



Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

INFORME FINAL

Identificación de resistencia a antracnosis y caracterización molecular del germoplasma de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala.

Equipo de investigación

Ing. Agr. Julio Cesar Villatoro Mérida
Coordinador de Proyecto

M.Sc. Carlos Raúl Maldonado Mota
Investigador

M.Sc. María Gabriela Tobar Piñón
Investigadora

Guatemala, Febrero de 2020

Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales
Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA)



Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador del Programa de Investigación

Julio César Villatoro Mérida
Coordinador del proyecto

Carlos Raúl Maldonado Mota
Investigador

María Gabriela Tobar Piñón
Investigadora

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2019. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 43.8.63.4.46. Durante el año 2019 en el Programa Universitario de Investigación de Ciencias Básicas.

Financiamiento aprobado por Digi: Q.150,000.00 Financiamiento ejecutado: Q.84,066.12

Índice

1	<i>Resumen</i>	1
2	<i>Palabras clave</i>	1
3	<i>Abstract</i>	2
4	<i>Introducción</i>	3
5	<i>Planteamiento del problema</i>	4
6	<i>Preguntas de investigación</i>	5
6.1	Pregunta central.....	5
6.2	Preguntas secundarias	5
7	<i>Delimitación en tiempo y espacio</i>	6
8	<i>Marco teórico</i>	6
8.1	Frijol común.....	6
8.2	Antracnosis.....	7
8.3	Resistencia genética para antracnosis	9
8.4	Selección de parentales para mejoramiento genético.....	9
8.5	El genoma del frijol común.....	10
8.5.1	Marcadores moleculares para el análisis de diversidad.....	10
8.5.2	Genotipado por secuenciación (GBS)	10
9	<i>Estado del arte</i>	11
10	<i>Objetivo general</i>	12
11	<i>Objetivos específicos</i>	12
12	<i>Hipótesis</i>	12
13	<i>Materiales y métodos</i>	13
13.1	Enfoque y tipo de investigación.....	13
13.1.1	Enfoque de investigación.....	13
13.1.2	Tipo de investigación.....	13
13.2	Recolección de la información.....	13
13.3	Técnicas e instrumentos	14
13.3.1	Identificación de resistencia del germoplasma	14
13.3.2	Criterios de selección para identificación de parentales	16
13.3.3	Generación de librerías de ADN genómico	17

13.4	Análisis de datos.....	17
13.5	Operacionalización de las variables	17
13.6	Procesamiento y análisis de la información	18
14	<i>Vinculación, difusión y divulgación.....</i>	18
15	<i>Productos, hallazgos, conocimientos o resultados.....</i>	18
15.1	Determinación de fuentes de resistencia del germoplasma arbustivo	18
15.2	Identificación de parentales con resistencia a antracnosis	21
15.3	Generación de librerías de ADN genómico	23
16	<i>Análisis y discusión de resultados</i>	23
16.1	Determinación de fuentes de resistencia del germoplasma arbustivo	23
16.2	Identificación de parentales con resistencia a antracnosis	25
17	<i>Conclusiones.....</i>	27
18	<i>Impacto esperado.....</i>	27
19	<i>Referencias.....</i>	28
20	<i>Apéndices.....</i>	33

Índice de tablas

Tabla 1.	Líneas diferenciales, código binario, genes de resistencia y origen genético de los cultivares diferenciales utilizados para caracterizar razas de <i>C. lindemuthianum</i>	8
Tabla 2.	Escala para evaluar la severidad de antracnosis.	14
Tabla 3.	Operacionalización de las variables o unidades de análisis.....	17
Tabla 4.	Genotipos resistentes (escala 1-3) del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala a la raza 585 de <i>C. lindemuthianum</i>	18
Tabla 5.	Genotipos resistentes (escala 1-3) del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala a la raza 3981 de <i>C. lindemuthianum</i>	21
Tabla 6.	Características de líneas resistentes del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala y líneas comerciales de ICTA.	22

Índice de figuras

Figura 1. Colección de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala.	14
Figura 2. Incremento de <i>C. lindemuthianum</i> en el laboratorio.	15
Figura 3. Reacción de plantas inoculadas con el patógeno de frijol <i>C. lindemuthianum</i> raza 585 bajo invernadero.	20

Identificación de resistencia a antracnosis y caracterización molecular del germoplasma de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala.

1 Resumen

El frijol común es el segundo grano más importante cultivado en Guatemala y es la fuente de proteína de origen vegetal más importante para el guatemalteco. Sin embargo, el cultivo se ve afectado por antracnosis, una enfermedad causada por el patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, un hongo que puede afectar el rendimiento del grano hasta un 100 %. El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) cuenta con una colección de frijol arbustivo en la región del altiplano del país, la cual ha presentado resistencia bajo presión natural de la enfermedad. Sin embargo, no se habían evaluado con razas de *C. lindemuthianum* previamente reportadas en la zona. Un germoplasma diverso generalmente permite encontrar genes novedosos de resistencia a enfermedades. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue identificar fuentes de resistencia al patógeno y buscar parentales dentro del germoplasma de frijol arbustivo nacional para fortalecer el programa de mejoramiento de frijol en Guatemala. Se realizaron inoculaciones de las razas 585 y 3981 de *C. lindemuthianum* en 216 genotipos de la colección de frijol arbustivo para encontrar fuentes de resistencia, utilizando una escala visual de severidad de 1 a 9. Para la raza 585 del patógeno se encontraron 67 genotipos resistentes (escala 1 a 3), y para la raza 3981 del patógeno se encontraron 21 genotipos resistentes (escala 1 a 3). Para ambas razas del patógeno siete genotipos fueron inmunes, seis de los cuales presentan un grano negro opaco, y pueden ser utilizados como parentales en planes de cruzamiento para Guatemala.

2 Palabras clave

Colletotrichum lindemuthianum, frijol común, *Phaseolus vulgaris* L., diversidad genética, colección de germoplasma.

Identification of new sources of resistance to anthracnose and molecular characterization in bush type bean germplasm from the highlands of Guatemala

3 Abstract

Dry bean is the second most important crop in Guatemala and is the main source of vegetal protein for Guatemalans. However, dry bean is affected by anthracnose, a disease that is caused by the pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungus that can affect the seed yield over a 100 %. The Institute of Agricultural Science and Technology (ICTA) has a dry bush type bean collection from the highlands of the country, which has demonstrated to have resistance under natural pressure of the disease. Nevertheless, this germplasm never was evaluated for specific races of *C. lindemuthianum* previously reported in Guatemala. A diverse germplasm collection generally allows to find novel genes of disease resistance. Therefore, the objective of this project was to identify sources of resistance to the pathogen and find parental lines within the bush type bean germplasm collection to strengthen the bean breeding program in Guatemala. Inoculations of the races 585 and 3981 of *C. lindemuthianum* were performed in 216 genotypes of the bush bean collection to find resistance sources, using a severity visual scale from 1 to 9. For race 585 of the pathogen we found 67 resistant genotypes (scale 1 to 3), and for race 3981 of the pathogen we found 21 resistant genotypes (scale 1 to 3). For both races of the pathogen seven genotypes were immune, six of which have black dull seed and can be used as parentals in breeding plans for Guatemala.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*, common bean, *Phaseolus vulgaris* L., genetic diversity, germplasm collection.

4 Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante para consumo humano alrededor del mundo (Broughton et al., 2003). La producción de frijol es de más de 23 millones de toneladas y casi un tercio de esta es producido por pequeños productores en países en vías de desarrollo de África y América Latina (Broughton et al., 2003). Guatemala es el país con la más alta desnutrición crónica en Latinoamérica (Gragnotati & Marini, 2003), y afecta principalmente a niños menores de 5 años (Osorno & McClean, 2013). En el altiplano de Guatemala, el frijol es importante porque es un componente básico en la dieta de los habitantes junto con el maíz. El frijol común es considerado un grano básico con un consumo per cápita de 9.4 kg (Osorno & McClean, 2013) y es la fuente de proteína vegetal más importante del país (Akibode & Maredia, 2012).

El germoplasma utilizado en los programas de mejoramientos se utiliza para poder hacer mejoras en la resistencia a enfermedades y otras características de importancia económica en el cultivo de frijol (Rosas, Gallardo, & Jimenez, 2003). La antracnosis es una enfermedad causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magnus) Briosi y Cavara, y es un hongo hemibiotrófico que afecta el cultivo de frijol a nivel mundial (Chávez, 1980), la enfermedad afecta varias partes de la planta y puede sobrevivir bastante tiempo en los residuos de las plantas enfermas (Chen et al., 2007). Además, la antracnosis puede causar pérdidas en rendimiento hasta del 100 % cuando la semilla está infectada y las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad (del Rio & Bradley, 2002; Markell, Wunsh, & del Rio, 2012). Desafortunadamente, la antracnosis reduce el rendimiento y la calidad de la semilla del frijol producida en este país, además el problema se ve agravado debido a que los productores no utilizan fungicidas para controlar la enfermedad porque es caro (Schwartz & Steadman, 1989). Guatemala por su ubicación es considerado un país de alta diversidad tanto en cultivos como en los patógenos más comunes que y afectan dichos cultivos. En un estudio reciente (Maldonado-Mota, 2017) reportaron la presencia de la raza 3981 de *C. lindemuthianum* en el departamento de Chimaltenango, la raza más agresiva reportada hasta el momento en Guatemala.

Para preservar la diversidad de una población es necesario entender cómo la diversidad genética se distribuye (Loveless & Hamrick, 1984). La evaluación de la diversidad genética y estructura de la población es necesaria para el mejoramiento genético de un cultivo porque permite

las tomas de decisiones tales como: la conservación del germoplasma y la identificación de genes candidatos (Acosta-Gallegos, Kelly, & Gepts, 2007).

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), en Guatemala tiene una colección de frijol arbustivo en la región del altiplano (Cojulún, 1976), esta colección ha presentado resistencia bajo presión natural de antracnosis, sin embargo, no se había utilizado con razas de *C. lindemuthianum* previamente reportadas. Por lo tanto, fue necesario identificar fuentes de resistencia para el programa de mejoramiento de frijol en Guatemala a razas del patógeno que se han reportado anteriormente. En este estudio 216 accesiones de frijol arbustivo se utilizaron para poder identificar nuevas fuentes de resistencia para las razas 585 y 3981 de *C. lindemuthianum* reportadas en el altiplano de Guatemala, se utilizaron estas razas porque una es la más frecuente en varias localidades del altiplano y la otra es la más virulenta (Awale, Falconí-Castillo, Villatoro-Mérida, & Kelly, 2008; Maldonado-Mota, 2017).

Otro de los objetivos de este proyecto fue desarrollar las librerías genómicas del ADN extraído de los 216 genotipos para poder identificar polimorfismos por medio de secuenciación y hacer una caracterización molecular de la colección del germoplasma y así poder identificar genes asociados a la resistencia encontrada para *C. lindemuthianum* (Miklas, Kelly, Beebe, & Blair, 2006), y generar marcadores moleculares eficientes para hacer selección asistida por marcadores en el proceso de mejoramiento genético y generación de variedades resistentes a antracnosis.

5 Planteamiento del problema

En Guatemala, el frijol común es el segundo cultivo más importante después del maíz (*Zea mays* L.). La antracnosis es una enfermedad principal de frijol en el Altiplano de Guatemala, causada por el patógeno *C. lindemuthianum* y puede ocasionar pérdidas de hasta el 100 % de la producción. Además, el patógeno se transmite por semilla y disminuye considerablemente el rendimiento del cultivo. El uso de químicos por parte del agricultor es una solución costosa y contamina el ambiente. Hasta ahora la mejor alternativa para el control de esta enfermedad es el mejoramiento genético, ya que la relación entre el patógeno y la planta es controlada por pocos genes. Sin embargo, el programa de mejoramiento de frijol del ICTA no ha enfocado su mejoramiento al control de esta enfermedad y no cuenta con la información necesaria para poder hacerlo.

En 2017 el estudio de Maldonado-Mota identificó seis razas de *C. lindemuthianum* en la región del altiplano occidental del país. Una de ellas (raza 585) se encontró en todos los departamentos que fueron muestreados, mientras que otra (raza 3981) la cual fue identificada en el departamento de Chimaltenango, es la raza más virulenta reportada hasta el momento en Guatemala. Por lo tanto, lo más probable es encontrar una fuente de resistencia en plantas de la región donde se encontraron las razas del patógeno, ya que han tenido la oportunidad de interactuar y evolucionar juntas.

Además, es necesario identificar fuentes de resistencia para el programa de mejoramiento de frijol en Guatemala a razas del patógeno que se han reportado anteriormente para poder incluirlas en los planes de cruzamiento para la generación de variedades resistentes a la enfermedad. En este estudio se identificaron fuentes de resistencia para las razas 585 y 3981 de *C. lindemuthianum* reportadas en el altiplano de Guatemala (Maldonado-Mota, 2017), en una colección de 216 accesiones de frijol arbustivo colectada en el altiplano de Guatemala. Como parte de este proyecto, también se generaron librerías de ADN genómico de los 216 genotipos de frijol arbustivo listas para ser secuenciadas y así poder encontrar polimorfismos entre ellos y correlacionarlos con la información de resistencia a antracnosis para la identificación de los genes de resistencia a nivel cromosómico. Esto permitirá generar marcadores moleculares para la selección asistida con marcadores que acelera el proceso de desarrollo de variedades mejoradas a la mitad del tiempo que se utiliza actualmente haciendo mejoramiento convencional.

6 Preguntas de investigación

6.1 Pregunta central

¿Qué fuentes de resistencia existen para antracnosis en la colección de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala?

6.2 Preguntas secundarias

¿Qué genotipos en la colección de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala son resistentes a las razas 585 y/o 3981 de *C. lindemuthianum*?

¿Qué genotipos en la colección de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala tienen características de importancia agronómica que puedan ser utilizados como parentales en los planes de cruzamiento?

7 Delimitación en tiempo y espacio

La investigación se realizó durante el período de marzo de 2019 a enero de 2020 y se dividió en tres fases: invernadero, laboratorio y gabinete. La fase de invernadero incluyó el incremento, limpieza y selección de semilla de 274 genotipos de frijol arbustivo y se realizó de marzo a junio de 2019; la inoculación de plantas con el patógeno y evaluación de severidad de la enfermedad se realizó de agosto de 2019 a enero de 2020. La fase de laboratorio incluyó el incremento de inóculo que se realizó en el período de marzo a noviembre de 2019 y la extracción de ADN y elaboración de librerías se realizó en los meses de octubre de 2019 a febrero de 2020. El incremento de inóculo del patógeno y la preparación de librerías de ADN, se realizaron en el laboratorio de la Disciplina de Biotecnología en ICTA Central, ubicado en Bárcena, Villa Nueva, Guatemala. Los incrementos de semilla e inoculaciones del patógeno se realizaron en el invernadero del Programa de Frijol en ICTA CIALC, ubicado en la Alameda, Chimaltenango, Guatemala.

8 Marco teórico

8.1 Frijol común

El frijol en el continente americano tiene una larga historia, se originó en México (Bitocchi et al., 2012) y tiene dos centros de domesticación, las montañas de los Andes de Sudamérica, el cual dio lugar al acervo genético Andino, y el acervo genético Mesoamericano de las tierras bajas y el altiplano de América Central (Blair, Díaz, Buendía, & Duque, 2009). Además de estos centros de domesticación, el frijol se subdivide en grupos llamados razas (Singh, Gepts, & Debouck, 1991). Actualmente se reconocen las razas Nueva Granada, Perú y Chile (acervo genético Andino), y Mesoamérica, Jalisco, Durango y Guatemala (Acervo genético Mesoamericano) (Beebe et al., 2000; Tobar-Piñón, 2017). En Guatemala el frijol común es el segundo cultivo de grano más importante después del maíz (*Zea mays* L.) y el frijol negro es la clase comercial más consumida. Las principales áreas para la producción de frijol común en Guatemala son: en la región norte el departamento de Petén; y en la región sudeste en los departamentos de Jutiapa, Chiquimula y Santa Rosa, donde los frijoles arbustivos se cultivan. En el altiplano, los departamentos productores son: Quiché, Huehuetenango, Chimaltenango, y San Marcos. La producción nacional de frijol en el 2014 fue de 225,760 toneladas en un área de 243,040 ha (MAGA, 2013). Actualmente, en ICTA

Guatemala existe una colección de germoplasma de frijol arbustivo colectado en el año de 1977 en diferentes departamentos de Guatemala, tales como: Quetzaltenango, Huehuetenango, Chimaltenango, Sololá, Alta Verapaz, y Baja Verapaz. La colección original es de 216 accesiones. Sin embargo, este número incrementó a través del tiempo debido a la incorporación de líneas de frijol, producto de cruzamientos, haciendo un total de 274 genotipos.

8.2 Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad causada por *C. lindemuthianum*, y reduce significativamente el rendimiento de semilla de frijol en plantas susceptibles (Zuiderveen, 2015). El patógeno también se puede propagar por semilla y cuando el ambiente es favorable la enfermedad se puede dispersar fácilmente y causar una epidemia (Markell et al., 2012). La antracnosis es una de las enfermedades más importantes que afecta el frijol a nivel mundial debido a su variabilidad patogénica y su eficiente método de transmisión. La resistencia genética es reconocida como la más efectiva estrategia de manejo para el control de antracnosis (Kelly & Vallejo, 2004) porque es una forma económica y ambientalmente viable (Meziadi et al., 2016). Los síntomas de antracnosis pueden aparecer en cualquier parte de la planta. La dispersión de la enfermedad depende de los factores ambientales, la fuente de inóculo y la susceptibilidad del hospedero. Las semillas infectadas son la principal fuente de inóculo, los síntomas iniciales usualmente aparecen en los cotiledones como lesiones oscuras o negras. La infección también puede producir pequeñas manchas de color óxido oscuro. Estas manchas crecen y forman una lesión hundida. El daño encontrado en las vainas es un chancro oscuro y bordes de color óxido oscuro levemente levantados. Las condiciones favorables para el desarrollo de *C. lindemuthianum* incluye temperaturas entre 13°C y 25°C, y alta humedad (Castellanos, Jara, & Mosquera, 2016).

La coevolución del frijol común y el patógeno *C. lindemuthianum* ha sido demostrada basado en variabilidad genética de las poblaciones del hospedero y del patógeno. La coevolución del patosistema ha sido estudiada en los acervos genéticos Andino y Mesoamericano (Balardin, Jarosz, & Kelly, 1997). Resultados de la población del patógeno han consistido en aislamientos de *C. lindemuthianum* colectados de regiones Andinas y Mesoamericanas, y han demostrado que la población patogénica más diversa está en la región Mesoamericana. La mayoría de las razas del patógeno encontradas en la región mesoamericana no fueron encontradas en la región andina, esto

sugiere que las razas patogénicas han evolucionado con cultivares de la misma región (Pastor-Corrales, Otoya, & Maya, 1993).

En 1991 Pastor-Corrales propuso un set de líneas de frijol para diferenciar y caracterizar las razas de antracnosis por medio de un sistema binario que se asigna a cada diferencial, así solo un número único puede ser generado por cada raza de antracnosis. Más de 100 razas de *C. lindemuthianum* han sido reportadas mundialmente usando el sistema binario (Ferreira, Campa, & Kelly, 2013).

Tabla 1.

Líneas diferenciales, código binario, genes de resistencia y origen genético de los cultivares diferenciales utilizados para caracterizar razas de C. lindemuthianum.

Líneas diferenciales	Código Binario	Gen de resistencia	Acervo genético
Michelite	1	<i>Co-11</i>	MA ¹
Michigan Dark Red Kidney	2	<i>Co-1</i>	A ²
Perry Marrow	4	<i>Co-1</i> ³	A
Cornell 49-242	8	<i>Co-2</i>	MA
Widusa	16	<i>Co-1</i> ⁵	A
Kaboon	32	<i>Co-1</i> ²	A
Mexico 222	64	<i>Co-3</i>	MA
PI 207262	128	<i>Co-3</i> ³ , <i>Co-4</i> ³	MA
TO	256	<i>Co-4</i>	MA
TU	512	<i>Co-5</i>	MA
AB 136	1024	<i>Co-6</i> , <i>co-8</i>	MA
G2333	2048	<i>Co-4</i> ² , <i>Co-3</i> ⁵ , <i>Co-5</i> ²	MA

¹MA= Mesoamericano ²A= Andino. Fuente: Bean Improvement Cooperative (2014) Recuperado de http://bic.css.msu.edu/_pdf/Bean_Genes_List_2014.pdf

En Guatemala, estudios previos han identificado varias razas de *C. lindemuthianum*: 9, 73, 520, 521, 556, 585, 648, 897, 1024, 1025, 1097, 1544, 1545, 1549, 1609, 1645, 1993, y 3981 (Awale et al., 2008; Mahuku & Riascos, 2004; Maldonado-Mota, 2017). Entre las razas más comunes reportadas en otros estudios se encuentran las razas 520, 585, 1024, y 1545 (Mahuku & Riascos, 2004, Awale et al., 2008, Maldonado-Mota, 2017). Actualmente, un total de 21 genes específicos de resistencia para *C. lindemuthianum* han sido identificados. Además de las variedades diferenciales, los programas de mejoramiento siguen buscando nuevas fuentes de resistencia para el patógeno.

8.3 Resistencia genética para antracnosis

Usualmente los genes de resistencia utilizados para antracnosis están presentes en diferentes genotipos de frijol, los genes de resistencia más comunes para los programas de mejoramiento son el locus *Co-1* y sus alelos, estos están presentes en la mayoría de los genotipos del acervo genético Andino, y ofrecen una amplia resistencia a razas de *C. lindemuthianum* de origen Mesoamericano, debido a que la interacción del patógeno con el hospedero es muy específica para genotipos de este acervo genético (Kelly & Vallejo, 2004). Una fuente de resistencia andina se encuentra en AND277, el cual contiene el gen *Co-1*⁴, este genotipo ha presentado resistencia a 21 razas de *C. lindemuthianum* (Gonçalves-Vidigal et al., 2011). Otros genotipos con resistencia debido al locus *Co-1* son los cultivares Jaguar, Phantom, Raven, Newport y Seafarer (Kelly & Vallejo, 2004). Otro gen de resistencia importante es *Co-4*, aunque los alelos más utilizados de este locus es *Co-4*³ reportado en el genotipo Mesoamericano PI207262 y *Co-4*², ambos se encuentran presentes en el cromosoma Pv08. *Co-4*² se encuentra presente en los genotipos Mesoamericanos G2333, G2338 y SEL 1308, el genotipo G2333 ha presentado amplia resistencia a varias razas de *C. lindemuthianum*, posee tres genes de resistencia y se ha utilizado para realizar introducción de genes (Kelly & Vallejo, 2004; Pastor-Corrales, Erazo, Estrada, & Singh, 1994; Kazimoto, 2016).

Otras fuentes de resistencia de origen Mesoamericano y Andino se han utilizado en los programas de mejoramiento de frijol común, Ouro Negro (Honduras 35) que contiene *Co-10* (Alzate-Marin, Costa, Arruda, De Barros, & Moreira, 2003), Jalo Vermelho (*Co-12*) (Gonçalves-Vidigal et al, 2008), Jalo Listras Pretas (*Co-13*) (Gonçalves-Vidigal, Pedro-Filho, Medeiros, & Pastor-Corrales, 2009), Pitanga que contiene (*Co-14*) (Gonçalves-Vidigal et al, 2011). Actualmente, se reportaron otras fuentes de resistencia de origen Andino, Paloma (*Co-Pa*), este genotipo ha sido resistente a las razas 2047 y 3481 de *C. lindemuthianum* (de Lima Castro et al., 2017), Amendoim Cavallo (*Co-AC*) (Nanami et al., 2017) y Perla (*Co-Pe*).

8.4 Selección de parentales para mejoramiento genético

La selección de parentales para donar rasgos adecuados para el mejoramiento de plantas se basa en la habilidad del parental donador en heredar variabilidad y poder hacer selección de las poblaciones segregantes, poder seleccionar parentales para utilizarlos en los bloques de

cruzamientos es un requisito para un programa de mejoramiento y es necesario para poder mantener el avance genético (Allard, 1999). Los programas de mejoramiento necesitan parentales apropiados que puedan utilizarse en cruza y que produzcan progenies con características deseables. Entre los criterios que se deben tomar para la selección de parentales están las características fenotípicas (rasgos agronómicos y morfológicos) y genotípicas (conocimiento genético) (Bertan, Carvalho, & Oliveira, 2007).

8.5 El genoma del frijol común

El frijol común es una especie diploide con once cromosomas ($2n=22$). El tamaño del genoma es de alrededor de 587 Megabases (Mb) (Schmutz et al., 2014), y 49.2 % del genoma son secuencias repetitivas. El genotipo Andino G19833 conocido como “Chaucha Chuga” y el genotipo Mesoamericano BAT93 fueron usados para desarrollar los genomas de referencia del frijol común (Schmutz et al., 2014; Vlasova et al., 2016). Los genes codificadores de proteínas que han sido reportados en ambas anotaciones de genomas son 27,197 para el genotipo G19833 y 30,491 para el genotipo BAT93.

8.5.1 Marcadores moleculares para el análisis de diversidad

Los marcadores moleculares pueden identificar diferencias genotípicas sin analizar el genoma entero, y pueden ser utilizados para identificar regiones del genoma asociados con rasgos fenotípicos específicos. Ellos pueden ser definidos como fragmentos de ADN que funcionan como “señales” e identifican información de interés. Además, los marcadores moleculares son útiles en muchos campos biológicos de estudio. Por estas razones, nuevas técnicas para su desarrollo han surgido (Agarwal, Shrivastava, & Padh, 2008). Para evaluar la diversidad, los primeros marcadores moleculares con base de ADN utilizados fueron los RFLP. Sin embargo, los marcadores más comunes utilizados en este campo son los RAPDs, SSRs, SNPs, y recientemente los marcadores basados en elementos transposones (Poczai et al., 2013). Los SNPs son los marcadores más abundantes porque ellos representan la unidad más pequeña en un gen que puede ser cambiada.

8.5.2 Genotipado por secuenciación (GBS)

Considerando el interés en el descubrimiento de secuencias de genes que controlan los fenotipos en los organismos, el desarrollo de tecnologías que hacen la secuenciación más eficiente

ha sido recientemente un interés principal. Desde los años 90, la secuenciación Sanger ha ayudado en avances genómicos. Sin embargo, en los últimos años, las tecnologías de la secuenciación de la siguiente generación (NGS), tales como secuenciación por síntesis de Illumina, han permitido la secuenciación de genomas completos de una manera más eficiente (Mardis, 2008). Ahora que la secuenciación es más rápida y más precisa, el uso de secuencias para identificar polimorfismos de un solo nucleótido es una herramienta común. Sin embargo, la secuenciación de genomas en plantas, las cuales tienen un alto número de secuencias repetitivas, se ha visto limitado por tiempo y costo. Importantemente, la mayoría de los genes están localizados en regiones no repetitivas (Elshire et al., 2011). El genotipado-por-secuenciación (GBS) es un enfoque que reduce la complejidad del genoma, utilizando enzimas de restricción que eligen como blanco regiones no repetitivas y luego secuencia únicamente esas regiones (Poland, Brown, Sorrells, & Jannink, 2012). GBS fue llevado a cabo por primera vez por Elshire y colaboradores (2011) en maíz y cebada (*Hordeum vulgare*), y está basado en la creación de librerías de ADN utilizando enzimas de restricción y PCR para amplificar un sub-set de fragmentos de ADN. Las librerías son secuenciadas después. Schröder y colaboradores (2016) mejoraron la calidad de datos de GBS para *P. vulgaris*, utilizando las enzimas de restricción *MseI* y *TaqαI*, las cuales permitieron la identificación de más SNPs, porque las enzimas tienen como blanco regiones de baja repetitividad del genoma de *P. vulgaris*.

9 Estado del arte

C. lindemuthianum es un patógeno que afecta el cultivo de frijol mundialmente, tiene una alta variabilidad patogénica y se puede transmitir por semilla infectada. La raza 73 es una de las razas que se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano y más de 100 razas del patógeno se han reportado a nivel mundial utilizando un panel de genotipos diferenciales estándar de frijol para antracnosis (Ferreira et al., 2013; Gonzáles et al, 2015). Estudios previos donde se haya utilizado germoplasma de frijol pertenecientes al acervo Mesoamericano o Andino con razas del patógeno han demostrado la existencia de fuentes de resistencia (Zuiderveen, Padder, Kamfwa, Song, & Kelly, 2016; Wu, Zhu, Wang, & Sang, 2017).

Pocos estudios han utilizado razas de *C. lindemuthianum* y accesiones de frijol de Guatemala de manera sistemática para la identificación de fuentes de resistencia. En 2017,

Maldonado-Mota, identificaron fuentes de resistencia en la colección de frijoles volubles del altiplano de Guatemala y lograron identificar regiones genómicas asociadas a la resistencia para la raza 73 de *C. lindemuthianum* en los cromosomas Pv04 y Pv07. Similarmente, Montejo, Dardón, Villatoro, Aldana, y Osorno (2017), en un estudio utilizando diferentes razas de Roya del frijol (*Uromyces appendiculatus*) lograron identificar fuentes de resistencia en el germoplasma de frijol voluble de Guatemala.

Varios estudios de diversidad genética se han hecho en los últimos años, incluyendo el estudio de diversidad genética en los frijoles volubles de Guatemala realizado por Tobar-Piñón (2017), en donde se confirma que los frijoles volubles de Guatemala contienen diversidad genética y son una raza diferente a las conocidas con anterioridad, a esta nueva raza se le denomina raza Guatemala. Esta raza fue inicialmente sugerida por Beebe y colaboradores (2000), y confirmada a pequeña escala por otras investigaciones (Blair et al., 2009; Blair et al., 2013; Chacón, Pickersgill, & Debouck, 2005; Ponciano-Samayoa, Villatoro-Mérida, & Molina, 2009). Estos estudios confirman el potencial de diversidad que tienen los frijoles guatemaltecos para ser evaluados por características de interés agronómico y económico.

10 Objetivo general

Generar información genética para el mejoramiento del cultivo de frijol en Guatemala.

11 Objetivos específicos

Determinar si la colección de germoplasma de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala muestra resistencia a antracnosis.

Identificar parentales con resistencia a antracnosis para mejoramiento de frijol común en Guatemala.

12 Hipótesis

H1: Al menos una accesión de la colección de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala presenta resistencia a las razas 585 o 3981 de *C. lindemuthianum*.

H2: Al menos una accesión de la colección de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala presenta características agronómicas de importancia para poder ser utilizada como parental en planes de cruzamiento.

13 Materiales y métodos

13.1 Enfoque y tipo de investigación

13.1.1 Enfoque de investigación

En este estudio la investigación será cuantitativa debido a los datos que serán recolectados y utilizados en análisis estadísticos para generar los resultados esperados.

13.1.2 Tipo de investigación

El tipo de investigación en este estudio es una investigación básica y exploratoria. Esto debido a que la investigación generará conocimiento que permitirá ser utilizado para resolver problemas en futuras investigaciones aplicadas. Es exploratoria ya que se evaluó germoplasma en el cual se desconocían sus características agronómicas potenciales.

13.2 Recolección de la información

Los datos fueron colectados el laboratorio e invernaderos de ICTA. Para la identificación de resistencia del germoplasma a antracnosis se utilizará el modelo estadístico completamente al azar: $y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$ donde: y_{ij} : variable de respuesta observada o media en la ij -ésima unidad experimental, μ : es la media general. τ_i : es el efecto del i -ésimo nivel del tratamiento en la variable dependiente. ε_{ijk} = error experimental asociado a la ij -ésima unidad experimental. El número de repeticiones fue de cinco debido a la disponibilidad de semilla y cada unidad experimental fue conformada por cinco plantas sembradas en bandejas plásticas. Se evaluaron 216 accesiones de frijol arbustivo con cada raza de *C. lindemuthianum*, las cuales fueron aplicadas en todos los genotipos del germoplasma de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala. La variable de respuesta a medir fue la severidad de la enfermedad.

Para la evaluación de la enfermedad se utilizó una escala visual de 1-9 (Tabla 2) en las plantas que presentaron síntomas de la enfermedad para cuantificar la severidad.

Tabla 2.

Escala para evaluar la severidad de antracnosis.

Escala	Fenotipo	Síntomas
1	Resistente	No visible
2	Resistente	Lesiones muy pequeñas en tallo, hojas y venas
3	Resistente	Lesiones pequeñas en tallo, hojas y venas.
4-5	Susceptible	Presencia de varias lesiones pequeñas en tallo, hojas y venas
6-7	Susceptible	Numerosas lesiones en tallo, hojas y venas, evidente lesión necrótica
8	Susceptible	Daño necrótico severo en tallos, hojas y venas
9	Susceptible	Necrosis severa y muerte de la planta

Fuente: modificado de Van Schoohoven, A., & Pastor-Corrales, M.A., (1987)

Para el análisis de diversidad genética se utilizaron 216 accesiones de frijol arbustivo de la colección del altiplano de Guatemala, tomando dos plantas de cada genotipo para su extracción de ADN y creación de librerías para su posterior secuenciación.

13.3 Técnicas e instrumentos

13.3.1 Identificación de resistencia del germoplasma

Material vegetal: Las diferenciales para antracnosis de frijol fueron utilizadas como testigo resistente (Michigan Dark Red Kidney, MDRK) y susceptible (Cornell 49242), para determinar que la raza que se está utilizando es la correcta. 216 accesiones de frijol arbustivo provenientes del germoplasma del altiplano de Guatemala fueron evaluadas (Figura 1).



Figura 1. Colección de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala.

Aislamientos de *C. lindemuthianum*: Las razas 585 y 3981 de *C. lindemuthianum* provenientes de una colecta que se realizó en el año 2016 (Maldonado-Mota, 2017) en el altiplano

de Guatemala fueron utilizadas en la evaluación para poder identificar plantas con resistencia al patógeno.

Crecimiento de micelio y esporulación: El micelio de las diferentes razas de *C. lindemuthianum* se encuentra almacenados en ICTA en sobres que contienen silica gel. Para revivir el micelio proveniente de una sola hifa se colocó una pieza del micelio en un medio de agar (20g L⁻¹) o APDA (PDA 25.6g L⁻¹ PDA y 14 gotas de ácido láctico al 50 %). Las cajas Petri fueron incubadas durante 4-7 días en la oscuridad a 22 °C, hasta que el crecimiento del micelio se pudo observar (Castellanos et al., 2016). Después de haber revivido el micelio, una pieza del agar que contenía el micelio se colocó en nuevas cajas petri estériles que contenían agar y hojas de frijol jóvenes esterilizadas (Figura 2). Esto con el fin de mejorar la esporulación del patógeno. Las cajas petri que contenían el micelio de cada raza de *C. lindemuthianum* y la hoja estéril fueron incubadas en oscuridad a 22 °C durante 15 días.

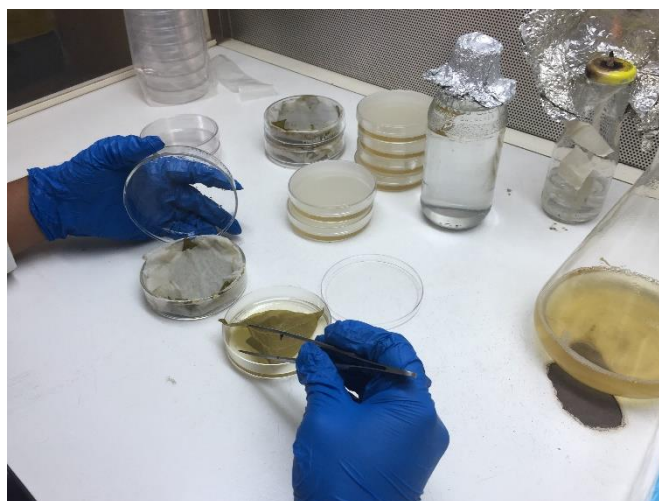


Figura 2. Incremento de *C. lindemuthianum* en el laboratorio.

Siembra del germoplasma de frijol voluble del altiplano de Guatemala: Cinco plantas de las dos diferenciales y cinco plantas de cada genotipo de las 216 accesiones del germoplasma de frijol arbustivo, fueron sembradas en bandejas de 25 x 50 cm, en medio de crecimiento (turba) y se mantuvieron bajo invernadero para mantener condiciones climáticas adecuadas para su crecimiento, hasta que las plantas mostraron la primera hoja trifoliada (V1).

Inoculación del hospedero: Después de que las cajas Petri con *C. lindemuthianum* presentaron esporulación, se obtuvo una suspensión con esporas del patógeno de la siguiente

forma: 10 ml de agua destilada aplicadas en la caja petri que contenía las esporas, el medio fue frotado con una espátula estéril. La suspensión se filtró con gaza para separar partículas innecesarias (residuos de agar, etc) de la conidia y se virió en un beaker (Castellanos et al., 2016). El hemocitómetro se utilizó para contar el número de esporas según el protocolo descrito por Bastidas (2017) y la concentración se ajustó a 1.2×10^6 conidia por mL^{-1} . La aplicación de la suspensión se hizo por medio de un nebulizador (o compresor de aire). Las plantas se inocularon hasta que estuvieran mojadas las hojas y los tallos. Después de la inoculación las plantas se mantuvieron en una cámara húmeda (> 80 % de humedad) durante un rango de 48 -72 horas. Al sacar las plantas de la cámara húmeda se colocaron en el invernadero y los síntomas de antracnosis fueron observados 8 a 10 después. La severidad de la enfermedad se midió por medio de la escala visual estándar (1-9) para la enfermedad. Las plantas resistentes se midieron de 1-3 y las plantas susceptibles de 4-9.

13.3.2 Criterios de selección para identificación de parentales

El frijol se cultiva en varios sistemas de producción, estos sistemas existen según la conveniencia de región, localidad, área a sembrar, precipitación pluvial, suelos. Cada sistema tiene su potencial para ser productivo y esta respuesta está sujeta al mejoramiento genético de variedades de frijol. Las plantas de frijol arbustivo provenientes de las accesiones colectadas en Guatemala que fueron seleccionadas para ser parentales donadores de resistencia debían poseer rasgos agronómicos de interés: ser de tipo arbustivo, de preferencia con habito de crecimiento tipo I, tipo II o tipo III debido a que el mejoramiento para el cultivo estará enfocado para un sistema que utilice solo frijol arbustivo donde se prefieren plantas erectas (Rosas, Castro, & Flores, 2000). Se buscaron plantas precoces ya que la precocidad de la planta es un factor importante, en el frijol la precocidad puede ser un mecanismo para evitar estrés por factores abióticos (falta de lluvia, heladas), o bien puede ser útil según la necesidad que el agricultor quiera cubrir (buen precio, alimentación). Lo que define a una planta que sea precoz depende del sistema de cultivo que tenga y las condiciones climáticas que pueden afectar la respuesta fenotípica de la planta (White & Singh, 1991).

13.3.3 Generación de librerías de ADN genómico

Para la colección nacional de frijol arbustivo de Guatemala, el tejido se colectó de la primera hoja trifoliada de dos plantas previamente sembradas en bandejas con turba en el invernadero y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml 15 días después de la siembra. Los tubos fueron congelados inmediatamente utilizando nitrógeno líquido. La extracción y aislamiento de ADN se hizo utilizando el kit de extracción de IBI Scientific. Las muestras de ADN se cuantificaron después utilizando un fluorómetro (Quantus®) y se evaluaron en un gel de agarosa al 2 %. Las muestras se ajustaron a 20 ng/μl.

Genotipado-por-secuenciación (GBS): Las muestras de ADN fueron transferidas a platos de 96 celdas para ser procesadas simultáneamente. En este estudio se utilizó el protocolo optimizado de genotipado-por-secuenciación para frijol común, desarrollado por Schröder y colaboradores (2016). Las librerías quedaron listas para ser enviadas a secuenciar.

13.4 Análisis de datos

Después de haber cuantificado la severidad de la enfermedad acorde a la escala visual de CIAT, se realizó para el análisis estadístico de la resistencia a antracnosis una media ponderada (LS Means) utilizando el software InfoStat® y se determinó el porcentaje de accesiones completamente resistentes a cualquiera de las dos razas del patógeno.

13.5 Operacionalización de las variables

Tabla 3. *Operacionalización de las variables o unidades de análisis*

Objetivos específicos	Variables	Cuantificación
Determinar si la colección de germoplasma de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala muestra resistencia a antracnosis.	Severidad de la enfermedad	Escala visual CIAT de 1 a 9.
Identificar parentales con resistencia a antracnosis para mejoramiento de frijol común en Guatemala.	Color de grano, brillo del grano, arquitectura de la planta, precocidad y resistencia.	Toma de datos visual en campo.

13.6 Procesamiento y análisis de la información

Para el análisis estadístico de la resistencia a antracnosis se utilizó una media ponderada (LS Means) utilizando el software SAS y se determinó el porcentaje de accesiones completamente resistentes a cualquiera de las dos razas del patógeno.

14 Vinculación, difusión y divulgación

Esta investigación se llevó a cabo con investigadores del ICTA y con apoyo de la facultad de agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El ICTA brindó además las instalaciones, varios insumos de laboratorio y el equipo para la elaboración de librerías de ADN e inoculación del patógeno en el invernadero. La información será publicada como un artículo científico en la revista Ciencia, Tecnología y Salud de la DIGI.

15 Productos, hallazgos, conocimientos o resultados

15.1 Determinación de fuentes de resistencia del germoplasma arbustivo

Según el análisis realizado utilizando el inóculo de la raza 585 de *C. lindemuthianum* en las líneas del germoplasma de frijol arbustivo se pueden observar 67 genotipos con valores de 1 a 3 (resistente) según la escala estándar visual de severidad para antracnosis (Tabla 4). La figura 3 muestra la sintomatología de la enfermedad en una de las accesiones evaluadas.

Tabla 4.

Genotipos resistentes (escala 1-3) del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala a la raza 585 de C. lindemuthianum.

Orden	Entrada	LSMeans raza 585
81	Guate-547	1
89	Guate-560	1
163	Vaina Blanca	1
136	Guate-681	1
190	La Estancia-89	1
202	Rabinal-118	1
78	Guate-542	1
23	Guate-161	1
24	Guate-167	1
189	Aguacatán-85	1
196	Tac Tic-109	1
171	La Alameda -4	1

Tabla 4 (continuación).

Genotipos resistentes (escala 1-3) del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala a la raza 585 de C. lindemuthianum.

Orden	Entrada	LSMeans raza 585
140	Guate-1207	1
114	Guate-642	1
94	Guate-572	1
124	Guate-665	1
119	Guate-655	1
172	San Martín Jilotepeque- 6	1
188	Chiquiyaba-83	1
198	Tac Tic-112	1
35	Guate-249	1
82	Guate-549	1
43	Guate-383	1
100	Guate-615	1
178	Los Corralitos-29	1
154	Guate-1339	1.11
90	Guate-561	1.11
167	Línea -17	1.11
117	Guate-651	1.17
19	Guate-145	1.17
38	Guate-261	1.17
201	Rabinal-117	1.22
83	Guate-550	1.25
209	Kaka Kinac	1.28
139	Guate-1195	1.33
118	Guate-654	1.33
175	Sn Andres Itzapa-12	1.33
91	Guate-563	1.33
206	El Sunso-33	1.33
197	Tac Tic-110	1.39
142	Guate-1210	1.5
79	Guate-544	1.5
11	Guate-131	1.67
177	San Miguel Chaparron-21	1.67
53	Guate-421	1.83
64	Guate-450	1.89
104	Guate-622	2
7	Guate-121	2
138	Guate-1163	2
9	Guate-126	2.11

Tabla 4 (continuación).

Genotipos resistentes (escala 1-3) del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala a la raza 585 de *C. lindemuthianum*.

Orden	Entrada	LSMeans raza 585
5	Guate-112	2.11
101	Guate-617	2.17
200	Salamá-116	2.33
85	Guate-552	2.33
61	Guate-436	2.33
126	Guate-667	2.33
207	Quetzaltenango-56	2.33
80	Guate-546	2.39
32	Guate-228	2.5
37	Guate-260	2.5
6	Guate-113	2.67
25	Guate-192	2.67
16	Guate-140	2.83
204	San Miguel Chicaj-133	2.89
93	Guate-568	2.89
128	Guate-669	3
13	Guate-133	3



Figura 3. Reacción de plantas inoculadas con el patógeno de frijol *C. lindemuthianum* raza 585 bajo invernadero.

Mientras que hubo 21 accesiones del germoplasma de frijol arbustivo resistentes (escala 1-3) para la raza 3981 de *C. lindemuthianum* (Tabla 5).

Tabla 5.

Genotipos resistentes (escala 1-3) del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala a la raza 3981 de C. lindemuthianum.

Orden	Entrada	LSMeans raza 3981
81	Guate-547	1
89	Guate-560	1
154	Guate-1339	1
163	Vaina Blanca	1
197	Tac Tic-110	1
209	Kaka Kinac	1
83	Guate-550	1.1
53	Guate-421	1.21
136	Guate-681	1.21
200	Salamá-116	1.21
190	La Estancia-89	1.22
202	Rabinal-118	1.42
78	Guate-542	1.46
191	Sacapulas-96	2.33
73	Guate-537	2.42
86	Guate-553	2.49
46	Guate-388	2.57
23	Guate-161	2.66
90	Guate-561	2.67
80	Guate-546	2.93
24	Guate-167	2.97

15.2 Identificación de parentales con resistencia a antracnosis

Según el análisis realizado utilizando las razas de 585 y 3981 *C. lindemuthianum*, las líneas que presentaron valores de 1 a 3 según la escala estándar visual de severidad para antracnosis, son resistentes. Ya que la raza 3981 del patógeno, es más virulenta que la raza 585, los parentales seleccionados fueron aquellos que presentaron resistencia (1-3) a ambas razas (Tabla 6) según la escala visual estándar. Además, de seleccionar por color de grano, se investigaron datos sobre los días a floración, días a cosecha, el hábito de crecimiento y el peso de 100 granos de los genotipos a utilizar como parentales con resistencia a antracnosis.

Tabla 6.

Características de líneas resistentes del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala y líneas comerciales de ICTA.

Orden	Entrada	Severidad Raza 585 ³	Severidad Raza 3981	Color de Grano	DAF ¹	DAC ²	Habito de crecimiento	Peso 100 granos (g)
81	Guate-547	1	1	Negro	63	95	II	24.6
89	Guate-560	1	1	Negro	60	95	I	28.4
154	Guate-1339	1.11	1	Negro	56	128	II	35.4
163	Vaina Blanca	1	1	Negro	41	95	-	27.2
197	Tac Tic-110	1.39	1	Negro	38	100	III	20.2
209	Kaka Kinac	1.28	1	Rojo	-	-	-	22
83	Guate-550	1.25	1.1	Negro	50	93	I	27.4
53	Guate-421	1.83	1.21	Negro	59	93	II	20.7
136	Guate-681	1	1.21	Negro	50	128	I	26
200	Salamá-116	2.33	1.21	Rojo	48	98	II	27.6
190	La Estancia-89	1	1.22	Negro	46	101	I	28.4
202	Rabinal-118	1	1.42	Negro	48	98	II	31
78	Guate-542	1	1.46	Negro	68	93	I	33.4
23	Guate-161	1	2.66	Negro	78	160	I	28
90	Guate-561	1.11	2.67	Negro	60	95	I	25
80	Guate-546	2.39	2.93	Negro	62	95	II	29.4
24	Guate-167	1	2.97	Rojo	40	70	I	27.2
-	ICTA Altense	9	9	Negro	50	120	II	26.3
-	ICTA Hunapú	9	9	Negro	50	120	II	28.2
-	ICTA Texel	9	9	Negro	40	100	III	27.1
-	ICTA Superchiva	9	9	Negro	45	120	II	22.4

¹DAF = Días a floración; ²DAC = Días a cosecha; ³La severidad de las razas de *C. lindemuthianum* está en la escala 1-9 donde 1 es completamente resistente y 9 completamente susceptible.

15.3 Generación de librerías de ADN genómico

Se logró extraer buena calidad de ADN de las 216 accesiones evaluadas. Utilizando la metodología GBS se crearon 4 librerías de 54 muestras cada una, las cuales serán enviadas a secuenciar posteriormente.

16 Análisis y discusión de resultados

16.1 Determinación de fuentes de resistencia del germoplasma arbustivo

De un total de 216 accesiones inoculadas con la raza 585 de *C. lindemuthianum*, 67 presentaron resistencia (escala 1-3), 71 fueron moderadamente resistentes (escala 4-6) y 78 fueron susceptibles (escala 7-9). Lo que significa que el 31% del germoplasma es resistente para esta raza del patógeno. Utilizando la raza 3981 de *C. lindemuthianum* el germoplasma de frijol arbustivo reaccionó de la siguiente forma: 21 accesiones presentaron resistencia (escala 1-3), 47 fueron moderadamente resistentes (escala 4-6) y 148 susceptibles (escala 7-9); esto significa que el 9.7% del germoplasma es resistente para esta raza del patógeno.

La raza 585 es la más frecuente en el altiplano de Guatemala y es virulenta a los genes de resistencia *Co-2*, *Co-3*, *Co-5*, y *Co-11*. La raza 3981 es una de las más virulentas reportadas en Guatemala, y es virulenta a los genes de resistencia *Co-13*, *Co-2*, *Co-3³*, *Co-3⁵*, *Co-4*, *Co-4²*, *Co-4³*, *Co-5*, *Co-6*, *co-8*, *Co-11*, superando casi a todos los genes de resistencia del acervo genético Mesoamericano conocido en las diferenciales estándar. Es de resaltar que esta raza es virulenta a la diferencial Perry Marrow, la cual contiene *Co-1³* un gen del acervo genético Andino (Melotto & Kelly, 2000), y también fue virulenta a G2333 una diferencial estándar de antracnosis que es muy utilizada para brindar una amplia resistencia a razas de *C. lindemuthianum* de origen mesoamericano (Pastor-Corrales et al., 1994). También la raza 3981 fue virulenta a Jalo Listras Pretas (*Co-13*), Corinthiano (*Co-15*), Paloma (*Co-Pa*), Amendoim Cavallo (*Co-AC*) y Perla (*Co-Pe*) (Maldonado-Mota, 2017). Interesantemente, la raza 3981 *C. lindemuthianum* es menos virulenta con la diferencial México 222 (Mexique 1), la cual contiene *Co-3*, pero en este estudio las calificaciones estuvieron por encima de 3 (resistente) según la escala visual de virulencia, por lo que se considera reevaluar la raza del patógeno para determinar si su nomenclatura es superior a la actual.

El germoplasma de frijol arbustivo se había mantenido en la estación experimental del ICTA, en el Centro de Investigación del Altiplano Central (CIALC), ubicado en La Alameda, Chimaltenango, pero nunca había sido evaluado con alguna raza de *C. lindemuthianum* de una forma sistematizada para poder determinar potenciales fuentes de resistencia. Después de haber cuantificado la reacción de los genotipos se puede deducir, debido a la reacción de las diferencias estándar de antracnosis que los únicos genes disponibles para la resistencia de la raza 3981 del patógeno son genes de origen Andino que contengan *Co-1*, *Co-1²*, *Co-1⁴*, *Co-1⁵*, *Co-12*, *Co-14*, y *Co-18* (Mendoza et al., 2001; Schwartz, Pastor-Corrales, & Singh, 1982; Freyre et al., 1998; Vallejo, Awale, & Kelly, 2003; Balardin & Kelly, 1998; Melotto & Kelly, 2000; Alzate-Marin et al., 2003; Gonçalves-Vidigal, Vallejo, & Kelly, 2003).

Las líneas que presentan resistencia serán evaluadas posteriormente para poder determinar el locus que esté involucrado, con la ayuda de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia reportados (Kelly & Vallejo, 2004). Los marcadores moleculares pueden ser utilizados para realizar un tamizado de los genotipos que mostraron resistencia, para determinar la existencia de un locus *Co* reportado con anterioridad o un posible locus que no haya sido reportado. En Pv01, se han reportado regiones genómicas que están involucradas en la resistencia de patógenos, estas regiones son útiles para determinar la existencia de genes *Co* de origen Andino (Gepts, 1988; Kelly & Vallejo, 2004). Mientras que en los demás cromosomas se ha reportado la existencia de genes *Co* de origen Mesoamericano (Kelly & Vallejo, 2004)

Sin embargo, en este estudio el germoplasma evaluado proviene de frijoles arbustivos de origen Mesoamericano. Es posible que la diversidad existente en el germoplasma de frijol arbustivo evaluado de origen Mesoamericano (Beebe et al., 2000; Singh et al., 1991) tenga genes existentes en Pv01 que no han sido estudiados, o que existan genotipos que hayan sido introducidos con anterioridad y sean de origen Andino. También es probable que exista un nuevo locus involucrado en la resistencia que aún no ha sido reportado. Ya que el centro de origen del frijol es Mesoamérica, es posible que en los germoplasmas Mesoamericanos de frijol a nivel nacional existan genotipos con regiones conservadas del acervo genético Andino que ofrezcan resistencia a patógenos en la región del cromosoma Pv01. O bien, la coevolución entre el hospedero y el patógeno pudo haber ejercido una presión de selección, para el germoplasma de frijol arbustivo en el cual se haya generado variabilidad genética que ofrezca una amplia resistencia.

En este estudio se demuestra que el germoplasma de frijol arbustivo se puede explotar para encontrar resistencia para *C. lindemuthianum*, se recomienda, que el germoplasma sea evaluado con otros factores bióticos y abióticos que afectan la producción del cultivo. También, se recomienda que se realice un estudio para determinar la variabilidad genética de este germoplasma.

16.2 Identificación de parentales con resistencia a antracnosis

Las líneas que presentan una amplia resistencia, color de grano negro opaco y con semilla de tamaño aceptable fueron seleccionadas para utilizarse en los bloques de cruzamiento de frijol de ICTA. En la Tabla 6, podemos apreciar que hay 9 genotipos de frijol arbustivo de grano negro con valores de 1 o cercano (resistente), y dos de color rojo con el mismo valor de resistencia. Los otros genotipos con valor por encima de dos, siguen siendo resistentes.

En la actualidad, para el altiplano de Guatemala existen cuatro líneas comerciales de frijol arbustivo del ICTA (ICTA Hunapú, ICTA Texel, ICTA Superchiva, ICTA Altense) y ninguna es resistente a las dos razas del patógeno utilizadas en este estudio. De las accesiones que resultaron resistentes para ambas razas, varias fueron seleccionadas debido a sus características agronómicas: la accesión Guate-1339, presenta según los registros de Cojulún (1976), días a floración (56 días) y días a cosecha un poco más tardío (128 días) que los testigos comerciales de frijol arbustivo del ICTA para el altiplano, pero el peso de 100 semillas (35.4g) es superior a los testigos comerciales. La accesión Vaina Blanca, es una línea con días a floración (41 días) y días a cosecha (95 días) precoces y se puede comparar con el testigo ICTA Texel, el más precoz de los testigos comerciales para el altiplano. En peso de 100 semillas Vaina Blanca, es similar a ICTA Texel. La accesión Guate-560, es superior en peso de 100 semillas (28.4g) a todos los testigos comerciales de ICTA, es más tardío en su floración (60 días), pero en días a cosecha es precoz (95 días). La accesión La Estancia-89, presenta precocidad similar al testigo ICTA Texel, y presenta un peso de 100 semillas superior (28.4) a los testigos comerciales. Rabinal-118, tiene un peso de 100 semillas superior (31g) a los testigos comerciales, en días a floración es tardío (48 días) en comparación a los testigos, pero en días a cosecha es precoz (101 días). La accesión Guate-542, también tiene un peso de 100 semillas superior (33.4g) a los testigos comerciales de ICTA, pero es tardío en la floración (68 días), aunque según los registros, la cosecha se hace a los 93 días. Guate-546, con un peso de 100 semillas superior (29.4g) a los testigos comerciales tiene días a floración (62 días) y días a cosecha (95 días) similares a Guate-542, esto significa que estas dos accesiones son precoces

para la cosecha en comparación a los testigos de ICTA. Por último, la accesión Guate-167 tiene un peso de 100 semillas superior (27.2) al testigo ICTA Texel y es similar en precocidad para floración (40 días) y cosecha (70 días).

Para estas accesiones que fueron seleccionadas para formar parte de los parentales de los bloques de cruzamiento para resistencia a antracnosis, es recomendable evaluarlas en campo para poder corroborar los datos anteriormente mencionados, también los datos de arquitectura de planta y rendimiento ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) previo a ser utilizados en los bloques de cruza.

Una de las fuentes de resistencia utilizadas en bloques de cruzamientos en ICTA, ha sido la diferencial estándar de antracnosis G2333 que contiene los genes ($Co-4^2$, $Co-5^2$ y $Co-3^5$), también conocida como Colorado de Teopisca, procedente de Chiapas, México, es una planta de hábito de crecimiento tipo IV (frijol de enredo), con semilla de color rojo brillante y tamaño pequeño (Pastor-Corrales et al., 1994). Sin embargo, al utilizar un genotipo de frijol voluble (tipo IV) y un frijol arbustivo (tipo II), en un bloque de cruza se presentan ciertos inconvenientes, la sincronía floral es un problema, el frijol tipo IV tiene una floración más tardía en comparación a un frijol con hábito de crecimiento tipo II (White & Singh, 1991). Mientras que, con las nuevas fuentes de resistencia encontradas en este estudio, la floración es similar, entonces esto evita problemas con la sincronía floral de los materiales a cruzar. Otra ventaja de las accesiones seleccionadas es que presentan color grano negro opaco, al momento de obtener el producto del cruzamiento, no se obtendrá segregación de semilla de color rojo y brillante. Esto significa que habrá más posibilidades de obtener genotipos con resistencia y con grano que tenga características de interés. Por lo tanto, la línea G2333, podría seguir utilizándose para realizar cruzamientos con genotipos de frijol tipo IV (enredo) y utilizar las nuevas fuentes de resistencia para cruzamiento de genotipos arbustivos tipo II. Así mismo, recomendamos no utilizar solo una fuente de resistencia al patógeno causal de antracnosis para evitar la pérdida de resistencia a través del tiempo.

Finalmente, se recomienda poder realizar más evaluaciones con otras razas del patógeno *C. lindemuthianum* en los genotipos resistentes con valor 1 según la escala visual de severidad, para poder determinar la amplitud de la resistencia, asimismo empezar a realizar estudios para determinar el gen que confiere la resistencia y utilizar las plantas resistentes para cruza útiles para el mejoramiento del frijol común en Guatemala.

17 Conclusiones

Este estudio sugiere que el germoplasma de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala es una potencial fuente de resistencia contra la virulencia de las dos razas del patógeno evaluadas. El uso de poblaciones de líneas endogámicas recombinadas o F2 se sugieren para utilizar selección asistida por marcadores (SAM), para la determinación del locus involucrado en la resistencia de los genotipos resistentes. También, se recomienda poder hacer la secuenciación del germoplasma de frijol arbustivo del altiplano de Guatemala para poder determinar regiones genómicas asociadas a la resistencia de patógenos del frijol.

Los resultados que se obtuvieron en esta investigación son de gran importancia, ya que las líneas resistentes pueden ser utilizadas para hacer introgresión de resistencia en líneas de interés, no solo del programa de mejoramiento de frijol común de Guatemala, sino en otros programas de mejoramiento a nivel mundial.

Las librerías de ADN que fueron generadas servirán para ser secuenciadas y evaluar la cantidad de polimorfismos presentes en la población para estudios de diversidad y estudios de asociación con genes de interés agronómico.

18 Impacto esperado

Este proyecto de investigación contribuye en la identificación de genotipos resistentes al patógeno de frijol *C. lindemuthianum*, el cual puede ser utilizado como base en bloques de cruzamientos de frijol común para el desarrollo de nuevas variedades del cultivo a nivel nacional resistente a enfermedades. También se espera que este germoplasma sea de utilidad para programas de mejoramiento de frijol común a nivel mundial.

19 Referencias

- Acosta-Gallegos, J. A., Kelly, J. D., & Gepts, P. (2007). Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Science*, 47(3), S-44.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4), 617-631.
- Akibode, S., & Maredia M. K. (2012). Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops. Recuperado de <https://impact.cgiar.org/sites/default/files/images/Legumetrendsv2.pdf>
- Alzate-Marin, A. L., Costa, M. R., Arruda, K. M., De Barros, E. G., & Moreira, M. A. (2003). Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. *Euphytica*, 133(2), 165-169.
- Allard, R. W. (1999). Principles of plant breeding. John Wiley & Sons.
- Awale, H., Falconí-Castillo, E., Villatoro-Mérida, J., & Kelly, J. (2008). Caracterización de aislamientos de *Colletotrichum lindemuthianum* de Ecuador y Guatemala para identificar genes de resistencia. *Agronomía Mesoamericana*, 19, 1-6. doi:<https://doi.org/10.15517/am.v19i1.5016>.
- Balardin, R. S., Jarosz, A. M., & Kelly, J. D. (1997). Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. *Phytopathology*, 87(12), 1184-1191.
- Balardin, R. S., & Kelly, J. D. (1998). Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(6), 1038-1047.
- Bastidas, O. (2017). Cell counting with Neubauer Chamber basic hemocytometer usage technical note. Recuperado de <https://www.scribd.com/document/116101966/Cell-Counting-Neubauer-Chamber>.
- Beebe, S., Skroch, P. W., Tohme, J., Duque, M. C., Pedraza, F., & Nienhuis, J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*, 40, 264-273.
- Bertan, I., Carvalho, F. I. F., & Oliveira, A. D. (2007). Parental selection strategies in plant breeding programs. *Journal of crop science and biotechnology*, 10(4), 211-222.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., ... & Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(114), E788-796.
- Blair, M. W., Díaz, L. M., Buendía, H. F., & Duque, M. C. (2009). Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 119(6), 955-972.
- Blair, M. W., Cortés, A. J., Penmetsa, R. V., Farmer, A., Carrasquilla-Garcia, N., & Cook, D. R. (2013). A high-throughput SNP marker system for parental polymorphism

- screening, and diversity analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126(2), 535-548.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus spp.*)—model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55-128.
- Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2016). Bean pathogens: practical guide for lab and greenhouse work. 2nd ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 257 p.
- Chacón, M. I., Pickersgill, B., & Debouck, D. G. (2005). Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 432-444.
- Chávez, O. (1980). Anthracnose. En H.F. Schwartz, G.E. Galvez (Eds), *Bean Production Problems: Disease, insect, soil and climatic constrains of Phaseolus vulgaris*. Cali, Colombia: CIAT.
- Chen, Y. Y., Conner, R. L., Gillard, C. L., Boland, G. J., Babcock, C., Chang, K. F., ... & Balasubramanian, P. M. (2007). A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. *Plant disease*, 91(10), 1271-276.
- Del Río, L., & Bradley, C. A. (2002). *Anthracnose of dry beans*. NDSU Extension Service. North Dakota Agricultural Experiment Station.
- De Lima Castro, S. A., Gonçalves-Vidigal, M. C., Gilio, T. A. S., Lacanallo, G. F., Valentini, G., Martins, V. D. S. R., ... & Pastor-Corrales, M. A. (2017). Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. *BMC genomics*, 18(1), 306.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS One*, 6(5), e19379.
- Ferreira, J. J., Campa, A., & Kelly, J. D. (2013). Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. *Translational Genomics for Crop Breeding: biotic stress*, 1, 151-181.
- Freyre, R., Skroch, P. W., Geffroy, V., Adam-Blondon, A. F., Shirmohamadali, A., Johnson, W. C., ... & Tohme, J. (1998). Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5-6), 847-856.
- Gepts, P. (1988). A Middle American and an Andean common bean gene pool. En *Genetic resources of Phaseolus beans* (pp. 375-390). Springer, Dordrecht.
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Vallejo, V., & Kelly, J. D. (2003). Characterization of the anthracnose resistance in the differential cultivar Widusa. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.*, (46).
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Lacanallo, G. F., Vidigal Filho, P. S. (2008). A new gene conferring resistance to anthracnose in Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Jalo Vermelho. *Plant Breed*, 127, 592–596.

- Gonçalves-Vidigal, M. C., Cruz, A. S., Garcia, A., Kami, J., Vidigal Filho, P. S., Sousa, L. L., ... & Pastor-Corrales, M. A. (2011). Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1⁴* genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND277. *Theoretical and applied genetics*, 122(5), 893-903.
- Gonçalves-Vidigal, M. C., Pedro Filho, S. V., Medeiros, A. F., & Pastor-Corrales, M. A. (2009). Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance gene. *Crop science*, 49(1), 133-138.
- González, A. M., Yuste-Lisbona, F. J., Rodiño, A. P., De Ron, A. M., Capel, C., García-Alcázar, M., ... & Santalla, M. (2015). Uncovering the genetic architecture of *Colletotrichum lindemuthianum* resistance through QTL mapping and epistatic interaction analysis in common bean. *Frontiers in plant science*, 6, 141.
- Gragnolati, M., & Marini, A. (2003). Malnutrition and poverty in Guatemala (Vol. 2967). World Bank Publications.
- Cojulún, R. (1976). *Libro de campo evaluación de germoplasma de frijol arbustivo y voluble*. P. 1-40. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas.
- Kazimoto, G. K. (2016). *Identification of Colletotrichum Lindemuthianum and introgression of its resistance gene (s) to common bean (Phaseolus Vulgaris L.) adapted in Tanzania* (Doctoral dissertation, Sokoine University of Agriculture).
- Kelly, J. D., & Vallejo, V. A. (2004). A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience*, 39(6), 1196-1207.
- Loveless, M. D., & Hamrick, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15(1), 65-95.
- Maldonado-Mota, C. R. (2017). *Identification of new sources of resistance to anthracnose in climbing bean germplasm from Guatemala* (Masters dissertation, North Dakota State University).
- Mahuku, G. S., & Riascos, J. J. (2004). Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3), 253-263.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24(3), 133-141.
- Markell, S., Wunsh, M., & del Rio, L. (2012). *Anthracnose of dry beans*. NDSU Extension Service. North Dakota Agricultural Experiment Station.
- Melotto, M., & Kelly, J. D. (2000). An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. *Euphytica*, 116(2), 143-149.
- Mendoza, A., Hernández, F., Hernández, S., Ruíz, D., de la Vega, O. M., Mora, G., ... & Simpson, J. (2001). Identification of *Co-1* anthracnose resistance and linked molecular markers in common bean line A193. *Plant disease*, 85(3), 252-255.

- Meziadi, C., Richard, M. M., Derquennes, A., Thareau, V., Blanchet, S., Gratias, A., ... & Geffroy, V. (2016). Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. *Plant Science*, 242, 351-357.
- MAGA (2013). Precios de frijol negro: producción de frijol negro. Recuperado de https://www.maga.gob.gt/wp-content/uploads/pdf/home/diplan/fn/informacion_de_precios_frijol_negro_2013.pdf
- Miklas, P. N., Kelly, J. D., Beebe, S. E., & Blair, M. W. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica*, 147(1-2), 105-131.
- Montejo L. M., Dardon, D., Villatoro J. C., Aldana L. F., & Osorno J. M. (2016). Phenotypic characterization of bean rust isolates from common bean in the Guatemalan highlands. Pan-African Grain Legume and World Cowpea Conference. Livingstone, Zambia.
- Nanami, D. S. Y., Vidigal, M. C. G., de Lima Castro, S. A., Frias, A. A. T., Vidigal Filho, P. S., & Elias, H. T. (2017). Characterization of genetic resistance in Andean common bean cultivar Amendoim Cavalo to *Colletotrichum lindemuthianum*. *Agronomy Science and Biotechnology*, 3(1), 43.
- Osorno, J. M., & McClean, P. E. (2013). Genetic improvement of Middle-American climbing beans in Guatemala (SO1.A1). Feed the Future, Legume Innovation Lab. Michigan State University, Michigan. Recuperado de http://legumelab.msu.edu/uploads/files/SO1.A1-FY2015_Annual_Technical_Progress_Report_Leg_Innovation_Lab.pdf
- Pastor-Corrales, M. A. (1991). Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology*, 81(6), 694.
- Pastor-Corrales, M. A., Otoya, M. M., & Maya, M. M. (1993). Diversidad de la virulencia de *Colletotrichum lindemuthianum* en Mesoamérica y la Región Andina. *Fitopatología*, 17(1-2), 31-38.
- Pastor-Corrales, M.A., Erazo, O.A., Estrada, E.I., & Singh S.P. (1994). Inheritance of anthracnose resistance in common bean accession G 2333. *Plant Disease*, 78, 959-961.
- Poczai, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J. P., & Hyvönen, J. (2013). Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*, 9(1), 6.
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., & Jannink, J. L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PloS One*, 7(2), e32253.
- Ponciano-Samayoá, K., Villatoro-Mérida, J., & Molina, L. (2009). Caracterización preliminar con microsatélites de la colección guatemalteca de frijol común trepador. *Agronomía Mesoamericana*, 20, 245-254.
- Rosas, J.C., Castro, A., & Flores, E. (2000). Mejoramiento genético del frijol rojo y negro mesoamericano para Centroamérica y El Caribe. *Agronomía Mesoamericana*, 11, 37-43.

- Rosas, J. C., Gallardo, O., & Jiménez, J. (2003). Mejoramiento genético del frijol común mediante enfoques participativos en Honduras. *Agronomía Mesoamericana*, 14(1), 1-9.
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., ... & Torres-Torres, M. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46(7), 707.
- Schröder, S., Mamidi, S., Lee, R., McKain, M. R., McClean, P. E., & Osorno, J. M. (2016). Optimization of genotyping by sequencing (GBS) data in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 36(1), 6.
- Schwartz, H. F., Corrales, M. P., & Singh, S. P. (1982). New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 31(3), 741-754.
- Schwartz, H. F., & Steadman, J. R. (1989). White mold. En H.F. Schwartz, M.A. Pastor-Corrales (Eds.), *Bean production problems in the tropics* (pp. 211–230). Cali, Colombia:CIAT.
- Singh, S. P., Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45(3), 379-396.
- Tobar Piñón, M. G. (2017). *Genetic Diversity of the Guatemalan Climbing Bean Collections* (Masters dissertation, North Dakota State University).
- Van Schoohoven, A., & Pastor-Corrales, M. A. (1987). Standard system for the evaluation of bean germplasm. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 53pp.
- Vallejo, V. A., Awale, H. E., & Kelly, J. D. (2003). Characterization of the anthracnose resistance in the Andean bean cultivar Jalo EEP558. *Bean Improvement Cooperative*, 44,121-122.
- Vlasova, A., Capella-Gutiérrez, S., Rendón-Anaya, M., Hernández-Oñate, M., Minoche, A. E., Erb, I., ... & Westergaard, G. (2016). Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biology*, 17(1), 32.
- White, J. W., & Singh, S. P. (1991). Sources and inheritance of earliness in tropically adapted indeterminate common bean. *Euphytica*, 55(1), 15-19.
- Wu, J., Zhu, J., Wang, L., & Wang, S. (2017). Genome-wide association study identifies NBS-LRR-encoding genes related with anthracnose and common bacterial blight in the common bean. *Frontiers in plant science*, 8, 1398.
- Zuiderveen, G. H. (2015). The genetics of anthracnose resistance in common bean. Michigan State University. Plant Breeding, Genetics and Biotechnology-Crop and Soil Sciences- Master of Science.
- Zuiderveen, G. H., Padder, B. A., Kamfwa, K., Song, Q., & Kelly, J. D. (2016). Genome-wide association study of anthracnose resistance in Andean beans (*Phaseolus vulgaris*). *PLoS One*, 11(6).

20 Apéndices

Apéndice 1: Incremento de semilla del germoplasma de frijol arbustivo de Guatemala



Apéndice 2: Incremento de esporas de las razas 585 y 3981 de *C. lindemuthianum*.



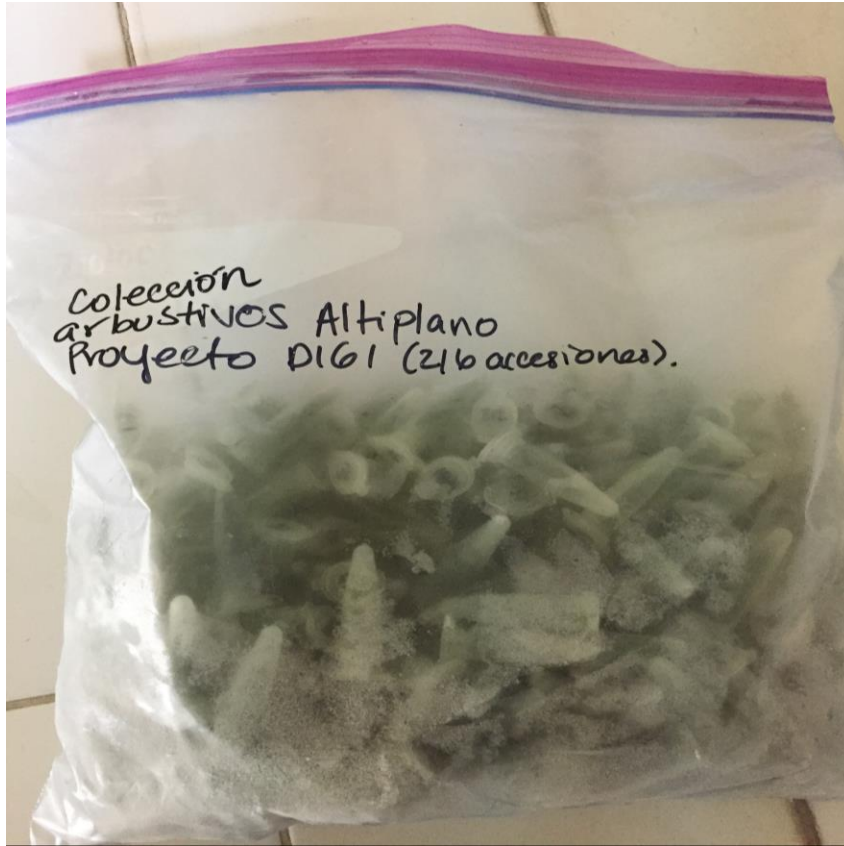
Apéndice 3: Plantas de frijol arbustivo en bandejas listas para su inoculación



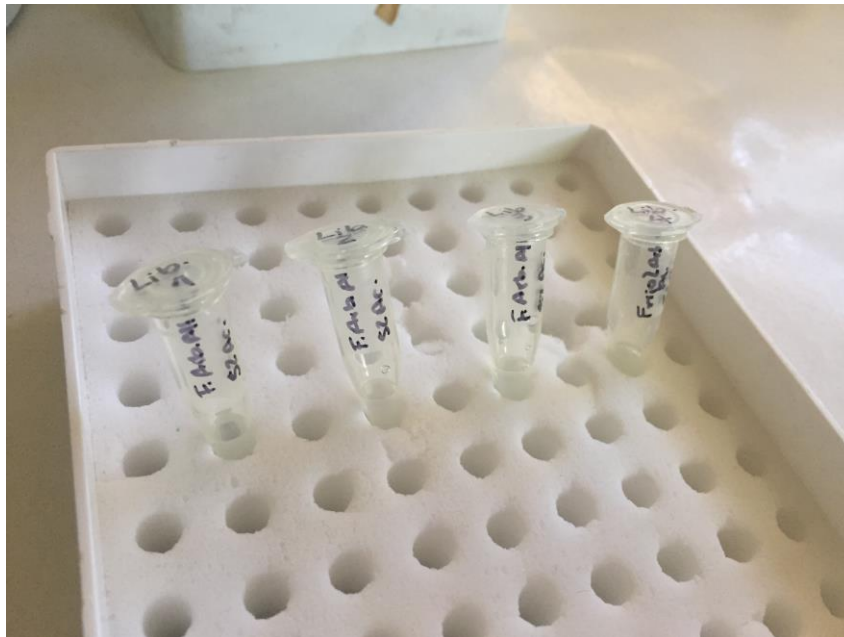
Apéndice 4: Plantas resistentes y plantas susceptibles al patógeno *C. lindemuthianum*



Apéndice 5: Tejido de hojas para extracción de ADN del germoplasma de frijol arbustivo



Apéndice 6: Librerías de ADN genómico del germoplasma de frijol arbustivo



Listado de los integrantes del equipo de investigación

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Julio César Villatoro Mérida	
Carlos Raúl Maldonado Mota	
María Gabriela Tobar Piñón	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Roberto Carlos Argueta Mellado	Peón		x		

Guatemala 17 de febrero de 2020

Ing. Agr. Julio César Villatoro Mérida
 Coordinador Proyecto de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
 Programa Universitario de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
 Coordinador General de Programas