del insecto vector.

Enfermedades causadas por hongos

Hongos que afectan las hojas y vaina
Tizón foliar por alternaria

Mancha parda

La mancha parda producida por *Alternaria* sp es un problema en localidades con alta humedad y temperaturas moderadamente bajas. Los síntomas en la hoja aparecen como pequeñas lesiones café-rojizas, irregulares, rodeadas por un borde café oscuro. Estas lesiones se alargan gradualmente y desarrollan como anillos concéntricos; con frecuencia, se vuelven brillantes y caen dejando orificios en la lámina foliar. Las lesiones se pueden unir y cubrir grandes áreas de la hoja, resultando una parcial o prematura defoliación causando así la muerte de los tejidos de crecimiento de la planta o reduciendo su vigor.

Las medidas de control incluyen rotación de cultivos, aplicación de fungicidas y desarrollo de variedades resistentes.

Mancha angular

La infección y desarrollo del hongo que produce la mancha angular se favorece por temperaturas moderadas (18-25°C) y períodos con alta humedad o lluvias frecuentes. Los síntomas aparecen generalmente, primero, en el envés de la hoja, como manchas grises; éstas se tornan posteriormente color café y se cubren de pequeñas columnas de hifas (sinema), las cuales cambian de gris a negro debido al color de las conidias. Las lesiones son angulares a causa de su delimitación por las venas y venillas. Las lesiones de las vainas y los tallos son de color café-rojizas y frecuentemente rodeadas por un borde más oscuro. El patógeno puede ser portado internamente por la semilla y la transmisión también puede ocurrir por esporas diseminadas por el viento.

Antracnosis

La antracnosis prevalece en la mayoría de las regiones del mundo, especialmente en elevaciones superiores a los 1000 m. La infección y el desarrollo de este patógeno son favorecidas por temperaturas bajas (14-18°C) y alta humedad. Las esporas son diseminadas por el viento, la lluvia o esparcidas a través del campo por el hombre y los insectos. Los signos y síntomas en la hoja, aparecen inicialmente en el envés y las lesiones son de un color que varía desde rojo hasta negro y se localizan a lo largo de las venas y venillas de la hoja. Estas lesiones también pueden aparecer en los peciolo, ramas, tallos, cotiledones o vainas. Generalmente, la infección en las vainas aparece en forma de manchas rosadas o de color herrumbroso hasta negro, las cuales se convierten en chancros que contienen masas

de esporas rosadas. El hongo puede ser portado internamente por la semilla y causar severas pérdidas en el campo.

Mancha de Ascochyta

La mancha de Ascochyta es, básicamente, un problema en valles altos, a más de los 1500 m y se favorece por temperaturas frías y alta humedad. Los síntomas en las hojas se manifiestan en forma de lesiones de color gris oscuro o negro, las cuales pueden contener pequeños picnidios. En epidemias severas ocurre la caída prematura de las hojas. El hongo es transmitido por la semilla.

Mancha redonda

La mancha redonda es un problema en regiones con temperaturas moderadamente frías y ambientes húmedos. En México, la infección usualmente ocurre en las hojas primarias, inmediatamente después de que la planta emerge. Los signos y síntomas se presentan en forma de lesiones circulares de color café claro o crema en el centro, rodeadas por un borde café-rojizo. En la lesión se pueden formar pequeños picnidios grises. Si el ataque es severo se presenta una defoliación, con las consiguientes pérdidas de rendimiento. El hongo puede ser transmitido por la semilla.

Las medidas de control incluyen rotación de cultivos, uso de semilla limpia, aplicación de fungicidas y desarrollo de variedades resistentes o tolerantes.

Mancha gris

La mancha gris prevalece en regiones con altitudes de 1500 m, en donde persisten temperaturas bajas y época de alta humedad. Los síntomas y signos consisten en lesiones angulares verde claro o cloróticas, de 2-5 mm

de diámetro, en el haz de la hojas . En estas lesiones se presenta un crecimiento de micelio y esporas de color blanco-grisáceo por el envés de la hojas, siendo estos signos muy característicos de este hongo. Las infecciones severas pueden causar defoliación prematura.

Moho gris

El patógeno responsable del moho gris es *Botrytis cinerea* en el estado conidial de *Botryotinia fuckeliana* y se presenta en los períodos de baja temperatura y alta humedad. La infección ocurre usualmente en las heridas, causadas en hojas, tallos, vainas, o botones florales envejecidos. Los síntomas se presentan como áreas humedecidas de color gris-verdoso en el tejido afectado, usualmente se presenta una pudrición acuosa suave de las vainas.

Oidium

El crecimiento del oidium está favorecido por baja humedad y temperaturas moderadas. El hongo puede prevalecer en un rango muy amplio de condiciones ambientales, causando daño severo si las plantas jóvenes son infectadas; sin embargo, la infección es más notoria en plantas adultas y rara vez produce pérdidas. Inicialmente, los síntomas y signos se presentan como áreas oscuras de la hoja, las cuales posteriormente se cubren de micelio blanco, en la cara superior. Estas manchas superficiales se pueden unir y cubrir en su totalidad la hoja entera con micelio y esporas, presentando una apariencia polvosa.. La infección severa puede causar defoliación prematura. Es posible que aparezcan síntomas en el tallo y en las vainas, causando deformación y decoloración café o púrpura. Las esporas pueden presentarse fuera de la semilla, y la diseminación primaria de esporas ocurre por las corrientes de aire.

Roya

La infección de este parásito está favorecida por temperaturas moderadas (18-25°C) y alta humedad relativa. Las esporas de la roya son transmitidas principalmente por corrientes de aire. Pueden resultar pérdidas severas en la producción si la infección aparece muy temprano, antes de la floración. Los síntomas se presentan como manchas cloróticas o blancas en las cuales se desarrollan pústulas o uredos de color café-rojizo, en el haz y envés de la hoja, dependiendo de la raza del patógeno, de la variedad y de las condiciones ambientales. La infección severa puede causar defoliación prematura. Es posible que también ocurra infección en las vainas.

Mustia hilachosa

La mustia hilachosa causa severas pérdidas en la producción del cultivo de frijol, en las tierras tropicales bajas, en donde persisten temperaturas altas y condiciones húmedas. Los síntomas en la hoja comienzan como pequeñas manchas húmedas con apariencia de escaldado, de color verde brillante hacia gris, frecuentemente rodeadas por un borde oscuro. El hongo produce hifas de color oscuro las cuales crecen desde las manchas hacia el follaje no infectado y eventualmente puede cubrir la planta entera con una tela de hifas, si las condiciones ambientales son favorables. Las vainas también pueden ser infectadas por el hongo. Este produce pequeños esclerocios café (0,2-0,5 mm de diámetro), los cuales sobreviven en el suelo. El hongo puede ser transmitido internamente por la semilla.

Moho blanco del tallo

El moho blanco está diseminado por todo el mundo y tiene un amplio rango de hospedantes, el cual incluye la mayoría de las especies hortícolas y muchas malezas. Este hongo se favorece con temperaturas

moderadas y frías, alta humedad y senectud de los tejidos de la planta. Los síntomas y signos de la infección se presentan inicialmente como lesiones de apariencia húmeda, seguidas por un crecimiento algodonoso blanco que envuelve las partes afectadas de la planta, tales como hojas o vainas.

Posteriormente, este tejido infectado se seca, tomando color claro y una apariencia blanquecina. Los esclerocios negros (1-10 mm de diámetro o más) se forman sobre los tejidos infectados unos pocos días después de la infección. Toda la planta puede infectarse pero, generalmente, la infección ocurre en las partes de la planta próximas al suelo. El hongo puede ser portado internamente por la semilla, sin embargo la diseminación primaria se hace por esclerocios o esporas liberadas por las estructuras reproductivas llamadas apotecios, producidas a partir de esclerocios enterrados en el suelo.

Hongos que Afectan la Raíz y el Tallo

Pudrición gris de la raíz

La pudrición gris de la raíz ocurre en regiones con temperatura moderada o cálida y alta humedad. Generalmente, los síntomas aparecen cuando el micelio o los esclerocios del suelo germinan e infectan los tallos de las plántulas o la base de los cotiledones en desarrollo. El hongo produce chancros negros, con márgenes muy definidos, los cuales con frecuencia presentan anillos concéntricos. El meristemo apical se puede morir o el tallo quebrarse. Las infecciones en plantas viejas pueden causar atrofiamiento, clorosis, defoliación prematura, degradación de la raíz y el hipocotilo, y finalmente, muerte de la planta. La infección es, a menudo, más pronunciada en un lado de la planta. Las lesiones posteriores se vuelven grises y frecuentemente

contienen pequeños picnidios negros o esclerocios. La semilla es portadora del hongo.

Marchitamiento por fusarium

El marchitamiento por *Fusarium oxysporum* produce síntomas que son fácilmente confundidos con los causados por *Fusarium solani*. Esta infección penetra a través de la raíz y heridas en el hipocotilo causando una coloración rojiza del sistema vascular, raíces, tallos, pecíolos y pedúnculos. Esto ocasiona un amarillamiento de las hojas inferiores, el cual progresa hasta las situadas en lo alto de la planta; volviéndose amarillas y con frecuencia envejecen prematuramente. Si la infección se presenta en las plántulas, éstas se atrofian. El hongo puede ser transportado por medio de esporas localizadas en la parte exterior de la semilla.

Medidas de Control para Enfermedades Fungosas

Las medidas de control incluyen rotación de cultivos, eliminación de residuos de la planta, uso de semilla limpia, preparación del terreno con arado profundo, bajas densidades de siembra, aplicaciones de los fungicidas y utilización de variedades resistente o tolerantes.

Enfermedades Causadas por Bacterias

Tizón común

Estas bacterias causan graves pérdidas en la producción, especialmente en regiones húmedas, con temperaturas que van desde moderadas hasta altas. La infección inicial por *Xanthomonas*, aparece en forma de puntos acuosos por el envés de la lámina foliar. Estos puntos aumentan de tamaño en forma irregular y las lesiones adyacentes se agrupan. Las regiones infectadas se presentan flácidas y

están rodeadas por un círculo estrecho de tejido, color amarillo-limón, el cual después se vuelve café y necrótico. Las lesiones presentan pequeñas gotas de exudado bacteriano, en contaminaciones severas los tallos y vainas también se infectan, mostrando síntomas como decoloración y provocando daño de la semilla; con lo que se provoca la transmisión de la bacteria.

Las medidas de control incluyen rotación de cultivos, siembra de semilla libre de bacteria, aplicación de bactericidas y utilización de variedades tolerantes.

Tizón de halo

La bacteria causante del Tizón es un problema serio en regiones con temperaturas frías o moderadas (menos de 28°C). Los síntomas iniciales aparecen de 3 a 5 días después de la infección como pequeñas manchas húmedas, generalmente en el envés de la hoja. Posteriormente, aparece un halo de color amarillo-verdoso alrededor de estas áreas humedecidas y se puede presentar clorosis sistémica, con amarillamiento y deformación de las hojas, sin aparente infección externa. En las lesiones se puede observar un exudado bacteriano de color crema o plateado. Los tallos y las vainas también se pueden infectar, con la posterior transmisión por medio de la semilla.

Medidas de Control para Enfermedades Bacterianas

Las medidas de control incluyen rotación de cultivos, uso de semilla libre de bacterias, aplicación de bactericidas y utilización de variedades tolerantes. La tolerancia es afectada por la existencia a cepas con diferente virulencia.

6.5.5. Enfermedades Causadas por Nemátodos

En la literatura se han descrito varias especies de nemátodos que infestan el frijol, entre ellas: *Meloidogyne* sp., *Trichodorus* sp., *Pratylenchus* sp *Belonolaimus* sp., *Heterodera* sp. y *Ditylenchus* sp.

Las plantas infectadas por nemátodos que producen agallas de la raíz, se atrofian; durante las horas más calurosas del día muestran amarillamiento y marchitamiento. Al examinar el sistema radical de una planta infectada se notan numerosos alargamientos o agallas (1-15 mm de diámetro o más), en los cuales se localizan los nemátodos. Estas agallas interfieren en la capacidad de la planta para obtener humedad y nutrientes del suelo, reduciendo significativamente la producción.

Las medidas de control para las agallas de la raíz y otras lesiones causadas por nemátodos incluyen rotación de cultivos, tratamiento químico del suelo y desarrollo de variedades con resistencia o tolerancia.

6.6. ARQUETIPOS FISIOLÓGICOS Y DOMESTICACION

Según datos arqueológicos, la domesticación de la especie, se inició hace por lo menos 10,000 años. Gracias a la aparición de la cerámica, hace aproximadamente 5000 años, tanto en Mesoamérica y los Andes, fue posible preparar el frijol como alimento en su forma actual.

En la zona andina hay varios sitios de domesticación, lo cual ocurrió en distintas épocas. Uno de esos comprende el área de los Andes del sur, de donde proviene la mayor cantidad del material que actualmente se cultiva en América del Sur y América Central, África, China, Medio Oriente, y el este de Estados Unidos. Mesoamérica fue otro centro de domesticación importante pero de diferente alcance que el de los Andes del sur.

Se ha podido deducir por los reportes arqueológicos que los frijoles han sido domesticados en América Latina hace un mínimo de 600 años (Kaplan y Kaplan 1988). Los cambios realizados durante este largo tiempo de domesticación se centraron en el tamaño color, dehiscencia de la vaina, así como en el tipo de hábito de crecimiento y la fisiología de la planta (Smartt 1969 y 1988).

La diferencia genética entre los ancestros silvestres y los cultivados es estrecha ya que existe un ligamiento entre grupos de genes (Gepts and Debouck). Esto reduce la base genética y la existencia de razas tipo weedy maleza se encuentran entre las fuertes razones para limitar los cambios taxonómicos por lo que no se reconocen rangos intraespecíficos en la nomenclatura formal como lo ha dicho por su parte Baudet. (1977).

Los frijoles silvestres tienen todos los atributos propios como son: un fuerte mecanismo de dispersión de semilla y una habilidad para crecer libremente y mantenerse por ellas mismas con una vegetación exuberante. Sin embargo en material cultivado estos atributos han sido alterados (Hartan 1975, Heiser, 1988).

Las formas silvestres del género que nos ocupa presentan una variación considerable que puede medirse con criterios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. En el Cuadro 1 se resumen algunos de los datos morfofisiológicos observado a lo largo del rango de distribución. No se conoce la morfología que tenían los frijoles silvestres en los primeros tiempos de la domesticación, se puede solo inferir desde las observaciones actuales.

Las razas escapadas tipo maleza (Weedy) tienen, en general, semilla más larga que las de los tipos silvestres y colonizan más

fácilmente los habitats hechos por el hombre como los campos abandonados y vegetación arbustiva de los alrededores de las cabañas y a lo largo de las veredas cuando las condiciones las favorecen para su cambio y formación ejemplo: eliminación de material silvestre, o uso de herbicidas selectivos en cultivos de macetas), ellos desaparecen sin más generaciones. Bajo las mejores condiciones las razas escapadas tipo maleza (Weedy) presentan las siguientes características:

- Semilla grande comparada con la de los tipos silvestres existentes en esa área.
- Color de semilla (café, marrón, canela, gris o negra) menos atractivo que el de los tipos cultivados presentes en el área, pero son diferentes a los típicos manchados de los tipos silvestres (negros con puntos o estrias en gris o canela),.
- Vainas con gran dehiscencia pero menos fuerte que la de las formas silvestres.
- Trepadora agresiva y en la mayoría de los casos hábito de crecimiento indeterminado y
- Colonización de los hábitos hechos por el hombre y de distribución vegetativa natural.

En el material cultivado se pueden distinguir entre las razas criollas primitivas y modernas. Según Harlan (1975) la llave de operación al inicio de la agricultura fueron las plantaciones que mediante la presión de selección humana conciente o inconciente (Heiser, 1988), fue ejercida en las características de la semilla.

En arqueología está claro que el carácter que permite separar las formas silvestres de los materiales cultivados en forma predominante es el tamaño de la semilla, aunque faltan las formas de transición entre los

silvestres y cultivados (Kaplan y Kaplan 1988). Sobre este punto Heiser (1982) comenta que el tamaño de las semillas pudo haber sido seleccionado inconcientemente.

Otra característica clave puede ser la reducción de la dehiscencia, consecuentemente, los materiales de frijol tienen que contar con la participación del hombre para su dispersión y sobrevivencia. Saber cual de los dos caracteres fue seleccionado primero o si los dos fueron seleccionados al mismo tiempo, es mucho especular pero varias de las formas primitivas aún todavía tienen un gran porcentaje de dehiscencia. (Brucher 1988).

Las razas primitivas son a veces muy similares a sus parientes silvestres (por ejemplo en hábito de crecimiento), pero se nota diferencia en tamaño de semilla (cambios en color de semilla) y en el porcentaje de dehiscencia.

En las variedades modernas algunos caracteres fueron conservados y mejorados con mayor diversidad en tipos de semillas; otras características modernas son por ejemplo, la insensibilidad al fotoperíodo, la modificación del hábito de crecimiento para cosecha mecánica y la apariencia de las variedades como las de frijol reventador.

6.7. MARCADORES MOLECULARES EN LA CARACTERIZACION DE ESPECIES VEGETALES

. Marcadores Genéticos

El mejoramiento clásico vegetal se basa en la selección de individuos superiores entre la progenie segregante de una cruce entre progenitores elite. Esa selección de plantas prometedoras tiene como base el fenotipo, el cual es resultado del genotipo y los efectos

ambientales. Sabemos que es difícil separar los efectos genotípicos de los ambientales para muchas características de las plantas, por otro lado las pruebas que realizamos en campo tanto para la selección como para la caracterización de material ya terminado son difíciles y tediosas o bien muy caras dependiendo de la naturaleza de la característica.

El fitomejorador tanto para seleccionar sus materiales como para caracterizar los ya terminados usa ciertas características fenotípicas que muchas de las veces le permiten inferir otras que se presentarán en otra etapa fenológica.

¿Qué es un marcador?

Un marcador es una característica fenotípica regulada genéticamente que nos permite inferir la presencia de otras características de la planta si es que están ligadas o bien con ellos podemos caracterizar los materiales.

Indudablemente que estos marcadores tienen su valor, sabemos que ciertos caracteres están condicionados por uno o dos genes pero muchos otros lo están por un gran número de genes por lo que se les da el nombre de caracteres cuantitativos. Así que esto hace que la selección y/o caracterización basada en el fenotipo sea más compleja y se tenga que recurrir a otro tipo de herramientas como son los marcadores genéticos moleculares.

En la actualidad la mayoría de los países han integrado a sus programas de fitomejoramiento el uso de marcadores genéticos moleculares como son el polimorfismo de isoenzimas, el de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), el del ADN amplificado al azar (RAPD), el de sitios de secuencias marcadas (STS), el de

secuencias repetitivas simples (SSR) o Microsatélites y el de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) los últimos cuatro, basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (Caetano et al., 1991, Rafalki et al 1991. Weising et al., 1991).

Estos marcadores tienen las ventajas de presentar efectos neutros sobre la planta, tienen una herencia mendeliana, además algunos de ellos son loci marcadores que presentan efectos codominantes como las isoenzimas los RFLP, los AFLP o dominante como en el caso de los RAPD, otra ventaja es que los marcadores se pueden encontrar a todo lo largo del genoma y es posible determinar el genotipo en cualquier etapa fenológico de la planta y en cualquier tejido, se pueden trabajar en casi todo tipo de población natural y en el caso de los marcadores de ADN estos no se enmascaran por el ambiente.

Todas estas técnicas pueden ser utilizadas para identificar y localizar genes de caracteres cuantitativos, medir cambios de frecuencias génicas por efecto de selección natural o artificial; se pueden predecir grados de heterosis mediante la medición de la divergencia genética. Además han sido propuestos como uno más de los requisitos necesarios para el registro de variedades, ya que se considera que el tipo de información que aportan estos marcadores es complementaria a la exigida por la normatividad establecida para tal efecto.

Marcadores basados en la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa puede amplificar secuencias específicas de ADN de cualquier origen (virus, bacterias, plantas y humanos).

La reacción en cadena de la polimerasa descrita en 1985 ha revolucionado el camino

de la biología molecular ya que la reacción es altamente específica, fácilmente automatizada y capaz de amplificar pequeñas cantidades de muestra en poco tiempo.

La técnica se apoya en una serie de ciclos repetitivos que involucran la desnaturalización, el alineamiento del primer oligo y la extensión, amplificación o duplicación de la cadena complementaria de ADN mediante la polimerasa, esto da como resultado la acumulación exponencial de un fragmento específico.

La mezcla de ADN mas nucleótidos y Taq polimerasa se calienta a 95°C para separar la doble cadena del ADN en estudio, posteriormente se enfría a 35°C y es allí donde el iniciador encuentra y se liga a las secuencias complementarias de las cadenas separadas del ADN posteriormente a 72°C la polimerasa permite la adición de cada uno de los nucleótidos para crear la nueva cadena complementaria. Este ciclo se repite varias veces hasta lograr amplificar en suficiente cantidad para visualizar el fragmento de ADN de interés. La amplificación es exponencial porque los productos de extensión de un ciclo sirven como ADN de reacción para nuevas amplificaciones.

Los polimorfismos resultan de las inserciones o de las deleciones en las regiones amplificadas o a partir de cambios de bases que alteran la unión del iniciador. El procedimiento es rápido, solamente se requieren pequeñas cantidades del ADN (no se necesita que sea extremadamente puro), no involucra radioactividad, ni tampoco es necesaria la transferencia tipo "Southern". El polimorfismo puede ser detectado en fragmentos que contienen grandes secuencias repetidas, dando lugar a marcadores en la región del genoma previamente inaccesible al análisis.

Otra de las ventajas de esta técnica es la forma tan sencilla de visualizar los fragmentos amplificados en la mayoría de las metodologías desarrolladas sobre esta base, ya que solo es necesario correr los fragmentos en un gel de agarosa, y una vez efectuada la electroforesis se revela con bromuro de etidio y se observan las bandas con luz ultravioleta.

La técnica de PCR, además de servir para la síntesis enzimática de ADN *in vitro* como vimos para el caso de la amplificación de sondas, es la base de una serie de marcadores que últimamente se han desarrollado como son el polimorfismo del ADN amplificado al azar, RAPD (Williams et al., 1990, Welsh and MacClelland, 1990) las secuencias de sitios marcados, STS (Olson et al., 1989. Talbert et al. 1994), secuencias simples repetitivas (SSR) o microsátelites (Beckman and Soller, 1990: Roder et al., 1995) y el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados, AFLP (Zebau, 1993).

RAPD. Polimorfismo del ADN amplificado al azar.

Este tipo de marcadores fue desarrollado en dos laboratorios al mismo tiempo (Welsh y Mecllland 1990, Williams et al 1990). Los RAPD se basan en la amplificación del ADN genómico con primers o iniciadores simples de secuencias arbitrarias de nucleótidos. Este procedimiento detecta secuencias nucleotídicas polimórficas. En esta reacción una sola secuencia simple de iniciador (primer) de solo 10 nucleótidos, se liga al ADN genómico en 2 diferentes sitios y en extremos opuestos al ADN de prueba. Si estos sitios afectados están dentro de la distancia amplificable, se produce un producto discreto a través de la amplificación mediada por el termociclador.

La presencia de cada producto de amplificación identifica la secuencia homóloga de nucleótidos completa o parcial entre el ADN genómico y los oligonucleótidos del iniciador (primer). En promedio, cada primer amplificará directamente a varios loci en el genoma, haciendo una eficiente selección del polimorfismo de secuencias de nucleótidos entre individuos.

Esta metodología funciona perfectamente para algunas especies pero para otras son necesarios algunos cambios sobre todo en el tipo de ADN a trabajar para lo cual se ha ideado el enriquecerlo eliminando las secuencias repetitivas con alto número de copias.

Las Enfermedades y el Uso de Marcadores Genéticos Moleculares

Las enfermedades bacterianas, virales y fungosas del frijol común ocurren anualmente en todo el mundo y para controlarlas se usan los pesticidas que aumentan los costos de producción, reducen el rendimiento, la calidad del producto final y contaminan el ambiente.

Los fitomejoradores desarrollan constantemente cultivares resistentes en contra de estos patógenos ya que este problema es regional y año con año se rompe la resistencia debido al surgimiento de nuevas razas patogénicas.

Por esta razón los trabajos en frijol se basan en la selección múltiple para mejorar un complejo de características.

El uso de los marcadores genéticos en la selección vegetal se está utilizando gracias al descubrimiento de la variación estructural de la herencia simple presente en las isoenzimas y las proteínas de almacenamiento de la semilla como la faseolina en el frijol común.

Con la tecnología del ADN recombinante estuvieron disponibles diferentes

tipos de marcadores moleculares. Como es el caso de los RFLP que debido a su naturaleza codominante se han extendido su uso en los mapas genéticos. Sin embargo por su costo elevado y por lo complejo de la técnica su uso no es tan frecuente por parte de los fitomejoradores.

En el frijol común, como una alternativa al mapeo, se han utilizado métodos de marcaje de genes que incluyen líneas isogénicas y análisis de segregantes en masa para identificar RAPD ligados a la resistencia de diferentes enfermedades del frijol. Gracias a esta metodología se tienen marcadores asociados a genes de resistencia específica (Monogénicos) atractivos a mejoradores que son de fácil incorporación a materiales susceptibles por medio de retrocruzas.

Se ha logrado por medio de esta técnica etiquetar el gene andino Ur-4 que condiciona la resistencia a varias razas diferentes de roya. Así como aquellos controlados por los genes de América Central Ur-3 y Ur-5.

Esto sugiere que los mejoradores tienen una oportunidad única de utilizar los genes de resistencia de los 2 grandes “pools” genéticos para desarrollar resistencia complementaria en un rango de patógenos del frijol.

En este sentido un ejemplo de la utilización de marcadores tipo RAPD para mantener el gene Ur-4 en presencia del Ur-3, lo tenemos en el desarrollo de la línea novy Belmidak-PR-7.

Por otro lado se han etiquetado con marcadores RAPD los genes Ur-4, Ur-3, y Ur-5 los Ur-3², y Ur-9; el primero que confiere una resistencia total y el segundo .

Actualmente, los marcadores se usan en forma rutinaria para acumular (en forma piramidal) los genes de resistencia y mantener

los genes “epistáticos” en el desarrollo del germoplasma resistente a roya.

Sin embargo existen algunos inconvenientes del uso de los RAPD, por ejemplo para los alelos Ur-3 y Ur-3² los marcadores son difíciles de reproducir, por lo que se requiere un refinamiento adicional que consiste en el desarrollo de marcadores tipo SCAR.

Para mejorar la característica de reproducción del marcador, muchas de estos RAPD se han convertido SCARs ó regiones amplificadas de secuencia

7. MATERIALES Y METODOS

Distribución geográfica

Las colectas tienen diversos orígenes ya que provienen de sitios desde 16 hasta 30° LN, esto es, desde el estado de Guerrero, hasta el estado de Durango. Este material puede tener la categoría de silvestre o “escapado” (o también conocido como maleza cuyo término en inglés es weedy) y presenta variación en su fenología (días a floración y madurez) tanto como en el tipo de hábito de crecimiento.

La forma “escapada” se define como un genotipo no cultivado resultante de la cruce entre un silvestre y un cultivado. Es genéticamente inestable y produce segregación, y también es un colonizador agresivo en la vegetación secundaria de los alrededores de los campos cultivados (Toro, *et al*, 1990).

La planta silvestre crece libre en una vegetación natural “climax” y es capaz de mantenerse a sí misma por períodos indefinidos sin la intervención humana. Entre sus características básicas se encuentran: su perfecta adaptación a una condición edáfica y climática en particular, su pertenencia a un

ecosistema específico, su alto potencial reproductivo y su gran reservorio de variabilidad para salir adelante en nuevas condiciones (Toro *et al.*, 1990).

Colectas de *P. vulgaris* estudiadas

Las accesiones o colectas de *P. vulgaris* forma silvestre fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma del INIFAP. Las 200 accesiones colectadas prodedentes de diferentes regiones de la República Mexicana se ubicaron geográficamente mediante la latitud y longitud de cada municipio, (Cuadro 2).siendo estos datos concentrados el sistema acces proporcionado por CONABIO.

Cuadro 2. Sitios de colecta de las accesiones silvestres en la búsqueda de resistencia genética a roya.

ENTIDAD	MUNICIPIO	LATITUD	LONGITUD
Durango	Canatlán	24° 28'	104° 36'
Durango	Durango	24° 22'	104° 28'
Durango	Durango	24° 19'	104° 27'
Durango	Durango	24° 20'	104° 28'
Durango	Nombre de Dios	23° 57'	104° 17'
Durango	Durango	23° 53'	104° 16'
Jalisco	S.M. del Valle	20° 54'	102° 22'
Jalisco	Zapopan	20° 46'	103° 24'
Jalisco	Arandas	20° 40'	102° 27'
Jalisco	Mascota	20° 34'	104° 46'
Jalisco	Cd. Guzmán	19° 41'	103° 29'
Nayarit	Ahuacatlán	21° 06'	104° 36'
Michoacán	Churintzin	20° 08'	102° 05'
Michoacán	Charo	19° 41'	100° 55'
Michoacán	Jungapeo	19° 28'	100° 29'
Morelos	Tepoztlán	18° 58'	99° 06'
Morelos	Tepoztlán	18° 57'	99° 13'
Morelos	Juitepec	18° 53'	99° 09'
Guerrero	Ixcateopan	18° 24'	99° 46'
Guerrero	Teloloapan	18° 19'	99° 49'
Oaxaca	Tlaxiactac	17° 40'	96° 39'

La colección de 200 accesiones provienen de latitudes que van desde el estado de Oaxaca hasta el estado de Durango e incluyen materiales clasificados como 1) silvestres, 2) “escapados” o 3) líneas de mejoramiento según el catálogo de frijol

silvestre del CIAT (Toro, Tohme y Debouck, 1990).

Características fenológicas

Se registraron en la base de CONABIO las siguientes variables fenológicas de las 200 colectas repatriadas:

1. Días a floración
2. Hábito de crecimiento

Días a Floración: Significa los días que tardó la accesión para llegar desde la siembra hasta la floración (cuando el 50 % de las plantas que representas esa colecta presentan flor). Por ejemplo, si se tiene un número 42 ó 50 de días a floración, estas plantas son muy precoces, ya que han empleado menos de dos meses en llegar a ese estadio fenológico. Por el contrario existen materiales sobre todo muy sensibles al fotoperiodo que al probarse en latitudes cercanas al ecuador alargan su periodo para formar la flor encontrándose datos de 160 y hasta 190 días.

Hábito de Crecimiento: Esta característica varió en los materiales silvestres, lo cual permitió evaluar la diversidad genética intrínseca de la especie (Figura 8).

El tipo de hábito de crecimiento se clasificó de acuerdo a Debouck (1984) en seis formas que describen a continuación:

- | | |
|-----------|---|
| Tipo I | determinado arbustivo |
| Tipo II | indeterminado arbustivo |
| Tipo IIIA | indeterminado totalmente postrado |
| Tipo IIIB | indeterminado semitrepador |
| Tipo IVA | indeterminado trepador con las vainas distribuidas en forma uniforme a lo largo de la planta. |
| Tipo IVB | Indeterminado trepador con las vainas concentradas en la parte superior de la planta. |

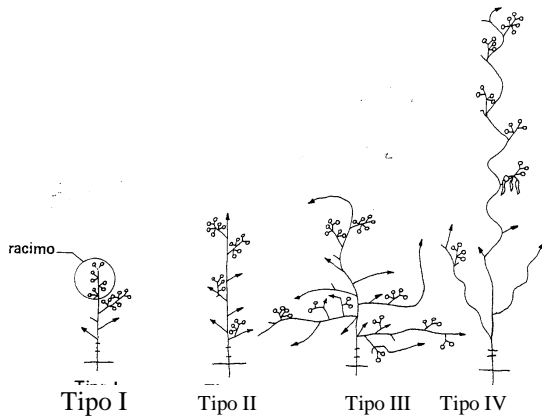


FIGURA 8. Hábito de crecimiento del frijol

El hábito de crecimiento fue tomado una vez que la planta había adquirido su tamaño máximo

Características fenotípicas

Se registraron en la base de CONABIO (Sistema Acces) las siguientes variables fenotípicas de las 200 colectas repatriadas:

1. Tamaño de hoja
2. Color de flor
3. Color, moteado y brillo de la semilla
4. Largo, ancho y grueso de semilla

Tamaño de Hoja: Este se consideró al determinar las medidas de las hojas de las colectas para obtener una escala de 9 tamaños que se definieron de la siguiente forma:

- 1: Tamaño pequeño, de 4 cm de largo por 2.5 cm de ancho de base
- 2: Tamaño pequeño, de 6 cm de largo por 4 cm de ancho de base
- 3: Tamaño mediano, de 6.5 cm de largo por 4.5 cm de ancho de base
- 4: Tamaño mediano, de 7 cm de largo por 5 cm de ancho de base

- 5: Tamaño grande, de 8.5 cm de largo por 6.5 cm de ancho de base
- 6: Tamaño grande, de 9 cm de largo por 7.5 cm de ancho de base
- 7: Tamaño grande, de 9.5 cm de largo por 9 cm de ancho de base
- 8: Tamaño grande, de 10.5 cm de largo por 9 cm de ancho de base
- 9: Tamaño grande, de 12.5 cm de largo por 10.5 cm de ancho de base

Esta medición se realizó en condiciones de campo, cuando las plantas ya han alcanzado, la floración y no han crecido con sombra. Se consideran solamente las hojas de una planta que ya han alcanzado su tamaño máximo.

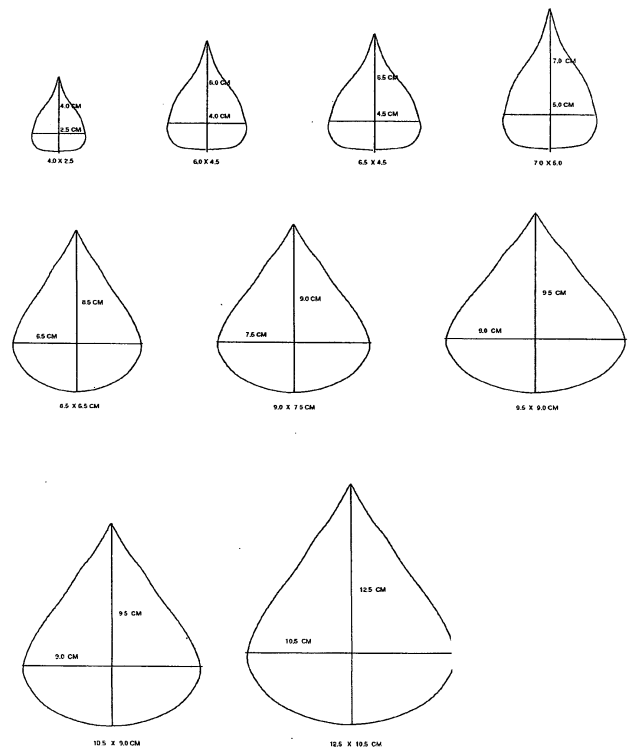


FIGURA. 7 El tamaño de hoja en las 200 colectas fue muy variable por lo que se definieron 9 tamaños.

El color de flor : Este se definió de acuerdo a las normas establecidas con números que corresponden a un color específico reconocido a nivel internacional.

- 0= Blanco,
- 1= Lila,
- 2=Morado,
- 3=Blanco con vetas lila

Las características anteriores fueron evaluadas en campo y en invernadero durante tres ciclos consecutivos para lograr obtener una información lo más completa posible ya que las colectas resultaron ser sensibles al fotoperiodo, además ser de diferentes regiones del país .

El color, moteado y brillo de semilla

Estas características se evaluaron por ser contrastantes en los materiales silvestres. Como se reviso en la literatura el color va del negro intenso, hasta el rosado claro calificados numericamente del 1 al 15. Estos colores tambien tienen otro componente ligado a la brillantez que agrega otra variante más, clasificandose en mate media y brillante con la clasificación numérica correspondiente a 3, 5 y 7. Así mismo presentan diferentes tipos de moteado dentro del color base de la semilla clasificados del 1 al 7 según el tipo.

Largo, ancho y grueso de semilla: Estas características fueron medidas con calibrador (vernier) y reportadas en milímetros.

7.5.CARACTERISTICAS FITOPATOLOGICAS

Se registraron en la base de CONABIO las siguientes variables fitopatológicas de las 200 colectas repatriadas:

1. Incidencia de roya,
2. Antracnosis
3. Tizón común
4. Vírus del Mosaico Común
5. Cercospora.

Todas estas enfermedades fueron evaluadas en campo bajo las condiciones del area del influencia del Campo experimental Valle de México(FIGURA 8).

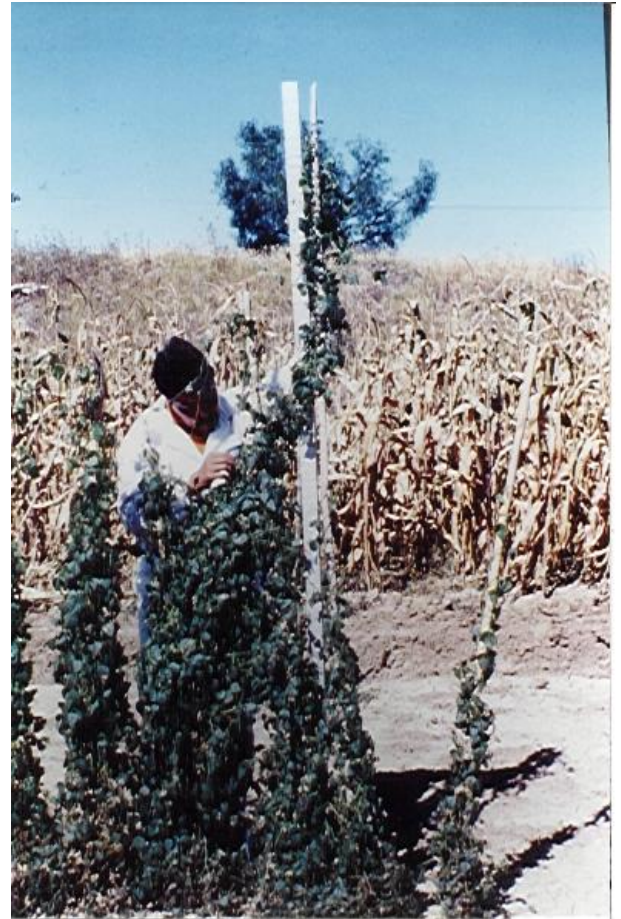


Figura 9. .Evaluación de las 200 colectas en condiciones de campo

La roya además se evaluó *in vitro* usando foliolos jóvenes de las colectas e invernadero donde se mantuvieron vivos en agua por el tiempo de la evaluación después de la infección realizada con una mezcla de roya de la región.

Las escalas utilizadas para evaluar la reacción a enfermedades del frijol fué la recomendada por van Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987) que varía de 1 a 9 donde 1 corresponde a síntomas no visibles o muy leves y el 9 cuando la planta presenta síntomas severos (Cuadro 3). En la base de datos pueden existir valores intermedios (p.e. 5.3), que se derivaron de una media aritmética resultado de tres evaluaciones periódicas, en diferentes etapas de desarrollo de los genotipo.

Las escalas de evaluación son una herramienta necesaria para determinar y/o discernir sobre probables fuentes de resistencia hacia uno o varios patógenos, a continuación se detallan las escalas utilizadas para “Calificar” la incidencia de diferentes enfermedades en las colectas de frijol.

En este informe se tendrán valores enteros y fracciones, éstos últimos indican que entre las plantas evaluadas hubo una o más con daño superior al de las plantas promedio. Como la colecta se compone por una población, al señalar la sensibilidad al ataque de cualquier patógeno deberán incluirse todos los individuos por lo que el valor promedio da una fracción.

Escala para roya

1. Altamente resistente: ausencia, a simple vista, de pústulas de roya
3. Resistencia: presencia en la mayoría de las plantas, de solo unas pocas pústulas, por lo regular pequeñas, que cubren aproximadamente el 2% del área foliar.
5. Intermedia: presencia, en todas las plantas, de pústulas generalmente pequeñas o intermedias que cubren aproximadamente el 5 % del área foliar.
6. Susceptible: presencia de pústulas generalmente grandes y rodeadas, generalmente, de halos cloróticos que cubren aproximadamente el 10% del área foliar.
9. Altamente susceptibles: Presencia de pústulas grandes y muy grandes, con halos cloróticos que cubren aproximadamente el 25 % del área foliar y causan defoliación prematura.

CUADRO 3. Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungos

Calificación	Categoría	Descripción	Comentarios
1	Resistente	Síntomas no visibles o muy leves	Germoplasma útil como progenitor o variedad comercial
2			
3			
4	Intermedio	Síntomas visibles y conspicuos que solo ocasionan un daño económico limitado	Germoplasma utilizable como fuente de resistencia a ciertas enfermedades
5			
6			
7	Susceptible	Síntomas severos a muy severos que causan pérdidas considerables en rendimiento o la muerte	Germoplasma para su conservación <i>ex situ</i>
8			
9			

Como ya se mencionó en un principio además de evaluar en campo la incidencia de esta enfermedad se hizo un estudio *in vitro* infectando hoja de cada una de las colectas con una mezcla colectada en la región.

Colecta del patógeno

Se colectaron hojas de frijol cultivado infectadas con el patógeno que contenían esporas viables del hongo. Los sitios de colectas pertenecen a diferentes localidades de

los estado de Puebla, Tlaxcala y México (Cuadro 4). Las muestras colectadas se

trasladaron en bolsas de plástico al Laboratorio de Fitopatología del CEVAMEX donde se conservaron en refrigeración a 5° C para su posterior incremento e inoculación

Inoculación y evaluación en el invernadero

La inoculación se efectuó con una suspensión de esporas provenientes de las 3 entidades federativas antes mencionadas. La separación del hongo del tejido se obtuvo golpeando las hojas sobre un tamiz de 40 mallas y recogidas en una superficie plástica para vaciarlas después en matraces con agua destilada y formar la mezcla para inocular las plantas.

La concentración aproximada del inóculo fue de 5×10^3 , que se formó con gr 10 de esporas colectados en hojas enfermas de roya.

La inoculación en planta se dirigió con el uso de atomizadores en ambos lados de las

hojas y se colocaron en una cámara de plástico de 3.0 x 1.5 m que funcionó como cámara húmeda ya que mantuvo la humedad relativa cercana al 100% durante 20 horas.

Posteriormente, las plántulas se llevaron a un bancal de invernadero y se asperjaron 3 veces al día con agua destilada. Después de 7 días empezaron a aparecer los síntomas. La evaluación se realizó 12 días después de la inoculación para lo que se utilizó la escala recomendada por CIAT (Van Schoohoven, 1978). La técnica utilizada fue la de hoja desprendida (Llagedorn *et al*, 1986).

En invernadero se efectuaron dos inoculaciones con roya. La primera en folíolos colectados de accesiones silvestres establecidas en campo, las cuales se colectaron en tubos de ensayo previamente esterilizados y llenos de agua destilada. La segunda se llevó a cabo en plantas vivas para corroborar los resultados obtenidos de la primera inoculación

Cuadro 4. Sitios de colecta de material atacado por roya en tres entidades. 1995.

ENTIDAD	MUNICIPIO	ENTIDAD	MUNICIPIO
Puebla	Amozoc	Puebla	Tlachichuca
	Nopalucan	México	Texcoco
	Libres		Xochimilco
	Tlatlanquitepec	Tlaxcala	San Vicente
	Tecamachalco		Tlaxcala
	Acatzingo		Calpulalpan
	Palmar de Bravo		Chiautempan
	Tlacotepec de Juárez	Apizaco	
S.N.B.A.	Huamantla		

Escalas utilizadas en la evaluación de otras enfermedades

Antracnosis

1. Sin síntomas visibles de la enfermedad
3. Presencia de muy pocas y pequeñas lesiones, generalmente en la vena primaria del envés de la hoja o de la vaina, las cuales cubren aproximadamente el 1% del área foliar.
5. Presencia de varias lesiones pequeñas en el pecíolo o en las venas primarias o secundarias del envés de las hojas. En las vainas las lesiones redondas y pequeñas (menos de 2 milímetros de diámetro) con esporulación reducida o sin ella, cubren aproximadamente el 5% de la vaina.
7. Presencia de numerosas lesiones grandes en envés de las hojas. También se pueden observar lesiones necróticas en el haz y en los peciolo. En las vainas presencia de lesiones de tamaño mediano (más de 2 mm de diámetro) Aunque también pueden hallarse algunas lesiones pequeñas y grandes, generalmente con esporulación, que cubren aproximadamente el 10 % de la superficie de la vaina.
9. Necrosis severa evidente en el 25% o más del tejido de la planta como resultado

Tizón común

1. Sin síntomas visibles de la enfermedad
3. Con 5 a 10% de la parcela evaluada está infectada.
5. Con 20 a 30% de la parcela evaluada está infectada.

7. Con 40 a 60% de la parcela evaluada está infectada

9. Más del 80% de la parcela evaluada está infectada

Cercospora

1. Sin síntomas visibles de la enfermedad
3. Presencia de pocas lesiones concéntricas pequeñas y oscuras, que cubren aproximadamente el 2% del área foliar y del área de las vainas.
5. Presencia de varias lesiones de tamaño pequeño a (hasta de 1 cm de diámetro), con esporulación limitada, las cuales cubren aproximadamente el 5% del área foliar y del área de las vainas.
7. Presencia de grandes lesiones con esporulación que cubren aproximadamente el 10 % del área foliar y del área de las vainas. También pueden aparecer lesiones en tallos y ramas. En el follaje estas lesiones pueden juntarse.
9. Necrosis severa evidente en el 25% o más del tejido de la planta como resultado de lesiones en la hoja, peciolo tallo, ramas e incluso en el punto de crecimiento; esta necrosis causa frecuentemente la muerte de gran parte de los tejidos de la planta.

Virosis

Esta escala se presenta en el Cuadro 5 donde se explica a detalle la incidencia de la enfermedad y la calificación del síntoma.

9.

CUADRO 5. Escala general de evaluación para enfermedades virales

Calificación	síntoma	incidencia%
1	ausentes	0
2	dudosos	1 - 10
3	débiles	11 - 25
4	moderados	26 - 46
5	intermedio	41 - 60
6	generales	61 - 75
7	intensos	76 - 90
8	severos	91 - 99
9	muerte	100

7.6. CARACTERISTICAS MOLECULARES

Para poder determinar la presencia de los marcadores asociados a los genes de resistencia Ur3 y Ur5 se tuvo que extraer AND para lo cual se utilizó el método de de Minipreps que desarrolló Afanador *et al.*, (1993) e involucra el uso del detergente biológico CTAB. Se considera como un método de minipreps especial porque requiere una cantidad relativamente grande de tejido vegetal (100 mg) en contraste con los minipreps que requieren alrededor de 100 µg. Este método fue adaptado por el personal del Laboratorio de Biotecnología del CEVAMEX-INIFAP.

Tratamiento de las muestras.

El tejido foliar joven, seleccionado, estaba libre de enfermedades o plagas, completamente sano y sin regiones cloróticas.

Las muestras se etiquetaron perfectamente y colocaron en bolsas de malla plástica (fibra de vidrio) para congelaron inmediatamente con Nitrógeno líquido.

Posteriormente se liofilizó (deshidratación de las muestras por sublimación durante 48 horas como mínimo) y se efectuó la extracción.

Metodología.

1.- Se molió el tejido vegetal liofilizado y pesó en tubos eppendorf de 2 ml al rededor de 100 mg.

2.- Se agregó 1 ml del amortiguador de extracción (Tris 100mM pH 8.0, CTAB 2% EDTA 20mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, βmercaptoetanol 1%) y mezcló cuidadosamente. Incubando después por 20 minutos a 65° C.

3.- Se adicionaron con 600µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclando suavemente por 15 minutos.

4.- Se centrifugó 15 minutos a 2500 x g para precipitar paredes celulares y fragmentos de membranas.

5.- Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo que contenía 700µl de isopropanol preenfriado, incubando a -20°C por 15 min.

6.- Se centrifugó 15 minutos a 2500xg y decanto el sobrenadante para secar la pastilla de ADN precipitada en el fondo del tubo.

7.- Al tubo se le agregaron 10 µl de TE (tris HCl 0.1 mM a pH 8.0) más 4µl de ARN'asa A (10 µg/ml), e incubó 30 minutos a 37°C.

7.-El ADN se precipitó con 200µl de EtOH Absoluto frío

7.-.- Se centrifugó 10 minutos a 2500xg a temperatura ambiente para separar las fases. Después se descartó sobrenadante y secó la pastilla de ADN

8.- El AND se resuspendió en 100 µl de TE pH 8.0, y almacenó a 4°C hasta su uso.

ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)

La técnica RAPD es una de las más sencillas entre las que involucran el manejo directo del ADN. Se fundamenta principalmente en la extracción del ADN genómico y el uso de oligonucleótidos (normalmente de 10 bases) como iniciadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Los pasos fundamentales de la técnica son:

- 1.- Selección de la muestra de tejido vegetal.
- 2.- Extracción del ADN genómico.
- 3.- Amplificación.
- 4.- Separación de los fragmentos amplificados.

Selección de la muestra.

Al igual que para cualquier otra técnica que requiera la extracción de ADN deben tenerse cuidados especiales al hacer las colectas ya que una mala selección de la muestra puede conducir a resultados erróneos, lo cual debe evitarse en cualquier trabajo de

investigación. Los principales cuidados que deben tenerse son:

Seleccionar tejido sano, sin rastros visibles de enfermedades por hongos o bacterias, sin insectos o arácnidos (ácaros, áfidos, aleuródidos, etc) o sus huevecillos, sin zonas cloróticas y de preferencia tejido joven.

Extracción de ADN.

La extracción se puede realizar por cualquier método ya sea maxipreps o minipreps, siempre y cuando se obtenga un ADN de la calidad necesaria (que la razón de absorbancias a 260/280 nm de longitud de onda se encuentre entre 1.7 y 2.0

Amplificación.

La amplificación se llevó a cabo por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en un Termociclador (Amplificador de ADN) usando una ADN- polimerasa termoestable cuyo punto de temperatura óptima se encuentra alrededor de 70°C. La primera enzima que se usó con este fin fue la ADN-polimerasa extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en ambientes de temperatura extrema, por lo que recibe el nombre de Taq polimerasa.

Escencialmente la obtención de este tipo de marcadores se basa en la replicación del ADN a nivel celular, de este proceso biológico se aislaron los pasos esenciales mínimos necesarios para replicar fragmentos de ADN. Las modificaciones más importantes son el uso de iniciadores de ADN en lugar de ARN, la separación completa de las dos cadenas de ADN y el uso único de la Taq polimerasa.

Las reacciones típicas de amplificación incluyen: ADN blanco (el ADN extraído previamente de las muestras de interés), taq

polimerasa, amortiguador estabilizador de la enzima (normalmente se encuentra a concentración 10X y se provee junto con la enzima y el Cloruro de Magnesio). Además se adicionan Cloruro de Magnesio, que funciona como cofactor de la polimerasa, bases nucleotídicas en la forma de desoxinucleótidos (desoxi-adenosín-trifosfato, desoxi-citidín-trifosfato, desoxi-timidín-trifosfato y desoxi-guanidín-trifosfato) que en conjunto se conocen genéricamente como dNTP's. Así mismo son indispensables los primers o iniciadores que servirán para reconocer sitios homólogos en el ADN blanco y se anclarán a ellos dando la oportunidad de que la polimerasa los reconozca e inicie la polimerización de las bases complementarias a la cadena de ADN, y finalmente agua bidestilada estéril para ajustar a un volúmen y concentraciones predeterminadas (Cuadro6).

CUADRO 6. Una mezcla de reacción típica incluye lo siguiente:

Componente	Concentración Final
Agua	Cuanto baste para 25 μ l
Amortiguador para PCR 10X	1X
Cloruro de Magnesio	2 mM
DNTP's	200 μ M c/u
Iniciadores	200 nM
Taq polimerasa	1 U
ADN	20-50 ng

Como los volúmenes a medir son demasiado pequeños es de utilidad hacer mezclas maestras de reacción que incluyan los reactivos necesarios para el total de las muestras a analizar (es útil incluir 1 o 2 reacciones más para asegurar que todos los tubos tengan el mismo volúmen) exceptuando el ADN blanco. Posteriormente el volúmen total se divide entre el número de muestras y a cada una se le agrega la muestra de ADN. Una

vez hecho esto a cada tubo se le agregan 1 o 2 gotas de aceite mineral estéril para evitar la evaporación.

En el termociclador se llevó acabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de manera automatizada. La PCR se basa en la separación por calor de la doble cadena de ADN (aproximadamente 90 °C), disminución de la temperatura (aproximadamente 40 °C) para permitir el apareamiento de los iniciadores con sus sitios complementarios en el ADN blanco y, por último, una elevación de la temperatura (aproximadamente 72°C) para permitir el buen funcionamiento de la taq polimerasa. Esto se repite alrededor de 35 veces.

El primer ciclo es de desnaturalización inicial para asegurar una buena separación de la doble cadena de ADN y que el iniciador se pegue apropiadamente. El último ciclo es de extensión final para asegurar que todos los fragmentos se polimericen adecuadamente. Los 35 ciclos intermedios corresponden propiamente a la amplificación (Cuadro 7).

CUADRO 7. Un programa de amplificación típico consta de lo siguiente:

No. De Ciclos	No. de segmentos	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	5 minutos
35	3	Segmento 1 94°C	1 minuto
		Segmento 2 35°C	1 minuto
		Segmento 3 72°C	2 minutos
1	1	72°C	5 minutos

Después de que el programa de amplificación se ha completado con éxito se procede a retirar el aceite mineral de cada tubo mediante la adición de 25 μ l de amortiguador

Tris-EDTA pH 8.0 (cuadro 1) y 50 µl de cloroformo, se mezcla, se centrifuga y se pasa la fase acuosa (aquí están los fragmentos amplificados) a otro tubo. A este tubo se le adicionan 6 µl de colorante de carga 5XSGB para que la solución se haga más densa y pueda irse al fondo del pozo cuando se cargue el gel, también sirve para ver la migración de las muestras; de esta manera las muestras amplificadas quedan listas para correrse en geles de agarosa

ELECTROFORESIS DE ADN

La Electroforesis de ADN es la separación de ADN o fragmentos de él en una matriz porosa de agarosa. Normalmente se separa el ADN genómico para ver su calidad, en este caso el gel se prepara a concentración de 0.7%. Los fragmentos de ADN pueden provenir de la acción de enzimas de restricción, de la amplificación por PCR, de Plásmidos, etc., en estos casos se usa una concentración del 1%-2%, para fragmentos amplificados se usa comúnmente al 1.4%.

A continuación se describe la técnica utilizada en el presente trabajo de separación de fragmentos de ADN por electroforesis sumergida en geles de agarosa.

Preparación del gel.

1.- Pesar la cantidad correspondiente de agarosa (1.4 g por cada 100 ml para un gel al 1.4%) y formar una suspensión en amortiguador TBE 1X (Trizma base. 10.8 gr/l, Acido Bórico 5.5 gr/l, Na₂EDTA 2 mM)

2.- Calentar la suspensión en horno de microondas hasta ebullición. Se debe obtener una solución incolora y cristalina. Permitir que se enfríe hasta aproximadamente 40°C (se puede enfriar más rápido en agua corriente con agitación continua).

3.- Servir en el portagel con el/los peines ya colocados y perfectamente nivelado para obtener una distribución uniforme. Permitir que se enfríe hasta que gelifique (de 30 a 45 minutos).

4.- Colocar el gel dentro de la cámara de electroforesis orientando el peine hacia el electrodo negativo. Llenar la cámara con amortiguador TBE 1X hasta que sobrepase el nivel del gel en aproximadamente 5 milímetros.

5.- Retirar el peine para dejar los pozos bien formados y que penetre el amortiguador en ellos sin que les queden burbujas de aire. El gel preparado de esta forma está listo para cargarse con las muestras.

Corrimiento.

1.- De los productos de amplificación o las mezclas de digestión con enzimas de restricción previamente adicionados con colorante de carga (5XSGB) se toman 15-20 µl y se colocan cuidadosamente dentro del pozo procurando no dañarlo ni formar burbujas al pipetear.

2.- Hacer un corte en la esquina superior izquierda del gel para identificar la primera muestra y el sentido del corrimiento (siempre se corren de negativo a positivo).

3.- Colocar los electrodos cuidando que se mantenga la polaridad correcta (negativo a positivo). Colocar la tapa de la cámara como medida de seguridad.

4.- Establecer en la fuente de poder la corriente necesaria (normalmente 50 a 60 miliamperes) y permitir la separación de las muestras por 1 a 2 horas (hasta que el azul de bromofenol del 5XSGB se encuentre a 1 cm de la siguiente fila de pozos).

Corrimiento.

1.- De los productos de amplificación o las mezclas de digestión con enzimas de restricción previamente adicionados con colorante de carga (5XSGB) se toman 15-20 μ l y se colocan cuidadosamente dentro del pozo procurando no

Revelado.

Una vez que el corrimiento se completó, se apaga la fuente de poder, se desconectan los electrodos y se revela el gel para ello se procede de la siguiente manera.

1.- Tomar cuidadosamente el portagel y llevarlo al área de revelado específica para manejo de bromuro de etidio. Introducirlo cuidadosamente en un recipiente que contenga bromuro de etidio a una concentración de 1 μ g/ml.

2.- Agitar suavemente durante 20 minutos.

3.- Enjuagar en agua destilada en agitación orbital suave durante 20 minutos.

4.- Colocar en el trasiluminador de luz ultravioleta (**ATENCIÓN:** la luz UV puede causar ceguera por lo que es necesario protegerse con lentes ó caretas especiales).

5.- Documentar mediante fotografía con rollo blanco y negro y filtro naranja.

Los iniciadores utilizados en este estudio para amplificar el ADN de las 200 colectas fueron los recomendados por Kelly y colaboradores (1995). Estos iniciadores son comerciales y los vende la compañía "Operon" y sus siglas son OPK14 y OPF10.

Como se mencionó en la literatura estos iniciadores proporcionan un patrón de fragmentos de ADN con diferente peso molecular. Cada uno de ellos tiene una

composición diferente en bases púricas y pirimídicas. Así el OPK14 del extremo 5' al 3' se compone como sigue: CCCGCTACAC y su peso molecular es 2624. Mientras que el OPF10 de peso molecular 3099, se compone como sigue: GGAAGCTTGG.

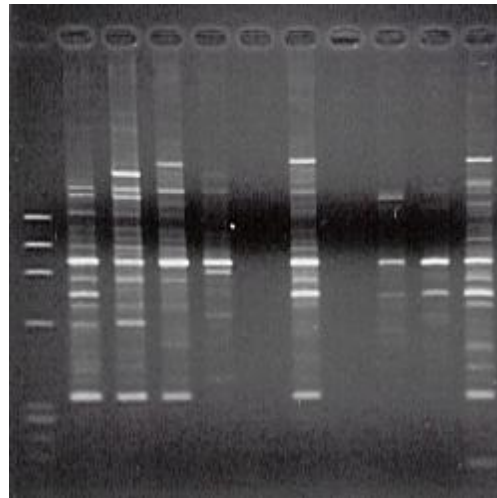


FIGURA 10. Ejemplo de amplificación de ADN mediante el primer OPK14 para la detección del gen de resistencia a roya Ur3. Corrimiento en gel de agarosa al 1.4%.

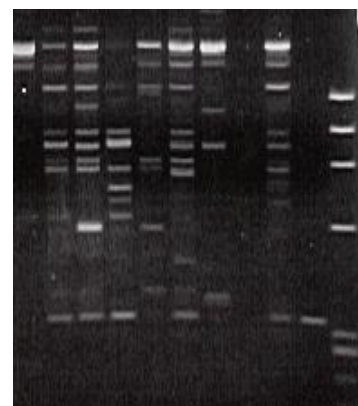


FIGURA 11. Ejemplo de amplificación de ADN mediante el primer OPF10 para la detección del gen de resistencia a roya Ur3. Corrimiento en gel de agarosa al 1.4%

El arreglo de las bases permite a los decámetros la amplificación de fragmentos de diferentes dimensiones, dependiendo de las partes del genoma donde se encuentre la fracción homologa donde se inicia el proceso de síntesis de la nueva cadena de ADN.

En el caso del OPK14 uno de esos fragmentos tiene 620 pares de bases y se encuentra ligado a la fracción genética identificada con el gen Ur3 que confiere resistencia a un tipo de roya.

Por lo que respecta al iniciador OPF10, este posee un fragmento de ADN que tiene 970 pares de bases y que esta relacionado con el gen Ur5, el cul también confiere resistencia a un tipo de roya.

La metodología empleada para la identificación de la presencia de estos marcadores asociados a los genes Ur3 y Ur5 consistió en utilizar un testigo cortado con una enzima específica para obtener fragmentos con pesos moleculares próximos a los de los marcadores.

En este trabajo se utilizaron como testigos ϕ X174 cortado con Hae III que proporcione fragmentos con rangos de 72 pares de bases (pb) hasta 1,353 pb y el otro testigo fue 1Kb ADN con fragmentos que van desde 500pb hasta 40 Kb.

En las siguientes figuras 12 y 13 se muestran los testigos que sirvieron de referencia para la detección de los fragmentos asociados a los genes Ur3 y Ur5.

Con base en las distancias recorridas del inicio del gel (pozos) hasta la presencia de los fragmentos de ADN testigo se determinaron los pares de bases de los fragmentos en estudio para cada colecta, logrando determinar la presencia o ausencia de

los fragmentos de ADN relacionados con la resistencia a roya

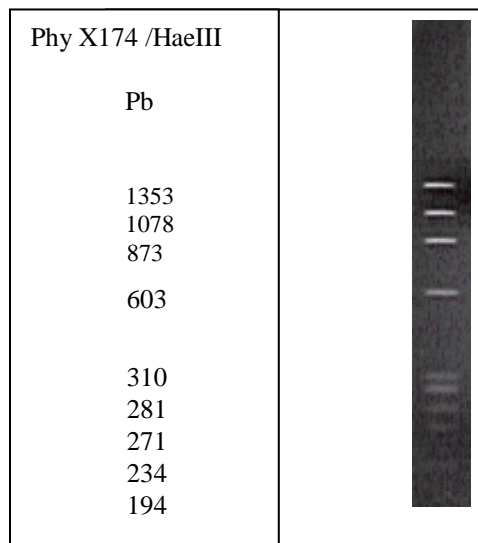


FIGURA 12. Testigo ϕ X174 /Hae III usado para identificar los fragmentos de 620 y 970 pares de bases asociados a los genes Ur3 y Ur5 que confieren resistencia a roya.

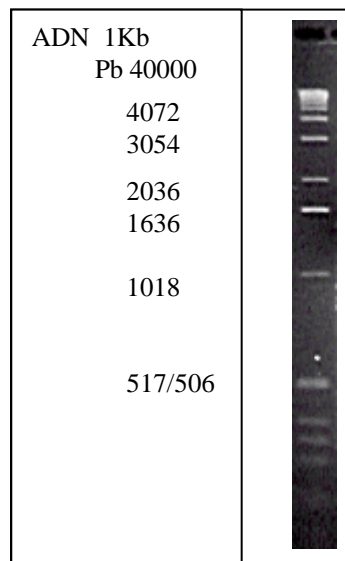


FIGURA 13. Testigo de ADN 1Kb usado para identificar los fragmentos de 620 y 970 pares de bases asociados a los genes Ur3 y Ur5 que confieren resistencia a roya.

8.RESULTADOS.

Características Fenológicas

Al analizar el conjunto de las 200 colectas se encontró que los días necesarios a floración variaron de 42 a 190 después de la siembra, lo cual mostró la variación del material para esta característica, al sembrarse en ésta latitud (19° 29'). Estos materiales silvestres mostraron una marcada respuesta al fotoperiodo, lo cual indica que su desarrollo esta influenciado por el medio, característica acentuada en las especies silvestres, cuya fenología esta coordinada con los cambios estacionales.

Además, al estudiarse (mediante análisis de conglomerados y componentes principales) 70 colectas representativas del conjunto total de las 200, se encontró que las provenientes del norte (Durango y Jalisco) florecieron primero (60-100 días) que las del Sur (Michoacan, Morelos Guerrero y Oaxaca) que tuvieron un periodo vegetativo más largo (120-134 días a floración). La precocidad de los materiales de Durango y Jalisco a que en esa región semiárida los genotipos han evolucionado a través del tiempo, hacia la precocidad para evitar factores adversos como la sequía y las heladas. En tanto que la floración tardía de los frijoles de los Estados del sur, como Morelos, Michoacán y Guerrero, son materiales que han evolucionado con menos factores climáticos limitantes y que no han permitido la precocidad.

Características Fenotípicas

En lo referente al habito de crecimiento se encontraron 18 colectas con tipo I esto es determinado arbustivo. Este hecho en plantas silvestres no se esperaba, sin embargo tal vez este material puede considerarse como escapado.

Del tipo indeterminado arbustivo se tubieron 26 colectas (tipo II), mientras que del indeterminado totalmente prostrado se detectaron 5 (tipo IIIA) lo que nos lleva a pensar. Del tipo indeterminado semitrepador fueron 25 (tipo IIIB) y del trepador con las vainas distribuidas uniformemente a lo largo de la planta se presentaron 89 (tipo IVA) y 35 del tipo Indeterminado trepador con las vainas concentradas en la parte superior de la planta (Tipo IVB).

Con respecto al tamaño de hoja los tamaños variaron desde el tamaño pequeño de 4 cm de largo por 2.5 cm de ancho de base (14 ejemplares) hasta, el tamaño grande de 12.5 cm de largo por 10.5 cm de ancho de base (un ejemplar). Los dos tamaños medianos predominaron en 71 ejemplares, mientras que los cinco tamaños grandes se presentaron en diferentes proporciones concentrandose en el tamaño grande de 8.5 cm de largo por 6.5 cm de ancho de base (46 ejemplares) y en el Tamaño grande de 9 cm de largo por 7.5 cm de ancho de base (21 ejemplares).

Con referencia al color de flor codificado para los fines de este estudio en 0= Blanco, 1= Lila, 2=Morado, y 3=Blanco con vetas lila, se observó que el color predominante fue el morado con 75 ejemplares, siguiendo el lila con 67 despues el blanco con 49 y finalmente 5 ejemplares con flores blancas con betas color lila.

Las características intrínsecas de la semilla fueron evaluadas de acuerdo a las normas internacionales establecidas como son el color, la forma, brillo, y el moteado característico. Así mismo se determinó el largo, ancho y grueso de la semilla.

En cuanto al color éste vario fuertemente dentro y entre colectas, por esta razón se observará en el catálogo de características fenológicas y fenotípicas, pocos

números enteros que representan a las colectas de color homogéneo; mientras que los números no enteros representan a las que tienen una variación interna en color.

Las colectas 1,2, 4, 6, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 30, 31, 33, 34, 41, 42, 44, 53, 56, 58, 59, 61, 72, 73, 74, 82, 84, 86, 87, 89, 91, 92, 96, 100, 101, 103, 105, 106, 109, 113, 114, 116, 124, 134, 136, 137, 138, 139, 141, 142, 145, 147, 150, 151, 153, 164, 170, 171, 172, 174, 176, 178, 179, 180, 183, 184, 186, 188, 189, 194, 195 y 198 presentaron colores uniformes al interior de cada una, mientras que las restantes 126 colectas presentaron variación.

El color predominante fue el café oscuro a claro con 72 ejemplares, después el marrón con 44, siguiendo el gris con 27 y el negro con 18. Así mismo se presentaron 8 colectas con color amarillo, 6 con ante y una con color morado.



FIGURA 13. Coloración presente en la colección de *phaseolus silvestre* repatriado estudiado en este trabajo.

Dentro del color del grano también se presentan características de brillantes, clasificándolas en tres categorías, mate, media y brillante.

La colección presentó en la mayor parte de sus ejemplares granos brillantes, (151 colectas). Con respecto a los materiales opacos o medios, éstos presentaron una variación interna como se observa en los datos del catálogo de características fenológicas y fenotípicas de la planta y semilla.

En cuanto a la forma, ésta también varió dentro de los materiales estudiados y solo 66 colectas presentaron una forma uniforme al interior de la misma (Figura 14).

La forma redonda solo fue presentada por dos materiales y la cuboide por 40, mientras la gran mayoría presentó una forma intermedia entre oval y cuboide

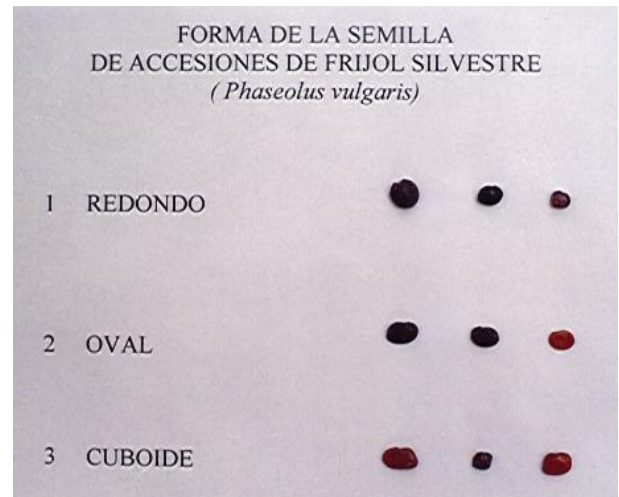


FIGURA 14. Formas del frijol silvestre.

El moteado presente en la semilla silvestre también presentó una variación al interior de 88 colectas, sin embargo 111 materiales fueron uniformes (Figura 15).

Se observó que 12 colectas no tuvieron moteado simple, 61 lo presentaron contrastante, 12 con un tipo rayado, una de

forma romboide, 5 punteado, 11 con tiras anchas y 16 con manchas bicolors.

Con respecto al tamaño del grano se encontró que el largo de toda la colecta vario de un mínimo de 3 a 10 mm con una media de 6.47mm y una desviación estandard de 1.34. Así mismo el ancho vario de 2 a 6.2 mm con una media de 4.0, cuya desviación fue de 0.79. El grueso también vario de 1 a 4.4 mm con una media de 2.32 mm y una desviación estandard a la de 0.64.

Del total de colectas 24 miden de largp menos de 5 mm y 77 tienen un ancho menor a 4 mm. Y para el grueso del grano tenemos que 47 materiales se encuentran abajo de los 2 mm.

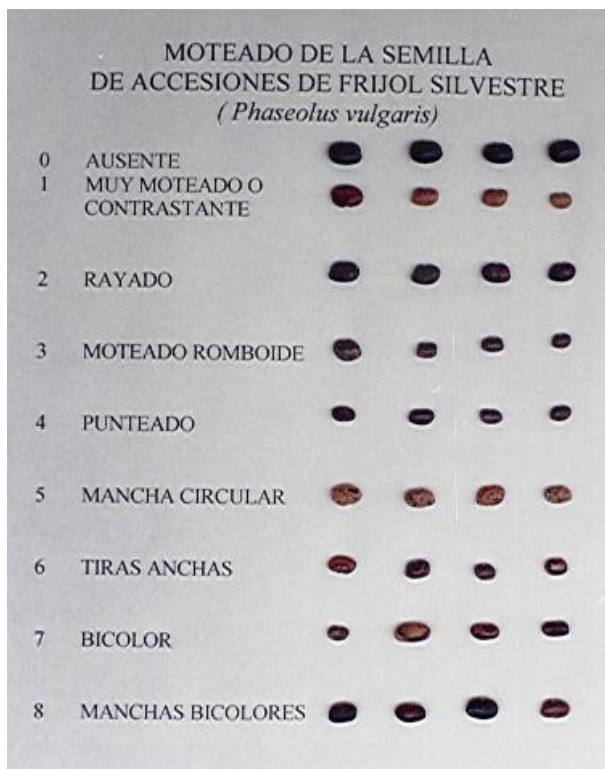


FIGURA 15. Muestra del tipo de moteado que se encuentra en los frijoles silvestres.

Características Fitopatológicas

Las enfermedades presentes en campo fueron: Roya, Virus del mosaico común, Tizón foliar por cercospora, antracnosis y tizón común. Los mayores daños se registraron en la segunda evaluación del día 28 de septiembre con 2.4 de daño contra 2.0 y 2.3 de la primera y tercera evaluación, respectivamente.

El patógeno que causó los mayores daños fue la roya con 4.1 en promedio durante las tres evaluaciones. El nivel se incrementó paulatinamente de un 3.2 inicial a 4.9 en la tercera evaluación. Debido a las bajas temperaturas (10 de octubre) no se pudo determinar si el daño seguiría incrementándose (Cuadro 8).

Campo

El mayor daño que se presentó a finales de septiembre coincidió con las precipitaciones registradas durante la semana anterior, y temperaturas promedio de 25° C, propicias para el desarrollo de dichos patógenos.

Algunas de las enfermedades que se desarrollan mejor bajo condiciones de humedad relativa baja y altas temperaturas disminuyeron en daño en la última evaluación (9 de octubre): como fue el caso de virosis, resistencia a roya, 16 al VCM, 49 cercospora, 51 a tizón común y 121 antracnosis.

El menor número de genotipos con resistencia genética a enfermedades se presentó en VMC y roya, debido a que patógenos que tienen gran variabilidad genética, por otra parte la etapa vegetativa de la planta en la que se presentaron las enfermedades fue preponderante en el grado de daño de las mismas, no así en antracnosis, en la cual existen evidencias de resistencia de planta adulta y por lo tanto escape de los genotipos hacia el patógeno.

Cuadro 8. Variación de daños en los genotipos silvestres evaluados en campo. Chapingo, México. 1995.

EVALUACIÓN	ENFERMEDAD					PROMEDIO
	ROYA	VCM	CERCOS	ANTRAC.	T-C	
19 de Sept.	3.21	2.67	2.10	1.03	1.00	2.0
28 de Sept.	4.34	2.64	1.81	1.09	1.35	2.4
9 de Oct.	4.90	2.39	1.08	1.00	2.42	2.3
PROMEDIO	4.15	2.56	1.66	1.04	1.62	2.2

ROYA = *Uromyces appendiculatus* VCM = Virus del mosaico común, CERCOS = Cercospora, ANTRAC = Antracnosis
T-C = Tizón común

En el caso de tizón foliar, el daño disminuyó debido a que la presencia de este patógeno se restringió a la parte baja del dosel, ocasionando defoliación en la parte basal de la planta. Las enfermedades que se favorecieron con el incremento de la humedad ambiental fueron la roya, antracnosis y más aún el tizón común. Los daños mayores fueron causados por roya 4.9 y los menores por antracnosis únicamente con 1.1 en promedio durante todo el ciclo. En la mayoría de los patógenos el daño fue un aumento, pero por las condiciones adversas de temperatura durante la primera decena de octubre, no se continuó con las evaluaciones.

Del total de genotipos evaluados en campo, solamente 18 resultaron con Invernadero

En la evaluación con roya, realizada *in vitro* en invernadero, únicamente 27 genotipos fueron resistentes, los cuales se redujeron a 22 en una segunda evaluación y sólo 16 se registraron como resistentes en ambas inoculaciones (Cuadro 9).

El tamaño de pústula fue variable, y se registró por orden de frecuencia; la presencia del halo y el grado de intensidad es un indicador también de genotipos con resistencia a roya.

Con base en los resultados obtenidos de campo e invernadero, se detectaron como fuentes de resistencia de frijol silvestre, aquellos genotipos que resultaron resistentes

en ambas condiciones; los resultados de invernadero nos aseguran la eliminación de genotipos con escape en campo.

Cuadro 9. Genotipos con resistencia a roya, en condiciones de invernadero. Chapingo, México. 1995.

NUMERO DE COLECTA	TIPO DE RESISTENCIA			
	GODIGO CIAT	PRIM. EVAL.	SEG. EVAL.	AMBAS
CODIGO INIFAP				
URG-11786	G-10006	*	*	*
URG-11789	G-10008A	*	*	*
URG-11803	G-10018	*	*	*
URG-11808	G-10020A	*	*	*
URG-11844	G-12876	-	*	
URG-11846	G-12877A	*	-	
URG-11845	G-12877	-	*	
URG-11855	G-12892	*	-	
URG-11860	G-12898	*	-	
URG-11872	G-12941	*	-	
URG-11887	G-12970	*	*	*
URG-11890	G-12974	*	*	*
URG-11895	G-12979	*	-	
URG-11909	G-13004	-	*	
URG-11906	G-13000	*	*	*
URG-11908	G-13003	*	*	*
URG-11755	G-9981C	*	*	*
URG-11756	G-9981D	*	*	*
URG-11759	G-9982	*	*	*
URG-11768	G-9987	*	*	*
URG-11774	G-9987F	*	-	
URG-11777	G-9989A	*	-	
URG-11780	G-9996	*	-	
URG-11783	G-9998A	*	*	*
URG-11787	G-10007	*	-	
URG-11767	G-9986 F	*	*	*
URG-11785	G-10001	*	*	*

* RESISTENTE
- SUSCEPTIBLE

De acuerdo con los criterios anteriores, únicamente nueve accesiones presentaron resistencia a roya en condiciones de campo e

invernadero. Considerando los datos de tres evaluaciones en campo, solamente cuatro accesiones mostraron resistencia múltiple a enfermedades; los genotipos fueron los codificados tipo CIAT G-9883 (URG-11760), G-9987D (URG-11768), G-10018 (URG-11803), y G-13000 (URG-11906).

Analizando globalmente los datos fenológicos, fenotípicos y relacionados con el grado de resistencia a las enfermedades se realizó un análisis de componentes principales.

De ese análisis inicial se seleccionaron las variables de mayor interés que no disparaban los datos obteniéndose una agrupación de los materiales estudiados de acuerdo a tres componentes principales que explican el 70.8% de la varianza. En el primero las características que tienen el mayor peso son largo, ancho y grueso de semilla, en el segundo, las variables más importantes son las relacionadas con el daño ocasionado por la roya inoculada *in vitro*, el tamaño de la pústula, y el tipo de halo que presenta este hongo, mientras que en el tercero son la incidencia de tizón y cercospora (ver Cuadro 9 y Figura 16).

CUADRO 9. Componentes Principales

Variable	PRIN 1	PRIN 2	PRIN 3
Tizón	0.12653	-0.1469	0.66149
Cercospora	0.06479	-0.0894	0.71226
Daño por Roya	0.07346	0.50353	0.07260
Tamaño Pústula	-0.0089	0.53949	0.01966
Tipo de Halo	0.02477	0.65126	0.16966
Largo semilla	0.57730	-0.0283	-0.0607
Ancho semilla	0.56855	-0.0267	-0.0977
Crueso semilla	0.56318	0.01343	-0.0863

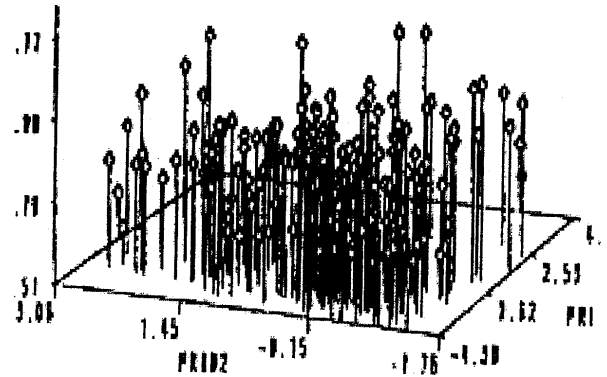


FIGURA 16. Análisis de Componentes Principales en la colecta de frijol silvestre repatriada, tomando en cuenta incidencia de enfermedades *in situ* e *in vitro*, características del hongo y de la semilla.

En un siguiente análisis de componentes principales se eliminaron los datos de la semilla y se encontró que los tres primeros componentes explicaron el 76.3% de la variación encontrada. Siendo para el primer componente las variables de mayor peso el daño por roya el tamaño de pústula y el tipo de halo formado; en el segundo componente destacan la incidencia de tizón y cercospora, mientras que en el tercero son el daño causado por roya *in vitro* y el tamaño de pústula. (Cuadro 10 y Figura 17)

CUADRO 10. Componentes Principales

Variable	PRIN 1	PRIN 2	PRIN 3
Tizón	-0.1330	0.68777	-0.0336
Cercospora	-0.0781	0.70299	0.12881
Daño por Roya	0.50777	0.09377	-0.7331
Tamaño Pústula	0.53819	-0.0048	0.66623
Tipo de Halo	0.65478	0.15476	0.02949

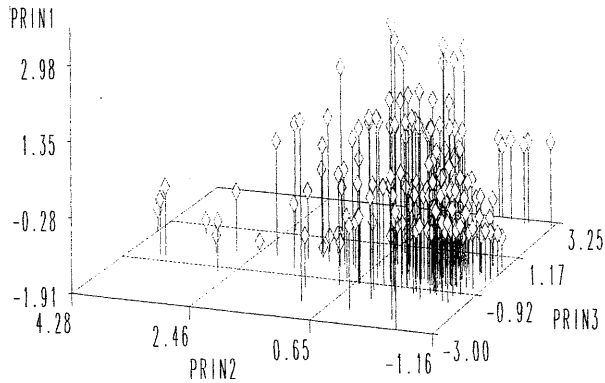


FIGURA 17. Análisis de Componentes Principales en la colecta de frijol silvestre repatriada, tomando en cuenta variables relacionadas con incidencia de enfermedades y características del ataque de roya

Características Moleculares

Las determinaciones para la amplificación de ADN de cada una de las colectas se efectuaron con dos iniciadores específicos para detectar la presencia de los marcadores asociados a la resistencia a dos tipos de roya. Estos marcadores se asocian a la parte del genoma donde se localizan los genes de resistencia conocidos como Ur3 y Ur5.

Mediante la técnica de amplificación de ADN amplificado al azar se obtuvieron patrones de bandas específicos para cada colecta. Para cada una se determinó la presencia o ausencia de las bandas asociadas a los genes de interés, en las Figura 15 y 16 se observan los patrones en cada uno de los carriles que corresponden a una colecta.

En la Figura 18 se muestran las amplificaciones hechas con el iniciador OPK14 que permite la amplificación del fragmento de ADN con 620 pares de bases que se encuentra justo arriba de la cuarta banda (de arriba hacia abajo) del marcador ϕ X 174 HaeIII que se encuentra a los extremos del gel (primer y último carril). Tomando en cuenta esta información la banda buscada se encuentra en

los carriles 4, 5, 7, y 9. Correspondientes en el catálogo de enfermedades y presencia o ausencia de genes Ur3 y Ur5 a las colectas G-13017, G-13030, G-13505, y G-9987E.

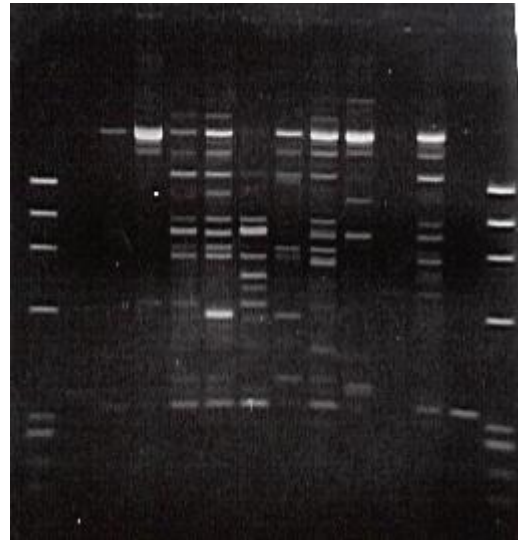


FIGURA 18. Patrón de fragmentos de ADN amplificado al azar con el iniciador OPK14 relacionado con el gen Ur3.

En la Figura 19 se muestran los fragmentos de ADN amplificados con el iniciador OPF10 que permite la obtención del fragmento con 970 pares de bases, el cual se encuentra entre el fragmento 2 y 3 del marcador (1078 y 872 pares de bases).

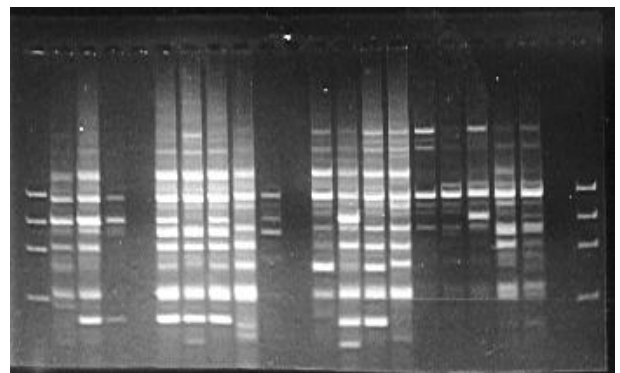


FIGURA 19. Patrón de fragmentos de ADN amplificado al azar con el iniciador OPF10 relacionado con el gen Ur5.

Al analizar la presencia o ausencia de los marcadores asociados a esos dos tipos de resistencia se encontró que 45 ejemplares poseen los dos tipos de marcadores por lo que deberían presentar los dos tipos de resistencia Ur3 y Ur5. Por otro lado 25 ejemplares no presentaron ningún tipo de marcador por lo que estos materiales son sensibles a esos dos tipos de roya. El resto del material presentó uno de los dos tipos de marcador. En general el marcador asociado a la resistencia Ur5 predominó en la colección.

Se observaron 9 sobresalientes por presentar los dos marcadores de resistencia y además una incidencia de roya menor de 2.5, tanto en la evaluación de campo (incidencia natural) como la realizada *in vitro* aplicando la roya de la zona de Valles Altos. En el cuadro 11 se presentan los códigos de los Bancos de germoplasma del INIFAP y CIAT donde se encuentra resguardada esta colecta.

CUADRO 11. Materiales sobresalientes de la colección por presentar los marcadores moleculares asociados a resistencia, más datos de incidencia de roya menores de 2.5 en forma natural y aplicada *in vitro*.

Colecta	Código INIFA	Código CIAT
3	URG-11749	G-7479
22	URG-11793	G-10012
33	URG-11804	G-10018A
52	URG-11823	G-11030
123	URG-11910	G-12992
142	URG-11920	G-13015
144	URG-11922	G-13017
172	URG-11755	G-9981C
173	URG-11756	G-9981D

9. CONCLUSIONES

Este estudio permitió la caracterización en atributos morfológicos, fenológicos, fitopatológicos y moleculares de 200 colectas de *Phaseolus vulgaris* tipo silvestre,

repatriadas, que representan una parte de la colección mexicana de frijoles silvestres.

Se logró identificar materiales tolerantes a la enfermedad conocida como roya a partir de las 200 repatriadas de silvestres.

Se identificaron materiales resistentes a dos tipos de Roya (Ur3 y Ur5) mediante el uso de Marcadores Moleculares

Se analizaron las relaciones existentes entre los materiales por agrupamientos derivados de sus atributos.

Se logró refrescar la colección de frijoles repatriados que tenía 10 años de conservación en refrigeración.

10. CATALOGO DE DATOS DE LA COLECCION REPATRIADA DE 200 COLECTAS DE PHASEOLUS VULGARIS .

A continuación se presentan el catálogo de datos que han sido reportados en la base de datos de Acces CONABIO.

El cuadro 12 presenta los datos básicos de la colección donde se concentra la identificación de los materiales, la identificación del estado, municipio, sitio y localidad donde se colectó el material.

Así mismo se reportan datos como la fecha de la colecta número de individuos, de copias y sexo entre otros datos más.

Parte de esta información viene codificada, como son el estado, municipio, sitio y lugar de colecta, sin embargo esta información puede ser obtenida en el sistema Acces.

193	242	505	INIFAP-97	20	553	37	1	14	1	1	97	99	99	9999	97	G027	1	1	0	5	2	ND	1:800000
194	243	505	INIFAP-106	16	69	40	1	13	1	1	106	99	99	9999	106	G027	1	1	0	5	2	ND	1:600000
195	244	505	INIFAP-119	14	8	41	1	13	1	1	119	17	11	1968	119	G027	1	1	0	5	2	ND	1:400000
196	245	505	INIFAP-122	14	8	41	1	13	1	1	122	17	11	1968	122	G027	1	1	0	5	2	ND	1:400000
197	246	505	INIFAP-130	14	81	48	1	13	1	1	130	15	12	1968	130	G027	1	1	0	5	2	ND	1:400000
198	247	505	INIFAP-133	16	28	43	1	13	1	1	133	4	11	1968	133	G027	1	1	0	5	2	ND	1:600000
199	248	505	INIFAP-143	14	17	53	1	13	1	1	143	15	12	1968	143	G027	1	1	0	5	2	ND	1:400000

En Cuadro 13 se concentran los datos fenológicos y fenotípicos tanto de la planta como de la semilla. Los días necesarios a floración fueron reportados directamente. Mientras que el tipo de hábito de crecimiento se codificó con números del 1 al 6, como se indica a continuación:

- Tipo I 1
- Tipo II 2
- Tipo IIIA 3
- Tipo IIIB 4

- Tipo IVA 5
- Tipo IVB 6

El tamaño de hoja también se encuentra codificado del 1 al 9 representando diferentes áreas, como se indica en la sección de materiales y métodos.

El color de flor y grano, así como el brillo, moteado y forma de grano se reportan en números de acuerdo a la clasificación reportada en materiales y métodos.

En lo que se refiere al largo, ancho y grueso de grano este se reporta en milímetros.

Cuadro 12. Catálogo de características fenológicas y fenotípicas de la planta y semillas

Colecta	Días a floración	Hábito	Tamaño hoja	Color flor	Color grano	Brillo grano	Moteado grano	Forma de grano	Largo grano	Ancho grano	Grueso grano
1	122	5	5	0	4	7.0	1	3	4.6	3.4	1.8
2	127	6	3	0	2	3.8	0	2.2	5.2	3.8	2.0
3	150	4	2	1	2.4	7.0	1.8	2.6	4.6	3.2	1.6
4	93	5	6	0	2	7.0	1	3	6.8	4.2	2.6
5	106	4	4	1	2.8	6.2	2	2.6	5.2	3.8	1.6
6	77	4	4	2	6	7.0	1	2.8	7.4	4.6	3.0
7	60	4	5	2	2.8	7.0	1.8	2.4	8.2	5.2	2.4
8	111	5	3	1	3.2	7.0	1.6	2.4	4.0	2.8	1.6
9	116	5	2	1	3.2	7.0	1.6	2.4	3.8	3.0	1.6
10	126	2	2	3	2.6	6.2	8.0	2.2	6.0	3.6	2.4
11	177	6	9	1	3.6	5.4	1.8	2.2	6.6	3.8	2.4
12	130	6	2	0	1.4	5.4	0	2.4	7.6	4.8	3.4
14	72	5	3	1	3.6	7.0	2.2	2.2	8.2	4.4	2.8
15	129	5	3	0	2	7.0	0.2	1.6	8.0	4.4	2.8
16	129	6	4	3	2	7.0	1.2	2.4	9.2	5.2	3.6
17	170	6	8	1	2	3.0	1	2.4	4.0	3.0	1
18	165	5	3	2	2	7.0	1	2.4	5.6	3.8	2.0
19	98	6	4	1	1.8	7.0	6.0	2.0	5.6	3.4	2.0
20	98	5	3	1	3	7.0	1.0	2.0	5.0	3.2	1.0
21	110	5	4	1	2	7.0	1.2	2.4	4.0	3.0	1.6
22	103	2	3	1	2.6	7.0	1.4	2	5	3.2	2
23	190	5	4	2	1	6.2	0	3	8.6	5.2	3.2
24	81	5	2	1	2.2	7.0	6.0	2.8	8.6	5.2	3.4

25	133	5	3	0	2.6	7.0	8.0	2.2	5.8	3.6	2.0
27	80	4	2	2	5.6	5.8	1.4	3.6	5.8	3.8	2.2
28	143	5	5	1	2.8	7.0	1.0	2.0	4.6	3.6	1.6
29	122	2	5	1	2.4	7.0	1.6	2.2	8.8	5.0	3.0
30	120	4	3	1	2.0	3.8	1.0	2.4	8.2	4.8	3.2
31	120	4	3	1	2.0	7.0	1.0	2.0	5.4	3.6	2.4
32	117	5	6	3	3.6	7.0	1.2	2.2	8.6	5.2	3.4
33	128	5	2	1	5.0	7.0	1.0	2.2	6.2	4.0	2.2
34	117	5	2	1	2.0	7.0	1.0	2.2	7.6	4.2	2.8
35	120	5	7	0	2.4	5.4	1.0	2.0	7.4	4.4	2.6
37	116	6	6	3	1.6	7.0	4.0	2.6	7.2	4.4	2.6
39	66	5	3	1	3.4	7.0	1.4	2.6	6.2	3.6	2.0
40	125	3	6	0	5.4	7.0	1.2	2.2	10	6.2	4.0
41	81	5	5	0	3.0	7.0	8.0	2.6	6.0	4.0	2.6
42	77	3	6	2	2.0	7.0	5.0	3.0	5.8	3.8	1.8
43	77	5	4	0	3.8	7.0	1.0	2.4	7.4	5.4	3.2
44	77	5	6	2	1.0	7.0	0	3.0	8.4	5.0	3.0
45	107	6	4	2	1.6	7.0	1.0	2.6	8.4	5.0	3.0
46	115	6	3	2	2.8	7.0	1.0	2.0	7.6	4.6	3.0
47	92	5	5	2	3.8	7.0	1.0	2.6	6.2	4.4	2.2
48	63	5	5	2	5.2	7.0	8.0	2.4	6.6	4.0	2.4
49	98	4	5	2	5.2	7.0	8.0	2.6	7.0	4.4	2.6
50	102	6	4	2	3.8	6.2	4.0	2.4	6.0	4.0	2.6
51	53	2	6	2	3.4	7.0	4.0	2.2	6.2	4.2	3.2
52	103	4	5	2	6.0	3.0	5.0	3.0	6.4	4.0	2.2
53	90	5	3	1	3.0	7.0	1.6	2.0	5.8	3.2	1.6
54	92	6	2	2	6.2	5.4	3.4	2.0	5.6	3.0	1.6
55	97	5	4	2	3.4	7.0	8.0	2.4	7.6	4.4	2.8
56	97	3	3	2	2.0	3.0	4.0	2.6	3.2	2.0	1.0
57	125	5	4	1	2.4	7.0	1.4	2.0	4.0	3.0	1.0
58	93	6	3	2	2.0	7.0	0	3.0	4.4	3.2	1.8
59	103	5	7	2	4.0	7.0	2.2	2.6	4.8	3.8	2.2
60	96	5	2	1	2.8	7.0	1.6	2.0	6.8	4.2	2.6
61	129	4	6	1	4.0	7.0	2.6	2.6	4.0	3.0	2.0
62	83	6	3	2	2.2	7.0	1.0	2.4	7.6	4.4	3.0
63	84	5	5	2	2.2	5.4	6.0	2.2	7.0	4.4	2.6
64	123	5	3	1	6.0	7.0	8.0	2.6	6.8	3.8	2.2
67	86	5	1	1	1.2	7.0	4.0	2.0	4.4	3.0	1.6
68	126	4	4	1	4.4	6.2	1.0	2.8	6.0	3.6	1.8
69	130	4	6	1	3.4	7.0	1.4	2.6	7.8	5.6	2.8
70	120	2	1	0	4.2	7.0	1.0	2.4	5.8	3.8	2.0
72	125	5	2	1	2.0	3.0	1.0	3.0	7.6	5.2	2.6
73	96	5	2	1	6.0	7.0	2.4	2.6	6.8	4.6	2.8
74	122	6	2	1	6.0	7.0	1.0	2.8	5.4	3.6	1.8
75	129	2	3	1	1.8	5.4	1.2	2.6	7.2	4.4	2.6
76	61	5	1	1	2.8	7.0	1.2	2.0	8.6	5.0	3.4
77	139	5	5	1	2.4	7.0	8.0	2.6	8.0	5.0	2.8
78	120	1	2	0	4.2	7.0	1.2	2.2	8.4	4.8	3.0
79	97	5	1	2	3.6	7.0	1.4	2.4	9.4	6.0	3.4
80	145	4	5	1	2.4	3.0	1.0	2.6	7.2	3.8	2.6
81	83	5	5	2	2.6	7.0	1.4	3.0	6.6	4.0	2.6
82	162	5	4	1	4.0	7.0	1.0	3.0	6.6	4.4	2.0
83	116	4	5	2	4.8	7.0	2.2	2.4	6.0	3.8	2.4
84	116	2	8	0	4.0	7.0	3.0	3.0	3.8	2.6	1.6
85	120	2	8	0	2.8	7.0	1.0	2.2	5.4	3.4	2.2
86	120	2	6	0	4.0	7.0	2.0	2.8	4.6	3.4	1.4

87	120	2	5	2	1.0	7.0	0	2.0	7.6	5.2	3.0
88	120	2	6	2	1.4	7.0	0	2.0	8.0	6.0	4.2
89	139	6	2	1	2.0	7.0	1	3.0	5.8	3.4	2.0
90	116	4	8	2	3.4	6.2	1.6	2.4	6.8	4.4	2.6
91	105	4	1	2	6.0	7.0	1.0	3.0	7.2	4.4	2.4
92	110	5	5	2	4.0	7.0	2.0	2.8	5.2	3.2	2.0
93	97	5	5	2	3.2	7.0	2.4	3.8	4.6	3.0	1.4
94	97	5	4	2	3.8	7.0	2.4	2.6	5.0	3.0	1.0
95	93	5	7	2	5.8	7.0	1.8	2.8	7.4	5.0	3.0
96	111	6	5	2	4.0	7.0	1.2	3.0	3.6	2.4	1.0
97	111	6	5	2	2.8	3.0	1.4	2.4	8.8	5.2	2.8
98	112	6	6	0	2.8	3.0	1.2	3.0	8.8	4.8	2.8
99	66	5	4	2	2.8	7.0	1.0	2.8	6.8	4.0	2.4
100	113	6	7	2	2.0	7.0	1.2	2.2	4.4	2.6	1.4
101	117	6	5	0	4.0	7.0	2.0	2.0	6.6	3.6	2.2
102	117	6	4	2	2.8	4.6	1.4	2.6	7.4	4.6	2.8
103	118	5	5	2	3.0	7.0	1.0	2.4	7.8	4.8	2.8
104	80	6	3	0	1.0	7.0	0	3.0	6.6	4.0	3.0
105	133	5	3	1	4.0	7.0	1.8	2.4	6.4	3.6	1.8
106	103	4	3	2	5.0	7.0	1.0	2.0	6.4	4.4	1.8
107	114	5	5	1	3.2	6.2	1.0	2.0	6.2	4.0	2.0
108	117	5	5	0	2.8	7.0	1.0	2.2	7.2	5.0	3.0
109	131	6	5	0	2.0	7.0	1.2	2.2	7.4	5.2	2.8
110	60	1	2	6	3.2	7.0	1.0	2.6	8.8	5.8	2.4
111	128	5	1	2	3.6	7.0	1.0	3.0	7.8	4.2	2.8
113	88	5	7	2	2.0	7.0	1.0	3.0	7.4	4.4	2.6
114	80	2	5	0	2.0	3.8	1.0	3.0	6.0	3.8	2.0
115	107	6	4	1	6.4	7.0	1.2	2.0	7.8	4.8	2.6
116	98	6	5	0	2.0	7.0	1.0	2.0	6.2	3.6	1.6
117	130	5	6	1	2.8	7.0	8.0	2.2	6.8	3.8	2.6
118	144	6	6	1	2.6	7.0	1.0	2.2	7.0	4.0	2.8
119	117	4	4	1	2.8	7.0	1.4	2.2	7.6	5.0	2.8
121	119	2	7	2	3.6	7.0	1.0	2.8	7.2	4.2	3.0
122	130	1	2	1	3.6	7.0	1.4	2.8	6.4	4.6	2.6
123	107	1	5	1	2.6	7.0	6.0	2.4	7.0	4.4	2.8
124	60	6	5	1	2.0	7.0	1.0	2.2	6.6	4.2	2.4
125	60	1	3	0	3.4	7.0	1.0	2.4	7.2	4.6	2.8
126	87	1	4	1	3.4	7.0	1.2	3.0	6.6	4.2	2.4
127	50	1	4	2	2.8	6.2	1.0	2.4	6.6	4.0	2.4
128	62	1	2	1	3.4	7.0	8.0	2.4	6.6	4.6	2.4
129	112	1	5	2	3.6	7.0	1.0	2.6	7.4	4.2	2.2
130	54	5	4	2	1.3	7.0	1.0	2.8	6.4	3.8	2.2
131	117	5	6	1	8.0	7.0	1.0	3.0	6.4	4.0	2.0
132	117	2	5	2	4.8	7.0	1.6	2.8	5.8	3.2	2.0
133	87	5	4	2	4.2	7.0	1.2	2.8	6.0	3.4	2.0
134	80	5	5	2	5.0	7.0	1.0	2.0	6.2	4.0	2.8
135	70	5	6	2	2.8	7.0	1.4	2.6	5.0	3.0	1.0
136	84	1	4	2	4.0	6.2	1.6	2.4	5.4	3.6	1.4
137	84	5	5	2	4.0	7.0	1.6	2.8	5.6	3.8	2.0
138	56	1	4	2	4.0	7.0	2.0	3.0	5.2	3.2	1.8
139	60	6	4	2	4.0	7.0	2.0	3.0	4.8	2.8	1.8
140	56	1	5	2	3.6	7.0	1.4	2.6	4.8	2.6	1.2
141	55	1	1	2	4.0	7.0	2.0	2.4	8.4	4.8	3.2
142	65	6	8	2	3.0	7.0	1.0	2.4	7.6	4.8	3.0
143	66	5	3	0	4.4	7.0	6.0	2.0	6.8	4.4	2.8
144	140	2	4	2	3.2	7.0	1.8	2.8	5.0	3.4	1.6

145	86	6	1	0	4.0	7.0	2.8	3.0	6.0	3.6	1.6
146	42	4	6	0	3.2	7.0	2.8	2.8	5.6	3.2	2.0
147	134	5	2	1	4.0	7.0	2.0	2.8	5.2	3.0	2.0
148	134	5	4	1	2.8	7.0	8.0	2.8	4.4	3.2	1.2
149	134	5	1	0	2.4	7.0	2.8	3.0	5.2	3.2	1.6
150	134	5	4	0	3.0	3.0	1.0	2.0	7.6	5.4	2.2
151	133	5	4	0	2.0	7.0	0	2.0	7.0	5.0	2.6
152	120	2	3	0	3.2	7.0	6.0	2.0	7.4	5.0	3.0
153	120	5	4	1	4.0	6.2	1.0	2.0	6.6	5.2	2.0
154	134	5	4	0	3.4	7.0	6.0	2.2	6.4	4.6	2.8
155	127	5	3	1	2.8	4.6	0.2	2.2	7.4	5.2	3.0
156	130	5	2	1	2.8	7.0	6.0	2.2	7.0	4.4	2.4
158	97	4	4	0	3.8	7.0	1.8	3.0	6.8	4.6	2.6
159	119	5	3	1	2.8	7.0	1.0	2.8	7.8	5.2	2.8
162	83	5	3	2	1.8	7.0	1.2	2.2	9.2	4.8	3.2
163	130	5	5	1	1.6	6.2	6.0	2.6	6.6	4.0	2.2
164	150	5	4	2	2.0	7.0	1.2	2.4	7.4	4.6	2.8
165	97	6	5	2	1.8	7.0	1.6	2.6	6.8	3.8	2.2
166	117	5	4	0	1.8	7.0	1.0	2.2	7.0	4.6	2.2
167	104	5	1	1	2.2	6.2	8.0	2.8	7.0	5.0	2.4
168	98	6	7	2	2.4	7.0	2.0	2.6	7.6	4.6	2.8
169	63	1	5	0	2.4	7.0	1.0	2.2	7.0	4.6	2.8
170	75	5	5	0	1.0	3.0	0	3.0	8.2	5.2	3.0
171	168	5	5	0	6.0	7.0	1.0	2.2	6.4	3.6	2.2
172	75	5	8	1	2.0	7.0	1.0	3.0	6.2	4.2	2.0
173	64	5	7	0	2.8	7.0	1.0	2.8	5.4	3.8	1.6
174	86	5	4	0	2.0	7.0	1.0	2.8	4.8	3.0	1.2
175	93	2	8	0	4.4	7.0	8.0	2.4	5.8	4.2	2.2
176	84	5	7	2	2.0	7.0	0	3.0	6.0	3.8	2.2
177	52	1	5	2	2.8	7.0	1.0	2.8	5.8	3.8	2.0
178	52	1	5	2	2.0	7.0	1.0	3.0	4.0	2.8	1.0
179	125	2	2	1	2.0	7.0	2.0	3.0	6.2	4.0	2.6
180	95	5	4	0	2.0	7.0	1.0	3.0	6.6	4.0	2.0
181	67	1	5	0	3.2	7.0	8.0	2.8	5.8	3.2	1.6
182	129	2	3	0	2.8	7.0	6.0	1.6	5.8	3.8	1.6
183	170	6	6	0	3.0	7.0	0	3.0	4.4	3.0	1.4
184	128	6	4	0	3.0	3.8	7.0	1.0	3.0	3.2	1.4
185	96	6	5	0	3.6	7.0	1.8	1.0	4.0	3.0	1.8
186	82	5	5	0	5.0	7.0	1.0	2.2	7.0	4.0	3.0
187	65	4	1	2	4.2	7.0	1.6	2.6	5.2	3.2	1.6
188	146	5	7	0	3	6.2	1.8	3.0	5.6	3.2	2.0
189	127	5	6	4	3	7.0	1.2	3.0	4.4	2.8	1.4
190	170	5	6	0	1.6	7.0	1.2	2.2	6.2	3.6	1.8
191	67	5	5	0	2.6	7.0	8.0	3.0	8.2	4.4	2.8
192	115	1	1	2	4.2	7.0	1.0	3.0	7.2	4.2	2.6
193	126	2	5	2	2.6	7.0	1.6	2.6	7.6	4.2	2.6
194	120	2	5	2	3.0	7.0	1.2	3.0	7.2	4.6	2.8
195	110	2	6	2	2.0	7.0	1.0	3.0	4.0	3.0	1.0
196	97	2	6	2	2.4	7.0	6.0	3.0	7.4	4.4	2.4
197	125	2	6	1	3.8	7.0	8.0	2.2	6.4	4.0	2.4
198	119	2	4	2	1.0	7.0	0	2.4	6.6	4.4	2.6
199	05	5	7	1	3.2	6.2	1.4	2.6	6.6	3.6	3.2

Con respecto a las enfermedades en el Cuadro 14 se presenta el catálogo de enfermedades evaluadas por la intensidad de ataque en las 200 colectas así mismo tenemos información sobre la infección *in vitro* que se realizó con roya colectada en Valles Altos. En esta información se reportan datos sobre la evolución del ataque de este tipo de roya mediante la evaluación del daño y

características de la pústula y el halo formado por este hongo. Finalmente en este mismo cuadro se presenta información sobre la presencia o ausencia de los genes Ur3 y Ur5 en las diferentes colectas detectados mediante marcadores moleculares.

CUADRO 14. Enfermedades presentes en las colectas, daño de roya *in vitro* y presencia o ausencia de los genes de resistencia Ur3 y Ur5 a dos tipos de roya.

Colecta	Roya	Antracnosis	Ttizón común	Virosis	Cercospora	Daño roya Infección <i>in vitro</i>	Tamaño pústula	Tipo halo	Gen de resistencia Ur3	Gen de resistencia Ur5
1	5.3	1	1	3.6	2	3	1	1	1	1
2	2.6	1	2	1.3	1	2.8	1	6	0	1
3	1	1	1	2	1	2.5	1	1	1	1
4	6	1	2.6	1	1.3	3.5	6	1	0	1
5	3.8	1	2.5	2.3	1	3	1	1	0	1
6	3	1	1.6	1	3.3	3	7	1	1	1
7	1	1	1	1	5.5	3.5	4	9	0	1
8	7.6	1	1.6	2.6	1	3.5	4	9	0	1
9	7	1	2.3	2.3	1	2	1	1	1	1
10	5.6	1	1.6	3	1	4.5	4	1	0	1
11	7	1	7	4	1	2.8	1	7	0	1
12	1.6	1	1	1.6	1	3.2	4	9	0	1
14	8	1	3	1	4	3	1	3	0	0
15	3.3	1	1.6	3.3	1	2.5	1	3	0	0
16	3	1	1	1.6	1	3	1	3	0	0
17	1	1	8	3	7	2	2	3	0	1
18	1	1	1	4	7	3	1	8	0	1
19	4	1	1	6	1	2.5	2	1	0	1
20	4	1	1	6	1	3.3	1	10	1	1
21	3	1	1	2	1	4	3	7	0	1
22	1	1	1	3.6	2	1.5	1	1	1	1
23	1	1	3.5	1	2.5	1	8	2	0	1
24	2.3	1	3.6	1	6	2.1	1	1	0	1
25	2	1	2	1	2	2.5	1	1	0	1
27	6	1	1	6	2.4	3.5	6	9	0	1

28	7	1	1	6	1	3	2	6	0	1
29	6	1	1	5	1	3	1	1	0	1
30	1	1	2.5	3.5	5.2	3.5	5	3	0	1
31	3.6	1	1.6	2.6	1	2	1	1	0	0
32	6	1	4	6	6	2	1	1	0	1
33	1	1.3	1	1.6	1	2	1	1	1	1
34	3	2	1	2	3.3	2	4	6	0	1
35	3	1	1	3.3	1	2	1	1	0	1
37	5.3	1	1.6	2.6	1	2.5	1	6	1	1
39	9	9	2	1	2	2	1	1	1	1
40	6	1	1	6	4	4.5	4	9	0	0
41	5.6	1	2	2.6	1	3	1	1	0	1
42	6.3	1	1.6	1	1	3	1	1	1	1
43	7	1	1	2.6	4	3.5	1	6	1	0
44	6	1	2	1.6	2.6	4	6	9	1	0
45	7	1	1	1	6	4	1	1	1	1
46	5.6	1	1.3	3.3	1	1.5	1	1	1	0
47	6.6	1	1.6	1.3	1	4	9	9	0	0
48	4.6	1	1.3	1	1	3.5	6	9	0	1
49	4.3	1	1.6	2.3	1	4	2	1	0	0
50	1	1	1	1	4.2	2	4	9	0	1
51	6.2	1	5.4	3.4	2.2	4	1	1	0	0
52	1	1	2.3	2	1	2.5	1	6	1	1
53	1	3	7	6	8	3.5	1	6	1	0
54	9	1	1	4	9	2	1	6	1	0
55	6.6	1	2	1.6	1	1	8	2	1	1
56	6.3	1	1	1.6	1	1.5	1	6	0	1
57	7	1	4	7	7	2.5	5	9	1	1
58	1	1	1	1	4	2	1	1	1	0
59	7.6	1	1	1.6	1	3.4	4	6	0	1
60	1	1	1	1	5	3	6	9	1	1
61	3.3	1	1	1.6	1	2	1	1	1	0
62	5	1	1	1	1	3.4	4	9	1	1
63	5	1	1.6	4	1	3	3	6	0	1
64	4.6	1	1	3	5.2	2.7	4	9	0	1
67	7	1	8	6	9	2	1	6	1	0
68	4	1	1.6	3.6	1	4.8	6	9	0	1
69	7	1	1	4.3	1	2.3	1	1	1	0
70	9	1	1	4	3	3.2	4	9	0	0
72	3	1	4.3	1	5.3	3.6	4	1	1	1
73	7	1	1	3	4	2.5	1	6	1	1
74	1	1	1	1	4.3	3.3	4	9	1	0
75	3.3	1	2.6	3.3	1	3.5	1	1	1	1
76	1	1	4	1	1	6	4	9	0	0
77	1	1	1	1	1	3.5	1	1	1	1
78	1	1	1	1	3.5	4.5	9	9	1	0
79	7	1	6	1	1	3.1	4	9	1	1
80	9	1	6	4	3.1	3.5	4	9		1
81	6.6	2	3.3	1.6	1	4.5	11	9	0	0
82	1	1	1	6	1	4.9	4	9	1	
83	6	1	1.3	2.6	1	4.5	10	9	0	0
84	3.3	1	1	5	1	4	10	9	1	1
85	3.3	1	1.6	1	1	4	4	9		1

86	3.3	1	1.6	3.3	1	2.5	1	1	1	0
87	5.6	1	1.6	3.6	1	2	1	1	1	0
88	5.6	1	1.6	2.6	1	3	1	6	0	1
89	3.5	1	1	2.5	1	4	1	1	1	1
90	5.6	1	4.6	4	1	3.4	4	9	1	0
91	6	1	1.6	3	2	2	1	6	0	1
92	6.6	1	2	2	1	4	1	1	0	1
93	6.6	1	1	2.6	1	4	2	1	0	1
94	6.6	1	1.6	2.3	1	2	1	6	0	1
95	6	1	3.6	1.3	1	2	1	6	0	1
96	6.6	2.3	2	2	1	1	8	2	0	0
97	6.6	1	1.6	3.3	1	2	1	1	0	1
98	7.3	1	2.6	2.6	1	2	2	1	0	0
99	4.6	1	2	1.3	1	4	1	1	0	1
100	6	1	3	6.3	1	2	2	1	0	0
101	6	1	3.6	3.6	1	5	1	1	1	0
102	5.3	1	2.3	3.6	1	2	4	1	1	1
103	5	1	2.3	1	1	2.5	2	6	0	1
104	1	1	5.3	1	2.6	2.5	1	1	0	1
105	1	1	1	1	2.3	3	1	1	0	1
106	1	1	1	3	2	2	2	6	1	0
107	5.3	1	2.3	2.6	1	2	1	6	1	1
108	7.3	1	2.6	2.6	1	3	2	6		1
109	1	1	1	1	1	1	8	2	0	1
110	1	1	1	1	7	2.8	1	1	0	1
111	1	1	1	2	3	1.6	1	1	0	1
113	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0
114	1	1	1	1	1	1	8	2	0	1
115	3	1	3	5	4	2	1	1	0	1
116	5.3	1	1.6	2	1	2	1	1	0	1
117	5.3	1	4	6.3	3.3	3	2	1		0
118	1	2	1	1	3	3	1	6	0	1
119	4	1	1.6	2	1	3.5	4	9	1	1
121	7	1	3	3.3	1	4.3	1	5	0	1
122	5	1	1	3	1	3.5	1	1		0
123	1	1	6	1	4	1.5	1	1	1	1
124	1	1	1	1	4	4	1	1	1	0
125	1	1	1.5	1	4.6	3.8	1	6	0	1
126	9	1	4	1	9	4.3	1	1	0	1
127	1	1	1	1	2.7	3	1	5	0	0
128	8	1	4	6	9	3	1	6	0	1
129	9	1	1	4	6	2.5	1	1	0	1
130	1	1	3	1	3	2	1	1	0	1
131	1	1	1	2.6	1	5	6	9	0	1
132	3.6	1	1	2.6	1	5.5	1	6	0	0
133	1	1	1.6	1.6	3.3	3.6	1	6	0	1
134	1	1	1	4.3	4	1	8	1	0	0
135	1	1	1.3	3	2.6	3.5	1	6	0	1
136	1	1	1	3.5	1	3.5	1	1	0	1
137	1	1	1	3	3.6	4.5	4	9	0	1
138	1	1	1	1	7	4.1	4	9	0	1
139	1	1	1	2.5	4.5	3	2	11	0	1
140	1	1	1	3.5	5	3	1	1	1	1

141	6	1	1	2	9	3	2	6	0	0
142	2	2	1	1	3	2.5	1	1	1	1
143	7.6	1	3.6	1	6	2	1	1	0	0
144	2	1	1	2	2	3	3	12	1	1
145	4.6	1	1	4	2	4	2	1	0	0
146	7	1	1	4	1	2.5	1	1	1	1
147	1	1	1	6	7	3.8	1	1	0	0
148	6.6	1	1	4	1.6	2.5	2	1	1	0
149	3	1	1	2	2	2	1	1	1	1
150	3.3	1	1	1	3	3	1	6		1
151	6	1	1	4.3	1.6	3	1	6	1	0
152	2	1	1.6	5.3	2	4	2	6	1	0
153	2.6	1	1	3.6	1	3	1	6	0	1
154	3.3	1	1	2	2.3	2	1	6	0	1
155	3.3	1	1	3	2	3	2	6	1	1
156	4	2	2.3	3.6	2	3	2	6	0	1
158	6.3	1	1.3	1	1.6	3	2	6	1	1
159	6.3	1	1.6	3	1.6	2.5	1	6	1	1
162	6	1	6	1	9	4	2	5	1	1
163	3.6	1	1	3.6	1.6	3	1	6	0	1
164	2.3	1	1	3.6	1.3	3	1	6	1	1
165	6.3	1	2.3	4.3	1.3	3	1	6	0	1
166	1	1	1	2.3	3.5	2	1	1	1	1
167	1	1	6	4.0	8.0	3	1	1	1	1
168	3	1	1	4.6	1.6	3.3	1	5	0	1
169	4	1	1	1.6	4.3	3.3	1	6	0	0
170	3.6	1	1	1	4.6	1.8	4	9	1	0
171	7	1	1	4	3	3.5	4	9	1	0
172	1.6	1	1	3.3	4	1	8	2	1	1
173	2.6	1	2	3.6	3	1.4	1	1	1	1
174	3.3	1	1	3	1	2.5	1	1	1	1
175	1	1	1	3	1.3	4	9	9	1	1
176	5.6	1	1.6	2.6	5	4.5	2	5	1	0
177	1	2.3	1	1	2.6	3	1	6	1	
178	2	1	1	3	3.3	1	8	2	1	0
179	4.3	1	2	4	2	3	1	1	0	1
180	2.6	1	1.6	1	1.3	2	3	5	0	1
181	2	1	1	2	1	2	1	1	0	1
182	2.3	1	1.6	3.3	1.3	1.8	1	5	0	1
183	3	1	1	1	4	1.5	1	1	0	1
184	5	1	1.6	5.3	1.3	3.8	6	1		
185	5.6	1	1	2.3	1.3	4	1	1	1	1
186	1	1.3	1	2.4	4.6	4	8	2	0	1
187	3	1	1.6	2.3	1.3	3	1	1	1	1
188	1	3	1	6	7	3.5	6	13	0	1
189	1	1	1	6.3	4	4	9	14	1	1
190	1	1	1	1	5	2.5	1	1	0	1
191	3	1	1.6	1.6	3.3	4	1	6	1	1
192	4.3	1	3	2	1	3.3	1	6		1
193	3	1	1	3.3	1	3.8	4	9	0	0
194	5.6	1	1.6	3.6	1	4.5	4	9	0	1
195	7	1	3	2.6	1	3	4	9		0
196	6.6	1	1	5	1	2.5	1	1	0	1

197	3.3	1	1	3	4.5	3.8	4	9	0	1
198	5.6	1	3.3	3.3	1	4.5	4	9	0	0
199	5.3	1	1	3	5	3	4	9	0	1

Finalmente en el Cuadro 15 se presentan los códigos de identificación de los Bancos de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y del Centro Internacional de Agricultura Tropical que poseen dicha colección.

CUDRO 15. CODIGOS DE IDENTIFICACION DE LAS COLECTAS DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS (INIFAP) Y DEL CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT).

Colecta	Código del banco de germoplasma del INIFAP	Código del Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT
1	URG-11730	G-13021
2	URG-11748	G-6386
3	URG-11749	G-7479
4	URG-11758	G-7479A
5	URG-11776	G-9989
6	URG-11777	G-9989A
7	URG-11778	G-9989B
8	URG-11779	G-9995
9	URG-11780	G-9996
10	URG-11781	G-9997
11	URG-11782	G-9998
12	URG-11783	G-9998A
13	URG-11784	G-10000
14	URG-11785	G-10001
15	URG-11786	G-10006
16	URG-11787	G-10007
17	URG-11788	G-10008
18	URG-11789	G-10008A
19	URG-11790	G-10010
20	URG-11791	G-10010A
21	URG-11792	G-10011
22	URG-11793	G-10012
23	URG-11794	G-10012A
24	URG-11795	G-10013
25	URG-11796	G-10013A
26	URG-11797	G-10014
27	URG-11798	G-10015
28	URG-11799	G-10016
29	URG-11800	G-10016A
30	URG-11801	G-10017
31	URG-11802	G-10017A

32	URG-11803	G-10018
33	URG-11804	G-10018A
34	URG-11805	G-10019
35	URG-11806	G-10019A
36	URG-11807	G-10020
37	URG-11808	G-10020A
38	URG-11809	G-10022
39	URG-11810	G-10999
40	URG-11811	G-11024
41	URG-11812	G-11025
42	URG-11813	G-11025A
43	URG-11814	G-11025B
44	URG-11815	G-11025C
45	URG-11816	G-11025D
46	URG-11817	G-11026
47	URG-11818	G-11027
48	URG-11819	G-11027A
49	URG-11820	G-11027C
50	URG-11821	G-11028
51	URG-11822	G-11029
52	URG-11823	G-11030
53	URG-11824	G-11030A
54	URG-11825	G-11032
55	URG-11826	G-11033
56	URG-11827	G-11034
57	URG-11828	G-11050
58	URG-11829	G-11051
59	URG-11830	G-11054
60	URG-11831	G-11055
61	URG-11832	G-11056
62	URG-11833	G-11125
63	URG-11834	G-12860
64	URG-11835	G-12863
65	URG-11836	G-12867
66	ERG-11837	G-12867A
67	URG-11838	G-12871
68	URG-11839	G-12872
69	URG-11840	G-12874
70	URG-11841	G-12874A
71	URG-11842	G-12874B
72	URG-11843	G-12875
73	URG-11845	G-12877
74	URG-11846	G-12877A
75	URG-11847	G-12877B
76	URG-11848	G-12878
77	URG-11849	G-12885
78	URG-11850	G-12887
79	URG-11851	G-12888
80	URG-11852	G-12889
81	URG-11854	G-12891
82	URG-11855	G-12892
83	URG-11856	G-12894
84	URG-11857	G-12895

85	URG-11858	G-12896
86	URG-11859	G-12897
87	URG-11860	G-12898
88	URG-11861	G-12899
89	URG-11862	G-12910
90	URG-11863	G-12921
91	URG-11864	G-12933
92	URG-11865	G-12934
93	URG-11867	G-12936
94	URG-11868	G-12937
95	URG-11870	G-12939
96	URG-11871	G-12940
97	URG-11872	G-12941
98	URG-11873	G-12942
99	URG-11874	G-12943
100	URG-11875	G-12945
101	URG-11876	G-12946
102	URG-11878	G-12948
103	URG-11879	G-12960
104	URG-11881	G-12962
105	URG-11882	G-12963
106	URG-11883	G-12965
107	URG-11884	G-12966
108	URG-11885	G-12967
109	URG-11886	G-12968
110	URG-11887	G-12970
111	URG-11888	G-12971
112	URG-11899	G-12972
113	URG-11891	G-12975
114	URG-11892	G-12976
115	URG-11893	G-12977
116	URG-11894	G-12978
117	URG-11895	G-12979
118	URG-11896	G-12980
119	URG-11897	G-12983
120	URG-11898	G-12985
121	URG-11899	G-12987
122	URG-11900	G-12988
123	URG-11901	G-12992
124	URG-11902	G-12994
125	URG-11903	G-12995
126	URG-11904	G-12997
127	URG-11905	G-12998
128	URG-11906	G-13000
129	URG-11907	G-13001
130	URG-11908	G-13003
131	URG-11909	G-13004
132	URG-11910	G-13005
133	URG-11911	G-13006
134	URG-11912	G-13007
135	URG-11913	G-13008
136	URG-11914	G-13009
137	URG-11915	G-13010

138	URG-11916	G-13011
139	URG-11917	G-13012
140	URG-11918	G-13013
141	URG-11919	G-13014
142	URG-11920	G-13015
143	URG-11921	G-13015A
144	URG-11922	G-13017
145	URG-11923	G-13018
146	URG-11924	G-13018A
147	URG-11925	G-13018B
148	URG-11926	G-13019
149	URG-11927	G-13019A
150	URG-11928	G-13019B
151	URG-11929	G-13020
152	URG-11931	G-13022
153	URG-11932	G-13023
154	URG-11933	G-13024
155	URG-11934	G-13024A
156	URG-11935	G-13024B
157	URG-11936	G-13025
158	URG-11937	G-13026
159	URG-11938	G-13027
158	URG-11939	G-3028
159	URG-11940	G-13029
162	URG-11941	G-13030
163	URG-11944	G-13034
164	URG-11945	G-13035
165	URG-11946	G-13037
166	URG-11947	G-13038
167	URG-11948	G-13505
168	URG-11751	G-9980
169	URG-11752	G-9981
170	URG-11753	G-9981A
171	URG-11754	G-9981B
172	URG-11755	G-9981C
173	URG-11756	G-9981D
174	URG-11757	G-9981E
175	URG-11758	G-9981F
176	URG-11759	G-9982
177	URG-11760	G-9983
178	URG-11761	G-9984
179	URG-11762	G-9986
180	URG-11763	G-9986A
181	URG-11764	G-9986B
182	URG-11765	G-9986D
183	URG-11766	G-9986E
184	URG-11767	G-9986F
185	URG-11768	G-9987
186	URG-11769	G-9987A
187	URG-11770	G-9987B
188	URG-11771	G-9987C
189	URG-11772	G-9987D
190	URG-11773	G-9987E

191	URG-11774	G-9987F
192	URG-11775	G-9988
193	URG-11844	G-12876
194	URG-11860	G-12898
195	URG-11866	G-12935
196	URG-11869	G-12938
197	URG-11877	G-12957
198	URG-11880	G-12961
199	URG-11890	G-12974

BIBLIOGRAFIA

- Acosta Gallegos, J. A. 1992. El cultivo del frijol y su problemática en México. In: Producción de Leguminosas de Grano, Solórsano V.E. (de). Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. pp 1-11.
- Acosta Gallegos, J.A., J. S. Muruaga Martínez, F. Cárdenas Ramos y M. Khairallah. 1996. Estrategias para la utilización de germoplasma de *Phaseolus* en el mejoramiento genético. Ciencia Academia de la Investigación Científica 47(2) 149-160.
- Adams, M. W. 1973. Arquitectura vegetal y eficiencia fisiológica de la planta de frijol. In: El potencial del frijol y de otras leguminosas de grano comestibles en América Latina CIAT (Ed.9). Cali, Colombia. pp. 181-189.
- Afanador, L.K., Haley, S.D. and Kelly, J.D. 1993. Adoption of a "mini'preps" DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris*) BIC. 36:10-11.
- Bannerot, H. et D. Debouk. 1972. L'importance de la double domestication pour l'amélioration du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Complex D' espèces, Flux de Gènes et Ressources Génétiques des Plantes. Monoulou, J. C. (de). Diffusion Lavoisier. Cachan, France, pp: 435-506.
- Beckman JS. Soller M (1990) Toward a unified approach genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Biotechnology 8: 930-932.
- Berglund-Brucher, O. and H. Brucher. 1976. The Sout american wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. Eco. Bot. 30: 257-272.
- Brown, J. W. S., F. A: Bliss, and T. C. Hall. 1981. Genetic variation in the subunits of globulin' 1 storage protein of Frech bean. Theor. Appli. Genet. 59: 83-88.
- Brucher, H. 1988. The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. In: Genetic Resources of *Phaseolus* beans. Gepts, P. (ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London 596 p.
- Burga M., C. A. 1978. Canopy architecture, light distribution and photosynthesis of different dry beans (*Phaseolus vulgaris* L). Plant types. Ph D dissertation. Michigan State University, Ears Lansing, MI, EUA. 142 p.
- Burkart, A. and H. Brucher. 1953. *Phaseolus aborigineus* Burk. Diemut eliche andine Stammform del Kultubhone. Zechter 23: 65-72.
- Cabrera, A. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. In: Enciclopedia Argentina de Agricultura y jardinería. Fascículo 1. Tomo II. 2a. ed. Ed.Acme S.A.C.I. 85 p.
- Caetano-Anollés, G., Basam, B.J.; Gresshoff P.M.; 1991 DNA amplification finger printing using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology Vol. 9: 553-557.
- Cárdenas R., F., J. S. Muruaga y J. A. Acosta 1996. Catálogo del Banco de Germoplasma de *Phaseolus* spp. del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), México.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1984. Morfología de la plata de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.); Guía de estudio para ser usada como

- complemento de la unidad audiotutorial sobre el mismo tema. Cali, Colombia. Serie 045B-09.01
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1978. Problemas de Campo en los Cultivos de Frijol en América Latina. Serie SG-19.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1980. Diversidad Genética de las especies Cultivadas del Género *Phaseolus*. Serie. 04SB-09.02
- Crisci J. V. M. F. López A. 1983. Introducción a la Teoría Práctica de la Taxonomía Numérica. Núm. 26. OEA. Washinton, D. C. 132 p.
- Debouck, D. 1986. *Phaseolus* germplasm collection in Northwestern Argentina. Trip Report. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). 37 p.
- Debouck, D. 1991. Importancia del germoplasma surandino en la producción y la mejora de la chaucha. Actas II Simposio Latinoamericano sobre Recursos Genéticos de Especies Hortícolas. Mar del Plata, Argentina. pp: 149-163.
- Debouck, D., y R. Hidalgo. 1984. Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia pp. 17-23.
- Dudley J:W., Saghai Marrof M.A., Rufener GK 1991 molecular markers and grouping of parents in maize breeding program. *Crop. Sci* 31:718-723.
- Esquinas A., J. T. 1981. Los Recursos Fitogenéticos, una Inversión Segura Para El Futuro. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid España. 44 p.
- Fernández, F., P. Gepts y M. López. 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*P. vulgaris*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 34 p.
- Gentry, H.S. 1969. Origin of the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Econ. Bot.* 23: 55-69.
- Gepts, P. 1988. A middle american and an Andean common bean gene pool. In: Genetic Resources of *Phaseolus* beans. Gepts, P. (ed.)
- Gepts, P. and D. Debouck, 1991. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) In: Common Beans Research for Crop Improvement. Van Schoonven, A. and O. Voysest (eds.). Commonwealth Agricultural Bureaux International. Wallingford, U. K. pp. 7-53.
- Gepts, P., K. Kmiecik, and F. A. Bliss. 1987. Disemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. Y. The Americas. *Econ. Bot.* 42(1): 73-85.
- Gepts, P., T. C. Osbord, K. Rashka, and F.A. Bliss 1986. Phaseolin protein variability in wild forms and land races of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) evidence for multiples centers of domestication. *Econ. Bot.* 40: 451-468.
- Gordillo, G. y A. Lencinas. 1979. Sierras Pampeanas de Córdoba y San Luis. Segundo Simposio de Geología Regional Argentina. Córdoba, Argentina. pp. 577-650.
- Gu WK. Weeden NF. Yu J. Wallace DH: Large-scale, cost effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theor Appl Genet* 91: 465-470 (1995).

- Haley SD. Afanador LK. Kelly JD: Selection for monogenic resistance traits with coupling- and repulsion-phase RAPD markers. *Crop Sci* 34: 1061-1066 (1994).
- Haley SD. Miklas PN. Stavely JR. Byrum J. Kelly JD: Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor Appl Genet* 86: 505-512 (1993).
- Haley, SD. Afanador LK. Miklas PN. Stavely JR. Kelly JD: Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines from RAPD marker localization. *Theor Appl Genet* 88: 337-342 (1994).
- Hamada H., Petrino M.G. Kakunagat. 1982 a novel repeat element With 2-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 79: 6465-6489.
- Hunt, R. 1981. Plant growth analysis. The Institute of Biology's. *Studies in biology* no. 96. 67 p.
- Hussain, A., H. Ramírez, W. Bushuk, and W. Roca 1986. Fiel bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivar identification by electrophoregrams of cotyledon storage proteins. *Euphytica* 35: 729-732.
- International Plant Genetic Resources. 1982. *Descriptor List for Wild Beans*. Rome, Italy. 28 p.
- Johnson E. Miklas PN. Stavely JR. Martínez-Cruzado JC: Coupling- and repulsion-RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. *Theor. Appl Genet* 90: 659-664 (1995).
- Johnson WC. Guzman P. Mandala D. Mkandawire ABC. Temple S. Gilbertson RL. Gepts P: Molecular tagging of the bc-3 gene for introgression into Andean common bean. *Crop Sci* 37: 248-254 (1997).
- Jung G. Coyne DP. Skroch PW. Nienhuis. J. Arnaud-Santana E. Bokosi J. Ariyaratne HM. Steadman JR. Beaver JS. Kaepler SM: Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight and rust in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Am Soc Hort Sci* 121: 794-803 (1996).
- Kaplan, L. y Kaplan, L. N. 1988. La domesticación del *Phaseolus*: una cosecha complementaria en la prehistoria. In: *Coloquio V. Gordon Childe. Estudios sobre las revoluciones neolítica y urbana* (Ed.)Manzanillo, L. UNAM, pp 147-166.
- Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 596 p.
- Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 596 p.
- Koinange, E. M. K., Singh, S. P. y Gepts, P. 1996. Genetic Control of the Domestication Syndrome in Common Bean *Crop Science* 36: 1037-1045.
- Kornerup, A. and J. H. Wansher. 1978. Methuen-London. 252 p.
- Lynch, J., González, A., Tohme, J. M, y García, J. A. 1992. Variation in Characters Related to Photosynthesis in Wild Bean Population. *Crop Sci*. 32: 633-640.
- Mabry, T. J., K. R. Markharm, and M. B. Thomas 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer Verlag. New York. 354 p.
- Maclean DJ. Braithwaite KS. Irvine JAG, Manners JM. Groth JV: Random

- amplified polymorphic DNA (RAPD) reveals relationships among diverse genotypes in Australian and American collections of *Uromyces appendiculatus*. *Phytopathology* 85: 757-765 (1995).
- Maréchal, R., J. M. Mascherpa, and F. Stainier. 1978. Etudes taxonomiques d' un groupe complexe d' especes des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques traitées par l'informatique. *Boissiera* 28. 237 p.
- Menéndez S., M. C. y R. Solari. 1988. Caracterización de una población de porotos (*Phaseolus vulgaris* L.) indígenas de Iruya, noroeste de Argentina. *Memorias VI Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos*. Quito. Ecuador. pp: 474-482.
- Menéndez Sevillano, M.C., R. Palacios, E.M Zallochi, y M.M. Brizuela. 1998. *Phaseolus vulgaris* L., (Fabaceae): Estudio de poblaciones de silvestres argentinas. *Agrociencia*, México, 32(2)131-137.
- Miklas PN. Afanador L. Kelly JD: Recombination-facilitated RAPD marker-assisted selection for disease resistance in common bean. *Crop. Sci* 36: 86-90 (1996).
- Miranda C., S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* (frijol común). *Agrociencia* 1(2): 99-109.
- Miranda, Colín, S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común). *Agrociencia* 1(6): 99-109
- Mmbaga M. Steadman JR. Stavely JR: The use of host resistance in disease management of rust in common bean. *Integrated Pest Mgr Rev Y*: 191-200 (1996).
- Muruaga Martínez, J. S. 1993. Estudio preliminar de las enfermedades y plagas insectiles en las colectas de *Phaseolus* de México. *Agronomía Mesoamericana* 4: 86-90.
- Muruaga Martínez, J. S., J. A. Acosta Gallegos y R. Garza García. 1992. Estudio preliminar de las enfermedades de las colectas de *Phaseolus* en México. In: producción de leguminosas de grano. E. Solórzano Vega (Ed.). Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. pp. 12-20.
- Olson, M.L. Hood, C. Canton, and D. Botstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434-1435.
- Palacios, R. y A. Vilela. 1991. Las especies Argentinas de *Phaseolus* (un recurso genético que necesita protección). *Actas del II Simposio Latinoamericano sobre Recursos Genéticos Hortícolas*. Mar del Plata. Bs As. Argentina. pp: 123-139.
- Paran I. Michelmore RW: Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85: 985-993 (1993).
- Payne, P. I., C. N. Law, and E. E. Mudd. 1980. Control by homoeologous group 1 chromosomes of the high molecular weight subunits of glutenin a major protein of wheat endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 58: 113-120.
- Picknett, T. M., Sanders, G., Foerd, P., and Holt, G. (1987). *Curr. Genet.* 12:449-455.
- Pickersgill, B., C. B. Heiser, y J. McNeill. 1979. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: the Biology and Taxonomy of the Solanaceae.

- Hawkes, J.G. (Ed). Linnean Society Symposium Series No. 7. Pp 679-700.
- Rafalki, J:A.; Tingey S.V.; Williams G.K. 1991 RAPD marker a new technology for genetic mapping and plant breeding. AgBiotech news and information Vol. 3 No. 4: 645-648.
- Roder, M.S., J. Plaxhke, S.U. Konig, A. Borner, M.E. Sorrells, S.D. Tanksley, and M.W. Ganal. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in Wheat. Mol Gen Genet 246: 327-333.
- Schoonhoven A.v. y Pastor-Corrales M.A.1987 Sistema estándar para la evaluación de Germoplasma de Frijol. CIAT.Cali, Colombia.
- Singh, S., P. Gepts, and D. Debouck. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Econ. Bot. 45(3): 379-396.
- Skroch P. Tivang J. Nienhuis J: Analysis of genetic relationships using RAPD marker data.CSSA-ASHS-AGA Joint Plant -Breeding Symposium Series. Minneapolis. Crop Science Society of America. Madison. WI. pp. 26-30 (1992).
- Smart, J. 1988. Morphological, physiological and biochemical changes in *Phaseolus* beans under domestication. In: Genetic Resources of *Phaseolus* beans. Gepts, P. (ed.).
- Smartt, J. 1969. Evolution of American *Phaseolus* Beans under domestication. In: Ucko, P. J. and Dimbleby, G. W. (EDS). The domestication and exploitation of plants and animal. Aldine, Chicago, Y1, USA. p 451-462.
- Smartt, J. 1988. Morfological, Physiological and biochemical changes in *Phaseolus* beans under domestication. In: Gepts, P. (Ed.). Genetic resources of *Phaseolus* beans; their maintenance, domestication, evolution, and utilization. Klumer, Dordrecht, Netherlands. p 143-161.
- Stavelly JR 1990., Genetic of rust resistance in *Phaseolus vulgaris* plant introduction PI 181996 Phytopathology 80: 1056 .
- Stavelly JR, Grafton KJ. Kelly JD1997: Linkage versus allelism of two major rust resistance genes in *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology 87: S93 .
- Stavelly JR, Kelly JD, Grafton KF, Mullins CA, Straw A. McMillan RT Jr. Beaver JS. Miklas PN, Steinke J. Steadman JR, Coyne DP, Lindgren DT, Silbernagel MJ.1997. Rust resistant bean germoplasm releases. 1994-1996. Annu Rep Bean Improv Crop 40: 120-121.
- Stavelly JR. Kelly JD. Grafton KJ: BelMiDak1994.- Rust-resistant navy dry beans germplasm lines. HortScience 29: 709-710 .
- Stavelly JR: Genetics of resistance of *Uromyces phaseoli* in a *Phaseolus vulgaris* line resistant to most races of the pathogen. Phytopathology 74: 339-344 (1984).
- Talbert, L.E., N.K. Blake, P.W. Chee, T.K. Blake, and G.M. Magyar. 1994. Evaluation of “sequence-tagged-site” PCR products as molecular markers in wheat. Theor Appl Genet 87: 789-794.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: A Genetic perspective. In: Speciation and Its Consequences. Otte, D. and J. A. Endler (eds.).
- Toro, O., J. Thone, and D. Debouck. 1990. Wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Description and distribution. International Board for Plant Genetic

- Resources (IBPGR) and Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 106 p.
- Toro, O., Tohme, J., Debouck, D. G. 1990. Wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Description and distribution. Internacional Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) and Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 106 p.
- Torres de la Noval, W. 1984. Análisis del crecimiento de las plantas. Cultivos tropicales INCA. Cuba, 38 p.
- Turner, J. C. y R. Mon. 1979. Cordillera Oriental. Segundo Simposio de Geología Argentina. Cordoba, Argentina. pp. 57-94.
- Vargas Vázquez, P., Mendoza Mendoza S. y Muruaga Martinez, J. 1998. Blanco Tlaxcala, nueva variedad Mexicana de frijol ayocote para las tierras altas de la mesa central: Demostración de tecnologías agrícolas; Resúmenes opciones tecnológicas de frijol, trigo, avena, triticale, cebada, amaranto, maíz y forrajes para el Edo de México. INIFAP- CIRCE-CEVAMEX, Publicación especial no 17, Chapingo, México, pp. 17-19.
- Vargas, P., S. Alvarado, J. Acosta y S. Azpiroz. 1996. Caracterización agronómica de germoplasma de frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris* L.). Memoria XVI Congreso de Fitotecnia, 6-12 oct., 1996. Montecillo, Edo. México. p 158
- Weising, K., Beyerman, B.; Ramser, J., Kahl, G. 1991. Plant DNA finger Printing with radiactivite and digoxigenad oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA secuencias. Electrophoresis Vol. 12 159-169.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 18: 7213-7218.
- White, J. W. y J- Izquierdo. 1991. Physiology of yield potential and stress tolerance. In: vanSchoonhoven A., y O. Voysest (eds). Common Beans research for crop improvement. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia pp. 287-382
- Williams, J.G.K., A.R., Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res 18: 6531-6535.
- Wu K.S., and Tanksley S.D. 1993. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol Genet 241: 225-235.
- Zietkiewics E., Rafalki A., Labuda D. 1994. Genoma finger printing by simple secuencia repeat (SSR)-anchores polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.