

**Análisis fenotípico y genético de la resistencia a mancha angular
(*Pseudocercospora griseola*) en el cultivo de frijol común
(*Phaseolus vulgaris*)**

Por

Diego Geovanny Rodríguez Ortega

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
en
AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2017

Aprobada por:

James Beaver, Ph. D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Timothy Porch, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Consuelo Estévez de Jensen, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Rosita Rivera, Ph. D.
Representante, Estudios Graduados

Fecha

Elvin Román Paoli, Ph. D.
Director del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important edible grain legume in the world, as it is an important source of income for farmers and food for millions of families. Angular leaf spot (ALS), caused by the fungus *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Ferraris, is one of the most important diseases in the production of common bean with the potential to cause seed yield losses > 80%. An effective alternative to control this disease is the use of improved varieties that combine resistance genes of Andean and Mesoamerican origin. In this study, the response of 183 bean genotypes to two angular spot isolates (races 61:11 and 63:51) was evaluated. A total of 16 lines were identified with resistance to both races. The resistant lines include the Andean breeding lines CAL 143, AND 277 and the Mesoamerican cultivar ‘Ouro Negro’ that possess the resistance genes *Phg-5*, *Phg-1*, *Phg-3*. In addition, the reaction of recombinant inbred lines (RIL) generated from a cross between ‘Rojo’ and CAL 143, to inoculation with the races 61:11 and 63:51 was studied. Three QTL associated with ALS resistance were identified in this population. The QTLs ALS2^{RC}, ALS5^{RC} and ALS11^{RC} are located on chromosomes Pv02, Pv05, and Pv11 respectively. QTL ALS2^{RC} and ALS11^{RC} have not been reported in previous studies, while a QTL for ALS resistance has been reported close to the QTL ALS5^{RC} region. The results obtained in this study indicate a quantitative inheritance pattern for angular leaf spot and that molecular marker assisted improvement can provide an advantage in genetic improvement for resistance to this disease.

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano comestible más importante en el mundo, ya que, constituye una fuente importante de ingresos económicos para los agricultores y de alimento para millones de familias. La mancha angular (MA), causada por el hongo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Ferraris, es una de las enfermedades más importantes en la producción de este cultivo ocasionando pérdidas superiores al 80% en el rendimiento. Una alternativa efectiva de control de esta enfermedad es el uso de variedades mejoradas que combinen genes de resistencia de origen Andino y Mesoamericano. En este estudio se evaluó la reacción de 183 genotipos de frijol a dos aislamientos de *P. griseola* (razas 61:11 y 63:51). Un total de 16 líneas con resistencia a ambas razas fueron identificadas. Las fuentes de resistencia incluyen las líneas Andinas CAL 143 y AND 277 y el cultivar Mesoamericano ‘Ouro Negro’ que poseen los genes de resistencia a la MA *Phg-5*, *Phg-1*, *Phg-3*. Adicionalmente se estudió la reacción de líneas recombinantes endogámicas generadas por la cruce entre el cultivar de frijol Andino ‘Rojo’ y la línea CAL 143. Mediante inoculación con las razas 61:11 y 63:51 en esta población, se identificaron tres QTL de resistencia a mancha angular, ALS2^{RC}, ALS5^{RC}, ALS11^{RC}, ubicados en los cromosomas Pv02, Pv05, y Pv11, respectivamente. Los QTL ALS2^{RC}, ALS11^{RC} no se han reportado en estudios anteriores, mientras que para ALS5^{RC} ya se han reportado QTL de resistencia a la MA cercanos a esta región. Los resultados obtenidos en este estudio indican un patrón de herencia cuantitativa de la resistencia a la mancha angular, por lo que, el mejoramiento asistido por marcadores moleculares brindará una ventaja en el mejoramiento genético para resistencia a esta enfermedad.

©Diego Geovanny Rodríguez Ortega, 2017

DEDICATORIA

A Dios por su guía y bendiciones

A mis padres, hermanos y sobrínitos

A mi bella esposa y a mis dos hermosos hijos

AGRADECIMIENTOS

A Dios por cada una de las bendiciones dadas en el trayecto de mi vida.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por haber financiado mis estudios de maestría en la UPRM

Al Ing. Eduardo Peralta por todo el apoyo que me brindó durante el tiempo que dirigió el Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andino.

A la ilustre Universidad de Puerto Rico por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Un agradecimiento especial a los Doctores James Beaver, Tim Porph y Consuelo Estévez por todo el apoyo incondicional que me brindaron durante la realización de mi tesis.

A los Doctores Linda Beaver, Lydia Rivera, Feiko Ferwerda, y a cada uno de los profesores que han contribuido en mi formación profesional, de quienes aprendí mucho y fue una grata experiencia ser su estudiante.

A John Hart por haberme capacitado en la parte de marcadores moleculares utilizados en mi tesis y en general al personal de TARS por su amabilidad, amistad y apoyo.

A los compañeros y amigos: Iveth, Astrid, Laura, Mayra, Lore, Mauricio, Dario, Edgar, Stephanie, Giovanni, Abiezer, Hector y cada una de las personas con las que he tenido el agrado de compartir esta grata experiencia.

A mi esposa, por su comprensión, esfuerzo y valentía, fue el apoyo moral más importante; así pude concentrarme y lograr culminar mis estudios de maestría.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
REVISION LITERARIA	5
<i>MANCHA ANGULAR</i>	5
<i>MEJORAMIENTO DE LA RESISTENCIA A MANCHA ANGULAR</i>	7
<i>MARCADORES MOLECULARES UTILIZADOS EN EL MAPEO DE QTLs</i>	10
<i>LÍNEAS ENDOGÁMICAS RECOMBINANTES (RILs RECOMBINANT INBRED LINES)</i>	14
<i>PANEL DE DIVERSIDAD GENÉTICO</i>	14
METODOLOGIA	16
<i>ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA RESISTENCIA</i>	16
<i>Para la identificación de posibles fuentes de resistencia, la severidad observada en los tres primeros grupos de genotipos se clasificaron como: plantas con puntajes (promedio de las dos repeticiones) de 1 a 3 se consideraron resistentes; plantas con puntajes de >3 a ≥6 se consideraron como resistencia intermedia; y plantas con puntajes de >6 a 9 se consideraron susceptibles (Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987). Al momento de la evaluación, las hojas con lesiones no esporuladas fueron sometidas a alta humedad (<80%) por 24 horas, fueron consideradas resistentes aquellas plantas cuyas hojas no esporularon después de este periodo de tiempo.</i>	25
<i>ANÁLISIS GENÉTICO DE LA RESISTENCIA</i>	26
RESULTADOS Y DISCUSION	31
<i>ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA RESISTENCIA A MANCHA ANGULAR</i>	31
<i>ANÁLISIS GENÉTICO DE LA RESISTENCIA A MANCHA ANGULAR</i>	41
<i>Comparación de resultados y selección de marcadores KASP</i>	41
<i>Mapeo de QTL</i>	48
CONCLUSIONES	55
LITERATURA CITADA	56
ANEXOS	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genotipos de frijol y frijol tepary, utilizados en este estudio correspondientes al ensayo BASE 120.	18
Tabla 2. Líneas y variedades de frijol provenientes de diferentes programas de	22
Tabla 3. Acciones del panel de diversidad andino (ADP, Andean Diversity Panel)..	23
Tabla 4. Fechas de siembra de los ensayos de frijol e inoculación y evaluación de los aislamientos de <i>P. griseola</i>	24
Tabla 5. SNP identificados por Raatz Bodo utilizando los 11 marcadores moleculares KASP de mancha angular en 6 líneas de frijol.....	28
Tabla 6. Marcadores moleculares SNP-KASP disponibles para el análisis genético de la resistencia a mancha angular.....	30
Tabla 7. Resumen del ADEVA para la severidad de dos aislamientos de mancha angular en cuatro grupos de líneas de frijol.....	32
Tabla 8. Severidad observada en cada línea del ensayo BASE 120 causada por dos aislamientos de <i>Pseudocercospora griseola</i>	33
Tabla 9. Severidad ocasionada por dos aislamientos de <i>Pseudocercospora griseola</i> en 34 líneas/variedades desarrolladas en diferentes programas de mejoramiento.	37
Tabla 10. Severidad inducida por dos aislamientos de <i>P. griseola</i> en 27 genotipos del Panel de Diversidad Andino.	38
Tabla 11. SNP relacionado a cada marcador genético KASP de mancha angular en 29 líneas/variedades de frijol.	42
Tabla 12. Información genotípica y fenotípica obtenida en la población RIL RC (Rojo x Cal 143) a partir de tres marcadores KASP-SNP y dos aislamientos de mancha angular.....	44
Tabla 13. Ubicación y el valor de LOD de los QTL identificados con los aislamientos ALS 1146C (Raza 63:51) y ALS 9029JD2 (Raza 61:11) de mancha angular.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del marcador molecular KASP ALSChr04_GC_43800347 en el cromosoma Pv04 de frijol.	43
Figura 2. Ubicación del marcador molecular KASP MAS_ALS5a en el cromosoma Pv05 de frijol.....	43
Figura 3. Ubicación del marcador molecular KASP MAS_ALS10b en el cromosoma Pv10 de frijol.....	44
Figura 4. Distribución de la severidad observada en la población RIL RC ocasionada por el aislamiento de mancha angular ALS 1146C	50
Figura 5. Distribución de la severidad observada en la población RIL RC ocasionada por el aislamiento de mancha angular ALS 9029JD2	50
Figura 6. QTL identificado con los datos de severidad del aislamiento ALS 1146C mediante el uso de R <i>qtl</i> con el método EM.....	51
Figura 7. QTL identificados con los datos de severidad del aislamiento ALS 9029JD2 mediante el uso de R <i>qtl</i> con el método EM.....	51

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*P. vulgaris* L.) es la leguminosa de grano de consumo humano directo más importante en el planeta y ocupa el octavo lugar entre las leguminosas sembradas en el mundo (Torres *et al.*, 2013). Es una fuente importante de alimento para cerca de 300 millones de personas, que, en su mayoría, viven en países en desarrollo. El frijol es especialmente importante en la alimentación de mujeres y niños; además, genera ingresos económicos para millones de agricultores de pequeña escala (Velásquez y Giraldo, 2005). Según los datos estadísticos de la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO por sus siglas en inglés) en el año 2013, la producción mundial de frijol común en seco alcanzó 23.1 millones de toneladas en un área cultivada de 29.2 millones de hectáreas y 20.7 millones de toneladas en un área de 1.5 millones de hectáreas de frijol común en verde para el año 2012.

Según Hernández-López (2013) las evidencias aportadas por estudios con enfoques arqueológicos, morfológico-agronómico, bioquímico y molecular, indican que el frijol tiene su centro de origen en la región de Mesoamérica, particularmente en el occidente y sur de México (desde Jalisco hasta Oaxaca), y que hubo dos centros de domesticación: uno primario (Mesoamérica) y otro secundario (Sur Andino).

La producción de frijol se ve afectada por una serie de enfermedades que se desarrollan ampliamente en las zonas de cultivo (Ddamulira *et al.*, 2014). La mancha angular, causada por el hongo hemibiotrofo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous y Braun, es una de las enfermedades más devastadoras alcanzando pérdidas de rendimiento de hasta el 80% (Singh y Schwartz, 2010). La resistencia genética es una estrategia rentable y conveniente para el manejo de enfermedades. Sin embargo, el progreso en el mejoramiento de la resistencia a la mancha angular se ha visto limitada por algunos factores. La diversidad y alta virulencia de *P. griseola* y el repetido descubrimiento de

nuevas razas de este patógeno son un reto para el desarrollo de cultivares con resistencia durable (Sartorato y Alzate-Marin, 2004; Abadío *et al.*, 2012). A pesar de la gran diversidad de patotipos, los aislamientos de *P. griseola* se han dividido en grupos Andinos y Mesoamericanos que corresponden a los dos grupos de origen del frijol común (Pastor-Corrales y Jara, 1995; Pastor-Corrales *et al.*, 1998). La co-evolución de *P. griseola* y frijol común ofrece la posibilidad de combinar genes de resistencia de los acervos genéticos (Andinos y Mesoamericanas) para lograr una resistencia más duradera. El uso de una amplia diversidad de genes de resistencia y el conocimiento de los patrones de virulencia podrían permitir a un manejo más eficaz de la enfermedad (Mahuku *et al.*, 2002). Durante muchos años los esfuerzos de investigación se han dirigido hacia la identificación de cultivares con resistencia a la mancha angular (Namayanja *et al.*, 2006). Sin embargo la utilización de tales cultivares en cualquier programa de mejoramiento requiere información genética de la resistencia. Estudios anteriores de herencia han revelado que la resistencia a *P. griseola* puede ser, dependiendo de la fuente de resistencia (Sartorato *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2000), controlada por genes de herencia cualitativa y por genes de naturaleza cuantitativa (QTL, “quantitative trait loci”), (Teixeira *et al.*, 2005; Mahuku *et al.*, 2009). Varios genes de resistencia a mancha angular han sido identificados en frijol común como son los genes *Phg-1*, *Phg-2*, *Phg-3*. Recientemente se identificaron los genes *Phg-4* y *Phg-5* respectivamente en los genotipos G5686 y CAL 143, los mismos que son utilizados por los programas de mejoramiento de frijol en Uganda, Colombia y Brasil (Souza *et al.*, 2016). Los genes *Phg-1*, *Phg-4* y *Phg-5* son de origen Andino mientras que los genes *Phg-2* y *Phg-3* son de origen Mesoamericano (Souza *et al.*, 2016).

Ferreira *et al.* (2013), citado por Souza *et al.* (2016), notaron que los genes de resistencia a las enfermedades causadas por patógenos de alta variabilidad frecuentemente se organizan en grupos en los cromosomas. Los genes individuales

confieren resistencia a una cepa específica o la raza del patógeno. Por esta razón el uso de información del mapeo directo o indirecto de marcadores moleculares ligados a genes y QTL de resistencia conocidos es recomendado para apoyar la caracterización de nuevos loci de resistencia a la mancha angular (Souza *et al.*, 2016).

La evaluación e identificación de genotipos con resistencia a la mancha angular puede ampliar la diversidad de fuentes de resistencia que puedan ser utilizados en los diferentes programas de mejoramiento de frijol. En un estudio realizado en Brasil, CAL 143 presentó resistencia a la mancha angular, a la roya causado por *Uromyces appendiculatus*, al mildiu causado por *Erysiphe polygoni*, a la mancha foliar por *Alternaria* causada por *Alternaria sp.*, a la antracnosis causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Vieira *et al.*, 2002), al tizón de halo causado por *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*, además la tolerancia a la acidez y a bajos niveles de fósforo y nitrógeno en el suelo (Kimani *et al.*, 2007). De igual manera, Rojo es una importante variedad de frijol (liberada en Tanzania), ya que posee los genes *I* y *bcI²* que confieren resistencia al virus del mosaico común (BCMV, siglas en inglés), además presenta resistencia a la roya, tolerancia a la sequía y buen rendimiento (Hillocks *et al.*, 2006). Por lo tanto, sería muy útil para los programas de fitomejoramiento el desarrollar un mapa genético de los genes de resistencia a las enfermedades de estas importantes líneas de frijol.

OBJETIVOS

1. Identificar genotipos de frijol con resistencia a *P. griseola* mediante inoculación artificial en condiciones de invernadero.
2. Analizar fenotípicamente y genéticamente la resistencia a *P. griseola* en una población de líneas endogámicas recombinantes (RIL) derivada del cruzamiento ‘Rojo x CAL 143’.

REVISION DE LITERATURA

La Mancha angular

La mancha angular es una enfermedad destructiva del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) causada por el hongo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous y Braun (syn. *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris) (Crous *et al.*, 2006). Es una enfermedad principalmente de la parte aérea de la planta y se produce en todo el mundo en donde esta leguminosa se cultiva, a menudo causando graves pérdidas de cosechas (Abadio *et al.*, 2012).

Para el desarrollo de la enfermedad es necesario un período prolongado de clima cálido y húmedo junto con una fuente de inóculo. El hongo puede sobrevivir en semillas y en desechos de plantas en el suelo. En el siguiente ciclo de siembra se producen nuevos coremios y conidios a temperaturas entre 16 y 28° C y bajo condiciones de alta humedad estos sirven de inóculo primario. El desarrollo de la enfermedad es más rápido a una temperatura de 24° C, y ocurre una gran esporulación luego de 72 horas a 20° C. De este modo, las condiciones climáticas más favorables para una epifitía, son temperaturas templadas, lluvias y humedad prolongada como para producir coremios e infección por conidios (3-4 días), alternando con atmósferas secas y acción eólica para la dispersión de esporas. La dispersión de esporas puede ocurrir por el salpicado del agua de lluvia, pero esto es menos efectivo que la acción del viento que arrastra las esporas provenientes de lesiones en esporulación (León, 2009; Schwartz *et al.*, 1982).

Los síntomas producidos como resultado de la infección son comunes en las hojas y se presentan generalmente como lesiones angulares delimitadas por las nervaduras. Generalmente, el patógeno puede producir estructuras reproductivas como sinemas en el

envés de la hoja sobre la lesión. En el tallo, las ramas y los peciolos, las lesiones son de color café-rojizo de borde más oscuro y de forma alargada. Las lesiones en las vainas son manchas ovales o circulares de centro rojo-marrón las cuales presentan, en algunos casos, bordes oscuros (Schwartz *et al.*, 1982).

P. griseola presenta una gran variabilidad genética y varias razas fisiológicas (Damasceno *et al.*, 2008), que pueden ser divididas en dos grupos de aislamientos: Mesoamericano y Andino. Aislamientos de *P. griseola* del primer grupo tienen una mayor variabilidad genética (Wagara *et al.*, 2004) e infectan cultivares de frijol del origen Andino y Mesoamericano, mientras que los aislados de este último grupo normalmente infectan plantas de frijol sólo del mismo origen (Pastor-Corrales y Jara, 1995). Sin embargo, algunos aislamientos Andinos que se encuentran en África pueden infectar tanto frijoles Andinos y Mesoamericanos (Mahuku *et al.*, 2002b).

Debido a la alta variabilidad de *P. griseola* (Abadio *et al.*, 2012), el mejoramiento para una amplia resistencia a MA requiere la combinación de genes de resistencia de origen Andino y Mesoamericano o genes del acervo genético secundario (Mahuku *et al.*, 2003). La variabilidad patogénica de *P. griseola* se ha estudiado mediante el uso de 12 variedades diferenciales estándar propuestas por el CIAT. De estas 12 variedades diferenciales seis son de origen Andino y las seis restantes son de origen Mesoamericano (Pastor-Corrales y Jara, 1995). La importancia de incluir líneas de frijol de los dos centros de origen radica en observar el comportamiento patogénico de este hongo en los dos acervos genéticos del frijol, que se desarrollaron bajo condiciones específicas muy diferentes (coevolución patógeno-hospedante). La evaluación constante de la variabilidad patogénica de mancha angular y la identificación de nuevas razas del patógeno y nuevos genes de resistencia son de fundamental importancia para el desarrollo de cultivares con resistencia duradera (Damasceno *et al.* 2008).

Mejoramiento de la resistencia a mancha angular

A causa de la co-evolución de *P. griseola* y frijol común, la piramidación de genes de resistencia de los dos centros del origen (Andino y Mesoamericano) podrían resultar en un manejo eficaz y duradero de la enfermedad (Mahuku *et al.*, 2002). Debido a la alta variabilidad del patógeno, el uso de una amplia diversidad de genes de resistencia y el conocimiento de la diversidad genética del patógeno para la virulencia son útiles herramientas para el desarrollo de variedades de frijol con duradera resistencia a la mancha angular (Mahuku *et al.* 2002).

La investigación por muchos años se han dirigido hacia la identificación de cultivares con resistencia a la mancha angular. Algunos de estos cultivares resistentes son A 75, A 140, A 152, A 175, A 229, BAT 76, BAT 431, BAT 1432, BAT 1458, G5686, MAR 1, MAR 2, AND 277, Cornell 49-242, México 54, G06727 (Namayanja *et al.*, 2006). Sin embargo, la utilización de fuentes de resistencia en cualquier programa de mejoramiento requiere información de los patrones de virulencia del patógeno.

Estudios anteriores han revelado que la resistencia a *P. griseola* está condicionado por unos pocos genes recesivos o dominante dependiendo del cultivar utilizado como el padre susceptible (Sartorato *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2000). De ahí la necesidad de verificar la naturaleza de los genes de resistencia en diferentes entornos susceptibles (Namayanja *et al.*, 2006).

Varios genes dominantes para resistencia a mancha angular han sido identificados en frijol común. El gen *Phg-1* es presente en el cultivar Andino AND 277 y fue mapeado en el cromosoma Pv01 (Carvalho *et al.*, 1998; Goncalves-Vidigal *et al.*, 2011; citados por Keller *et al.*, 2015). El gen *Phg-2* presente en el cultivar Mesoamericano México 54 es

ubicado en el cromosoma Pv08 (Sartorato *et al.*, 2000). Loci de resistencia en la misma región genómica han sido identificados en los cultivares MAR 2 (Ferreira *et al.*, 2000), Cornell 49-242 (Nietsche *et al.*, 2000, citado por Keller *et al.*, 2015), Ouro Negro (Faleiro *et al.*, 2003), G10474 (Mahuku *et al.*, 2004) y G10909 (Mahuku *et al.*, 2011), BAT 322 (Namayanja *et al.*, 2006). El gen *Phg-3*, presente en el cultivar Ouro Negro, es localizado en el cromosoma Pv04 (Correa *et al.*, 2001; Gonçalves-Vidigal *et al.*, 2013; citados por Keller *et al.*, 2015). Sin embargo, además de estos genes específicos de resistencia, en los programas de mejoramiento de frijol en Uganda, Colombia y Brasil se han reportado el uso de diferentes fuentes de resistencia tales como BAT 332, G5686 y CAL 143 (Souza *et al.*, 2016).

Hay algunos reportes de QTL controlando resistencia a mancha angular. En la accesión G109093 dos QTLs fueron mapeados, uno de ellos sobre el grupo de ligamiento B04 y el otro sobre el grupo de ligamiento B08 (Mahuku *et al.*, 2011), igualmente en la accesión G 5686 dos QTL fueron mapeados sobre el grupo de ligamiento B04 y otro QTL sobre el grupo de ligamiento B09 (Mahuku *et al.*, 2009).

En un estudio realizado en Brasil por Oblessuc *et al.* (2012) los resultados indican que el control de la resistencia presente en CAL 143 es de naturaleza cuantitativa. Siete QTL con efecto variable se identificaron en ese estudio, cuatro de ellos no han sido mapeados con anterioridad. Entre estos sobresale un QTL mayor (ALS10.1^{DG, UC}) de efecto estable sobre el grupo de ligamiento Pv10 que controla el 22 y 16% de la resistencia bajo infecciones en condiciones de campo e invernadero, respectivamente. El aislamiento de *P griseola* utilizado fue caracterizado como la raza 0:39 (Oblessuc *et al.*, 2012).

Así mismo, Keller *et al.* (2015), en un estudio realizado en el CIAT, utilizando la raza 31:0 del patógeno, en múltiples análisis de QTL identificaron 3 regiones de QTL incluyendo en la accesión G5686, un QTL mayor en el cromosoma Pv04 que explica el

73% de la variación observada para resistencia a mancha angular. Todos estos QTL han sido ligados a distintos tipos de marcadores moleculares (Muhuku *et al.*, 2009; Muhuku *et al.*, 2011; Oblesuc *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2015). Estos marcadores moleculares son herramientas útiles para la introducción de genes de resistencia a mancha angular en las líneas de frijol común. Según Oblesuc *et al.*, 2013, el aumento de la densidad de los marcadores en la región de QTLs tales como el ALS10.1 es muy importante para facilitar la selección asistida por marcadores.

Según Souza *et al.* (2016) en julio del 2015 el Comité Genético del Bean Improvement Cooperative (BIC) estableció un grupo de trabajo para examinar los progresos en el análisis genético y mejoramiento de la resistencia a mancha angular. Este grupo concluyó que: basado en los resultados en una prueba alelismo realizado por Namayanja *et al.* (2006), el gen de resistencia a ALS presente en BAT 332 será considerado como alélico del gen *Phg-2* presente en México 54 y que los genes de resistencia a la mancha angular presentes en MAR 2, Cornell 49-242, G10474 y G10909 también pueden ser alélicos de *Phg-2*. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para aclarar la relación alélica de *Phg-2* y los genes resistentes a mancha angular presentes en MAR 2, Cornell 49-242, G10474 y G10909, para de esta manera guiar la nomenclatura de estos genes (Souza *et al.*, 2016).

Adicionalmente el grupo formado por el Comité Genético del BIC propuso que: los QTLs ALS4.1^{GS, UD} en el cromosoma Pv04 y el ALS10.1^{DG, UC} en el cromosoma Pv10, identificados en los genotipos G5686 y CAL 143, serán nombrados oficialmente como *Phg-4* y *Phg-5*, respectivamente (Souza *et al.*, 2016). Esta propuesta considera que estos loci principales tenía efectos consistentes y significativas entre los diferentes ambientes y poblaciones en estudios realizados por Mahuku *et al.* (2009), Oblessuc *et al.* (2012),

(2013), y Keller *et al.* (2015). Estos QTL se han mapeado físicamente en posiciones diferentes a las que se ubican los genes *Phg-1*, *Phg-2* y *Phg-3* (Souza *et al.*, 2016).

Este esfuerzo por caracterizar mejor y nombrar formalmente los principales loci identificados como resistentes hasta el momento será útil para apoyar los programas de mejoramiento de frijol con respecto a la selección y el uso de fuentes de resistencia a la mancha angular. Además, también guiará la caracterización de nuevos loci que confieren resistencia (Souza *et al.*, 2016).

Ferreira *et al.* (2013), citado por Souza *et al.* (2016), notaron que loci de resistencia a las enfermedades causadas por patógenos de alta variabilidad se confieren resistencia a una cepa específica o la raza del patógeno. Por esta razón el uso de información del mapeo directo o indirecto de marcadores moleculares ligados a genes y QTL de resistencia conocidos es recomendado para apoyar la caracterización de nuevos loci de resistencia a la mancha angular (Souza *et al.*, 2016). Adicionalmente el desarrollo de marcadores moleculares efectivos y fáciles de utilizar son necesarios para ser adoptados por programas de fitomejoramiento (Oblessuc *et al.*, 2013).

Marcadores moleculares utilizados en el mapeo de QTLs

El fitomejoramiento asistido por marcadores moleculares es un enfoque en el que las líneas de mejoramiento se seleccionan utilizando el índice de selección basado en los datos genotípicos de genes específicos o QTL. Se espera que la ganancia de selección a través de dicho índice a ser mayor que la selección fenotípica utilizado en métodos recurrentes convencionales (Semagn *et al.*, 2006). Sin embargo, la identificación de genes específicos o QTL es el primer paso en la aplicación del mejoramiento asistido por marcadores moleculares (Teixeira *et al.*, 2005). Para que el mejoramiento asistido sea

éxito, una alta correlación y/o vínculo estrecho debe existir entre los genes de resistencia a enfermedades y los marcadores moleculares, además los marcadores deben ser estables, reproducibles y fáciles de ensayar (Yu, 2004; citado por Muhamba *et al.*, 2013).

Isoenzimas y posteriormente Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs, restriction fragment length polymorphisms) fueron los primeros marcadores moleculares, aunque, este sistema de marcadores ya no son empleados con frecuencia debido a los inconvenientes de la complejidad, la tasa de polimorfismo bajo, y alto costo que implica realizar esta técnica (Gao *et al.*, 2016). Microsatelites (SSRs, simple sequence repeats) se consideran los marcadores moleculares de segunda generación (Gao *et al.*, 2016), debido a que utilizan una técnica relativamente sencilla con una tasa de polimorfismo mayor y menor costo, los marcadores de SSR se han empleado ampliamente en el estudio de muchos cultivos, incluyendo frijol (Blair *et al.*, 2006). Los marcadores moleculares de tercera generación son los de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphisms) (Gao *et al.*, 2016). El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) se refiere al cambio de una sola base nitrogenada en una secuencia específica de ADN (ácido desoxirribonucleico), con una habitual alternativa de dos nucleótidos posibles en una posición dada en esta secuencia de ADN (Vignal *et al.*, 2002; citado por Semagn *et al.*, 2014).

Marcadores moleculares de ADN, especialmente microsatelites (SSR, Simple Sequence Repeats) y polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), se utilizan ampliamente para la construcción de mapas de ligamiento, mapeo de loci de rasgos cuantitativos (QTL) y selección asistida por marcadores en cultivos de importancia económica (Song *et al.* 2015). Según Semagn *et al.* (2014) los marcadores SNP han reemplazado en gran medida a los microsatelites en especies de cultivos que han sido secuenciados extensivamente, como por ejemplo el maíz (*Zea mays*

L.) y frijol (Song *et al.*, 2015). Esto se debe a su bajo costo, gran abundancia en el genoma, especificidad de locus, herencia co-dominante, facilidad de documentar, potencial en el análisis de alto rendimiento, una tasa de error relativamente baja en el genotipado (Semagn *et al.*, 2014). SNP han surgido como herramientas poderosas para muchas aplicaciones genéticas incluyendo la construcción de mapas de ligamiento para análisis de QTLs (Semagn *et al.*, 2014).

En frijol común, un conjunto de 239 SNP se informó por primera vez mediante la comparación de las secuencias de regiones codificantes y no codificantes y de ADN genómico de un conjunto de 10 genotipos diversos (Gaitán-Solís *et al.*, 2008; citado por Song *et al.*, 2015). Más recientemente, con el advenimiento de la secuenciación de la próxima generación de tecnologías se informó de, aproximadamente 4000 SNPs mediante la comparación de alineamientos de secuencias de diferentes genotipos (Blair *et al.*, 2013; Hyten *et al.*, 2010; citados por Song *et al.*, 2015).

El progreso continuo en tecnologías genómicas de alto rendimiento ha dado lugar a numerosas plataformas de genotipado SNP (Semagn *et al.*, 2014) que combinan una variedad de métodos de detección y formatos de reacción (Tadesse *et al.*, 2014). Algunas de las plataformas de genotipado SNP ampliamente utilizadas incluyen: BeadXpressTM, GoldenGateTM e Infinium[®] de Illumina (<http://www.illumina.com>); SNaPshotTM y TaqManTM de Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com>); SNPWaveTM de KeyGene (<http://www.keygene.com>); entre otras. Competitive allele-specific PCR (recientemente llamado Kompetitive Allele Specific PCR, or KASPTM) de KBioscience or LGC Genomics (<http://www.lgcgenomics.com>) también es una plataforma uniplex genotipado de SNP (Semagn *et al.*, 2014).

Según Tadesse *et al.* (2014) el sistema KASP se ha convertido en una tecnología de referencia mundial. El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo

(CIMMYT) utiliza rutinariamente KASP, la generación de más de un millón de datos anualmente para fines de mejoramiento de cultivos (Semagn *et al.*, 2014). Además, ha sido el sistema elegido para convertir SNP en marcadores útiles para la mejora en once cultivos, entre los que se encuentran arroz (*Oriza sativa* L.), maíz, trigo (Rubio-Cabetas *et al.*, 2014) y frijol común (Cortez *et al.*, 2011).

KASP ha sido comparado con diversas plataformas de genotipado SNP por varios autores y ha sido seleccionado como la mejor opción. Por ejemplo, Yuan *et al.* (2014) comparo KASP con la plataforma TaqMan (Life Technologies) en el mejoramiento de soya y concluyó que KASP presentó algunas ventajas como: que fue más rentable en la selección de ensayo específico de alelo, facilitado de manera eficiente la determinación del genotipo de soya a través de un gran número de líneas individuales para una gran variedad de marcadores (cientos a miles). Así mismo Semagn *et al.* (2014) compara KASP con un chip basado en la plataforma GoldenGate de Illumina e informa que KASP ofrece flexibilidad y rentabilidad en aplicaciones que requieren de pequeños a moderados número de marcadores, tales como el análisis de control de calidad, loci de rasgos cuantitativos (QTL) en el mapeo biparental de poblaciones, la selección recurrente asistida por marcadores, retrocruzamiento asistida por marcadores, y mapeo fino de QTL. Así mismo Gao *et al.* (2016) en su estudio concluyó que, los marcadores SNP usando el sistema de KASP son menos costosos y más eficientes que los marcadores de SSR. Para la mancha angular del frijol se disponen de 11 marcadores KASP (Tabla 8) desarrollados en CIAT por Raatz Bodo (datos no publicados).

Líneas endogámicas recombinantes (RILs Recombinant inbred lines)

Las líneas endogámicas recombinantes (RILs) pueden servir como herramienta poderosa para el mapeo genético. Un RIL se forma al cruzar dos líneas puras, seguido por autofecundación repetida o por el apareamiento de hermanos para crear una nueva línea consanguínea cuyo genoma es un mosaico de los genomas parentales. Como cada RIL es una línea endogámica, esta puede ser propagada eternamente, un panel de RIL tiene una serie de ventajas para el mapeo genético. La ventaja principal es que constituyen una población permanente de mapeo, por lo que pueden evaluarse en ensayos replicados y en ambientes diferentes (Broman, 2005).

Panel de diversidad genético

La diversidad en los recursos filogenéticos brinda la oportunidad a los fitomejoradores de desarrollar cultivares nuevos y mejorados con características deseables, que incluyen rasgos preferidos por los agricultores (altos rendimientos, resistencia/tolerancia a factores bióticos y abióticos, etc.) (Govindaraj *et al.*, 2015). Una riqueza genética es accesible en todo el mundo, con aproximadamente 6 millones de accesiones en más de 1400 bancos de germoplasma (Hammer *et al.*, 2003).

En el caso de frijol, la diversidad de poblaciones cultivadas y silvestres son un recurso importante para el mejoramiento genético, ya que muchas de ellas cuentan con genes de tolerancia a factores adversos. Estas poblaciones (cultivadas y principalmente silvestres) de frijol han sido expuestas a factores ambientales adversos como frío, sequía, calor, enfermedades y plagas. Las poblaciones que sobrevivieron incrementaron el número de alelos favorables para su adaptación a esas condiciones y se han utilizado para ampliar la

base genética del frijol cultivado mediante mejoramiento genético (Bellon *et al.*, 2009). El ensayo “Bean Abiotic Stress Evaluation” (BASE 120) y el Panel de Diversidad Andino (ADP) (Cichy, *et al.* 2015) utilizados en este estudio son precisamente ejemplos de colecciones de líneas y cultivares que representan la diversidad genética de frijol.

El ensayo BASE 120 está compuesto por 118 genotipos de frijol común y dos líneas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius* L.). Estos genotipos provienen de diferentes programas de fitomejoramiento de diferentes países como: Puerto Rico, Honduras, Colombia, Estados Unidos, entre otros.

El panel de diversidad andina (ADP) consta de 396 accesiones de frijol e incluye importantes cultivares, líneas mejoradas y variedades locales que son originarias principalmente de África, el Caribe, América del Norte y del Sur (Cichy, *et al.* 2015).

METODOLOGIA

Análisis fenotípico de la resistencia

Los experimentos se realizaron en dos invernaderos de la Universidad de Puerto Rico en el recinto de Mayagüez. Se utilizaron 2 aislamientos de *P. griseola* colectados en Puerto Rico codificados como ALS 9029JD2 (colectado en la localidad de Juana Díaz) y ALS 1146C (colectado en la localidad de Isabela). Estos dos aislamientos en base a la reacción a los diferenciales para mancha angular (Pastor-Corrales y Jara, 1995) han sido caracterizados como las razas 61:11 y 63:51 respectivamente (Estevez de Jensen *et al.*, 2015). Con los dos aislamientos se inocularon cuatro grupos de líneas y cultivares de frijol común. El primer grupo consiste de 118 genotipos de frijol común y dos líneas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius* L.) del ensayo BASE 120 (Tabla 1). Este grupo está compuesto por genotipos de origen Mesoamericano principalmente y pocos de origen Andino. El segundo grupo corresponde a 34 líneas y variedades provenientes de diferentes programas de fitomejoramiento, seleccionadas para resistencia a *P. griseola*, e igualmente consta de genotipos de origen Andino y Mesoamericano (Tabla 2). El tercer grupo corresponde a 27 líneas y variedades del ADP conservados por el USDA-ARS-TARS, (Tabla 3). Estos 27 genotipos fueron seleccionados ya que presentaron resistencia a mancha angular en evaluaciones realizadas en condiciones de campo y consta de genotipos principalmente de origen Andino y pocos de origen Mesoamericano. Finalmente, el grupo 4 corresponde una población de 147 líneas endogámicas recombinantes (RILs), obtenidas del cruzamiento entre el cultivar Rojo y la línea CAL 143. Esta población RIL, abreviada como RC, la generó el Dr. Phil Miklas de USDA-ARS por el método de descendencia de semilla única (datos no publicados). El cultivar Rojo es una variedad de frijol de origen Andino liberada en Tanzania con semillas de

tamaño grande, de color rojo y forma parte del ADP (ADP-0096). Esta variedad posee los genes *I* y *bcI²* que brindan resistencia al virus del mosaico común (Hillocks *et al.*, 2006). CAL 143 es una línea mejorada de frijol de semilla de tamaño grande y de color rojo moteado, fue generada en el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) y también es parte del ADP (ADP-0526). CAL 143 posee resistencia a la mancha angular, a la roya, al mildiu, a la antracnosis, a la mancha foliar por alternaría y al tizón del halo (Souza *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2002).

La metodología de siembra, inoculación y evaluación fue la misma para los cuatro grupos de líneas/variedades de frijol.

La siembra de cada genotipo se realizó en macetas plásticas de 9 cm de diámetro con sustrato comercial (Sunshine mix #1) sembrando 5 semillas de cada genotipo y dejando únicamente 3 plántulas para la inoculación. Cada maceta se consideró como una repetición, y se implementaron 2 repeticiones.

El incremento de inóculo de las dos razas de *P. griseola* se realizó en medio de cultivo V8 (200 ml V-8 juice, 3 g CaCo₃, 18 g Bacto agar y 800 ml agua destilada estéril) siguiendo la metodología de Castellanos *et al.* (2011). Los dos aislamientos se incrementaron en medio de cultivo V8 y se incubaron a 24°C aprox. durante 15 días. La inoculación se realizó a los 15 días de la siembra en la primera hoja trifoliada asperjando el inóculo en el envés de los folíolos, la concentración del inóculo fue de 1x10⁴ c/ml ajustada con un hemacitómetro (1/400 mm², Haussner Scientific). Las plantas inoculadas fueron expuestas a una humedad del 90-100%, mediante el uso de un humidificador, durante un periodo de 72 hrs después de la inoculación, transcurrido ese tiempo fueron colocadas en mesas bajo invernadero y sometidas a humedad constante (70-90%) todas las noches hasta su evaluación.

Tabla 1. Genotipos de frijol y frijol tepary, utilizados en este estudio que corresponden al ensayo BASE 120.

Número de la entrada	Genotipos	Color y tamaño de semilla	Origen
1	Aifi Wuriti SS	Negra, pequeña	Zamorano
2	ABL 213	Roja, pequeña	CIAT
3	ABL 74	Roja, pequeña	CIAT
4	ALS 0532-6	Roja, pequeña	Zamorano
5	Amadeus 77	Roja, pequeña	Zamorano
6	B12724	Negra, pequeña	Universidad del Estado de Michigan
7	B14302	Negra, pequeña	"
8	B14303	Negra, pequeña	"
9	B14311	Negra, pequeña	"
10	BAT 477	Crema, pequeña	CIAT
11	BAT 881	Crema, pequeña	CIAT
12	Beníquez	Blanca, pequeña	UPR
13	BFS 139	Roja, arriñonada	Zamorano
14	BFS 29	Roja, arriñonada	“
15	BFS 81	Roja, arriñonada	“
16	BFS 87	Roja, arriñonada	“
17	BFS 94	Roja, arriñonada	“
18	BFS 95	Roja, arriñonada	“
19	BIOF 2-106	Roja, pequeña	“
20	BIOF 4-70	Negra, pequeña	“
21	BK9-2	Negra, pequeña	“
22	Bribri	Roja, pequeña	“
23	BRT 103-182	Roja, pequeña	“
24	BRT 943-20	Negra, pequeña	"
25	CALIMA	Rosada, moteda	CIAT
26	Cardenal	Roja, pequeña	Zamorano
27	Carioca	Crema, rayada	CIAT
28	Carrizalito	Violeta, pequeña	Zamorano
29	Cedrón	Roja, pequeña	Zamorano

30	Centa Pipil	Violeta, pequeña	"
31	Croissant	Crema, moteada	Universidad del Estado de Colorado
32	DEHORO	Roja, pequeña	Zamorano
33	DOR 364	Violeta, pequeña	CIAT
34	DOR 390 (ck)	Negra, pequeña	"
35	DPC 40	Negra, pequeña	IDIAF
36	FBN 1203-43	Roja, pequeña	Zamorano
37	FBN 1203-47	Roja, pequeña	"
38	FBN 1203-31	Negra, pequeña	"
39	FBN 1203-48	Negra, pequeña	"
40	G21212	Negra, pequeña	CIAT
41	GN9-4	Blanca, arriñonada	CIAT
42	I9365-31	Negra, pequeña	USDA-ARS
43	ICA Pijao	Negra, pequeña	CIAT
44	ICB 301-204	Roja, pequeña	CIAT
45	ICTAZAM ML	Negra, pequeña	Zamorano
46	IJR	Rosada, rayada	CIAT
47	INB 835	Crema, moteada	CIAT
48	INB 841	Crema, moteada	CIAT
49	INTA Precoz	Roja, pequeña	Zamorano
50	Jamapa	Negra, pequeña	CIAT
51	Matambú	Negra, pequeña	Zamorano
52	Matterhorn	Blanca, arriñonada	MSU
53	MEN 2201-64 ML	Negra, pequeña	Zamorano
54	MER 2212-28	Roja, pequeña	"
55	MHN 322-49	Negra, pequeña	"
56	Morales	Blanca, pequeña	UPU
57	MSU BNF Entry 86	Negra, pequeña	MSU
58	NCB 280	Negra, arriñonada	CIAT
59	Paraisito	Rosada, pequeña	Zamorano
60	Pérola	Crema, rayada	CIAT
61	PR 0401-259	Marrón, pequeña	UPR

62	PR 0443-151	Negra, pequeña	"
63	PR 0806-81	Blanca, pequeña	"
64	PR 1147-1	Negra, pequeña	"
65	PR 1147-3	Negra, pequeña	"
66	PR 1147-6	Negra, pequeña	"
67	PR 1147-8	Negra, pequeña	"
68	PR 1165-3	Negra, pequeña	"
69	PR 1217-1	Blanca, pequeña	"
70	PR 1217-6	Blanca, pequeña	"
71	PR 1418-15	Negra, pequeña	"
72	PR 1483-105	Negra, pequeña	"
73	PR 9920-171	Rosada, moteada	"
74	Quimbaya	Roja, arriñonada	CIAT
75	RCB 593	Roja, pequeña	CIAT
76	Rosetta	Crema, pequeña	Universidad del Estado de Michigan
77	RRH 336-28	Roja, pequeña	Zamorano
78	Sayaxché ML	Negra, pequeña	Zamorano
79	SB 747	Blanca, pequeña	USDA-ARS-TARS
80	SB 754	Roja, mediana	"
81	SB 761	Violeta, mediana	"
82	SB 770	Violeta, mediana	"
83	SB 774	Violeta, mediana	"
84	SB 781	Negra, pequeña	"
85	SB 787	Crema, moteada	"
86	SB 793	Negra, pequeña	"
87	SB 815	Crema, moteada	"
88	SB DT 1	Negra, pequeña	"
89	SEF 10	Roja, mediana	CIAT
90	SB 2-4	Crema, moteada	USDA-ARS-TARS

91	SEF 15	Rosada, pequeña	CIAT
92	SEF 16	Roja, mediana	CIAT
93	SEF 17	Roja, mediana	CIAT
94	SEF 71	Roja, mediana	CIAT
95	SEQ 342-39	Negra, pequeña	Zamorano
96	SEQ 342-89	Negra, pequeña	Zamorano
97	SER 113	Roja, mediana	CIAT
98	SER 118	Roja, mediana	CIAT
99	SER 125	Roja, mediana	CIAT
100	SER 16	Violeta, mediana	CIAT
101	SER 78	Roja, pequeña	CIAT
102	SJC 730-79	Roja, pequeña	Zamorano
103	SB2-46	Crema, moteada	USDA-ARS-TARS
104	SB2-96	Blanca, arriñonada	"
105	SB2-105	Crema, moteada	"
106	SXB 405	Crema, pequeña	CIAT
107	SXB 412	Crema, pequeña	CIAT
108	TARS HT-1	Negra, pequeña	USDA-ARS-TARS
109	SB2-170	Rosada, pequeña	USDA-ARS-TARS
110	TARS-LFR1	Roja, pequeña	USDA-ARS-TARS
111	TARS MST 1	Negra, pequeña	USDA-ARS-TARS
112	Tepary G40001	Blanca, pequeña	USDA-ARS-TARS
113	TARS-Tep-22	Blanca, pequeña	USDA-ARS-TARS
114	Tio Canela 75	Violeta, pequeña	Zamorano
115	USRM 20	Roja, arriñonada	USDA-ARS
116	VAX 6	Violeta, pequeña	CIAT
117	Verano	Blanca, pequeña	UPR
118	XRAV-40-4	Negra, pequeña	UPR
119	Zenith	Negra, pequeña	Universidad del Estado de Michigan

120	Zorro	Negra, pequeña	“
-----	-------	----------------	---

Tabla 2. Líneas y variedades de frijol provenientes de diferentes programas de mejoramiento evaluadas para resistencia a mancha angular.

Número de la entrada	Línea o Variedad	Color y tamaño de semilla	Origen
1	Ouro negro	Negra, pequeña	---
2	INIAP 484-Centenario	Rojo moteado-grande	INIAP-Ecuador
3	INIAP-483 Intag	Morado moteado-grande	INIAP-Ecuador
4	PR 0633-4	Roja moteada-grande	UPR
5	AND 227	Roja moteada-grande	---
6	PR 0637-6	Rojo moteada-grande	UPR
7	PR 0637-116	Café moteada-grande	UPR
8	PR 0633-1	Rosado moteada-grande	UPR
9	PR 1530-1	Blanca-pequeña	UPR
10	PR 1530-29	Blanca-pequeña	UPR
11	PR 1530-31	Blanca-pequeña	UPR
12	PR 1530-31	Blanca-pequeña	UPR
13	PR 1530-38	Blanca-pequeña	UPR
14	PR 1530-47	Blanca-pequeña	UPR
15	PR 1530-48	Blanca-pequeña	UPR
16	PR 1530-52	Blanca-pequeña	UPR
17	PR 1530-54	Blanca-pequeña	UPR
18	PR 1530-57	Pequeña	UPR
19	PR 1530-60	Pequeña	UPR
20	PR 1486-10	Blanca-pequeña	UPR
21	PR 1486-35	Blanca-pequeña	UPR
22	PR 1486-52	Blanca-pequeña	UPR
23	PR 1846-71	Blanca-pequeña	UPR
24	PR 1846-74	Blanca-pequeña	UPR
25	ALS 0546-78	Negra-pequeña	Zamorano
26	ALS 0532-6	Roja-pequeña	Zamorano
27	ALS 0546-97	Negra-pequeña	Zamorano
28	ALS 053-41	Roja-pequeña	Zamorano
29	ALS 0532-38	Roja-pequeña	Zamorano
30	ALS 0531-97	Roja-pequeña	Zamorano
31	ALS 0546-60	Negra-pequeña	Zamorano
32	ALS 0532-4	Roja-pequeña	Zamorano
33	ALS 0526-35	Roja-pequeña	Zamorano

34	ALS NIL 604-29	Roja-pequeña	Zamorano
----	----------------	--------------	----------

Tabla 3. Accesiones del panel de diversidad andino (ADP, Andean Diversity Panel) seleccionadas para este estudio.

Número de la entrada	# ADP	Línea o Variedad	Color y tamaño de semilla	Origen
1	40	Katwela	Roja-pequeño	Tanzania
2	41	Mrondo	Roja-grande	Tanzania
3	48	W6 16534	Roja-grande	Tanzania
4	96	Rojo	Roja-grande	Tanzania
5	97	Bilfa 4	Café-pequeña	E. África
6	111	Uyole 98	Amarilla-grande	Tanzania
7	126	Selian 05	Gris-pequeña	Tanzania
8	127	Selian 06	Rosada-grande	Tanzania
9	439	754-3	Roja moteado-pequeña	Puerto Rico
10	447	INIAP 414	Roja moteada-grande	Ecuador
11	449	INIAP 420	Amarilla-grande	Ecuador
12	461	PI527540-A	Gris-pequeña	Burundi
13	462	PI527540-B	Amarilla opaca-grande	El Este de África
14	472	PI527537-B	Gris-pequeña	El Este de África
15	517	Carioca, Kibala	Carioca-grande	Angola
16	526	CAL 143	Roja moteada-grande	Malawi
17	551	AFR 612	Roja moteada-grande	CIAT
18	556	BRB194	Roja-grande	CIAT
19	590	SEQ11	Roja moteada-grande	CIAT
20	716	SUGAR 131	Roja-grande	Malawi
21	722	KAB 06 F2.8-144	Amarilla-pequeña	Malawi
22	724	Inter Lab 04	Purpura-grande	Malawi
23	728	GCI -LRK-291-RAR	Roja-grande	Malawi
24	731	Bilfa Uyole	Purpura grande	Malawi
25	736	KG 15-26	Roja-grande	Malawi
26	737	KG 27-8	Roja moteada-grande	Malawi

27	740	CIM-RM05-ALS-82	Roja-grande	Malawi
----	-----	-----------------	-------------	--------

Siembra de experimentos

La siembra del ensayo BASE 120 en invernadero se realizó en dos fechas, el 8 de Octubre y el 18 de Noviembre del 2015. La inoculación se realizó 15 días después de la siembra con el aislamiento ALS 9029JD2. La siguiente siembra se la realizó el 4 de Octubre del 2016 en dos invernaderos (una repetición por cada invernadero) y 15 días después de la siembra se inoculó el aislamiento ALS 1146C (Tabla 4).

Tabla 4. Fechas de siembra de los ensayos de frijol e inoculación y evaluación de los aislamientos de *P. griseola*.

Ensayo	Fecha de siembra	Fecha de inoculación	Aislamiento inoculado	Evaluación
Base 120	8 de Octubre y 18 de Noviembre del 2015	22 de Octubre y 2 de diciembre	ALS 9029JD2	5 de noviembre y 16 de diciembre
	4 de Octubre del 2016	18 de Octubre	ALS 1146C	5 de noviembre
ADP y Líneas/ Variedades mejoradas	17 de febrero del 2016	2 de marzo	ALS 9029JD2	16 de marzo
	25 de abril del 2016	9 de mayo	ALS 1146C	23 de mayo
RIL RC	20 de marzo del 2016	3 de abril	ALS 9029JD2	17 de abril
	30 de mayo del 2016	6 de junio	ALS 1146C	20 de junio
Verificación	10 de Noviembre del 2016	24 de noviembre	ALS 9029JD2, ALS 1146C	8 de diciembre

La siembra del ADP y de las líneas/variedades mejoradas se realizó el 17 de Febrero del 2016 en dos invernaderos (una repetición en cada invernadero), 15 días después de la siembra se inoculó el aislado de *P. griseola* ALS 9029JD2. La siguiente

siembra de estas líneas se la realizó de la misma forma el 25 de Abril del 2016 para 15 días después inocular el aislamiento ALS 1146C (Tabla 4).

Las líneas de la población RIL fueron sembradas el 20 de Marzo del 2016, en dos invernaderos (una repetición en cada invernadero), 15 días después de la siembra se inoculó el aislamiento ALS 9029JD2. La siguiente siembra de estas líneas se la realizó el 30 de Mayo y luego de 15 días se inoculó el aislamiento ALS 1146C (Tabla 4).

Finalmente el 10 de Noviembre del 2016 se realizó la siembra de las líneas que no germinaron en siembras anteriores y de las líneas en las que se necesitaba confirmar los datos de severidad observados en evaluaciones anteriores (Tabla 4). Esta siembra se la realizó en dos invernaderos, un invernadero para inocular cada aislamiento de *P. griseola*.

La evaluación de la severidad de mancha angular se realizó a los 15 días después de la inoculación de acuerdo con una escala descriptiva 1-9 de CIAT, donde 1 = las plantas no presentan síntomas; 3 = plantas con 2% de la superficie de la hoja con lesiones; 5 = plantas con 5% del área de la hoja con lesiones y la esporulación; 7 = plantas con hasta 10% de la superficie de la hoja con lesiones y esporulación, asociados con clorosis y tejidos necróticos; 9 = con 25% del área de la hoja con lesiones, frecuentemente asociada con la caída temprana de las hojas y muerte de la planta (Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987).

Para la identificación de posibles fuentes de resistencia, la severidad observada en los tres primeros grupos de genotipos se clasificaron como: plantas con valores (promedio de las dos repeticiones) de 1 a 3 se consideraron resistentes; plantas con valores de >3 a ≥ 6 se consideraron como resistencia intermedia; y plantas con valores de >6 a 9 se consideraron susceptibles (Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987). Al momento de la evaluación, las plantas que presentaron hojas con lesiones sin el desarrollo de sinemas

fueron sometidas a una humedad superior al 80% por 24 horas con la ayuda de un humidificador, y se consideraron resistentes aquellas plantas cuyas hojas no desarrollaron sinemas después de este periodo de tiempo (Sartorato, 2002).

El análisis de los datos de las lecturas de MA obtenidos en estos tres grupos se los realizó utilizando el software estadístico Infostat (versión 2008). El diseño experimental fue bloques completos al azar (DBCA) con dos replicas. El Análisis de Varianza (ADEVA) se lo hizo mediante un Modelo Lineal General y para la comparación entre las medias de las líneas en cada grupo se empleó la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (DMS), con un nivel de probabilidad de $P < 0.05$.

Los datos de reacción a MA obtenidos del último grupo de genotipos (población RILs) fueron llevados a medias de mínimos cuadrados (LSM, Least Square Means), para que sean parte del análisis genético de esta población RILs RC. Las medias de mínimos cuadrados para los dos aislamientos se obtuvieron usando el software estadístico SAS a través de un diseño de bloques completos al azar, Modelo lineal generalizado.

Análisis genético de la resistencia

Esta investigación se realizó en los laboratorios de USDA-ARS-TARS en Mayagüez, Puerto Rico. Para el análisis genético de la resistencia a mancha angular se estudió las reacciones a los dos aislamientos de *P. griseola* de la población RIL ‘Rojo x CAL 143’ (RC) y preliminarmente los 11 marcadores KASP de CIAT disponibles para mancha angular (Tabla 6).

Adicionalmente a los dos progenitores de la población se incluyeron 27 líneas/variedades (12 diferenciales de mancha angular y 17 líneas mejoradas) que también

fueron evaluadas con los 11 marcadores KASP (Tabla 12). De las 27 líneas/variedades utilizadas, las líneas de frijol México 54, G5686, Sprite, AND 277 y las líneas de tepari G40001 y G10474 ya fueron evaluadas por Raatz Bodo - CIAT (datos no publicados). Este estudio se realizó con el fin de comparar los resultados obtenidos con los presentados por Raatz Bodo y aportar con información adicional que se obtuvo de los 21 genotipos restantes.

La extracción de ADN de las líneas RILs y de las 27 líneas/variedades se realizó a partir de tejido joven de las hojas primarias (10 días después de la siembra) usando el kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante (<http://manualzilla.com/doc/5989778/quick-startprotocol-dneasy%C2%AE-plant-mini-kit-april-2012>). El ADN obtenido se cuantificó usando el kit QuantiFluor® dsDNA System y el lector Quantus fluorometer de Promega (www.promega.com). El ADN fue diluido con agua libre de nucleasa a 5ng/μl.

Para la corrida de los marcadores KASP se siguieron las instrucciones del manual publicado por Robinson y Holmes, (2011): 8μl de reacción contiene 4μl de ADN y 4μl de una mezcla entre el master mix y el marcador KASP con la etiqueta fluorescente de alelo específico. La amplificación de PCR consistió de un ciclo de 15 minutos a 94⁰ C, seguido por 10 ciclos a 94⁰ C por 20 segundos, 65-57⁰ C por 60 segundos (disminuyendo 0.8⁰ C por ciclo), seguido por 30 ciclos a 94⁰ C por 20 segundos y 57⁰ C por 60 segundos usando un Termociclador (C1000 Touch, BIORAD). Seguidamente los genotipos fueron agrupados automáticamente con un sistema de PCR-Cuantitativa (en inglés, quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR) (Modelo Mx3005P, Stratagene®, Agilent Technologies, USA) según los alelos que poseen, clasificándolos como homocigotos resistentes, homocigotos susceptibles y heterocigotos. Para el agrupamiento de los

genotipos se tomó como referencia el alelo que poseen dos genotipos testigos, uno resistente y el otro susceptible, para cada uno de los 11 marcadores (Tabla 6).

Con los 11 marcadores KASP disponibles se evaluaron las 27 líneas/variedades con lo que se asignó el SNP (alelo) correspondiente, incluyendo las 6 líneas evaluadas por Raatz Bodo – CIAT (Tabla 5) con las que fue posible comparar los resultados obtenidos en ambos estudios.

Tabla 5. SNP identificados por Raatz Bodo utilizando los 11 marcadores moleculares KASP de mancha angular en 4 líneas de frijol común y 2 líneas de frijol tepary

marker ID	MAS_ALS4b	ALSch04_GC_43800347	MAS_ALS5a	MAS_ALS5b	ALSch08_CT_57798588	MAS_ALS10a	ALSch09_TA_17203795	ALSch09_CT_17294365	ALSch09_CT_17299731	MAS_ALS10b	MAS_ALS10c
G10474*	T:T	G:G	A:A	T:T	T:T	G:G	T:T	?	C:C	A:A	C:C
G5686	C:C	C:C	A:A	C:C	C:C	T:T	A:A	T:T	T:T	C:C	T:T
AND 277	C:C	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
MEXICO 54	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	?	C:C	?	C:C
SPRITE	T:T	G:G	G:G	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
G40001*	?	?	G:G	T:T	?	G:G	?	?	?	A:A	?

*Líneas de frijol tepary

Para definir los marcadores moleculares SNP-KASP a usarse en la población RILs, las líneas Rojo y CAL 143 (progenitores de esta población) fueron evaluados con los 11 marcadores KASP (incluyendo los dos genotipos testigos de cada marcador) mediante el sistema de PCR-Q. Los marcadores KASP que identificaron el SNP (alelo) específico que era polimórfico entre Rojo y CAL 143 fueron seleccionados. Los marcadores moleculares KASP elegidos fueron utilizados para asignar el alelo de resistencia/susceptibilidad correspondiente a cada línea RIL, obteniendo de esta manera

la información genotípica que posteriormente fue asociada con la respuesta fenotípica (obtenida mediante inoculación) para crear el mapa genético.

El análisis de asociación entre la información genotípica (obtenida por marcadores KASP) y la información fenotípica (obtenida mediante inoculación) se realizó mediante el paquete estadístico R *qtl* (Broman *et al.*, 2003) mediante un análisis de QTL simple, para lo cual se utilizaron 988 marcadores SNP los que se encuentran distribuidos en los 11 cromosomas del frijol. La “GBS library” fue un trabajo desarrollado en los laboratorios de USDA/ARS Prosser (Miklas, comunicación personal) con la población RIL utilizada en este estudio. Con esta información, en el laboratorio de USDA/TARS (Mayagüez), John Hart realizó el análisis bioinformático para identificar y organizar los marcadores SNP, posteriormente Tim Porch generó el mapa de ligamiento necesario para la identificación de QTL (Porch, comunicación personal) usando JoinMap (Kyazma, Netherlands) con un LOD de 3.0 (Stam, 1993).

En este estudio el valor LOD (valor de significancia estadística) para la identificación de QTL fue de 3.0, asignado tomando como referencia estudios anteriores. Para los QTL identificados como significativos se realizó un análisis de intervalos utilizando el método EM (Expectation Maximization), de esta manera se verifica la ubicación del QTL sobre el cromosoma en el que se encuentra y el efecto que representa en la variación fenotípica de resistencia en la población RIL.

Tabla 6. Marcadores moleculares SNP-KASP disponibles para el análisis genético de la resistencia a mancha angular.

#	Assay ID	Posición física	Primer_Alelo FAM	Primer_Alelo HEX	Alelo FAM	Alelo HEX	Ligado a QTL/Gen
1	ALSChr04_GC_43800347	Pv04_43800347	CAAGTACTTTCGTCGTA ACGTTGTAG	CAAGTACTTTCGTCGTA ACGTTGTAC	R alelo = C (G5686)	S alelo = G (SPRITE)	<i>Phg-2</i>
2	ALSChr08_CT_57798588	Pv08_57798588	ATATTTTATTTGAAAGA TGGAAGTAGTGCC	ATATATTTTATTTGAAA GATGGAAGTAGTGCT	R alelo = T (G10474)	S alelo = C (SPRITE)	QTL ALS 4.1
3	MAS_ALS10a	Pv08_58726385	GAGGAGACACAGGAAG CACTGAT	AGGAGACACAGGAAGC ACTGAG	R alelo = G (Mexico 54)	S alelo = T (SPRITE)	QTL ALS 4.1
4	ALSChr09_CT_17294365	Pv09_17294365	ACTTACCAAGGATGCC TACTCC	AGACTTACCAAGGATGC CTTACTCT	R alelo = T (G5686)	S alelo = C (SPRITE)	QTL ALS 9.1
5	ALSChr09_CT_17299731	Pv09_17299731	ACACTTCCACAGTTTAC TGGTTCC	AATACACTTCCACAGTT TACTGGTTCT	R alelo = T (G5686)	S alelo = C (SPRITE)	QTL ALS 9.1
6	ALSChr09_TA_17203795	Pv09_17203795	GATGCTTCAAGCATGA TGTATTGGAAT	GATGCTTCAAGCATGAT GTATTGGA AAA	R alelo = A (G5686)	S alelo = T (SPRITE)	QTL ALS 9.1
7	MAS_ALS10b	Pv10_3801446	CAAGAGCAGCAGAATT CTGCAATCT	AAGAGCAGCAGAATTCT GCAATCG	R alelo = C (G5686)	S alelo = T (SPRITE)	QTL ALS 10.1
8	MAS_ALS10c	Pv10_37955117	AAAAGTAATGCAAGAT CAAAACATCATCAG	CAAAAGTAATGCAAGAT CAAAACATCATCAA	R alelo = T (G5686)	S alelo = C (SPRITE)	QTL ALS 10.1
9	MAS_ALS4b	Pv04_43794830	TTGTATGATTGTTGTTT GTGTGAACATGA	GTATGATTGTTGTTTGTG TGAACATGG	R alelo = C (G5686)	S alelo = T (SPRITE)	<i>Phg-2</i>
10	MAS_ALS5a	Pv05_38366776	AGATTCAACACCAAAG ACATTCAA ACTAA	CAACACCAAAGACATTC AAACTAG	R alelo = A (G5686)	S alelo = G (SPRITE)	QTL ALS 10.1
11	MAS_ALS5b	Pv05_38310848	TCTCCATATTCATTCAA ATGTCTAGT	CTTCTCCATATTCATTCA AATGTCTAGC	R alelo = C (G5686)	S alelo = T (SPRITE)	QTL ALS 10.1

Fuente: CIAT, B. Raatz, datos no publicados.

R alelo= Alelo de resistencia.

S alelo= Alelo de susceptibilidad.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis fenotípico de la resistencia a mancha angular

Durante el estudio fenotípico de la resistencia a los dos aislamientos de *P. griseola* el rango de temperatura alcanzada en los dos invernaderos en los que se realizó el estudio fue de 20 a 36°C con promedio de $26 \pm 3^\circ\text{C}$ y el rango de humedad ambiental (posterior a los tres días de humificación continua después de las inoculación) fue de 60 a 79% durante el día y 90-95% durante la noche. La temperatura y humedad fueron registradas con un sensor iButton® (Maxim Integrated™, USA) cada 15 minutos durante 15 días (desde la inoculación hasta la evaluación de cada aislamiento). Allorent y Savary (2005) mencionan diferentes límites en los rangos de temperatura para cada etapa de desarrollo de la enfermedad. Entre 10 y 33°C para la germinación de la espora y proceso de infección, entre 12 y 30°C para el desarrollo de la enfermedad y entre 10 y 30°C para la esporulación. En este estudio las inoculaciones se realizaron por la tarde (después de las 5 PM) favoreciendo el proceso de infección, ya que en este periodo de tiempo la temperatura era inferior a los 30°C. En días soleados se alcanzaba temperaturas de hasta 36°C por lapsos variados de tiempo, principalmente al medio día, lo que sobrepasa por 3°C la temperatura máxima indicada para el desarrollo de mancha angular. Sin embargo, durante la evaluación de severidad de mancha angular se observaron síntomas contundentes con abundante esporulación en los genotipos susceptibles y los genotipos testigos (resistentes y susceptibles) obtuvieron los niveles de severidad esperados, por lo que, aparentemente las temperaturas superiores a los 30°C-33°C durante periodos cortos no afectaron de manera significativa el desarrollo de la enfermedad. Es indudable que la presencia de alta humedad (proporcionada por humidificadores) durante el ensayo fue fundamental en el desarrollo la enfermedad. Adicionalmente la temperatura promedio

alcanzada en este estudio nos indica que la mayor parte del tiempo las condiciones del ambiente fueron favorables.

Al realizar análisis estadístico de la severidad de mancha angular (Diseño de bloques completos al azar) en Infostat, se observó diferencia estadística significativa para líneas en todos los ensayos de inoculación (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen del ADEVA para la severidad de dos aislamientos de mancha angular en cuatro grupos de líneas de frijol

Grupo de líneas de frijol	Aislamiento	Valor de P	Media	CV %
BASE 120	ALS 9029JD2	<0.0001	6.32	12.25
Líneas/variedades mejoradas		<0.0001	3.84	13.71
ADP		<0.0001	5.16	12.89
RIL RC		<0.0001	5.81	12.26
BASE 120	ALS 1146C	<0.0001	6.00	11.15
Líneas/variedades mejoradas		<0.0001	4.30	21.82
ADP		<0.0001	5.88	12.63
RIL RC		<0.0001	5.14	8.73

Las líneas de los tres primeros grupos de genotipos presentaron diferentes niveles de la enfermedad de severidad para los dos aislamientos, identificando un reducido número de líneas con resistencia a los dos aislamientos.

En el primer grupo de genotipos (ensayo BASE 120), al evaluar la severidad inducida por el aislamiento ALS 9029JD2 (raza 61:11) se identificaron sesenta líneas susceptibles (lecturas con promedios >6.0, cuatro líneas resistentes (lecturas con promedios \leq 3.0), cuarenta y dos líneas con resistencia intermedia (lecturas con promedios >3 y \leq 6 (Tabla 7). Catorce líneas del BASE 120 no germinaron. Con el aislamiento ALS 1146C (raza 63:51) cincuenta y cinco líneas fueron susceptibles, cuatro resistentes, cuarenta y ocho líneas con resistencia intermedia. Trece líneas no germinaron

(Tabla 8). Únicamente las líneas G21212 y SER 125 fueron resistentes a los dos aislamientos.

Tabla 8. Severidad observada en cada línea del ensayo BASE 120 causada por dos aislamientos de *Pseudocercospora griseola*.

Número de la entrada	Genotipo	Reacción promedio Aislamiento ALS 9029JD2		Reacción promedio Aislamiento ALS 1146C	
40	G21212	1.0 ^{A*}	R	1.3 ^{A*}	R
38	FBN 1203-31	2.0 ^A	R	3.8 ^{BC}	I
Control resistente	CAL 143	2.0 ^A	R	2.3 ^{AB}	R
99	SER 125	2.5 ^{AB}	R	3.0 ^B	R
109	SB2-170	3.0 ^{ABC}	R	---	---
71	PR 1418-15	4.0 ^{ABCD}	I	4.5 ^{CD}	I
108	TRAS-HT1	4.0 ^{ABCD}	I	3.0 ^B	R
111	TRAS-MST1	4.0 ^{ABCD}	I	5.0 ^D	I
39	FBN 1203-48	4.5 ^{CDE}	I	---	---
4	ALS 0532-6	4.6 ^{CDE}	I	---	---
1	Aifi Wuriti SS	5.0 ^{DE}	I	7.3 ^{FG}	S
7	B14302	5.0 ^{DE}	I	7.5 ^{FG}	S
9	B14311	5.0 ^{DE}	I	6.0 ^E	I
32	DEHORO	5.0 ^{DE}	I	6.0 ^E	I
45	ICTAZAM ML	5.0 ^{DE}	I	6.5 ^{EF}	S
58	NCB 280	5.0 ^{DE}	I	7.0 ^F	S
64	PR 1147-1	5.0 ^{DE}	I	5.5 ^{DE}	I
65	PR 1147-3	5.0 ^{DE}	I	6.5 ^{EF}	S
75	RCB 593	5.0 ^{DE}	I	---	---
84	SB 781	5.0 ^{DE}	I	4.0 ^C	I
90	SB 2-4	5.0 ^{DE}	I	7.0 ^F	S
93	SEF 17	5.0 ^{DE}	I	3.5 ^{BC}	I
94	SEF 71	5.0 ^{DE}	I	6.7 ^{EF}	S
101	SER 78	5.0 ^{DE}	I	7.0 ^F	S
102	SJC 730-79	5.0 ^{DE}	I	6.0 ^E	I
114	Tio Canela 75	5.0 ^{DE}	I	4.5 ^{CD}	I
116	VAX 6	5.0 ^{DE}	I	6.0 ^E	I
Control R intermedia	Badillo	5.0 ^{DE}	I	6.0 ^E	I
28	Carrizalito	5.5 ^{DEF}	I	4.0 ^C	I
88	SB-DT1	5.5 ^{DEF}	I	6.3 ^{EF}	S
6	B12724	6.0 ^{DEFG}	I	7.5 ^{FG}	S

14	BFS 29	6.0 ^{DEFG}	I	6.0 ^E	I
15	BFS 81	6.0 ^{DEFG}	I	6.7 ^{EF}	S
22	Bribri	6.0 ^{DEFG}	I	5.0 ^D	I
24	BRT 943-20	6.0 ^{DEFG}	I	6.0 ^E	I
30	Centa Pipil	6.0 ^{DEFG}	I	5.7 ^{DE}	I
46	IJR	6.0 ^{DEFG}	I	5.3 ^{DE}	I
51	Matambú	6.0 ^{DEFG}	I	6.0 ^E	I
54	MER 2212-28	6.0 ^{DEFG}	I	6.3 ^{EF}	S
57	MSU BNF Entry 86	6.0 ^{DEFG}	I	5.7 ^{DE}	I
91	SEF 15	6.0 ^{DEFG}	I	---	---
92	SEF 16	6.0 ^{DEFG}	I	---	---
98	SER 118	6.0 ^{DEFG}	I	---	---
103	SB2-46	6.0 ^{DEFG}	I	6.3 ^{EF}	S
105	SB2-105	6.0 ^{DEFG}	I	7.0 ^F	S
115	USRM 20	6.0 ^{DEFG}	I	6.5 ^{EF}	S
117	Verano	6.0 ^{DEFG}	I	6.4 ^{EF}	S
119	Zenith	6.0 ^{DEFG}	I	6.5 ^{EF}	S
5	Amadeus 77	6.5 ^{EFGH}	S	6.0 ^E	I
16	BSF 87	6.5 ^{EFGH}	S	4.3 ^{CD}	I
36	FBN 1203-43	6.5 ^{EFGH}	S	3.7 ^{BC}	I
96	SEQ 342-89	6.5 ^{EFGH}	S	7.7 ^{FG}	S
107	SXB 412	6.5 ^{EFGH}	S	6.5 ^{EF}	S
112	Tepary G40001	6.5 ^{EFGH}	S	5.8 ^{DE}	I
118	XRAV-40-4	6.5 ^{EFGH}	S	7.0 ^F	S
120	Zorro	6.5 ^{EFGH}	S	6.8 ^{EF}	S
3	ABL 74	7.0 ^{FGHI}	S	7.0 ^F	S
8	B14303	7.0 ^{FGHI}	S	7.2 ^{FG}	S
21	BK9-2	7.0 ^{FGHI}	S	6.5 ^{EF}	S
23	BRT 103-182	7.0 ^{FGHI}	S	6.0 ^E	I
35	DPC 40	7.0 ^{FGHI}	S	7.0 ^F	S
41	GN9-4	7.0 ^{FGHI}	S	7.0 ^F	S
43	ICA Pijao	7.0 ^{FGHI}	S	6.0 ^E	I
44	ICB 301-204	7.0 ^{FGHI}	S	5.7 ^{DE}	I
49	INTA Precoz	7.0 ^{FGHI}	S	5.7 ^{DE}	I
53	MEN 2201-64 ML	7.0 ^{FGHI}	S	7.0 ^F	S
55	MHN 322-49	7.0 ^{FGHI}	S	6.0 ^E	I
60	Pérola	7.0 ^{FGHI}	S	6.0 ^E	I
73	PR 9920-171	7.0 ^{FGHI}	S	6.3 ^{EF}	S
77	RRH 336-28	7.0 ^{FGHI}	S	---	---
83	SB 774	7.0 ^{FGHI}	S	5.7 ^{DE}	I
85	SB 787	7.0 ^{FGHI}	S	6.3 ^{EF}	S

86	SB 793	7.0 ^{FGHI}	S	7.0 ^F	S
87	SB 815	7.0 ^{FGHI}	S	6.0 ^E	I
95	SEQ 342-39	7.0 ^{FGHI}	S	7.0 ^F	S
97	SER 113	7.0 ^{FGHI}	S	5.5 ^{DE}	I
104	SB2-96	7.0 ^{FGHI}	S	6.3 ^{EF}	S
106	SXB 405	7.0 ^{FGHI}	S	6.0 ^E	I
110	TARS-LFR1	7.0 ^{FGHI}	S	7.0 ^F	S
10	BAT 477	7.5 ^{GHIJ}	S	7.2 ^{FG}	S
19	BIOF 2-106	7.5 ^{GHIJ}	S	6.3 ^{EF}	I
20	BIOF 4-70	7.5 ^{GHIJ}	S	4.0 ^C	I
26	Cardenal	7.5 ^{GHIJ}	S	4.5 ^{CD}	I
29	Cedrón	7.5 ^{GHIJ}	S	7.0 ^F	S
37	FBN 1203-47	7.5 ^{GHIJ}	S	6.5 ^{EF}	S
42	I9365-31	7.5 ^{GHIJ}	S	6.3 ^{EF}	S
66	PR 1147-6	7.5 ^{GHIJ}	S	7.0 ^F	S
67	PR 1147-8	7.5 ^{GHIJ}	S	6.0 ^E	I
69	PR 1217-1	7.5 ^{GHIJ}	S	6.3 ^{EF}	S
72	PR 1483-105	7.5 ^{GHIJ}	S	6.3 ^{EF}	S
76	Rosetta	7.5 ^{GHIJ}	S	7.7 ^{FG}	S
12	Beniquez	8.0 ^{HI}	S	7.7 ^{FG}	S
17	BFS 94	8.0 ^{HI}	S	6.0 ^E	I
18	BFS 95	8.0 ^{HI}	S	7.6 ^{FG}	S
27	Carioca	8.0 ^{HI}	S	5.0 ^D	I
34	DOR 390	8.0 ^{HI}	S	6.3 ^{EF}	S
47	INB 835	8.0 ^{HI}	S	6.3 ^{EF}	S
50	Jamapa	8.0 ^{HI}	S	7.3 ^{FG}	S
52	Matterhorn	8.0 ^{HI}	S	6.5 ^{EF}	S
56	Morales	8.0 ^{HI}	S	6.3 ^{EF}	S
62	PR 0443-151	8.0 ^{HI}	S	4.3 ^{CD}	I
63	PR 0806-81	8.0 ^{HI}	S	6.3 ^{EF}	S
68	PR 1165-3	8.0 ^{HI}	S	5.0 ^D	I
70	PR 1217-6	8.0 ^{HI}	S	7.0 ^F	S
78	Sayaxché ML	8.0 ^{HI}	S	8.0 ^G	S
82	SB 770	8.0 ^{HI}	S	6.7 ^{EF}	S
89	SEF 10	8.0 ^{HI}	S	3.0 ^B	R
Control susceptible	PAN 72	8.0 ^{HI}	S	7.0 ^F	S
100	SER 16	9.0 ^I	S	4.0 ^C	I
2	ABL 213	---	---	5.0 ^D	I
11	BAT 881	---	---	7.7 ^{FG}	S
13	BFS 139	---	---	7.3 ^{FG}	S
25	CALIMA	---	---	6.0 ^E	I

59	Paraisito	---	---	6.7 ^{EF}	S
79	SB 747	---	---	7.0 ^F	S
80	SB 754	---	---	5.7 ^{DE}	I
81	SB 761	---	---	6.0 ^{EF}	I
113	TARS Tep-22	---	---	6.3 ^{EF}	S

R= Resistente, I= Resistencia intermedia, S= Susceptible, según escala de Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987.

*Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En el segundo grupo de genotipos, es decir, las líneas y variedades de frijol desarrolladas por diversos programas de mejoramiento para resistencia a mancha angular, al evaluar el aislamiento ALS 9029JD2 se identificaron quince líneas resistentes, once líneas con resistencia intermedia y ocho susceptibles. Con el aislamiento ALS 1146C se identificaron quince líneas resistentes, trece líneas con resistencia intermedia y seis susceptibles. Finalmente se identificaron doce líneas con resistencia a los dos aislamientos de mancha angular. Ouro Negro, INIAP 484-Centenario, INIAP-483 Intag, AND 277, PR 0637-6, PR 1530-57, ALS 0546-78, ALS 0532-6, ALS 0531-41, ALS 0531-97, ALS 0546-60, ALS NIL 604-29 (Tabla 9).

Con respecto a los resultados obtenidos en el tercer grupo de genotipos que corresponde al Panel de Diversidad Andino (ADP), al evaluar el aislamiento ALS 9029JD2 se identificaron diez líneas resistentes, cinco líneas con resistencia intermedia y once susceptibles; dos líneas no germinaron. Con el aislamiento ALS 1146C se identificaron cuatro líneas resistentes, siete líneas con resistencia intermedia y doce susceptibles; cinco líneas no germinaron. Finalmente se identificaron dos líneas con resistencia a los dos aislamientos de mancha angular CAL 143 y AFR 612 (Tabla 10).

Tabla 9. Severidad ocasionada por dos aislamientos de *Pseudocercospora griseola* en 34 líneas/variedades desarrolladas en diferentes programas de mejoramiento.

Número de la entrada	Genotipo	Reacción promedio Aislamiento ALS 9029JD2		Reacción promedio Aislamiento ALS 1146C	
3	INIAP-483 Intag	1.0 ^{A*}	R	2.0 ^{ABC*}	R
28	ALS 0531-41	1.0 ^A	R	1.7 ^{AB}	R
32	ALS 0532-4	1.0 ^A	R	4.0 ^{DEFG}	I
5	AND 277	1.3 ^{AB}	R	2.0 ^{ABC}	R
30	ALS 0531-97	1.3 ^{AB}	R	3.0 ^{BCDE}	R
Testigo resistente	CAL 143	1.3 ^{AB}	R	3.0 ^{BCDE}	R
2	INIAP 484-Centenario	1.5 ^{AB}	R	2.0 ^{ABC}	R
26	ALS 0532-6	1.5 ^{AB}	R	2.0 ^{ABC}	R
6	PR 0637-6	1.7 ^{AB}	R	2.0 ^{ABC}	R
25	ALS 0546-78	1.7 ^{AB}	R	2.0 ^{ABC}	R
34	ALS NIL 604-29	1.7 ^{AB}	R	3.0 ^{BCDE}	R
1	Ouro Negro	2.0 ^{ABC}	R	1.0 ^A	R
27	ALS 0546-97	2.0 ^{ABC}	R	5.0 ^{FGH}	I
29	ALS 0532-38	2.0 ^{ABC}	R	---	---
31	ALS 0546-60	2.5 ^{BCD}	R	**5.0 ^{FGH}	R
18	PR 1530-57	3.0 ^{CDE}	R	**6.0 ^{HIJK}	R
17	PR 1530-54	3.1 ^{CDE}	I	5.0 ^{FGH}	I
19	PR 1530-60	3.8 ^{DEF}	I	6.0 ^{HIJK}	I
8	PR 0633-1	4.0 ^{DEF}	I	4.0 ^{DEFG}	I
12	PR 1530-31	4.0 ^{DEF}	I	4.5 ^{EFGH}	I
22	PR 1486-52	4.3 ^{EFG}	I	5.0 ^{FGH}	I
4	PR 0633-4	5.0 ^{GH}	I	7.0 ^{JK}	S
7	PR 0637-116	5.0 ^{GH}	I	6.0 ^{HIJK}	I
Testigo resistente	G 067727	**5.0 ^{GH}	R	---	---
11	PR 1530-31	5.3 ^{GH}	I	6 ^{HIJK}	I
10	PR 1530-29	5.5 ^{GHI}	I	**6.0 ^{HIJK}	R
20	PR 1486-10	6.0 ^{IJ}	I	5.0 ^{FGH}	I
24	PR 1846-74	6.0 ^{IJ}	I	7.0 ^{JK}	S
13	PR 1530-38	6.3 ^{IJ}	S	6.3 ^{IJK}	S
15	PR 1530-48	6.3 ^{IJ}	S	8.0 ^K	S
Testigo susceptible	PAN 72	6.3 ^{IJ}	S	7.0 ^{JK}	S
33	ALS 0526-35	6.5 ^{JKL}	S	2.0 ^{ABC}	R
14	PR 1530-47	6.7 ^{JKL}	S	6.0 ^{HIJK}	I
16	PR 1530-52	6.7 ^{JKL}	S	6.3	S

9	PR 1530-1	6.8 ^{JKL}	S	2.0 ^{ABC}	R
21	PR 1486-35	7.0 ^{KL}	S	7.0 ^{JK}	S
23	PR 1846-71	7.3 ^{KL}	S	4.8 ^{EFGH}	I

**Líneas/variedades con lesiones de mancha angular, pero sin esporulación, por lo que según la escala utilizada son consideradas como resistentes.

R= Resistente, I= Resistencia intermedia, S= Susceptible, según escala de Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987.

*Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla 10. Severidad inducida por dos aislamientos de *P. griseola* en 27 genotipos del Panel de Diversidad Andino.

ADP #	Genotype	Reacción promedio Aislamiento ALS 9029JD2		Reacción promedio Aislamiento ALS 1146C	
		Mediana	Reacción	Mediana	Reacción
127	SELIAN 06	1.0 ^{A*}	R	6.0 ^{DE*}	I
551	AFR 612	1.0 ^A	R	1.3 ^A	R
556	BRB194	1.0 ^A	R	---	---
716	SUGAR 131	1.0 ^A	R	4.0 ^C	I
526	CAL 143	2.0 ^{AB}	R	2.0 ^{AB}	R
724	INTER LAB 04	2.0 ^{AB}	R	---	---
731	BILFA UYOLE	2.0 ^{AB}	R	8.0 ^{EF}	S
737	KG 27-8	2.3 ^B	R	3.5 ^{BC}	I
48	W6 16534	3.0 ^B	R	---	---
97	Bilfa 4	5.0 ^C	I	5.0 ^{CD}	I
736	KG 15-26	5.3	I	4.0 ^C	I
447	INIAP 414	6.0 ^{CDE}	I	7.0 ^{EF}	S
449	INIAP 420	6.0 ^{CDE}	I	7.0 ^{EF}	S
740	CIM-RM05-ALS-82	6.0 ^{CDE}	I	6.0 ^{DE}	I
41	MRONDO	6.7 ^{DEF}	S	7.5 ^{EF}	S
590	SEQ11	6.7 ^{DEF}	S	8.0 ^F	S
96	Rojo	7.0 ^{EFG}	S	6.6 ^{DEF}	S
111	Uyole 98	7.0 ^{EFG}	S	7.0 ^{EF}	S
722	KAB 06 F2.8-144	7.0 ^{EFG}	S	7.0 ^{EF}	S
Control susceptible	PAN 72	7.0 ^{EFG}	S	7.0 ^{EF}	S
126	SELIAN 05	7.3 ^{FG}	S	7.3	S
472	PI527537-B	7.3 ^{FG}	S	8.0 ^F	S
728	GCI -LRK-291-RAR	7.0 ^G	S	6.5 ^{DEF}	S
40	KATWELA	8.0	S	8.0 ^F	S
439	754-3	8.0 ^G	S	7.5 ^{EF}	S

461	PI527540-A	8.0 ^G	S	---	---
517	Carioca, Kibala	8.0 ^G	S	6.0 ^{DE}	I
462	PI527540-B	---	---	1.0 ^A	R

R= Resistente, I= Resistencia intermedia, S= Susceptible, según escala de Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987.

*Medias con letras distintas son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En resumen se identificaron 16 líneas de frijol resistentes (lecturas promedios ≤ 3.0) a los dos aislamientos de *P. griseola* de un total de 183 genotipos evaluados. Estos resultados demuestran la vulnerabilidad genética de la gran mayoría de las líneas de frijol a esta enfermedad, lo que ya se ha mencionado anteriormente por varios autores como Singh y Schwartz (2010), Abadio (2012), Damasceno (2008), Mahuku (2003), entre otros. Entre las 16 líneas identificadas como resistentes trece (con excepción de las líneas AND 277 y Ouro Negro) pertenecen al grupo de líneas/variedades de frijol desarrolladas en programas de fitomejoramiento de Honduras (EPZ), Puerto Rico (UPRM, USDA-TARS) y Ecuador (INIAP), por lo que, se cuenta con fuentes de resistencia tanto de origen Andino como Mesoamericano. Algunas de estas líneas poseen resistencia a otras enfermedades de importancia económica.

Según Mahuku *et al.* (2003) debido a la alta variabilidad de *P. griseola*, el mejoramiento para una resistencia efectiva y duradera a mancha angular implica la introducción de genes resistencia de origen Andino y Mesoamericano. Por lo que, los 16 genotipos identificados como resistentes en este estudio pueden ser incluidos como fuentes de resistencia en programa de fitomejoramiento. Sin embargo, es importante mencionar que estos materiales fueron evaluados con dos aislamientos de *P. griseola* (razas 61:11 y 63:51) y a pesar de que son razas virulentas, es necesario que sean expuestos a las razas del patógeno donde el fitomejorador pretende trabajar para evaluar su comportamiento y garantizar una resistencia efectiva. Por lo mencionado, es muy importante recordar que la información acerca de la variabilidad patogénica de *P.*

griseola, no sólo es útil para conocer la distribución y frecuencia de patotipos (razas), sino también para ayudar a la selección de los mejores genotipos para diferentes regiones geográficas.

Otro aspecto importante a tomar en cuenta con relación a los genotipos considerados como resistentes en este estudio, es que, es necesario conocer la herencia de la resistencia presente en estos genotipos, ya que, se ha reportado en diferentes estudios herencia cuantitativa y cualitativa de la resistencia genética a mancha angular (Keller *et al.*, 2015, Oblessuc *et al.*, 2012). De esta manera se podrá optimizar la selección de plantas resistentes durante el proceso de fitomejoramiento.

Según Pereira *et al.* (2015) las líneas de frijol AND 277, Ouro Negro y CAL 143, incluidas en este estudio, son fuentes de resistencia reconocidas, aunque no presentan resistencia a todos los aislamientos de *P. griseola* evaluados. Estas tres líneas fueron resistentes a las dos razas de *P. griseola* (61:11 y 63:51) inoculadas y según Souza *et al.* (2016) estas líneas poseen los genes de resistencia *Phg 1*, *Phg 3* y *Phg 5* respectivamente, por lo que estos genes se consideran efectivos para controlar las dos razas de *P. griseola* evaluadas en este estudio.

Adicionalmente es importante e imprescindible continuar con la evaluación e identificación de nuevas fuentes de resistencia con la finalidad de ampliar la base genética de la resistencia a esta enfermedad, con el fin de contrarrestar la gran variabilidad patogénica que se ha identificado en *P. griseola*.

Análisis genético de la resistencia a mancha angular

Comparación de resultados y selección de marcadores KASP

Al comparar los resultados obtenidos con los 11 marcadores KASP en este estudio con los obtenidos por Raatz Bodo en las líneas México 54, G5686, Sprite, AND 277, G40001 y G10474 se observa que coinciden a excepción de dos casos. El primer caso que no coincide es con el marcador MAS_ALS10b y el genotipo AND 277 y el segundo caso que no coincide es con el marcador MAS_ALS10a y el genotipo México 54 (Tabla 11). Al identificar que el nucleótido observado en México 54 con el marcador MAS_ALS10a fue diferente al reportado por Bodo Raatz y siendo este genotipo testigo de este marcador, se utilizó el cultivar G40001 para sustituirlo como testigo. Es importante mencionar que los dos genotipos testigos para cada marcador molecular KASP se encuentran disponibles en la Tabla 84.

Los marcadores KASP seleccionados para ser usados en el análisis genético de la población RIL RC fueron ALSChr04_GC_43800347, MAS_ALS5a, MAS_ALS5b, MAS_ALS10a y MAS_ALS10b, ya que resultaron ser polimórficos para los dos progenitores, Rojo y CAL 143 (Tabla 11).

A continuación los cinco marcadores seleccionados fueron evaluados en la población RIL RC, sin embargo, con los marcadores MAS_ALS5b y MAS_ALS10a, no se obtuvieron resultados. Al momento de realizar la evaluación del marcador MAS_ALS5b con el sistema de PCR-Cuantitativa no se evidenció poliformismo para las líneas de la población RIL, mientras que el marcador MAS_ALS10a no fue posicionado dentro del mapa de ligamiento desarrollado para este estudio. Por lo que, el análisis

genotípico de la población RIL se lo realizó con los tres marcadores restantes, ALSChr04_GC_43800347, MAS_ALS5a y MAS_ALS10b.

Tabla 11. SNP relacionado a cada marcador genético KASP de mancha angular en 29 líneas/variedades de frijol.

ID Marcador	MAS_ALS4b	ALSChr04_GC_43800347	MAS_ALS5a	MAS_ALS5b	ALSChr08_CT_57798588	MAS_ALS10a	ALSChr09_TA_17203795	ALSChr09_CT_17294365	ALSChr09_CT_17299731	MAS_ALS10b	MAS_ALS10c
Rojo	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
CAL 143	T:T	C:C	G:G	C:C	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
Sprite*	T:T	G:G	G:G	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
G40001*	T:T	?	G:G	T:T	C:C	G:G	T:T	?	C:C	A:A	C:C
G10474*	?	G:G	A:A	T:T	T:T	G:G	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
AND 227*	C:C	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
G5686*	C:C	C:C	A:A	C:C	C:C	T:T	A:A	T:T	T:T	C:C	T:T
MEX 54*	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
						G:G**					
Don Timoteo	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
G11796	T:T	G:G	G:G	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
Bolón Bayo	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
Montcalm	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
Amendoin	T:T	G:G	G:G	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
PAN 72	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
G2858	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
Flor de Mayo	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
BAT 332	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
Cornell 49242	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
Ouro negro	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
INIAP 484-Centenario	T:T	G:G	G:G	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
INIAP-483 Intag	T:T	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
G 067727	C:C	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	T:T	C:C	C:C	A:A	C:C
ALS 0546 - 78	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
ALS 0532 - 6	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
ALS 0546 - 97	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
ALS 0531 - 41	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
ALS 0532 - 38	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
ALS 0531 - 97	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C
ALS 0546 - 60	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C	G:G	T:T	C:C	C:C	C:C	C:C

*Lineas evaluadas anteriormente por Raatz Bodo – CIAT (datos no publicados)

**Nucleotido reportado por Raatz Bodo – CIAT (datos no publicados)

Durante el análisis de asociación los tres marcadores KASP ALSChr04_GC_43800347, MAS_ALS5a y MAS_ALS10b, fueron ubicados en el mapa de ligamiento en los cromosomas Pv04 (Figura 1), Pv05 (Figura 2) y Pv10 (Figura 3).

Figura 1. Ubicación del marcador molecular KASP ALSChr04_GC_43800347 en el cromosoma Pv04 de frijol.

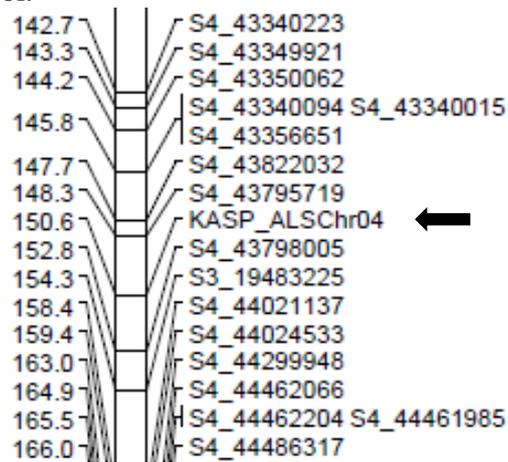


Figura 2. Ubicación del marcador molecular KASP MAS_ALS5a en el cromosoma Pv05 de frijol

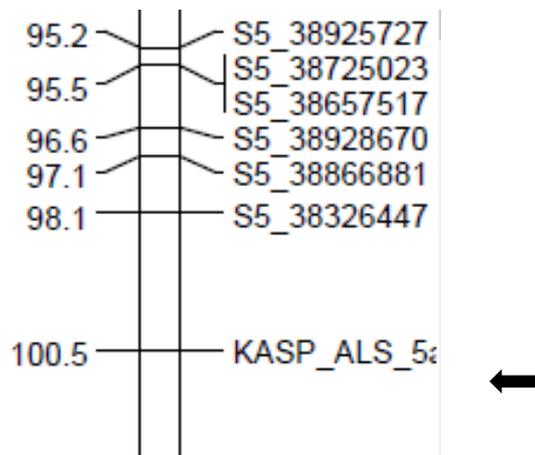
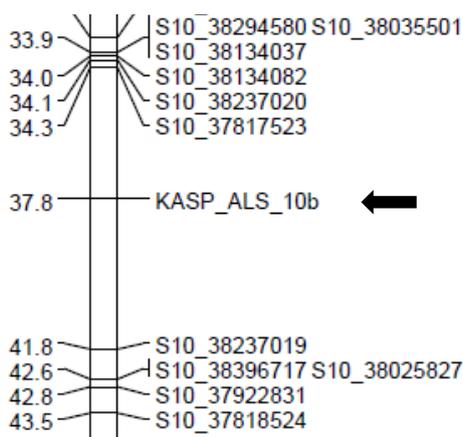


Figura 3. Ubicación del marcador molecular KASP MAS_ALS10b en el cromosoma Pv10 de frijol.



Con estos tres marcadores moleculares KASP, el sistema PCR Real Time separó automáticamente a las líneas RILS en tres grupos, homocigotos dominantes, homocigotos recesivos y heterocigotos. Las líneas identificadas como heterocigotas con cada marcador molecular KASP fueron muy escasas (Tabla 12). De esta manera se obtuvo la información genotípica que posteriormente fue asociada a la respuesta fenotípica a mancha angular (Tabla 12) con el fin de identificar QTL de resistencia.

Tabla 12. Información genotípica y fenotípica obtenida en la población RIL RC (Rojo x Cal 143) a partir de tres marcadores KASP-SNP y dos aislamientos de mancha angular

#	ID RIL	Marcadores moleculares KASP-SNP			Reacción a mancha angular	
		KASP_ALSC hr04_GC_ 43800347	KASP_ALS_ 10a	KASP_ALS _5a	ALS 9029JD2	ALS 1146C
1	RC-100	B	B	A	...	7.3
2	RC-101	A	B	A
3	RC-102	B	B	B	5.3	7.5
4	RC-103	A	B	B	...	6.7
5	RC-104	A	B	A	...	4.5
6	RC-105	B	B	A	4	...
7	RC-106	B	B	B
8	RC-107	B	A	A	...	6.5
9	RC-108	A	A	B	6.7	...
10	RC-109	B	A	A	7	7.0
11	RC-10	A	A	A

12	RC-110	A	B	B	...	3.0
13	RC-111	A	A	B	4	6.6
14	RC-112	Ambos	B	A	6	5.0
15	RC-113	A	B	B	...	6.3
16	RC-114	A	A	B	2	2.0
17	RC-115	A	B	B	7	5.6
18	RC-116	B	A	A	7.0	7.6
19	RC-117	B	A	A	...	7.5
20	RC-118	A	A	B	...	7.6
21	RC-119	A	B	B	6.5	...
22	RC-11	B	B	A	7	3.0
23	RC-120	A	A	A	7	4.0
24	RC-121	A	A	B	6	3.0
25	RC-122	B	B	A	...	7.0
26	RC-123	Ambos	A	B	5.5	6.0
27	RC-124	Ambos	B	B	6	6.5
28	RC-125	A	A	A	...	2.0
29	RC-126	A	B	A	5	6.6
30	RC-127	B	B	B	4	6.0
31	RC-128	A	B	A
32	RC-129	B	A	B	4.6	6.0
33	RC-12	A	A	A	...	6.8
34	RC-130	A	A	A	...	4.3
35	RC-131	A	B	A	6.5	6.5
36	RC-132	B	A	A	2.7	1.0
37	RC-133	A	A	A	5	5.0
38	RC-134	A	A	B	...	6.0
39	RC-135	B	A	A	6	4.5
40	RC-136	A	B	B
41	RC-137	B	A	B	6.5	3.7
42	RC-138	B	A	B	...	1.3
43	RC-139	B	B	A	...	6.0
44	RC-13	A	B	A	3	1.7
45	RC-140
46	RC-141	A	A	B	6.6	...
47	RC-142	7	3.5
48	RC-143	B	A	A	6	5.6
49	RC-144	A	B	A	...	6.0
50	RC-145	B	B	A	6	5.0
51	RC-146	A	A	A	...	2.0
52	RC-147	A	A	A	5	6.5
53	RC-148	B	B	B	...	7.0

54	RC-149	B	B	B
55	RC-14	B	A	A	...	3.0
56	RC-150	B	B	B
57	RC-151	A	B	B	...	6.0
58	RC-152	A	A	B	6.25	6.0
59	RC-153	A	B	B	6	3.0
60	RC-154	A	A	B	7	5.5
61	RC-155	A	A	B	6.5	6.5
62	RC-156	A	B	A
63	RC-157	A	B	A	6	1.7
64	RC-158	B	A	B	...	6.5
65	RC-159	B	B	B	7	7
66	RC-15	B	B	A	6.7	3.0
67	RC-16	B	B	A	7	...
68	RC-17	B	B	A	4.5	2.0
69	RC-18	B	B	A	3	2.3
70	RC-19	B	B	A	6.3	5.0
71	RC-1	A	A	A	...	6.0
72	RC-20	B	B	A	5.7	6.0
73	RC-21	B	A	A	7	6.3
74	RC-22	A	B	A	3.7	2.0
75	RC-23	A	A	A	4	3.7
76	RC-24	Ambos	B	A	6.5	3.0
77	RC-25	B	B	A	7.3	3.0
78	RC-26	A	B	A	5.5	1.5
79	RC-27
80	RC-28	A	B	A
81	RC-29	A	A	A	6	...
82	RC-2	B	A	A	7	2.5
83	RC-30	A	B	A	5	2.0
84	RC-31	A	A	A	4.5	6.5
85	RC-32	A	A	A	3	...
86	RC-33	B	A	A	4.3	5.7
87	RC-34	A	B	A	3	4.0
88	RC-35	A	A	A	7	7.0
89	RC-36	B	A	A	7	3.0
90	RC-37	A	A	A		4.0
91	RC-38	A	A	A	7	6.8
92	RC-39	A	B	A	...	2.0
93	RC-3	A	B	A
94	RC-40	A	A	A	6.6	2.0
95	RC-41	A	A	A		3.0

96	RC-42	B	B	A	6	5.8
97	RC-43	B	A	A
98	RC-44	A	A	A
99	RC-45	A	A	A	6.3	6.6
100	RC-46	A	A	A	6.7	...
101	RC-47	B	B	A	5.5	6.3
102	RC-48	B	B	A	5	5.7
103	RC-9	B	B	A
104	RC-51	B	B	A	5	5.5
105	RC-52	B	B	A	...	6.0
106	RC-55	A	B	A
107	RC-56	A	A	A	7	6.6
108	RC-59	A	B	A	...	4.0
109	RC-5	A	B	A	6	6.5
110	RC-60	B	B	A	...	5.0
111	RC-61	B	A	A	6.5	5.0
112	RC-62	A	A	A	6.5	4.3
113	RC-63	B	B	A	...	6.0
114	RC-64	A	B	A
115	RC-65	B	B	A	6.5	6.0
116	RC-66	B	B	A	6.5	5.0
117	RC-68	A	B	A	7	7.0
118	RC-69	A	B	A	7	6.0
119	RC-70	B	B	A	6.3	7.0
120	RC-73	A	B	A	...	6.7
121	RC-74	A	B	A	7.3	7.5
122	RC-75	B	B	A	7	6.6
123	RC-76	A	B	A	7	3.0
124	RC-78	B	B	A	6	6.5
125	RC-79	A	A	A	6.5	6.5
126	RC-80	B	B	A	7	7.3
127	RC-81	B	B	A	7	6.3
128	RC-82	B	A	A	3	7.5
129	RC-83	B	B	B
130	RC-84	A	A	B	6.3	5.3
131	RC-85	A	A	A	...	5.0
132	RC-86	B	B	A	...	2.0
133	RC-87	Ambos	A	Ambos	7	6.5
134	RC-88	A	A	A	7	7.3
135	RC-89	A	B	B	7	3.0
136	RC-8	B	B	A	6.3	8.0
137	RC-90	B	B	B	7	...

138	RC-91	B	B	A	6.5	7.0
139	RC-92	B	A	A	2	1.0
140	RC-93	A	B	Ambos	6.6	6.6
141	RC-94	B	B	B	...	4.0
142	RC-95	B	B	B	...	8.0
143	RC-96	A	B	A	3.5	6.5
144	RC-97	B	B	A	...	7.3
145	RC-98	A	B	B	7	6.5
146	RC-99	A	A	B	5	6.0
147	RC-9
	Rojo				7	6.6
	CAL 143				2	2

A y B = Letras asignadas por sistema PCR para diferenciar líneas (de la población RIL) homocigotas dominantes de las homocigotas recesivas.

Ambos = Líneas clasificadas como heterocigotas

Mapeo de QTL

La información genotípica de la población RIL se obtuvo a partir de 143 líneas del total y la información fenotípica se obtuvo a partir de 93 líneas para el aislamiento ALS 1146C y de 119 líneas para el aislamiento ALS 9029JD2.

Durante las diferentes inoculaciones de las líneas RIL se perdieron una gran cantidad de plantas (obteniendo datos solamente de una repetición para algunas líneas), debido a que la semilla de varias líneas no germinaron o presentaron síntomas severos de *Macrophomina phaseolina*. Según Abawi y Pastor Corrales (1990) *M. phaseolina* es un hongo fitopatógeno que se desarrolla y produce síntomas severos a temperaturas de 30°C o superiores. Las condiciones de temperatura y humedad obtenidas en los invernaderos en los que se realizó este estudio de mancha angular fueron idóneas también para *M. phaseolina*, por lo que se perdió una gran cantidad de plantas. Se presume que el inoculo

primario de este hongo fue de semilla infectada, ya que se descartaron otras fuentes de contaminación como sustrato, macetas o el mismo invernadero.

Al inicio del estudio se planteó que los niveles de severidad observados en la población RIL sean convertidos a medias de mínimos cuadrados (LSM, siglas en inglés), sin embargo, debido al problema con *M. phaseolina* que se presentó en el invernadero, el número total de líneas con datos de LSM fue mucho menor para los dos aislamientos. Para el aislamiento ALS 1146C se obtuvo LSM de 44 líneas y para el aislamiento ALS 9029JD2 se obtuvo LSM de 94 líneas (Anexo 1), por lo que se decidió trabajar con las medias obtenidos directamente de la evaluación realizada.

Previamente a la obtención de las LSM se realizó, en el software estadístico “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1®), el Análisis de Varianza con los datos de severidad observados con los dos aislamientos de mancha angular mediante un Modelo Lineal general, obteniendo diferencia estadística significativa entre las líneas de la población RIL con un nivel de probabilidad de $p < 0.05$. (Tabla 7).

De igual manera se realizó la prueba de normalidad con los datos de severidad utilizando el Software estadístico Minitab® versión 15.1.20.0, utilizando la prueba de Ryan-Joiner (Similar a la prueba de Shapiro-Wilk). Los datos del aislamiento ALS 1146C no se consideran normales, lo que puede ser consecuencia de la pérdida de datos debido a la muerte de plantas ocasionado por *M. phaseolina*.

Con respecto a la evaluación fenotípica, los niveles de severidad de mancha angular (escala 1 a 9) dentro de la población RIL fueron desde 2 hasta 7.3 para el aislamiento ALS 1146C (Figura 4) y de 1 hasta 8 para el aislamiento de ALS 9029JD2 (Figura 5). El promedio de severidad observado para el parental CAL 143 fue de 2 para para los dos aislamientos ALS 1146C y ALS 9029JD2. El promedio de severidad

observado para el parental Rojo fue de 7 para el aislamiento ALS 9029JD2 y 6.6 para el aislamiento ALS 1146C (Figuras 4 y 5).

Figura 4. Distribución de la severidad observada en la población RIL RC ocasionada por el aislamiento de mancha angular ALS 1146C

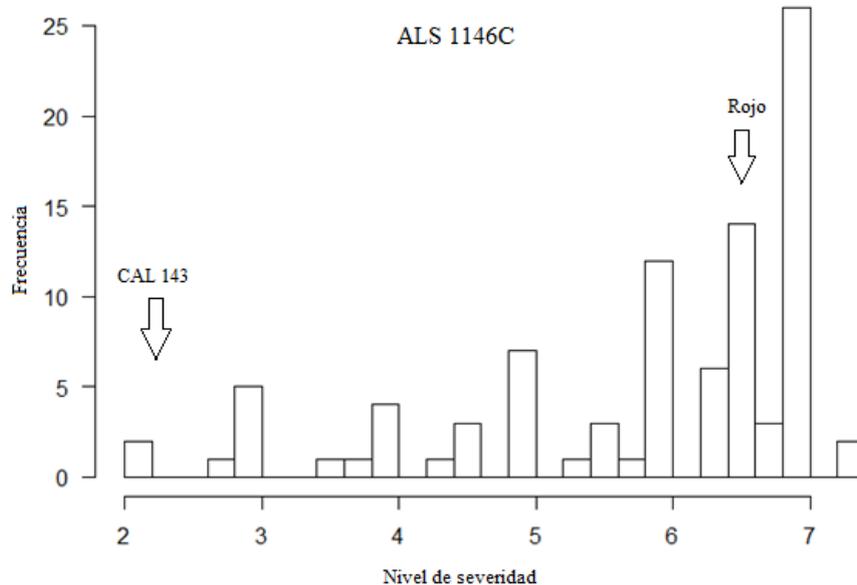
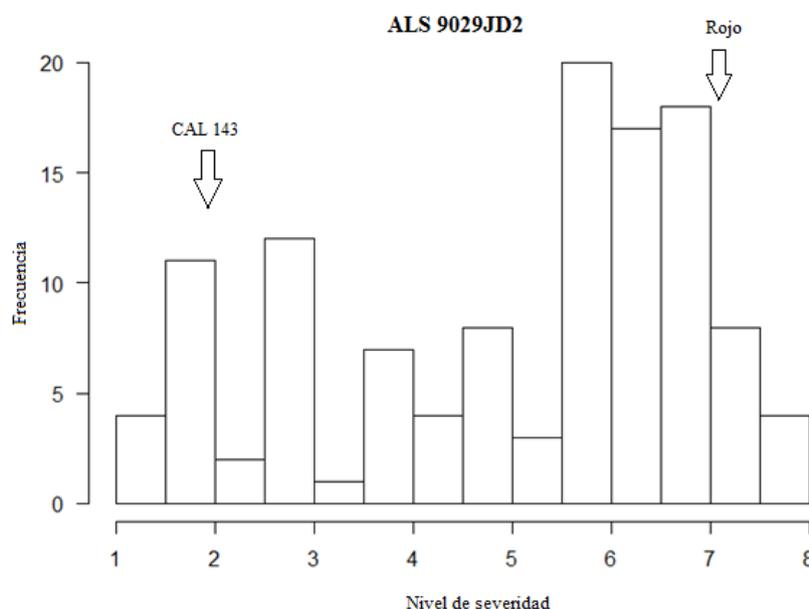


Figura 5. Distribución de la severidad observada en la población RIL RC ocasionada por el aislamiento de mancha angular ALS 9029JD2



El análisis de QTL simple usando el método EM (Expectation Maximization) revelaron en total tres QTL, uno de ellos fue en el cromosoma Pv02, identificado con el aislamiento ALS 1146C (Raza 63:51) (Figura 6) y los dos QTL restantes en los

cromosomas Pv05 y Pv11 fueron identificados con el aislamiento ALS 9029JD2 (Raza 61:11) (Figura 7).

Figura 6. QTL identificado con los datos de severidad del aislamiento ALS 1146C mediante el uso de R *qtl* con el método EM

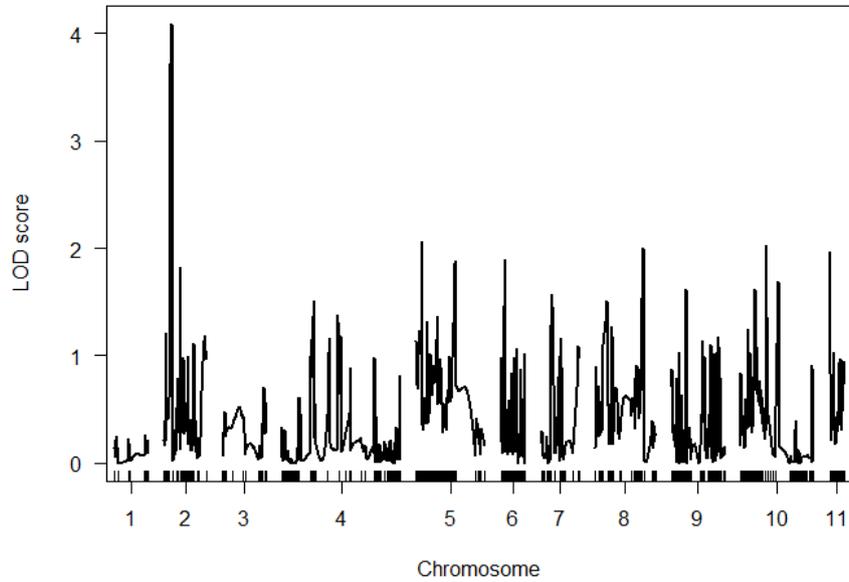
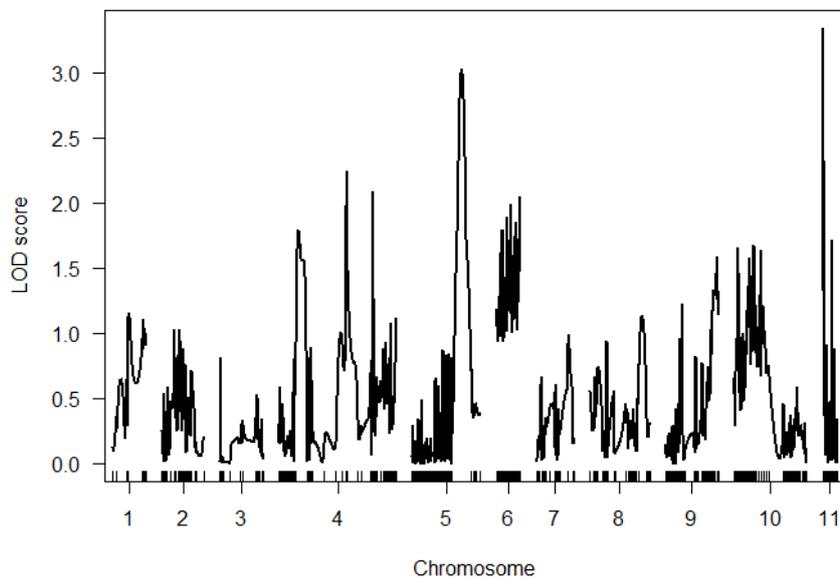


Figura 7. QTL identificados con los datos de severidad del aislamiento ALS 9029JD2 mediante el uso de R *qtl* con el método EM



Posteriormente se realizó el mapeo de intervalos en estos tres QTLs, con lo que se obtuvo la ubicación y el efecto que tiene cada QTL con respecto a la variación fenotípica de la resistencia a mancha angular presente en esta población (Tabla 13).

Tabla 13. Ubicación y el valor de LOD de los QTL identificados con los aislamientos ALS 1146C (Raza 63:51) y ALS 9029JD2 (Raza 61:11) de mancha angular.

Raza	Cromosoma	QTL	Posición	LOD
63:51	Pv02	ALS2 ^{RC}	3287508 pb	4.1
61:11	Pv05	ALS5 ^{RC}	40259584 pb	3.0
61:11	Pv11	ALS11 ^{RC}	390213 bp	3.3

Con respecto al QTL ALS2^{RC} ubicado a 3,287,508 pb en el cromosoma Pv02, esta es la primera vez que se reporta un QTL en esta parte del cromosoma Pv02. Oblessuc *et al.* (2012) reportó la presencia de un QTL en este cromosoma (ALS2.1^{UC}), sin embargo, es una ubicación diferente a la reportada en este estudio, por lo que se asume que el QTL identificado en este estudio es diferente al identificado por Oblessuc *et al.* (2012).

El QTL ALS11^{RC} ubicado a 390,213 bp en el cromosoma Pv11, posiblemente es identificado por primera en esta parte del cromosoma. Queiroz *et al.* (2004) identificó un QTL en el cromosoma Pv11 ubicado a 48.5 Mpb (Raatz *et al.*, 2015). De igual manera Bassi *et al.* (2017) identificó el QTL ALS11^{AS}, en la parte final de este cromosoma, sin embargo, utilizó marcadores moleculares distintos al de este estudio, por lo que no se puede observar su ubicación exacta. Por lo mencionado se asume que el QTL ALS11^{RC} identificado en este estudio es diferente al identificado por Queiroz *et al.* (2004) y Bassi *et al.* (2017).

En el estudio de Perseguini *et al.* (2016), se identificaron varios marcadores moleculares ligados a resistencia para antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y mancha angular. Teniendo en cuenta tanto a la antracnosis como a la mancha angular, en

los cromosomas Pv03 y Pv11 se identificaron el mayor número de loci (nueve) implicados en la respuesta inmune a ambas enfermedades. Adicionalmente este autor menciona que los telómeros en los cromosomas Pv06, Pv07 y Pv11 (entre 2,7 Mb y 5,5 Mpb) parecen estar enriquecidos por loci asociados para resistencia a ambas enfermedades. Tomando en cuenta el estudio de Perseguini *et al.* (2016), existe la posibilidad de encontrar el QTL ALS11^{RC} en el cromosoma Pv11 en la ubicación que se presenta en este estudio.

Con respecto al QTL ALS 5^{RC} identificado a 40,259,584 pb en el cromosoma Pv05, estudios anteriores ya han identificado QTL cercanos a la ubicación del QTL identificado en este estudio. En el cromosoma Pv05 Oblessuc *et al.* (2012) identificó dos QTL ALS5.1^{UC} y ALS5.2^{UC} ubicados a 25 Mpb y 38.1 Mpb respectivamente (Raatz *et al.*, 2015). Bassi *et al.*, (2017) identificó el QTL ALS5^{AS} cerca de la región del QTL ALS5.2^{UC}. De la misma forma Keller *et al.* (2015) identificó el QTL ALS5.1^{GS} ubicado a 38.3 Mpb.

Si se comparan los resultados del trabajo de Oblessuc *et al.* (2012) con los de este estudio, en cuanto a QTL identificados y tomando en cuenta que se utilizó el mismo parental resistente en la generación de la población RIL bajo estudio, se puede asumir que se coincidió en la identificación de un QTL en el cromosoma Pv05. Los demás QTL identificados en ambos estudios fueron diferentes. Esto se debe al uso de diferentes razas del patógeno y de diferentes parentales susceptibles, tal como lo sugiere Namayanja *et al.* (2006). Oblessuc *et al.* (2012) también menciona que cuando se realiza una evaluación cuantitativa de los síntomas es posible identificar diferentes genes de resistencia en el mismo genotipo. Con respecto a esta parte, es importante mencionar que en el estudio de Bassi (2014) después de escanear las hojas con síntomas utilizó el software ImageJ® (procesamiento de imágenes digitales) para realizar la evaluación de la severidad de mancha angular durante la caracterización fisiológica de aislamientos de *P. griseola*, de

esta manera cuantificó el número de lesiones, el área de lesión (cm²) y el porcentaje de tejido afectado. Este tipo de metodología contribuye a una evaluación de severidad menos subjetiva.

Varios estudios han demostrado la presencia de resistencia de herencia cuantitativa a mancha angular en diferentes genotipos de frijol (Keller *et al.*, 2015; Bassi, 2014; Mahuku, 2009; Teixeira *et al.* 2005) y la línea CAL 143 no es la excepción, como ya lo mencionó Oblessuc *et al.* (2012) en su estudio y los resultados de este estudio es otra contribución para llegar a esa conclusión.

Como se mencionó anteriormente CAL 143 es considerada como una fuente de resistencia a mancha angular muy importante, y es utilizada en diferentes programas de fitomejoramiento de varios países. Por ejemplo, CAL 143 es uno de los parentales de la variedad mejorada INIAP 484-Centenario (evaluada en este estudio, (Tabla 9) liberada en el 2012 en Ecuador (Murillo *et al.*, 2012). Esta variedad ha presentado resistencia a 13 razas de mancha angular identificadas en ese país y su resistencia ha permanecido estable en campo hasta la actualidad (datos no publicados).

Al igual que CAL 143 otras líneas de frijol como BAT 332, G5686, MAR 2, MAR 3, México 54, AND 277, Cornell 49-242, Ouro Negro, entre otras, también son consideradas como importantes fuentes de resistencia (Souza *et al.*, 2016; Namayanja *et al.*, 2006; Gonçalves-Vidigal *et al.*, 2013). Por lo que es importante, en estos genotipos, continuar con la validación e identificación de QTL o genes de resistencia y de marcadores moleculares ligados a estos, lo que permitirá maximizar su uso por programas de mejoramiento genético mediante la selección asistida permitiendo obtener variedades con resistencia efectiva y duradera a esta enfermedad.

CONCLUSIONES

Al identificar únicamente 16 líneas, de los 183 genotipos evaluados, con resistencia a dos aislamientos de *P. griseola* (razas 61:11 y 63:51) se demuestra la vulnerabilidad genética de los frijoles a esta enfermedad. Por lo que es importante continuar con la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia.

Las 16 líneas de frijol con resistencia a los dos aislamientos de mancha angular (razas 61:11 y 63:51) son: G21212, SER 125, AFR 612, Ouro Negro, CAL 143, AND 227, PR 0637-6, PR 1530-57, ALS 0546-78, ALS 0532-6, ALS 0531-41, ALS 0531-97, ALS 0546-60, ALS NIL 604-29, INIAP 484-Centenario, INIAP-483 Intag. Las últimas doce líneas fueron desarrolladas por diferentes programas de mejoramiento como CIAT (Colombia), UPR y USDA-ARS (Puerto Rico), Zamorano (Honduras), INIAP (Ecuador). Por lo que se cuenta con fuentes de resistencia de origen Andino y de origen Mesoamericano. Con esta información se puede planificar futuros trabajos de mejoramiento mediante la piramidación de genes de ambos acervos genéticos del frijol para generar variedades con resistencia duradera a esta enfermedad. Las líneas de frijol Ouro Negro, CAL 143, AND 227 poseen los genes de resistencia *Phg-1*, *Phg-3* y *Phg-5*, por lo que estos genes se consideran efectivos para controlar esta dos razas de mancha angular

De los tres QTL para resistencia a mancha angular identificados en este estudio, ALS2^{RC} y ALS11^{RC} no se han reportado en estudios anteriores, por lo que es necesario realizar más estudios para validarlos, mientras que para el QTL ALS5^{RC}, en estudios anteriores ya se han reportado QTL cercanos a esta región, por lo que se la puede considerar como una región de interés para futuros estudios más específicos.

LITERATURA CITADA

- Abadio, A., Lima, S., Santana, M., Salomão, T., Sartorato, A., Mizubuti, E., Araújo, E., de Queiroz, M. 2012. Genetic diversity analysis of isolates of the fungal bean pathogen *Pseudocercospora griseola* from central and southern Brazil. *Genetic and Molecular Research*. 11(2): 1272-1279.
- Abawi, G., y Pastor Corrales, M. 1990. Root rots of bean in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Centro Internaional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 114p.
- Allorent, D. y Savary, S. 2005. Epidemiological characteristics of angular leaf spot of bean: a systems analysis. *European Journal of Plant Pathology* 113:329–341.
- Bassi, Denis. 2014. Mapeamento de locos associados à resistência à mancha angular e ao oídio em feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*). M.Sc. diss. Instituto Agronômico Pós-Graduação (IAC). Campinas, São Paulo, Brazil.
- Bassi, D. et al. 2017. Linkage and mapping of quantitative trait loci associated with angular leaf spot and powdery mildew resistance in common beans. *Genetics and Molecular Biology*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0314>.
- Bellon, M., Barrientos, A., Colunga, P., Perales, H., Reyes, J., Rosales, R., Zizumbo, D. 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas. En: *Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México. p. 355-382.
- Blair, M., Giraldo, M., Buendía, H., Tovar, E., Duque, M., Beebe, S. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) *Theoretical Applied Genetics*. 113(1): 100-109.
- Broman, K., Wu, H., Sen, S., Churchill, G. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19(7):889–890. doi:10.1093/bioinformatics/btg112
- Broman, K. 2005. The Genomes of Recombinant Inbred Lines. *Genetics Society of America*. *Genetics* 169(2):1133-1146
- Castellanos, G., Jara, C., Mosquera, G. 2011 Manejo del hongo en el laboratorio. *Phaeoisariopsis griseola*, vol 6. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali-Palmira.
- Cichy, K., Porch, T., Beaver, J., Cregan, P., Fourie, D., Glahn, R., Grusak, M., Kamfwa, K., Katuramu, D., McClean, P., Mndolwa, E., Nchimbi-Msolla, S., Pastor-Corrales, M. and Miklas, P. 2015. A *Phaseolus vulgaris* diversity panel for Andean bean improvement. *Crop Science* doi:10.2135/cropsci2014.09.0653.

- Cortés, A., Chavarro, M., Blair, W. 2011. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical Applied Genetics* 123: 827.
- Crous, P., Liebenberg, M., Braun, U., Groenewald, J. 2006. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. *Studies in Mycology*. 55:163–173.
- Damasceno, K., De Souza E., Sartorato, A., De Souza, N. 2008. Pathogenic Variability of Isolates of *Pseudocercospora griseola*, the Cause of Common Bean Angular Leaf Spot, and its Implications for Resistance Breeding. *Journal of Phytopathology*. 156:602–606.
- Ddamulira, G., Mukankusi, C., Ochwo-Ssemakula, M., Edema, R., Sseruwagi, P., Gepts, P. 2014. Identification of new sources of resistance to angular leaf spot among Uganda common bean landraces. *Canadian Journal of Plant Breeding*. 2(2):55-65.
- Estevez de Jensen, C., Porch, T., Beaver, J. 2015. Response of different common bean lines to *Phaeoisariopsis griseola*. *Common Bean Disease Workshop*. p. 36.
- Faleiro, F., Ragagnin, V., Schuster, I., Corrêa, R., Good-God, P., Brommonshenkel, S., Moreira, M., Barros, E. 2003. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira*. 28:59–66
- Ferreira, C., Borém, A., Carvalho, G., Nietsche, S., Paula, T., Barros, E., Moreira, M. 2000. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean and identification of a RAPD marker linked to a resistance gene. *Crop Science*. 40:1130–1133.
- Freytag, G., Debouck, D. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae-Papilionideae*) in North-America, Mexico and Central America. *SIDA, Botanical Miscellany* 23. Botanical Research Institute of Texas. Fort Worth, USA. 300 p.
- Gao, L., Jia, J., Kong, X. 2016. A SNP-Based Molecular Barcode for Characterization of Common Wheat. *PLoS ONE* 11(3): e0150947. doi:10.1371/journal.pone-0150947.
- Gepts, P. y Debouck, D. 1991. Origin, domestication and evolution of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Van Schoonhoven, A. & Voysest, O. (Eds). *Common Beans; Research for Crop Improvement*. CIAT, Cali, Colombia. p.7-53.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., Srinivasan, M. 2015 “Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives,” *Genetics Research International*, vol. 2015, Article. 14 p.

- Hammer, K., Arrowsmith, N., Gladis, T. 2003. Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften* 90:241-250.
- Hernández-López, V., Vargas-Vázquez, M., Muruaga-Martínez, J., Hernández-Delgado, S., Mayek-Pérez, N. 2013. Origen, domesticación y diversificación del frijol común. *Avances y perspectivas. Revista. Fitotecnia. Mexicana.* 36(2): 95-104.
- Hillocks, R., Madata, C., Chirwa, R., Minja, E., Msolla, S. 2006. Phaseolus bean improvement in Tanzania, 1959–2005. *Euphytica*: DOI: 10.1007/s10681-006-9112-9 C _ Springer.
- Keller, B., Manzanares, C., Jara, C., Lobaton, J., Studer. B., Raatz, B. 2015. Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical Applied Genetics.* 128:813-826.
- Kimani, J., Kimani, P., Githiri, S., Kimenju, J. 2007. Mode of inheritance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) traits for tolerance to low soil. *Euphytica.* 115:225–234.
- León, I. 2009. La antracnosis y la mancha angular del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Temas de Ciencia y Tecnología.* 13:45-54.
- Mahuku, G., Jara, C., Cuasquer, J., Castellanos, G. 2002. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding of common bean. *Plant Pathology.* 51:594–604.
- Mahuku, G., Henriquez, M., Munoz, J., Buruchara, R. 2002 (b). Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology.* 92(6):580–589.
- Mahuku, G., Jara, C., Cajiao, E., Beebe, S. 2003. Sources of resistance to angular leaf spot (*Phaeoisariopsis griseola*) in common bean core collection, wild *Phaseolus vulgaris* and secondary gene pool. *Euphytica.* 130(3):303–313.
- Mahuku, G., Montoya, C., Henriquez, M., Jara, C., Teran, H., Beebe, S. 2004. Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. *Crop Science.* 44(5):1817–1824.
- Mahuku, G., Iglesias, A., Jara, C. 2009. Genetics of angular leaf spot resistance in the Andean common bean accession G5686 and identification of markers linked to the resistance genes. *Euphytica.* 167:381–396.
- Mahuku, G., Henriquez, M., Montoya, C., Jara, C., Teran, H., Beebe, S. 2011. Inheritance and development of molecular markers linked to angular leaf spot resistance genes in the common bean accession G10909. *Molecular Breeding.* 28:57–71.
- Muhamba, G., Chilagane, L., Protas, D., Kusolwa, P., Nchimbi-Msolla, S. 2013. Marker Assisted Selection for Common Bean Diseases Improvements in Tanzania:

- Prospects and Future Needs. Andersen, S. B. (Ed.). InTech. 10.5772/3362. Plant breeding from laboratories to fields. p. 121 – 147. <http://dx.doi.org/10.5772/52823>
- Murillo, A., Peralta, E., Mazón, N., Rodríguez, D., Pinzón, J. 2012. INIAP 484 Centenario, Variedad de fréjol arbustivo con resistencia múltiple a enfermedades. Boletín Divulgativo No. 421 Noviembre, 2012. INIAP, Quito, Ecuador.
- Namayanja, A., Buruchara, R., Mahuku, G., Rubaihayo, P., Kimani, P., Mayanja, S., Eyedu, S. 2006. Inheritance of resistance to angular leaf spot in common bean and validation of the utility of resistance linked markers for marker assisted selection outside the mapping population. *Euphytica*. 151:361–369.
- Oblessuc, P., Baroni, R., Garcia, A., Chioratto, A., Carbonell, S., Aranha, C., Benchimol, L. 2012 Mapping of angular leaf spot resistance QTL in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different environments. *BioMed Central Genetics* 13:50. doi:10.1186/1471-2156-13-50.
- Oblessuc, P., Perseguini J, Baroni, R., Chiorato, A., Carbonell, S., Mondego, J., Vidal, R., Camargo, L., Benchimol-Reis, L. (2013) Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. *Theoretical Applied Genetics*. 126(10):2451–2465.
- Pastor-Corrales, M. y Jará, C. 1995. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol común en América Latina. *Fitopatología Colombiana*. 19:15–24.
- Pastor-Corrales, M., Jara, C., Singh, S. 1998. Pathogenic variation in, source of, and breeding for resistance to *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in commonbean. *Euphytica*. 103:161–71.
- Pereira, R., Souza, E., Barcelos, Q., Abreu A., Librelon, S. 2015. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. *Genetics and Molecular Research*. 14 (2): 5044-5053.
- Perseguini JMKC, Oblessuc PR, Rosa JRBF, Gomes KA, Chiorato AF, Carbonell SAM, *et al.* 2016. Genome-Wide Association Studies of Anthracnose and Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS ONE* 11(3): e0150506. doi:10.1371/journal.pone.0150506.
- Queiroz *et al.* 2004. Development of SCAR markers linked to common bean angular leafspot resistance genes. *BIC* 47:237- 238.
- Raatz, B. *et al.* 2015. ALS: molecular tools. Common Bean Disease workshop on ALS and RRs. Skukuza, SA.
- Robinson P, Holmes J (2011) KASP version 4.0 SNP Genotyping Manual. Kbioscience. http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/PDFs/KASP_SNP_Genotyping_Manual.pdf. Consultado el 9 de septiembre del 2016.

- Rubio-Cabetas, M., Picó, B., Casas, A., Badenes, M.L. 2014. Aplicación de la biotecnología en los programas actuales de mejora. En: La obtención de variedades, desde la mejora clásica hasta la mejora genética molecular. Rafel Sociasi Company Rubio-Cabetas, M., Garcés-Claver, A., Mallor, M., Álvarez, M. (Editores). p 97-137.
- Sartorato, A., Nietsche, S., Barros, E., Moreira, M. 1999. SCAR marker linked to angular leaf spot resistance gene in common bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. 42:23–24.
- Sartorato, A., Nietsche, S., Barros, E., Moreira, M. 2000. RAPD and SCAR markers linked to resistance gene to angular leaf spot in common beans. Fitopatología. Brasileira. 25:637–642.
- Sartorato, A. 2002. Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five States in Brazil. Fitopatologia Brasileira 27:078-081
- Sartorato, A. 2004. Pathogenic variability and genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from two counties in the State of Goias, Brazil. J. Phytopathol. 152: 385-390.
- Sartorato, A. y Alzate-Marin. 2004. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. 47:235-237.
- Schoonhoven A., Pastor-Corrales, M. 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali. 56p.
- Schwartz, H., Correa, F., Pastor Corrales, M. 1982. La mancha angular del frijol y su control; guía de estudio. CIAT. Cali, Colombia. 24p.
- Semagn, K., Babu, R., Hearne, S., Olsen, M. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. Molecular Breeding. 33:1–14.
- Semagn, K., Bjornstad, A., Ndjiondjop, M. 2006. Progress and prospects of marker assisted backcrossing as a tool in crop breeding programs. African Journal of Biotechnology. 5(25): 2588-2603.
- Singh, S. y Schwartz, H. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. Crop Science. 50:2199–2223.
- Song, Q., Jia, G., Hyten, D., Jenkins, J., Hwang, E., Schroeder, S., Osorno, J., Schmutz, J., Jackson, S., McClean, P., Cregan, P. 2015. SNP Assay Development for Linkage Map Construction, Anchoring Whole-Genome Sequence, and Other Genetic and Genomic Applications in Common Bean G3: Genes, Genomes, Genetics. 5:2285-2290.

- Souza, T., Gonçalves-Vidigal, M., Raatz, B., Mukankusi, C., Abreu, A., Melo, L., Pastor-Corrales, M. 2016. Major Loci Controlling Resistance to the Angular Leaf Spot of Common Bean. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 59: xv-xviii.
- Stam, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. The Plant Journal 3: 739-744.
- Tadesse, B., Ogugo, V., Worku, M., Das, B., Olsen, M., Labuschagne, M., Semagn, K. 2015. Comparison of Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) and genotyping by sequencing (GBS) for quality control analysis in maize. BioMed Central Genomics. 16:908.
- Teixeira, F., Dos Santos, J., Patto, M., Barbosa, A., Teixeira, C., De Oliveira, A. 2005. QTL mapping for angular leaf spot in common bean using microsatellite markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology. 5:272-278.
- Torres, E., Quisphe, D., Sánchez, S., Reyes, M., González, B., Torres, A., Cedeño, A., Haro, A. 2013. Caracterización de la Producción de Frijol en la Provincia de Cotopaxi Ecuador: Caso Comuna Panyatug. Ciencia y Tecnología. 6(1): 23-31.
- Van Ooijen, J. 2009. MapQTL® 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.
- Velásquez, J. y Giraldo, P. 2005. Posibilidades competitivas de productos prioritarias de Antioquia frente a los acuerdos de integración y nuevos acuerdos comerciales. Gobernación de Antioquia, Departamento de Planificación- Secretaría de productividad y competitividad. Informe, 92 p.
- Vieira, R., Vieira, C., Pinto, C., Rodrigues, O. 2002. Comportamento de cultivares de feijão tipo manteigão em Minas Gerais – III. Ceres 49:29–39.
- Wagara, N., Mwangombe, A., Kimenju, J., Buruchara, R., Jamnadass, R., Majiwa, O. 2004. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Kenya as revealed by AFLP and group-specific primers. Journal of Phytopathol. 152:235–242
- Yuan, J., Wen Z., Gu C., and Wang, D. 2014. Introduction of High Throughput and Cost Effective SNP Genotyping Platforms in Soybean. Plant Genetics, Genomics, and Biotechnology. 2 (1): 90–94.

ANEXOS

Anexo 1. Medias de mínimos cuadrados obtenidos con los datos de severidad de dos aislamientos de mancha angular en líneas de la población RIL RC. Análisis realizado en el Software estadístico SAS.

Líneas RIL	Aislamiento ALS 1146C	Aislamiento ALS 9029JD2
RC-100:C6D9PACXX:1:24	...	Non-est
RC-101:C6D9PACXX:1:36
RC-102:C6D9PACXX:1:48	5.3	7.5
RC-103:C6D9PACXX:1:60	...	Non-est
RC-104:C6D9PACXX:1:72	...	4.5
RC-105:C6D9PACXX:1:84	Non-est	...
RC-106:C6D9PACXX:1:96
RC-107:C6D9PACXX:1:97	...	6.5
RC-108:C6D9PACXX:1:104	6.7	...
RC-109:C6D9PACXX:1:111	7.0	7.0
RC-10:C6D9PACXX:1:14
RC-110:C6D9PACXX:1:118	...	3.0
RC-111:C6D9PACXX:1:125	4.0	6.6
RC-112:C6D9PACXX:1:132	Non-est	5.3
RC-113:C6D9PACXX:1:138	...	5.8
RC-114:C6D9PACXX:1:144	Non-est	2.0
RC-115:C6D9PACXX:1:98	7.2	5.5
RC-116:C6D9PACXX:1:105	7.1	7.5
RC-117:C6D9PACXX:1:112	...	6.7
RC-118:C6D9PACXX:1:119	...	7.7
RC-119:C6D9PACXX:1:126	6.5	...
RC-11:C6D9PACXX:1:26	Non-est	3.0
RC-120:C6D9PACXX:1:133	7.0	4.0
RC-121:C6D9PACXX:1:139	5.8	2.0
RC-122:C6D9PACXX:1:145	...	Non-est
RC-123:C6D9PACXX:1:99	5.5	6.0
RC-124:C6D9PACXX:1:106	6.0	6.2
RC-125:C6D9PACXX:1:113	...	2.0
RC-126:C6D9PACXX:1:120	Non-est	Non-est
RC-127:C6D9PACXX:1:127	4.0	6.0
RC-128:C6D9PACXX:1:134
RC-129:C6D9PACXX:1:140	4.2	Non-est
RC-12:C6D9PACXX:1:38	...	6.2
RC-130:C6D9PACXX:1:146	...	4.3
RC-131:C6D9PACXX:1:100	Non-est	Non-est
RC-132:C6D9PACXX:1:107	2.4	1.0
RC-133:C6D9PACXX:1:114	5.0	4.8

RC-134:C6D9PACXX:1:121	...	6.0
RC-135:C6D9PACXX:1:128	5.8	4.2
RC-136:C6D9PACXX:1:135
RC-137:C6D9PACXX:1:141	6.3	3.8
RC-138:C6D9PACXX:1:147	...	1.3
RC-139:C6D9PACXX:1:101	...	Non-est
RC-13:C6D9PACXX:1:50	3.0	1.7
RC-140:C6D9PACXX:1:108
RC-141:C6D9PACXX:1:115	6.6	...
RC-142:C6D9PACXX:1:122	7.0	3.3
RC-143:C6D9PACXX:1:129	6.0	5.5
RC-144:C6D9PACXX:1:136	...	Non-est
RC-145:C6D9PACXX:1:142	6.0	Non-est
RC-146:C6D9PACXX:1:148	...	2.0
RC-147:C6D9PACXX:1:102	4.8	5.3
RC-148:C6D9PACXX:1:109	...	7.0
RC-149:C6D9PACXX:1:116
RC-14:C6D9PACXX:1:62	...	3.0
RC-150:C6D9PACXX:1:123
RC-151:C6D9PACXX:1:130	...	6.0
RC-152:C6D9PACXX:1:137	6.5	6.0
RC-153:C6D9PACXX:1:143	Non-est	3.0
RC-154:C6D9PACXX:1:149	7.0	5.4
RC-155:C6D9PACXX:1:103	6.5	4.8
RC-156:C6D9PACXX:1:110
RC-157:C6D9PACXX:1:117	5.8	1.5
RC-158:C6D9PACXX:1:124	...	6.1
RC-159:C6D9PACXX:1:131	7.0	7.0
RC-15:C6D9PACXX:1:74	6.3	3.0
RC-16:C6D9PACXX:1:86	7.0	...
RC-17:C6D9PACXX:1:3	Non-est	2.0
RC-18:C6D9PACXX:1:15	3.0	Non-est
RC-19:C6D9PACXX:1:27	6.5	4.6
RC-1:C6D9PACXX:1:25	5.5	5.3
RC-20:C6D9PACXX:1:39	5.5	5.5
RC-21:C6D9PACXX:1:51	6.8	Non-est
RC-22:C6D9PACXX:1:63	Non-est	2.2
RC-23:C6D9PACXX:1:75	3.8	3.5
RC-24:C6D9PACXX:1:87	6.0	2.7
RC-25:C6D9PACXX:1:4	Non-est	3.0
RC-26:C6D9PACXX:1:16	Non-est	1.5
RC-27:C6D9PACXX:1:28
RC-28:C6D9PACXX:1:40
RC-29:C6D9PACXX:1:52	Non-est	...
RC-2:C6D9PACXX:1:37	Non-est	2.5
RC-30:C6D9PACXX:1:64	5.0	2.0

RC-31:C6D9PACXX:1:76	4.3			Non-est
RC-32:C6D9PACXX:1:88		Non-est	...	
RC-33:C6D9PACXX:1:5	4.8			Non-est
RC-34:C6D9PACXX:1:17		Non-est	3.7	
RC-35:C6D9PACXX:1:29	7.0		6.7	
RC-36:C6D9PACXX:1:41	7.0			Non-est
RC-37:C6D9PACXX:1:53	...			Non-est
RC-38:C6D9PACXX:1:65	6.7		6.8	
RC-39:C6D9PACXX:1:77	...		2.0	
RC-3:C6D9PACXX:1:49	...			
RC-40:C6D9PACXX:1:89		Non-est	2.0	
RC-41:C6D9PACXX:1:6	...			Non-est
RC-42:C6D9PACXX:1:18		Non-est	5.8	
RC-43:C6D9PACXX:1:30	
RC-44:C6D9PACXX:1:42	
RC-45:C6D9PACXX:1:54	6.5		6.6	
RC-46:C6D9PACXX:1:66	6.5		...	
RC-47:C6D9PACXX:1:78		Non-est		Non-est
RC-48:C6D9PACXX:1:90		Non-est		Non-est
RC-4:C6D9PACXX:1:61	
RC-51:C6D9PACXX:1:7	5.0		5.5	
RC-52:C6D9PACXX:1:19	...			Non-est
RC-55:C6D9PACXX:1:31	
RC-56:C6D9PACXX:1:43	7.0			Non-est
RC-59:C6D9PACXX:1:55	...		4.0	
RC-5:C6D9PACXX:1:73	6.0		6.3	
RC-60:C6D9PACXX:1:67	...		5.0	
RC-61:C6D9PACXX:1:79	6.5		5.0	
RC-62:C6D9PACXX:1:91	6.5		4.1	
RC-63:C6D9PACXX:1:8	...			Non-est
RC-64:C6D9PACXX:1:20	
RC-65:C6D9PACXX:1:32	6.5		6.0	
RC-66:C6D9PACXX:1:44		Non-est	5.0	
RC-68:C6D9PACXX:1:56		Non-est	5.0	
RC-69:C6D9PACXX:1:68	7.0			Non-est
RC-70:C6D9PACXX:1:80	6.3		7.0	
RC-73:C6D9PACXX:1:92	
RC-74:C6D9PACXX:1:9	7.3		7.5	
RC-75:C6D9PACXX:1:21		Non-est	6.5	
RC-76:C6D9PACXX:1:33	7.0		3.0	
RC-78:C6D9PACXX:1:45	6.0		6.5	
RC-79:C6D9PACXX:1:57	6.5		6.5	
RC-80:C6D9PACXX:1:69	6.7			Non-est
RC-81:C6D9PACXX:1:81		Non-est	6.3	
RC-82:C6D9PACXX:1:93		Non-est	7.5	
RC-83:C6D9PACXX:1:10	

RC-84:C6D9PACXX:1:22	5.8		5.3
RC-85:C6D9PACXX:1:34	7.0		5.0
RC-86:C6D9PACXX:1:46	...		2.0
RC-87:C6D9PACXX:1:58	7.0		6.3
RC-88:C6D9PACXX:1:70	7.0		7.2
RC-89:C6D9PACXX:1:82	7.0		Non-est
RC-8:C6D9PACXX:1:85	6.2		8.0
RC-90:C6D9PACXX:1:94		Non-est	...
RC-91:C6D9PACXX:1:11	6.5		7.0
RC-92:C6D9PACXX:1:23	2.0		1.0
RC-93:C6D9PACXX:1:35	6.5		6.2
RC-94:C6D9PACXX:1:47	...		3.5
RC-95:C6D9PACXX:1:59	...		8.0
RC-96:C6D9PACXX:1:71	3.5		6.5
RC-97:C6D9PACXX:1:83	...		7.3
RC-98:C6D9PACXX:1:95	7.0		6.5
RC-99:C6D9PACXX:1:12	5.0		5.3
RC-9:C6D9PACXX:1:2

LSM obtenidos con el Software estadístico SAS
Non-est= Medias que no pudieron ser estimadas
... = Valor perdido