



Revista científica de la Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala



Vol. XXXV, No. 1



Guatemala,  
Enero - Junio 2017

**Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala**

**Junta Directiva del 2017**

Ing. Agr. Mario Godínez López	<b>Decano</b>
Ing. Agr. Juan Herrera	<b>Secretario Académico</b>
Dr. Tomás Padilla Cámara	<b>Vocal I</b>
Ing. Agr. César Linneo García	<b>Vocal II</b>
Ing. Agr. Erberto Raúl Alfaro	<b>Vocal III</b>
P. Agr. Walfer Yasmany Godoy	<b>Vocal IV</b>
P. Cont. Neidy Yassnine Juracán M.	<b>Vocal V</b>

**Consejo Editorial**

Ing. Agr. Mario Godínez López (Presidente)  
Pdsta. Dennis Escobar Galicia (Secretario)  
Dr. Hugo Cardona Castillo  
Dr. Exequiel López  
Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes  
Lic. José María Santos  
Br. Marco Yordano Hernández

Revista   
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Ciudad Universitaria, zona 12  
Guatemala, Guatemala  
Teléfonos: (502) 2476-9770  
Fax: (502) 2476-9770  
Correo electrónico: [comited.agro@usac.edu.gt](mailto:comited.agro@usac.edu.gt)

Editor:  
Dennis Orlando Escobar Galicia

## ***PRESENTACIÓN***

Revista TIKALIA (Volumen XXXV, No. 1-2017. Enero-Junio) publicación científica semestral de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, catalogada en Latindex ([www.latindex.unam.mx](http://www.latindex.unam.mx)) contiene los artículos siguientes:

**«ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN MASIVA DE MICROTUBÉRCULOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) VAR. LOMAN, EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADO (RITA)»**, de Carlos Orozco Castillo, Paola Cedillo Gómez, Óscar Barrios y Krystal Castillo. En este estudio se considera que la papa (*Solanum tuberosum* L.) Var. Loman está entre los cultivos agrícolas prioritarios en Guatemala; por lo que con el uso del RITA se pretende favorecer la producción de microtubérculos en menos tiempo y con mejor calidad convencional (con excelente calidad fitosanitaria) obteniendo así una mejor producción para beneficiar a los agricultores.

**«IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE MARCADORES MOLECULARES (SSR) ASOCIADOS A TOLERANCIA A SEQUÍAS DE LÍNEAS ISOGÉNICAS EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)»**, de Krystal García Méndez, Carlos Orozco Castillo, Miguel García y Diego José Estrada Aníbal López. El estudio se llevó a cabo en virtud de que en los últimos años una de las principales causas del bajo rendimiento en los culti-

vos es el clima, entre ellos la sequía; afectando la economía de los agricultores. Por lo que se propone la mejora genética como una opción para estabilizar e incrustar la producción de frijol común bajo condiciones de sequía. Uno de los objetivos del estudio fue evaluar líneas provenientes de cruza con caracteres fenotípicos asociados con condiciones de riego y sequía. Se recomienda aplicar más marcadores moleculares que puedan estar asociados con genes de tolerancia a sequía.

**«ANÁLISIS DE SECUENCIAS GENÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE RELACIONES FILOGENÉTICAS Y EVOLUCIÓN DEL GÉNERO *COFFEA*»**, de Carlos Orozco Castillo, Chalmers Kenneth, Waugh Robbie y Powel Wayne. En este estudio se investigaron las secuencias genéticas específicas de regiones no codificantes de cloroplasto, así como de la región V7 de la mitocondria. Adicionalmente también fueron analizadas secuencias genéticas nucleares. El propósito fue encontrar las relaciones filogenéticas en el género *Coffea* y la ruta de evolución de *C. arabica*. Los resultados presentados en el estudio son consistentes con aquellos inferidos de comparaciones taxonómicas clásicas y reflejan el origen y la distribución geográfica de especies del género *Coffea*.

Finalmente, se incluye una sección que da cabida a varios resúmenes de tesis de las carreras que se imparten en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

**Los editores.**

# CONTENIDO

- 7 **“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA DE MICRO TUBÉRCULOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) var. Loman, EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADO (RITA)”**

**Autores:**

Carlos Orozco Castillo  
Paola Cedillo Gámez  
Oscar Barrios  
Krystal García

---

- 29 **“IDENTIFICACIÓN PREELIMINAR DE MARCADORES MOLECULARES (SSR) ASOCIADOS A TOLERANCIA A SEQUÍA DE LÍNEAS ISOGÉNICAS EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)”**

**Autores:**

Krystal García Méndez  
Carlos Orozco Castillo  
Miguel García  
Diego José Estrada  
Aníbal López

---

- 51 **ANÁLISIS DE SECUENCIAS GENÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE RELACIONES FILOGENÉTICAS Y EVOLUCIÓN DEL GÉNERO *COFFEA***

**Autores:**

Carlos Orozco Castillo  
Chalmers Kenneth  
Waugh Robbie  
Powell Wayne

---

- 89 **RESÚMENES DE TESIS**
- 

- 99 **Instrucciones para los autores**





# “ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA DE MICROTUBÉRCULOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) var. Loman, EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADO (RITA)”

## **Autores:**

Carlos Orozco Castillo<sup>1</sup>,  
Paola Cedillo Gámez<sup>2</sup>,  
Oscar Barrios<sup>3</sup>,  
Krystal García<sup>4</sup>

Recibido el 20 de junio de 2017.

Aprobado el 24 de julio de 2017.

---

<sup>1</sup>Profesor Investigador, Facultad de Agronomía USAC.

<sup>2</sup>Ingeniera Agrónoma FAUSAC.

<sup>3</sup>Auxiliar de Investigación FAUSAC.

<sup>4</sup>Auxiliar de Investigación FAUSAC

## RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Loman está entre los cultivos agrícolas prioritarios en Guatemala, esta variedad es la que más se cultiva en el país con rendimientos que van desde 20 a 30 t.ha<sup>-1</sup> en alturas comprendidas entre los 2,390 msnm hasta 3,500 msnm. Dada la importancia que esta tiene es necesario brindar al agricultor semilla con alta calidad fitosanitaria. Para la obtención de microtubérculos de alta calidad fitosanitaria se utilizaron Recipientes de Inmersión Temporal (RITA®) este coadyuvó a la producción masiva de los mismos.

Con el RITA® se evaluaron diferentes frecuencias de inmersión (3 min en intervalos 3, 7 y 10 hr) y distinto fotoperiodo (14 hr con luz y 10 hr sin luz, 16 hr con luz y 8 hr sin luz), se obtuvo una producción de 4.17 microtubérculos con 2.32 g de peso fresco en promedio a una frecuencia de inmersión de tres min en intervalos de diez horas y un fotoperiodo de catorce horas de luz y diez horas de oscuridad con una intensidad de lumínica de 2000 lux. La microtuberización fue afectada por el fotoperiodo de diez horas luz produciendo un mayor número de microtubérculos pero bajo dieciséis horas luz se incrementó el peso y tamaño de los mismos; 54 fueron los microtubérculos vitrificados a una frecuencia de inmersión de tres minutos con intervalo de diez horas.

El uso del RITA® favorece la producción de microtubérculos en menos tiempo y con mejor calidad fitosanitaria que la forma convencional, (con excelente calidad fitosanitaria) obteniendo así una mejor producción (beneficiando a los agricultores).

**Palabras clave:** biotecnología, in vitro, RITA®, yemas axilares, explantes

## ABSTRACT

The potato (*Solanum tuberosum* L.) var. Loman is among priority agricultural crops in Guatemala, this variety is that most grown in the country with yields ranging from 20 to 30 t / has heights ranging from the 2,390 meters to 3,500 meters above sea level. Given the importance of this is necessary to provide the farmer with phytosanitary quality seed. Used for obtaining microtubers of high quality plant containers for temporary immersion (RITA®) this coadyuvo to the mass production of the same.

With the RITA® were evaluated different frequencies of immersion (3 min intervals 3, 7 and 10 hr) and different photoperiod (14 hr light) and 10 hr without light, with light 16 hr and 8 hr without electricity, was a production of 4.17 microtubers with 2.32 g fresh weight on average at a rate of immersion for three minutes at 10-hour intervals and a photoperiod of 14 hours of light and ten hours of darkness with an intensity of light of 2000 lux, the microtuberización was affected by photoperiod of ten hours of light producing a greater number of microtubers but under sixteen hours light increased the weight and size of the same; 54 were vitrified microtubers at a frequency of three minutes immersion with ten hour interval.

The use of the RITA® promotes the production of microtubers in less time and with better plant that the conventional form, (with excellent phytosanitary) obtaining thus a better production (benefiting farmers).

**Key words:** biotechnology, vitro, RITA®, axillary buds, explants

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de América del Sur, se propagó inicialmente desde las cercanías del lago Titicaca a 3,800 msnm hasta la cordillera de los Andes frontera de Bolivia y Perú. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 2008). Las montañas del centro y occidente de Guatemala, poseen condiciones óptimas para el cultivo de la papa, en alturas de 1,500 a 2,800 msnm, con temperaturas desde los 7°C a los 25°C. Debido a los factores favorables de producción, Guatemala es el principal productor de América Central, de acuerdo a El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA), Según “El Agro en Cifras”, edición 2015; en Guatemala se produjeron 11,836,900 quintales en un área aproximada de 30,500 manzanas; la producción nacional genera 12,793 empleos permanentes. (MAGA, 2015); la papa que se produce en el país es vendida mayormente en zonas urbanas y para la exportación a países vecinos. Sin embargo, la falta de material certificado de siembra y la fragmentación de las cadenas de suministro limitan el potencial productivo de papa en Guatemala.

La propagación convencional del cultivo de papa se realiza por medio de tubérculos. Este método tiene desventajas tales como la transmisión de enfermedades virales y bacterianas, costos por transportes de tubérculos pesados y voluminosos y brotes prematuros. (Oropeza, 2012).

El uso de la biotecnología permite reducir las limitantes del potencial productivo de papa, debido a que los microtubérculos se obtienen de forma aséptica en medios de cultivo definidos y en un ambiente controlado. Adicionalmente, el uso de microtubérculos como herramientas de investigación experimental tiene potencial en las áreas del metabolismo de plantas, evaluación y selección de germoplasma, transformación genética, hibridación somática y biología molecular (Coleman, Donnelly & Coleman, 2001).

Atendiendo a los requerimientos de mayor disponibilidad de nutrientes en el cultivo *in vitro* utilizando medios líquidos, se implementó el uso de recipientes especiales llamados sistemas de inmersión temporal; estos se basan en la inmersión temporal de los explantes en el medio de cultivo (Aitken-Christie, 1991), solo durante unos min con determinada frecuencia diaria o mediante burbujeo, evitan la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tienen bajo costo de producción (Teisson & Alvard, 1999).

El objetivo de la presente investigación fue estandarizar un protocolo para la propagación en forma masiva de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) *var.* Loman, mediante el uso de sistemas de inmersión temporal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ubicación del área de estudio**

### **Ubicación de áreas de colecta**

La colecta se llevó a cabo en los municipios de San Mateo y La Esperanza del departamento de Quetzaltenango, ubicado a 210 km de la ciudad capital, con productores de la empresa Frito Lay. La semilla de papa proviene de la empresa semillera BEJO Guatemala, con categoría de semilla certificada como fuente inicial de material de propagación.

Las coordenadas del municipio de San Mateo son 14°522 003 N 91°352 003 O, en una altitud de 2,497 msnm y del municipio de La Esperanza 14°522 003 N 91°342 003 O en una altitud de 2,465 msnm.

### **Ubicación del área de experimentación**

El experimento se realizó en el laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales y el laboratorio de biotecnología, de la Unidad de Vinculación y Gestión de Recursos (UVIGER). Esta unidad es parte del área tecnológica de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### **Técnicas e instrumentos**

### **Materiales de laboratorio**

Se utilizaron frascos de vidrio de 50 mL, probetas de varios volúmenes, tubos de ensayo, micropipetas de 10-100µL, beakers 2 L, bisturís 24 y 11, pinzas, cajas Petri, mechero de alcohol, guantes de látex y nitrilo, mascarillas, papel sellador Parafilm®.

## **Equipos de laboratorio**

Se utilizaron recipientes de inmersión temporal marca RITA® (recipiente con patente del centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo, CIRAD, por sus siglas en francés), cámara de flujo laminar, autoclave All American®, potenciómetro Oakton®, refrigerador para almacenamiento de muestras, balanza de precisión AE ADAM®, agitador Fisher Scientific®, dispensador para medios de cultivo Ward's Science®.

## **Esterilización de materiales y limpieza de equipo**

Se utilizó hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}_3$ ) al 5% con la sumersión de los recipientes de vidrio durante 6 horas. Los residuos de cloro en los recipientes se eliminaron con agua desmineralizada, posteriormente las cajas Petri, las pinzas y los bisturí se esterilizaron en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  durante 20 min. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  durante 20 min.

Previo a la siembra de los tejidos se desinfectó el área de trabajo de la cámara de flujo laminar con etanol al 70%.

## **Establecimiento de ápices meristemáticos**

### **Preparación y desinfección del material vegetativo**

Los tubérculos fueron lavados con agua y detergente antibacterial, se utilizó una navaja previamente desinfectada con una solución de  $\text{NaClO}_3$  al 2% para la disección de las muestras y la toma de al menos una yema axilar. Las yemas fueron sumergidas por un intervalo de 20 min en una solución de 2 g de benomil®/ 1 L de agua.

## **Siembra in vitro del material vegetativo**

La fase in vitro se llevó a cabo en tres etapas, establecimiento, multiplicación y tuberización en sistemas de inmersión temporal.

### **Fase de establecimiento**

Los brotes de yemas se desinfectaron durante 5 min con  $\text{NaClO}_3$  al 2%, posteriormente se eliminaron los residuos de cloro con tres lavados sucesivos de agua desmineralizada estéril. Se utilizaron hojas estériles de bisturi para extraer ápices meristemáticos de aproximadamente 0.5 cm los cuales fueron sembrados en grupos de tres. Los recipientes para la siembra fueron frascos de vidrio de 7cm de alto y 5 cm de diámetro a los que se les adicionó 25 mL de medio de cultivo MS con 0.2 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 0.1 mg/L de ácido giberélico (GA3).

Los recipientes de siembra fueron colocados en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de  $20 \pm 2$  °C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 30 días.

### **Fase de multiplicación**

Transcurridos 30 días del establecimiento se inició la multiplicación por micro esquejes, se procedió a la siembra de los mismos en tubos de ensayo con 15 mL de medio para multiplicación. En la fase de multiplicación se agregaron ácido giberélico y 6-BAP incorporadas al medio de cultivo. Los tubos fueron colocados en cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de  $20 \pm 2$  °C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 21 días (Castro et al., 2012).

## **Fase de tuberización**

### **Limpieza de los componentes**

Se utilizó una solución de  $\text{NaClO}_3$  al 2.5% para la desinfección de los componentes del RITA®, los cuales fueron sumergidos por 20 minutos, luego se procedió a esterilizarlos por 20 min a 120°C y 15 libras de presión.

### **Propagación en Sistemas de Inmersión Temporal**

Los explantes utilizados fueron los obtenidos en la etapa de multiplicación en medio de cultivo semisólido, cada RITA® se conectó a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor con un sistema automatizado para controlar las frecuencias de inmersión, tiempo y flujo de gases (Montoya et al., 2008).

En la fase de tuberización fueron seleccionados 15 esquejes con seis o siete yemas axilares cada uno, la cantidad fue seleccionada de acuerdo a la capacidad del Recipiente de Inmersión Temporal RITA®.

### **Preparación de medio de tuberización**

En la fase de tuberización se prepararon 15L de medio de cultivo; para la preparación del medio se utilizó, medio de cultivo MS Caisson® 4.33 gr/L, L. cysteina 0.1 mg/L, ácido cítrico 0.05 mg/L, ácido ascórbico 0.05 mg/L, Pantotenato de calcio 0.1 mg/L, 6-BAP 1mg/L y sacarosa 80 gr/L (Montoya, N. Castro, Dagoberto. Díaz, Jaiber. Ríos, D., 2008).

El inductor de tuberización utilizado en este experimento fue la sacarosa la cual actuó como inductor de genes encargados de controlar la producción

de microtubérculos (Xu, et al., 1998), Según Jiménez et al., 1999, la concentración óptima de sacarosa para la formación de microtubérculos es de 80 g/L.

Se dispensaron 300 mL de medio de tuberización en cada uno de 72 frascos RITA® previamente esterilizados, utilizando la cámara de flujo laminar.

### **Siembra de explantes en RITA ®**

Se tomaron 15 esquejes producto de la multiplicación, se colocaron los esquejes sobre el tamiz del RITA®. Posterior a la siembra se llevó el sistema al área de crecimiento donde se sometió a diferentes condiciones de fotoperiodo y frecuencia de inmersión, como se indica en los tratamientos (cuadro 1).

### **Operatización de las variables**

#### **Variables no paramétricas**

a. Número de microtubérculos y b. Número de microtubérculos vitrificados. El análisis de las variables no paramétricas fue realizado con la prueba de Kruskal-Wallis modificada, utilizando un nivel de significancia a 0.05, la ecuación utilizada fue la siguiente:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

Dónde: g es el número de rangos que se repiten y ti es el número de veces que se repite el rango i-ésimo.

## VARIABLES PARAMÉTRICAS

- c. Peso fresco de microtubérculos; se utilizó la prueba de Duncan para estimar la diferencia entre pares de medias luego de se ha rechazara la hipótesis nula en el análisis de varianza, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

## TRATAMIENTOS

Los tratamientos evaluados para la producción de microtubérculos en RITA® se detallan en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Tratamientos evaluados en la micropropagación de tubérculos de papa variedad Loman.

Tratamiento	Variedad	Frecuencia de inmersión	Fotoperíodo
Tratamiento 1	Loman	3 min en intervalos de 3 h	14 h luz, 10 h sin luz
Tratamiento 2	Loman	3 min en intervalos de 3 h	16 h luz, 8 h sin luz
Tratamiento 3	Loman	3 min en intervalos de 7 h	14 h luz, 10 h sin luz
Tratamiento 4	Loman	3 min en intervalos de 7 h	16 h luz, 8 h sin luz
Tratamiento 5	Loman	3 min en intervalos de 10 h	14 h luz, 10 h sin luz
Tratamiento 6	Loman	3 min en intervalos de 10 h	16 h luz, 8 h sin luz

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar el efecto de la frecuencia de inmersión y el fotoperiodo en diferentes intervalos en el cultivo de papa, se realizó una prueba de Duncan con un  $\alpha = 0.05$  a los tratamientos, el tratamiento cinco con una frecuencia de inmersión de 3 min en intervalos de 10 horas y un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad dio un mayor peso fresco como se muestra en el cuadro 2; sin embargo no hubo una diferencia significativa comparada con el tratamiento seis (3 min en intervalos de 10 horas y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad), en ambos tratamientos se alcanzaron valores de 2.32 y 2.19 respectivamente (Cuadro 2), por los resultados anteriores se considera que ambos tratamientos pueden ser utilizados, deseablemente el tratamiento cinco.

Esta prueba múltiple de comparación de medias Duncan (Cuadro 2) para la variable peso fresco, considero el test: Duncan Alfa=0.05, un error de 0.7555 y 66 gl.

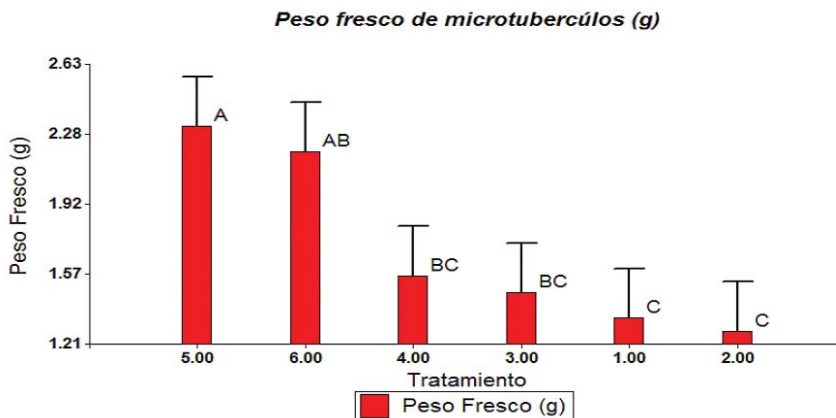
**Cuadro 2.** Prueba múltiple de medias para la variable peso fresco.

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
5	2.32	12	0.25	A		
6	2.19	12	0.25	A	B	
4	1.56	12	0.25		B	C
3	1.47	12	0.25		B	C
1	1.35	12	0.25			C
2	1.28	12	0.25			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

En la figura 1 se observa el comportamiento de los tratamientos en relación al peso fresco de microtubérculos, los tratamientos 5 y 6 fueron los mejores, no mostrando entre ellos diferencia significativa ya que ambos poseen la misma frecuencia de inmersión; sin embargo fueron superiores con relación a los otros tratamientos; por lo tanto la frecuencia de inmersión es considerada uno de los factores que tiene mayor incidencia en la respuesta morfogénica de los explantes ya que es el proceso mediante el cual los explantes se ponen en contacto con el medio de cultivo líquido y de esa forma se toman los nutrientes, se logra la aireación e intercambio gaseoso del vaso de cultivo y se regula el nivel de hiperhidricidad de los brotes (Rademacher, 2000).

El resultado de peso fresco se ve afectado por la variedad, ya que en otros casos se presenta mayor peso fresco en fotoperiodos cortos; así lo reporta Jaramillo et al. (2003) en un estudio sobre microtuberización in vitro de cuatro variedades de papa. (*Solanum tuberosum* L.).



**Figura 1.** Peso fresco de microtubérculos de papa por tratamiento.

## Número de microtubérculos

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis para la variable número de microtubérculos, el tratamiento que presentó mayor número fue el tratamiento cinco, con una frecuencia de inmersión de tres min en intervalos de 10hr y un fotoperiodo de 14 h de luz y 10hr oscuridad con una intensidad de luz de 2000 lux, obteniéndose en promedio 4.17 microtubérculos, un microtubérculo más con relación al tratamiento 3 (Cuadro 3 y 4).

Comparado con la investigación efectuada por Castro y colaboradores (2011), a la variedad de papa Andinita, en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracay, Aragua, Venezuela, en las que les fue posible obtener un promedio entre cinco y siete microtubérculos, con calibres entre 4 y 16 mm por planta, en SIT (Castro et al., 2011).

En esta investigación, debe considerarse que a todos los tratamientos se les agregó 80gr/L de sacarosa como inductora de tuberización; la sacarosa juega un doble papel en el desarrollo de microtubérculos, aparte de ser una fuente de carbono adecuada fácilmente asimilada por las plantas in vitro y convertida en almidón en el desarrollo de los microtubérculos, también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo de microtubérculos (Khuri y Moorby, 1995).

**Cuadro 3.** Prueba de de Kruskal-Wallis para la variable no paramétrica número de microtubérculos.

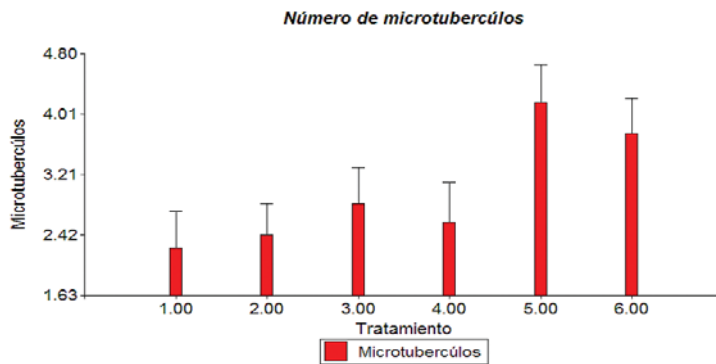
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Microtubérculos	1	12	2.25	1.66	2.50	12.24	0.0271
Microtubérculos	2	12	2.42	1.44	3.00		
Microtubérculos	3	12	2.83	1.64	3.00		
Microtubérculos	4	12	2.58	1.83	2.50		
Microtubérculos	5	12	4.17	1.70	4.00		
Microtubérculos	6	12	3.75	1.60	4.50		

**Cuadro 4.** Prueba múltiple de medias de de Kruskal-Wallis para la variable no paramétrica número de microtubérculos.

Tratamientos	Rangos			
5	50.33	A		
6	46.00	A		
3	34.28	A	B	
4	32.04	A	B	C
2	28.67	B	C	
1	27.58		C	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Debe considerarse que otros factores que influyen en la tuberización son la temperatura, el fotoperiodo y la intensidad de la luz; se observó que el tratamiento cinco que fue expuesto a menor fotoperiodo, comparado con el tratamiento seis, aunque comparten la misma frecuencia de inmersión, el promedio de microtubérculos del tratamiento cinco fue 0.42 mayor que el tratamiento seis, también se deben tomar en cuenta los componentes de los medios de cultivo y la variedad (Garner y Blake 1989; Hussey y Stacey 1984), ambos tratamientos mostraron mejores promedios en relación a los demás tratamientos evaluados en este estudio.



**Figura 2.** Relación de microtubérculos obtenidos por tratamiento.

## Número de microtubérculos vitrificados

El mayor número de microtubérculos vitrificados se presentó en el tratamiento dos y en el tratamiento uno (Cuadro 5 y 6), debido a que fueron los tratamientos sometidos a mayor frecuencia de inmersión, tres min en intervalos de tres horas, para los dos tratamientos; la vitrificación o hiperhidricidad es un desorden fisiológico, causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos (Ziv, 1994).

Las hojas y los tallos de las plantas hiperhidricas muestran una apariencia turgente y superficie acuosa, sus órganos son de cierto modo translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Van Huylenbroeck, J.M., Van Laere, L. M., Piqueras, A., Debergh, P., C., Bueno, P., 1998), de igual forma se observaron y cuantificaron microtubérculos turgentes, frágiles y con un cambio de color café-amarillento, los cuales no se consideran viables para un proceso en campo.

### **Cuadro 5.** Prueba de Kruskal-Wallis para la variable no paramétrica microtubérculos vitrificados.

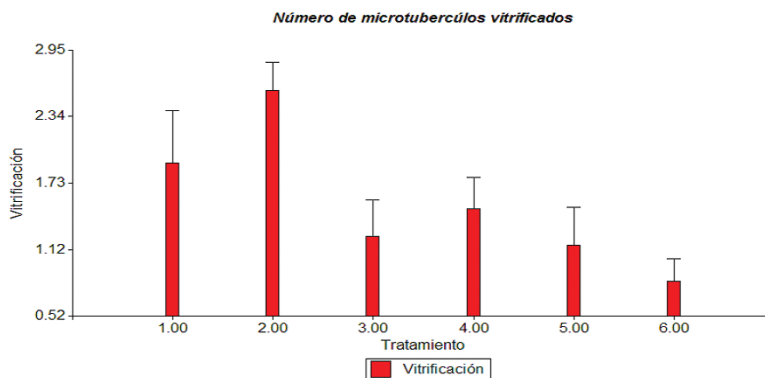
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Vitrificación	1	12	1.92	1.68	2.00	14.22	0.0101
Vitrificación	2	12	2.58	0.90	2.50		
Vitrificación	3	12	1.25	1.14	1.00		
Vitrificación	4	12	1.50	1.00	1.50		
Vitrificación	5	12	1.17	1.19	1.00		
Vitrificación	6	12	0.83	0.72	1.00		

**Cuadro 6.** Resumen prueba de Kruskal-Wallis para la variable no paramétrica microtubérculos vitrificados.

Tratamientos	Rangos		
6	25.00	A	
5	30.04	A	
3	32.17	A	
4	36.83	A	
1	40.96	A	B
2	54.00		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

El tratamiento dos en la figura 3 muestra la mayor media de microtubérculos vitrificados con una media de 2.58 (Cuadro 5) en relación a los otros tratamientos; esto pudo deberse a las bajas condiciones de intercambio gaseoso, ya que al restringir el intercambio gaseoso a medio ó bajo se reduce la capacidad de realizar la fotosíntesis (Desjardins, 1995; Zimmerman, 1995).



**Figura 3.** Número de microtubérculos vitrificados por tratamiento.

## CONCLUSIONES

El protocolo para el establecimiento in vitro en el sistema de inmersión temporal RITA® que se utilizó y brindó mejores resultados en la producción de microtubérculos fué el medio inductor para tuberización (100%MS, BAP 1mg/L) con una concentración óptima de 80g/L de sacarosa.

Los mayores rendimientos obtenidos en base a peso fresco y cantidad de microtubérculos fueron para el tratamiento cinco con una frecuencia de inmersión de 3 min en intervalos de 10 horas y un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad, sin embargo no hubo un diferencia significativa con el tratamiento seis con una frecuencia de inmersión 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El tratamiento cinco presentó microtubérculos más grandes y de mayor peso, así como las plantas de más altura, mayor número de nudos y mayor biomasa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación fue realizada gracias al financiamiento de la Dirección General de Investigación (DIGI) de la Universidad San Carlos de Guatemala (USAC) con número de partida presupuestaria 4.8.63.6.69; con el aval del Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales (IIA) de la Facultad de Agronomía; se agradece al Instituto de Biociencias (CENBIO) Universidad Autónoma Tapachula, Chiapas, México, por su aporte sobre el uso de los sistemas de inmersión temporal RITA®.

## REFERENCIAS

- Aitken-Christie, J. (1991). *Automation. Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 363-388 p.
- Aitken-Christie, J., Kozai, T., Takayama, S. (1995). *Automation in plant tissue culture - general introduction and overview*. Moscú., RU. Kluwer Academic Publisher. 24 -32 p.
- Akita, M., Takayama, S. (1994). Induction and development of potato tubers in jar fermentor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 18: 284 – 287 p.
- Aragón, C. E., Escalona M., Capote I., Pina D., Cejas I., González-Olmedo J. (2004). Evaluación del efecto de las condiciones generadas por Biorreactores de inmersión temporal sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas in vitro de plátano cv. CEMSA ¾. *Biotecnología Vegetal* 4 (3): 147-152 p.
- Azurdia, C. (2014). Cultivos nativos de Guatemala y bioseguridad del uso de organismos vivos modificados. Papa (*Solanum tuberosum*). Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Documento Técnico No. 11-2014. 39 p.
- Barquero, M., Gómez, L., Brenes A., y Vaverde R. (2001). El tamaño del pote en la producción de semilla prebásica de papa en invernadero. *Agronomía Costarricense* 25(1):61-66 p.
- Coleman, W. K., Donnelly, D.J., Coleman, S. E. (2001). Potato microtubers as research tools: a review. *American Journal of Potato Research* 78: 47-55 p.
- Desjardins, Y. 1995. Photosynthesis in vitro- on the factors regulating CO2 assimilation in micropropagation systems. *Acta Hort*. 393:45-59.
- Escalona, M., Lorenzo, J., Daquinta, M., Borroto, C. (2003). Procedimiento y equipo para la propagación de plantas por inmersión temporal. La Habana., CU. 48 – 49 p.
- Escalona, M. (2006). Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta Annual* 48-49 p.
- Etienne E., Berthouly M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Org. Cult*. 69: 215-231 p.
- Garner, N., Blake, J. (1989). The induction and development of potato microtubers in vitro on media free of growth regulating substances. *Ann. Bot*. 63:663-674 p.
- Hussey, G. (1986). Problems and prospects in the in vitro propagation of herbaceous plants. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Withers LA y Alderson PG (eds). Butterworths, Boston. 69-84 p.
- Igarza Castro, J., Agramonte, D., Alvarado-Capó, Y., de Feria, M., & Pugh, T. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal*, 12(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/495>

- Santos, A.J., González, M. D. J. R., Montañó, H., Rodríguez, J. J. L. G. Microtuberización in vitro de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.).
- Scherwinski, P., Luces, G.R. (2004). Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação in vitro. *Horticultura Brasileira* 22(2). 197-201 p.
- Jiménez, E., Pérez N., de Feria M., Barbón R., Capote A., Chávez M., Quiala E. y Pérez J.C. (1999). Improved production of potato (*Solanum tuberosum* L.) Microtubers using a temporary immersion system. *Plant cell, tissue and organ culture* 59: 19-23 p.
- Khuri, S., Moorby J. (1995). Investigation into the role of sucrose in potato cv. 'Estima' microtuber production in vitro. *Ann Bot* 75: 295-303 p.
- Lugo, J. (2000). Factores que afectan la producción de vitroplantas y microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) y el uso de estos materiales en la obtención de microtubérculos de las variedades Kennebec y Andinita. Disponible: [http://postgrado.ucla.edu.ve/agronomia/Horticultura/trabajos/Lugo\\_Jos%C3%A9.htm](http://postgrado.ucla.edu.ve/agronomia/Horticultura/trabajos/Lugo_Jos%C3%A9.htm) en:
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (2015). El Agro en Cifras. Disponible en: <http://web.maga.gob.gt/download/lagro-cifras2015.pdf>
- Montoya, N. Castro, D. Díaz, J., & Ríos, D. (2008). Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L), variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo. *Ciencia* 16 (3), 288-295.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). 2008. Año Internacional de la Papa. Disponible en: <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/origenes.html>
- Oropeza, M. P. (2012). Efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- Pérez-Alonso, N., de Feria, M., Jiménez, E., Capote, A., Chávez, M., & Quiala, E. (2001). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos in vitro de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en el campo. *Biología Vegetal*, 1(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/54>
- Pereira, J.E.S. y G.R.L. Fortes. (2003). Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília 39(9):1035-1043 p.
- Piedra Burbano, M. A. (2014). Tesis: Evaluación de la microtuberización de los cultivares de papa INIAP-VICTORIA y SUPERCHOLA, bajo sistemas de inmersión temporal. Quito, Ecuador. 66 p.
- Rademacher W (2000) Growth retardants: effects on giberellins biosynthesis and other metabolic pathways

- Suárez, K. F., Martín, F. F., Declerck, S. (2013). Búsqueda de un medio de cultivo para la micorrización in vitro de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 34(4), 9-19 p.
- Teisson, C., Alvard, D. (1999). In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato research*. 42: 499 – 504 p.
- Van Huylenbroeck, J.M., Van Laere, L. M., Piqueras, A., Debergh, P., C., Bueno, P. (1998). Time course of catalase and superoxide dismutase during acclimatization and growth of micropropagated *Calathea* and *Spathiphyllum* plants. *Plant Growth Regulation* 26(1): 7-14 p.
- Xu, X., Van Lammeren, A., Vermeer, E., Vreugdenhil, D. (1998). The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiol.* 117: 575 -584 p.
- Zimmerman, R.H. 1995. Environmental effects and their control in plant tissue culture-overview. *Acta Hort.* 393:11-14.
- Ziv, M. (1994). The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Environmental Effects and their Control in Plant Tissue Culture* 393, 25-38 p.
- Ziv, M., y Shemesh D., (1996). Propagation and tuberization of potato bud clusters from bioreactors culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32: 31-36 p.



# “IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE MARCADORES MOLECULARES (SSR) ASOCIADOS A TOLERANCIA A SEQUÍA DE LÍNEAS ISOGÉNICAS EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)”

## **Autores:**

Krystal García Méndez<sup>1</sup>

Carlos Orozco Castillo<sup>2</sup>

Miguel García<sup>3</sup>

Diego José Estrada<sup>4</sup>

Aníbal López<sup>5</sup>

Recibido el 14 de junio de 2017.

Aprobado el 18 de julio de 2017.

---

<sup>1</sup>Asistente de Investigación. Facultad de Agronomía-CONCYT.

<sup>2</sup>Profesor Investigador, Facultad de Agronomía, USAC.

<sup>3</sup>Investigador- CONCYT.

<sup>4</sup>Asistente de Investigación CONCYT-FAUSAC;

<sup>5</sup>Investigador CONCYT.

## RESUMEN

En los últimos años una de las principales causas del bajo rendimiento en los cultivos es el clima, entre ellos la sequía, afectando la economía de los agricultores y en consecuencia de las regiones y países productores. La mejora genética es una opción para estabilizar e incrementar la producción de frijol común bajo condiciones de sequía. Uno de los objetivos fue evaluar líneas provenientes de cruza con caracteres fenotípicos asociados con condiciones de riego suplementario y sequía; los RILS evaluados fueron los L-88 producto de la cruce de los genotipos de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) B98311, VAX 5 y TLP 19 con la finalidad de obtener una línea o líneas tolerantes a estrés hídrico y su posible identificación con un marcador molecular genómico, en este caso microsatélites (SSR) identificados y puestos en bibliotecas genómicas (Blair et al, 2003). Se realizó una prueba de rendimiento evaluando condiciones de sequía y riego óptimo, bajo condiciones de invernadero. Los mayores rendimientos en condiciones de sequía fueron en promedio 66.4 kg.Ha<sup>-1</sup> con un máximo rendimiento de 200kg.Ha<sup>-1</sup> para la línea L88<sub>63</sub> y el menor rendimiento fue para las líneas L88<sub>31</sub>, L88<sub>38</sub>, L88<sub>43</sub> y L88<sub>44</sub>.

Se corrieron 31 marcadores moleculares SSR todos polimórficos, de estos, 5 se consideraron efectivos en la distinción de caracteres ligados a la tolerancia a sequía siendo estos BM152, IAC76, BM221, BMc284, BM189. El marcador BM189 posiblemente se encuentre asociado con la característica de tolerancia a sequía en las líneas evaluadas ya que fue el único que amplificó de forma positiva para la L88-63 que presentó mejores rendimientos bajo condiciones de sequía. Las posiciones promedio para el mapeo genético de los marcadores evaluados estuvo entre 2.83 y 12.29 cM de los SSR BM189 y BMc284 en frijol. Entre estas regiones posiblemente puedan encontrarse genes de tolerancia a sequía.

**Palabras Clave:** RILS, sequía, mejoramiento, microsatélites.

## ABSTRACT

In recent years one of the main causes of poor performance in crops is the climate, including drought, affecting the economy of farmers and thus of producer countries and regions. Genetic improvement is an option to stabilize and increase the production of bean under drought conditions. One of the objectives was to evaluate lines from crosses with phenotypic characters associated with conditions of supplemental irrigation and drought; evaluated RILS were the product L-88 of the cross of the black bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) B98311, VAX 5 and TLP 19 with the aim of obtaining a line or lines tolerant to water stress and its possible identification with a genomic molecular marker, in this case microsatellite (SSR) identified and brought in genomic libraries (Blair et al., 2003). A performance test was performed evaluating conditions of drought and irrigation optimal, under greenhouse conditions. The highest yields in drought conditions were in average 66.4 kg. Ha<sup>-1</sup> with a maximum yield of 200kg. HA-1 for the line L8863 and the lower performance was for the lines L8831, L8838, L8843 and L8844.

Is ran 31 SSR molecular markers all polymorphic, of these, 5 were considered effective in distinguishing characters linked to tolerance to drought being these BM152, IAC76, BM221, BMc284 and BM189. Marker BM189 possibly is associated with the characteristic of drought tolerance in the lines evaluated since it was the only one I amplifico positively for the L88-63 presented best yields under drought conditions. The average positions for genetic mapping of evaluated markers was between 2.83 and 12.29 cM of the BM189 SSR and BMc284 in beans. Between these regions they can possibly find genes for tolerance to drought.

**Key words:** RILS, drought, improvement, microsatellites.

## INTRODUCCIÓN

Las necesidades actuales de alimentación a nivel global exigen mejorar, bajo las condiciones climáticas actuales, aumentar la calidad y la producción (Allard 1980). Se ha estimado que el 60% de los cultivos, no solamente el de frijol son manejados bajo el riesgo de una sequía Intermitente o terminal (White and Singh 1991). Se estima que la producción total de frijol a nivel mundial supera los 23 millones de toneladas métricas al año.

El frijol proporciona una fuente de alimentación proteica en la dieta alimenticia de poblaciones. La semilla o grano contiene 22% de proteínas altamente digerible, contiene 70% de carbohidratos totales, aporta minerales (Ca, Mg, Fe), y Vitaminas A, B 1-Tiamina, B2-Rivoflavina, C-ácido ascórbico, realiza simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (*Rhizobiumphaseoli*) y contribuye al mejoramiento y recuperación de suelos (CIT,2006). Se distribuye en todos los continentes con excepción de la Antártida (López, Fernández et al. 1985).

La producción de los cultivos incluyendo el frijol se ven afectadas por factores ambientales y bióticos que se traducen en la reducción del cultivo, ya sea causado por daños de patógenos e insectos (Beebe, 1991), o la reducción del área para la siembra por escasez de lluvia, erosión del suelo y altas temperaturas. Los caracteres heredables forman parte del componente de rendimiento, calidad nutricional y tolerancia a estrés y se manifiestan por la acción de genes denominados poligenes; sin embargo todavía se están realizando estudios de posiciones cromosómicas y el efecto de las interacciones que controlan las expresiones genéticas y fenotípicas. El objetivo de la investigación fue identificar con técnicas biotecnológicas (microsatélites) regiones asociadas a tolerancia a sequía, en una población de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) L88 las cuales se obtuvieron de líneas recombinantes (RILs).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 81 líneas derivadas de los RILs L-88, que se trabajaron en cooperación con el departamento de Genética de la Escuela Zamorano Honduras, con parentales de características tales como tolerancia a sequía, sistema radicular profundo y resistencia a patógenos. Las líneas L-88 tienen como parentales a B98311/TLP 19 (Tolerante) y B98311/VAX 5 (susceptible) (Fraham, 2003, CIAT, 1986).

Se realizaron evaluaciones con marcadores moleculares SSR y pruebas de tolerancia a sequía bajo condiciones controladas en un invernadero.

### 2.1 Evaluación a nivel genético:

Se sembraron *in vitro* tres semillas por cada línea de frijol L-88; la siembra se hizo en frascos de vidrio de 100 mL, con una mezcla de agar y agua previamente esterilizada a 120 ° C. Las semillas se establecieron para su germinación por 10 días, con el propósito de obtener material vegetal joven y sano; después de la germinación se tomaron 3 folíolos por línea y se colocaron en un tubo de 1.5mL, los cuales fueron macerados con nitrógeno líquido.

Se utilizó el método CTAB (Afanador, 1993) para la extracción de ADN. La integridad y calidad de la extracción fue verificada con el corrimiento de geles de agarosa al 1.5%, concentración y corrida en electroforesis horizontal a 100V por un periodo de 4 horas. La cuantificación de cada extracción se realizó con un Espectrofotómetro marca Eppendorf ®.

## Evaluación de marcadores moleculares

Se evaluaron 31 marcadores moleculares tipo microsatélites (Cuadro 5) creados por Gaitan-Solis, 2002 quien los utilizó para la evaluación de microsatélites en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para el aislamiento, caracterización y amplificación de especies cruzadas y por Blair en 2003 en el cual buscaba desarrollar un mapa de microsatélites anclando en todo el genoma para frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Se utilizaron con la finalidad de genotificarlos y observar relaciones genéticas entre los mismos.

**Cuadro 1.** Marcadores moleculares tipo microsatélites evaluados en Líneas L88.

No.	Nombre	Genebank	Tamaño esperado	Forward	Tm °C	Reverse	Tm °C
1	IAC51	DQ469448	221	CCAGCAAAATAAA CAACCCAAA	54.3	AACAGAGCAACGAAAA GAAGG	53.9
2	PVBR94	BV686491	165	ACGA OGGAGAGAGAGGTGA	57.3	CCGF GTTCCITCTGTCTG	55.6
3	PVgocaco001	U77995	95	OGTTA.GATCCGGCCAAATAGT	56.6	CCGFCCAGGAAGAGCGAGC	60.6
4	PVBR24	DQ185889	224	GFTAA CCAA GCTA AAGAC	47.5	CTCTACTCAACAAATAGTG	47.6
5	BM152	AF483868	127	AAGAGGAGGTCGAAA.CCTTAAATCG	56.7	CCGGACTTGGCCA.GAA.GAAC	58.4
6	PVER112	BV686497	183	AACAACACCACCTGGAGAC	57.3	ACA.AAAA.CCGAGGAATCACG	53.6
7	PVER255	BV686530	177	GCCCTTAA.CGTTGGA.GT.CAA	55.2	TTGCCCTTT.CAGATAAACG	53.6
8	PVER11	DQ185879	142	AAACTCAA.AGTTGTTCC	51	CCACTGACTCTAGCTCCTCC	56
9	BM189	AF483893	114	CTCCCACCTCTCA.CCCTCACT	58.1	GCCCAAGTGAAACTAAGTAGA	55
10	PVBR87	BV686488	163	CTCATTTGGTCTACCA.GTGC	56	CCTAGGTTCCCGACGATGT	57.5
11	IACT76	DQ469473	191	TTCATGGCCAAAT.AATCAGG	50	GAGAAA.AATTCAGAGGGTAGATG	50.6
12	PVER218	BV686520	185	TGTAAATGGCAGGCA.GTGAA	54.7	ATGA.OCACGCA.GTGA.CA.GAG	57.2
13	PVBR31	BV686603	188	AATGGCA.GGT.CAGTGAAA.CA	54.7	ATGA.OCACGCA.GTGA.CA.GAG	57.2
14	BM445	AF293023	129	GTTTGGGA.AG.CCCTCATA.CAG	55.4	ATCTTOGACCCACTTGTCT	56.3
15	PVBR242	BV686526	117	CCCTCACAC.CCCTTTTCTGATTC	53.8	GGGTTTCCTT.CIT.GGTTCTCC	55.3
16	GATS54	AF483841	114	GAACCTGCAAA.GCAA.AGAGC	55	TCACTCTCCA.CCAGAT.CGAA	55.4
17	PVM115	CB539191	143	AAATGTA.AAGT.CCTOCAT	46.1	CTGAGAGAAA.GAA.AGAGACA	48.9
18	BM417	U77995	116	GTTAGATCCCGCCAAATA.GTGC	55	AGATA.GGAAGGGCGTGGTT	56.1
19	PVBR125	BV686499	190	GGAGCGCA.GA.GAAAATCGAAA	52.6	CTGAGACCGCA.GA.CCAGACAC	57.9
20	BM153	AF483869	226	CCGTTAGGGA.GTGTGTGA.GG	55.22	TGACAA.CCATGAATAT.GCTAA.GA	52.4
21	BM211	AF483903	186	ATACCCACAT.GCA.CA.AGTTTGG	55.9	CCACCAT.GTGTCTCAT.GAA.GAT	55.2
22	PVBR67	BV686483	152	TGA.OCCATATATTTTTCTCA.CTCTT	52.2	ATGGGCATGGT.G3AT.GATA.G	54.6
23	BM6284	GO478003	189	CCCTATTTATCTGCAAATTCACGAG	54	GGA.GT.GTA.GATCCAAGATTAAG	52.3
24	PVBR5	DQ185875	195	AITAGACCGT.GATGACAGAG	51.6	A.CCAGAAATCCITTT.GAGTGTG	52.7
25	PVBR20	DQ185886	297	TGA.GAAAGTTGATGGATTG	50.1	TA.OGCTGTTGAGGCTCTCA.C	54.4
26	BM221	GO149520	149	G3AATGA.GA.GA.GAAAGCATGG	53.2	CCOCTCAGGTTTGGACT.CIT	56.6
27	BM137	AF483855	155	CCGTATCCGA.CCACCGTAAC	57.7	CGCTTACTCACTGT.AG3CACG	58.1
28	BM154	AF483870	218	TCTTGC.GACC.GA.CTCTCTCC	59.5	CTGAATCTGAGGAACGAT.GACCAG	57.1
29	BM114	AF483854	234	AGCCTGGT.GA.AATGCTCATAG	55	CATGCTTTGGTCCCTA.CACTCT.CT	55.1
30	BM187	AF483891	191	TTTTCTCA.AACTCA.CT.CCTTTCC	54.6	TGTGTTTGTGTTCCGA.ATTAT.GA	52.9
31	BM158	AF483874	130	CCGAGCA.CCGTAA.CTGAAATGC	58.6	CGCT.OGCTTACTCACTGTACGC	60

Los microsatélites fueron amplificados por medio de PCR utilizando termocicladores Eppendorf® y Bio-Rad®, en tubos de 0.2 µl de tapa plana esterilizados; se utilizó el protocolo de amplificación propuesto por Ponciano (2009); el protocolo final de amplificación se muestra en el Cuadro 2. Se utilizó GoTaq® G2 Green Máster Mix en cada una de la reacciones de cadena de la polimerasa, y se trabajó con concentración de templado de 150ng. El volumen por cada reacción final fue de 25 µl.

**Cuadro 2.** Programa de amplificación PCR para microsatélites de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

	Descripción	Temperatura °C	Tiempo min.
A	Desnaturalización	95	10.00
A <sub>1</sub>	Desnaturalización	95	0.30
B	Alineamiento	*	1.00
C	Extensión	72	0.30
D	Ciclos	30	A <sub>1</sub>
E	Enfriamiento	72	0.30
E <sub>1</sub>	Enfriamiento	55	5.00

\*Temperatura en °C de alineamiento según cada par de SSR. A<sub>1</sub>= Desnaturalización.

El producto de PCR fue desnaturalizado a 96°C por 5 minutos (Ponciano, 2009). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis horizontal en cámaras Fisher Biotech® y Bio-Rad®, el gel de separación se trabajaron a una concentración del 2%, en el primer pozo de cada cámara se utilizó un marcador de peso marca Promega® de 100-1000pb, el tamaño de los fragmentos en los SSR los cuales se encontraron entre un rango de 108 a 297 pb (Gonzalo, C., 2013), el tiempo de electroforesis fue 2 horas, a 100V constantes y 500mA.

Los geles producto de la electroforesis fueron teñidos para su visualización con bromuro de etidio (Ponciano, 2009).

Se determinaron las frecuencias alélicas propuestas por Hardy-Weinberg para calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas amplificadas, y luego se compararon entre sí con el rendimiento promedio de las líneas amplificadas con cada SSR para establecer un posible marcador asociado al rendimiento bajo condiciones de sequía.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Prueba de rendimiento en invernadero**

Se evaluaron las características fenotípicas de las variedades y líneas (rendimiento, altura de planta y longitud de raíz) bajo condiciones de riego óptimo y sequía, (Cuadro 3).

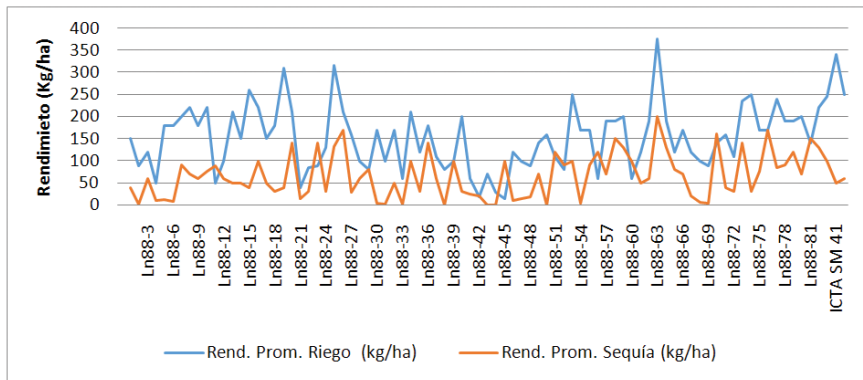
**Cuadro 3.** Rendimiento bajo condiciones de riego y sequía de las líneas L88<sub>1-81</sub> y variedades ICTA Petén, Ligero, SM41 y SM42.

Línea 88	Rend. Prom. Riego (kg/ha)	Rend. Prom. Sequía (kg/ha)	Altura de Planta riego (Alt.PI (cm))	Altura de Planta sequía (Alt.PI (cm))	Longitud de raíz (Long. Raíz riego (cm))	Longitud de raíz (Long. Raíz sequía (cm))
Ln88-1	150.2	40.0	31	24	27	21
Ln88-2	90.0	2.1	22	20	25	16
Ln88-3	120.0	60.0	32	28	24	27
Ln88-4	50.0	10.0	38	23	19	21
Ln88-5	180.0	12.0	38	23	30	23
Ln88-6	180.0	8.0	34	20	21	28
Ln88-7	200.0	90.0	33	31	25	30
Ln88-8	220.0	70.0	26	24	20	23
Ln88-9	180.0	60.0	31	19	22	33
Ln88-10	220.0	77.0	33	23	16	23
Ln88-11	50.0	89.5	31	24	20	22
Ln88-12	100.0	60.0	37	26	21	20
Ln88-13	210.0	50.0	37	16	12	21
Ln88-14	150.0	50.0	19	22	15	24
Ln88-15	260.0	40.0	28	21	16	20
Ln88-16	220.2	100.0	33	23	17	22
Ln88-17	150.0	50.0	27	24	16	24
Ln88-18	180.0	30.0	32	26	14	30
Ln88-19	310.0	40.0	31	20	13	22
Ln88-20	210.0	140.7	22	15	18	21
Ln88-21	40.0	15.0	29	12	19	16
Ln88-22	85.0	30.0	32	18	26	25
Ln88-23	90.0	140.0	18	29	19	22
Ln88-24	130.0	30.0	26	23	18	15
Ln88-25	315.0	132.9	31	22	22	22
Ln88-26	210.0	170.0	15	20	32	21
Ln88-27	160.0	28.5	29	22	23	28
Ln88-28	100.0	60.0	17	24	17	25
Ln88-29	80.1	80.0	33	23	28	17
Ln88-30	170.0	5.0	24	21	26	19
Ln88-31	100.0	2.0	24	19	23	28
Ln88-32	170.0	50.0	33	20	31	23
Ln88-33	60.0	3.0	28	20	25	23
Ln88-34	210.0	100.0	30	18	20	21
Ln88-35	120.0	30.0	33	21	23	24
Ln88-36	180.0	140.0	26	24	19	20
Ln88-37	110.0	60.0	23	20	19	28
Ln88-38	80.0	1.0	29	17	16	16
Ln88-39	100.0	100.0	32	24	31	27
Ln88-40	200.3	30.0	32	21	28	22
Ln88-41	60.1	25.0	33	19	22	28
Ln88-42	20.0	20.0	23	20	20	21
Ln88-43	70.0	0.1	24	22	23	23

Línea 88	Rend. Prom. Riego (kg/ha)	Rend. Prom. Sequía (kg/ha)	Altura de Planta neogo	Altura de Planta sequía	Longitud de raíz (Long.)	Longitud de raíz (Long.)
Ln88-44	30.0	0.1	22	12	21	20
Ln88-45	15.0	100.0	14	18	25	24
Ln88-46	120.0	10.0	24	16	23	20
Ln88-47	100.0	14.5	20	26	22	12
Ln88-48	90.0	19.0	26	22	16	24
Ln88-49	140.0	70.0	24	18	29	18
Ln88-50	160.0	0.0	29	15	18	17
Ln88-51	110.0	120.0	21	19	24	16
Ln88-52	80.0	90.0	20	20	26	21
Ln88-53	250.0	100.0	25	22	22	16
Ln88-54	170.0	5.0	27	17	22	20
Ln88-55	170.0	90.0	23	20	20	27
Ln88-56	60.5	120.0	31	22	21	21
Ln88-57	190.2	70.0	27	16	22	24
Ln88-58	190.0	150.0	31	21	26	22
Ln88-59	200.0	130.0	30	22	22	23
Ln88-60	60.0	100.0	45	23	22	24
Ln88-61	120.0	50.0	56	27	22	23
Ln88-62	190.0	60.8	35	19	24	22
Ln88-63	375.0	200.0	35	15	18	28
Ln88-64	190.0	130.0	41	16	18	20
Ln88-65	120.0	80.0	32	20	16	22
Ln88-66	170.0	70.0	30	20	27	20
Ln88-67	120.0	20.0	51	20	23	21
Ln88-68	100.0	7.0	38	22	22	23
Ln88-69	90.0	4.5	40	12	16	20
Ln88-70	140.0	160.0	52	15	29	21
Ln88-71	160.0	40.0	43	12	18	16
Ln88-72	110.0	30.0	27	18	24	25
Ln88-73	235.7	140.0	56	29	26	22
Ln88-74	250.5	30.0	30	23	22	15
Ln88-75	170.0	75.9	37	22	22	22
Ln88-76	170.0	170.0	33	20	20	21
Ln88-77	240.0	84.6	41	17	21	20
Ln88-78	190.0	90.0	37	20	22	27
Ln88-79	190.0	120.0	51	22	26	21
Ln88-80	200.0	70.0	40	16	22	24
Ln88-81	140.0	150.0	30	21	29	22
ICTA Ligero	220.0	130.0	33	22	16	23
ICTA Peten	245.7	100.0	31	23	20	24
ICTA SM 41	340.0	50.0	25	27	22	23
ICTA SM 42	250.0	60.0	30	19	25	22

A las líneas indicadas en el cuadro anterior se les aplicaron pruebas estadísticas, complementadas por una gráfica de líneas (Figura 1), para determinar las de mejor comportamiento en ambas condiciones de riego.

**Gráfico 1.** Rendimiento bajo condiciones de riego y sequía de líneas L88<sub>1</sub> y variedades ICTA Petén, Ligero, SM41 y SM42.



El cuadro 4 refleja el comportamiento de las líneas L-88 de forma sintetizada

**Cuadro 4.** Resumen del rendimiento líneas L-88.

	Rend. Prom. Riego (kg/ha)	Rend. Prom. Sequía (kg/ha)	Altura de Planta riego (Alt.PI (cm))	Altura de Planta sequía (Alt.PI (cm))	Longitud de raíz (Long. Raíz riego (cm))	Longitud de raíz (Long. Raíz sequía (cm))
Promedio	154.7467	66.3907	30.95	20.67	21.79	22.13
Valor Máx	375.0000	200.0000	56.16	31.00	32.00	33.00
Valor Mín	15.0000	0.0100	14.00	12.00	12.00	12.00

En la prueba en invernadero al someter las líneas y variedades a condiciones de riego complementario (**Rg**) se obtuvo un rendimiento promedio de 154.7, resultando la línea L88-63 la más productiva con 375kg.Ha<sup>-1</sup> y la línea L88-45 la de menor rendimiento, cumpliendo con el requerimiento hídrico (INTA, 1997) de 362mm de agua, mientras que Bajo condiciones de sequía (**Sq**) el rendimiento promedio fue de 66.4 kg.Ha<sup>-1</sup>; el máximo rendimiento obtenido fue de 200kg.Ha<sup>-1</sup> para la línea L88-63 y el menor rendimiento fue el de las líneas (L) 88-31, 38, 43, 44 y 50 encontrándose por debajo del

Kilogramo por hectárea. La línea 63 se encontró dentro de las diez líneas más vigorosas en el desarrollo del cultivo (buen tamaño, follaje), bajo ambas condiciones; así también presentó un buen rendimiento y cualidades fenotípicas favorables bajo condiciones de sequía. El criterio de selección considerado fue rendimiento, ya que el mismo es un carácter eficiente para la detección de genotipos tolerantes a sequía (Terán, 2002).

Las variaciones en rendimiento pueden deberse a la composición genética aportada por el progenitor común B98311, ya que posee tolerancia a sequía, derivada de la línea mejorada de la raza Durango y las características de rendimiento de un cultivar de la raza Mesoamericana. El germoplasma de la raza Mesoamericana se reconoce como una fuente de genes para el mejoramiento en ambientes secos y húmedos en América Central (White *et al.* 1994).

El rendimiento similar para las condiciones de Riego y Sequía en algunas líneas (L88 39, 76, 81) posiblemente se debe a que el control de patógenos fue similar para ambos; lo cual coincide con otros estudios realizados por (Pérez, 2009).

## **Marcadores Moleculares**

### **Microsatélites (SSR)**

Se evaluaron un total de 31 marcadores (Cuadro 1) reportados como polimórficos por otros estudios (Blair, 2003; Gaitán, 2002), se realizó un estudio de genética descriptiva con el fin de conocer polimorfismos entre padres y características de los marcadores dentro de la población. De los SSR solamente amplificó el 16% (BM152, BM189, IAC76, BMc284 y BM221); el SSR BM189 presentó 6 amplificaciones en las líneas L88<sub>9-10-62-63-72 y 74</sub>, con un rendimiento promedio 95.13 Kg.Ha<sup>-1</sup>, SSR BM152 con 5

amplificaciones L88<sup>21-22-58-74 y 75</sup>, con un rendimiento promedio 88.18 Kg.Ha<sup>-1</sup>, SSR IAC76 2 amplificaciones L88<sup>3 y 21</sup> con un rendimiento promedio 37.5 Kg.Ha<sup>-1</sup>, SSR BMc284 4 amplificaciones L88<sup>23-24-74 y 75</sup> un rendimiento promedio 103.98 Kg.Ha<sup>-1</sup> y SSR BM221 con una única amplificación en la línea L88 74 con un rendimiento promedio 75.9 Kg.Ha<sup>-1</sup>, las variedades ICTA Petén, Ligero, SM41 y SM42; el SSR BM221 no mostraron una sola amplificación. El promedio de las amplificaciones en las Líneas fue del 4%; por otra parte, ninguna de las variedades ICTA Petén, Ligero, SM41 y SM42 mostró amplificación, probablemente debido a que no eran líneas puras (Burr, 1998).

Se obtuvo el valor p Hardy-Weinberg para calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas amplificadas (Cuadro 5) lo que dio como resultado que los marcadores BMc284 y BM189 puedan utilizarse en el genoma para determinar posible tolerancia a sequía basado en el rendimiento obtenido (Figura 2). Lo anterior puede observarse en el cuadro 9

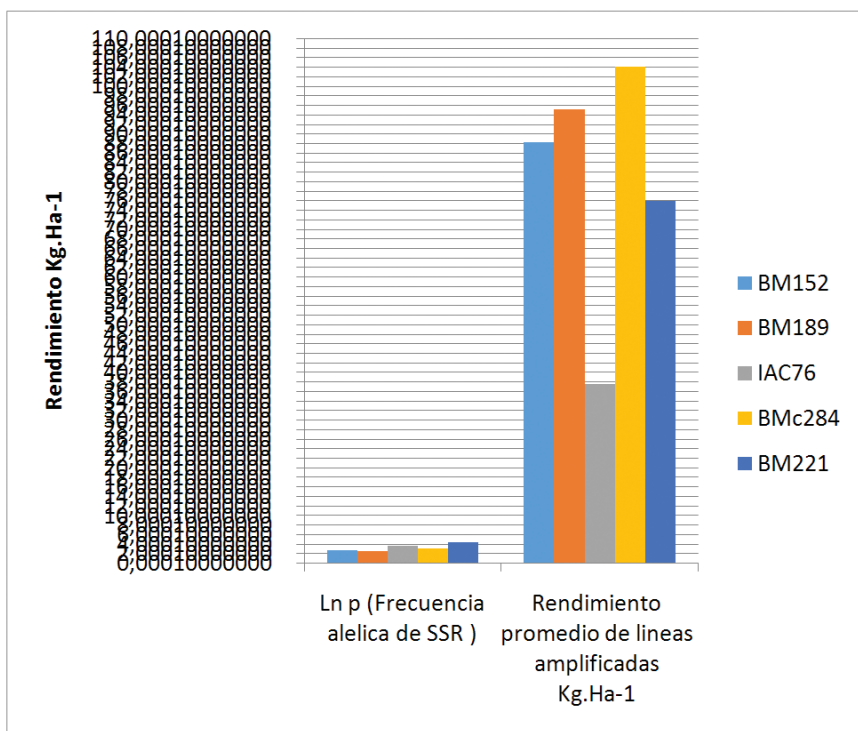
**Cuadro 5.** Frecuencias por marcador asociado a rendimiento de frijol bajo condiciones de sequía.

Locus	Valor p	Ln p	Rendimiento Kg.Ha <sup>-1</sup>
BM152	0.0588235294117647	2.83321334406	88.18
BM189	0.0705882352941176	2.65089178726	95.13
IAC76	0.0235294117647059	3.749504075930	37.50
BMc284	0.0470588235294118	3.056356895370	103.98
BM221	0.0117647058823529	4.442651256490	75.90

Fuente: Datos tomados de la matriz binaria para la amplificación en electroforesis.

Esta asociación entre los marcadores señalados y la tolerancia a sequía puede reflejarse en la figura 2.

**Figura 2.** Gráfica rendimiento bajo sequía de líneas L88<sub>1-81</sub> y variedades ICTA Petén, Ligero, SM41 y SM42 y su asocio con SSR.



## Construcción mapa de ligamiento

Se evaluó un total de 31 marcadores SSR; en la construcción del mapa se consideró la ubicación de los microsatélites en los mapas previos a esta investigación (Blair et al., 2003). Esto se presenta en el cuadro 6

**Cuadro 6.** Características y posición en el genoma de los SSR.

Nombre	Genebank	Tamaño esperado cM
BM152	AF483868	127
BM189	AF483893	114
IAC76	DQ469473	191
BM221	AF483903	186
BMc284	GO478003	189

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Para los 5 marcadores microsatélites se construyó un mapa de ligamiento con las L88; se reportan 11 grupos de ligamiento con distancias promedio de 176.8cM según NCBI. En la gráfica de mapa de ligamiento se observa que los marcadores BM189 y BMc284 con posiciones 2.83 Y 12.29cM. En base al número de amplificaciones positivas, entre estas regiones podrían encontrarse algunos de los genes de tolerancia a sequía.

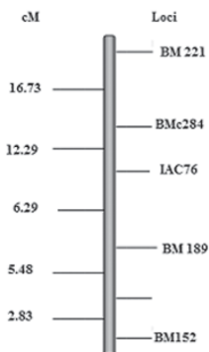


Figura 3: Mapa de ligamiento con 16 individuos de la L88.

## CONCLUSIONES

1. De los 31 marcadores moleculares SSR evaluados, solamente cinco marcadores BM152, BM189, IAC 76, BM221 y BMc284 amplificaron con las L88; los cuales posiblemente pueden asociarse con el rendimiento de Líneas de frijol y con la característica de tolerancia a sequía. Los marcadores BM152 y BM189 mostraron la mayor amplificación de bandas en las líneas L-88; BM152 amplificó para las líneas L88-21-22-58-74 y 75, BM189 amplificó con las líneas L88-9-10-62-63-72 y 73.
2. El marcador BM189 posiblemente es el que se encuentre asociado con la característica de tolerancia a sequía en las líneas evaluadas ya que fue el único que amplificó de forma positiva para la L88-63 que presentó mejores rendimientos bajo condiciones de sequía, y que coincide con el estudio “Técnicas de detección indirecta de la resistencia a la sequía en frijoles secos elaborado por Fraham en el año 2003.
3. Las posiciones promedio para el mapeo genético de los marcadores evaluados estuvo entre 2.83 y 12.29cM para los marcadores BM189 y BMc284 en frijol. Entre estas regiones posiblemente puedan encontrarse genes de tolerancia a sequía.
4. Las líneas L88-63 y L88-23 presentaron los rendimientos más elevados y las características fenotípicas más vigorosas en las condiciones de sequía.

## RECOMENDACIONES

1. Aplicar más marcadores moleculares que puedan estar asociados con genes de tolerancia a sequía.
2. Analizar las Líneas L88 en condiciones de campo bajo las mismas modalidades de riego y sequía para observar la interacción de genotipo ambiente y campo y verificar la asociación de los marcadores identificados con tolerancia a sequía.
3. Evaluar líneas criollas que presenten tolerancia a sequía, cumpliendo con la regla de utilizar líneas de la progenie a partir de la segunda generación (F2), retrocruzas (BC), líneas recombinantes hermanas (RILs) para evitar niveles elevados de distorsión en la segregación durante el análisis de ligamiento.

## REFERENCIAS

1. Afanador, L., S. Hadley, et al. (1993). "Adoption of a mini-prep DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L)." *Bean Improv. Coop* **36**: 10–11.
2. Acosta-Díaz, E., C. Trejo-López, et al. (2004). "Adaptation of Common Bean to Drought Stress During the Reproductive Stage." *Terra Latinoamericana* **22**(1): 49-58.
3. Becerra-Velásquez, V.L., y Gepts, P. (1994). RFLP diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genome* **37**: 256-263.
4. Beebe, S., Skroch, P.W., Thome, 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**(1):264-273.
5. Blair, M.W., Giraldo, M.C., Buendía, H.F., Tovar, E., Duque, M.C., Beebe, S.E. (2006). Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **113**: 100-109.
6. Blair, M.W., Lair, M.W., Fregene, M.A., Beebe, S.E., Ceballos, H. (2007). Marker-assisted selection in common beans and cassava. pp. 81-115.
7. Blair, M.W., Pedraza, F., Buendía, H.F., Gaitán-Solis, E., Beebe, S.E., Tohme, J. (2003). Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 1362-1374.
8. Broughton, W. J., G. Hernandez, et al. (2003). "Beans (*Phaseolus spp.*) – Model Food Legumes" *Plant and Soil* **252**: 55–128.
9. Burr, B., Burr, F.A., Thompson, K.H., Albertson, M.C., y Stuber, C.W. (1998). Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* **118**: 519-526.
10. Casas J, Ramírez, J, Sánchez, J, Parra, J., Hernández, S., Chuela, M. (2003) .Características agronómicas en retrocruzamientos maíz-teocintle. *Revista Fitotecnía*. Vol.26. Mexico.p.239-248.
11. Centro Internacional de agricultura tropical (CIAT). (1986) Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Fernando Fernandez de C. Paul Gepts. Marcelino López. Cali Colombia: 4-6.
12. Cerón-Rojas, J.J. y Sahagún-Castellanos, J. (2007). Estimating QTL biometrics parameters in F2 populations: a new approach. *Agrociencia* **41**:57-73.

13. Chambers GK and Macavoy ES (2000) Microsatellites: Consensus and controversy. *Comp BiochemPhysiol*, B 126:455-476.
14. Collard, B.C., Jaufer M.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
15. Debouck, D. and R. Hidalgo (1985). Morfología de la planta del frijol común. In *Frijol: Investigacion y produccion.* CIAT-PNUD.
16. Ferreira, M., Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA Brasil. 220p.
17. Frahm, M.A.; Foster, E.F.; Kelly, J.D. 2003. Indirect screening techniques for drought resistance in dry beans. *Annu. Rept. Bean Improv. Coop.* 46: 87-88.
18. Freyre, R., Skroch, P.W., Geffroy, V., Adam-Blondon, A.F., Shirmohamadali, A., Johnso, W.C., Llaca, V., Nodari, R., Pereira, P.A., Tsai, S.M., Tohme, J., Dron, M., Nienhuis, J., Gaitan-Solis, E., M. C. Duque, et al. (2002). “Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* spp.” *Crop Science* 42: 2128–2136.
19. Gepts, P. Bliss, F. (1986). Phaseolin variability among wild and cultivated common Beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.* 40: 469-478.
20. Gepts, P., Debouck, DG. (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Common beans: research for crop improvement.* V. A. Schoonhoven and Voysest, O. Wallingford Common wealth Agricultural Bureaux International. 7–53.
21. Gepts, P., Beavis, W.C., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stañker, H.T., Weeden, N.F., Young, N.D. (2005). Legumes as a model plant family. *Plant Physiology* 137:1228–1235.
22. Gonzalo, C., Palacios Rojas, N., Espinoza, Bedoya. (2013). Diversidad genética en maíces nativos mexicanos tropicales. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol.36. Supl. 3-A: 329-328
23. Henry, R.J. 2001. *Plant Genotyping. The DNA Fingerprinting of Plants.* CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. 344 p.
24. Hoelzel, A. R. (1998). “Molecular Genetic Analysis of population.” *The Practical Approach Series.*
25. ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola), MAGA. (1995) Nueva Variedad de Frijol Negro Precoz y Resistente a Mosaico Dorado

26. ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola), MAGA. (2007) Nueva Variedad de Frijol Negro ICTA Peten <sup>AMC</sup> e ICTA Sayaxche.
27. Instituto Nacional de Adecuación de Tierras (INAT), Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). (1997). Manejo de cultivos bajo riesgo en distritos de pequeña escala. Manual de asistencia técnica 5. 174pp.
28. Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología (INSIVUMEH) en línea Consultado de datos históricos 2007.
29. Iriarte, G. 2002. Características agronómicas en una retrocruza avanzada entre una accesión silvestre y una variedad andina mejorada (ICA Cerinza) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).
30. Jones, N., Ougham, H., and Thomas, H. 1997. Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytologist* 137:165-177.
31. Karp, A., Edwards, K.J. (1998). DNA markers: a global overview», en: *DNA markers: protocols, aplicaciones and overviews*. Eds: G. Caetano- Anollés y P.M. Gresshoff, Wiley, Nueva York: 1-13.
32. Kelly, J., Afanado, L., Halley, S., Miklas, P. (1994) Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento de frijol. *Agronomía Mesoamericana*.5:1-7.
33. Lambers, H., Chapin, F.S. III., Pons, T.L. (2000). *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, New York Inc. 539p
34. Lander, E., y Botstein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.
35. López, M., F. Fernández, et al. (1985). *Frijol: Investigación Y Producción*. Palmira.
36. MAGA (Ministerio de Agricultura y Ganadería y Alimentación) . (2004). *Oficina de Políticas y Estrategias*, SV. Guatemala.
37. MAGA (Ministerio de Agricultura y Ganadería y Alimentación). (2015). *Informe situación del frijol, Guatemala abril 2015*.
38. Mansilla, E. (2010). *Elementos y patrones constitutivos del riesgo de sequía en América Central*. Global Assessment Report. UNISDR.
39. Martíz-Gomez, P., Sanchez-Perez, M., Rubio, F., Dicenta, T.M., G.O. Sozzi. (2005). Application of recent biotechnologies to Prunus tree crop genetic improvement. *Cien. Inv. Agr.* 32:73-96.
40. Miklas, P. N. y S. P. Singh (2007). “Common Bean.” *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Volumen 3*.

41. Mishra, V. y K. A. Cherkauera (2010). "Retrospective droughts in the crop growing season: Implications to corn and soybean yield in the Midwestern United States." *Agricultural and Forest Meteorology* 150: 1030–1045.
42. Nodarir, R., Tsai, S.M., Guzmán, P., Gilbertson, R.L., Gepts, P. (1992). Toward an Integrated Linkage Map of Common Bean. III. Mapping Genetic Factors Controlling Host-Bacteria Interactions. *Genetics* 134: 341-350.
43. Paterson, A. (1996). *Genome mapping in plants*. Academic Press. California, USA. 330 p.
44. Paz, T., Selmerira, F., Guy, D. (2007). Informe de cadena de frijol rojo en Nicaragua. NITLAPAN. International Food Policy Research Institute, Managua.
45. Pérez, J. (2009). Evaluación de genotipos de frijol andino de la colección CIAT bajo condiciones de sequía.
46. Phillips, W; Fritz, P. (1995). Cacao y marcadores de ADN en el CATIE. Mejoramiento genético y desarrollo de los cultivos tropicales. Turrialba, CR, CATIE. p 25.
47. PNUD. (2012). Evaluación del bienestar humano y ambiente en el corredor seco oriental de Guatemala Programa Naciones Unidas para el Desarrollo. 81 p. Guatemala.
48. Ponciano, et al. 2009 Caracterización preliminar con microsatélites de a colección guatemalteca de frijol común trepador. *Agronomía Mesoamericana* 20 (2):245-254
49. Rosales-Serna, R., J. Kohashi-Shibata, et al. (2004). "Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars." *Field Crops Research* 85: 203-211.
50. Rubio, G.; Liao, H.; Yan, X.; Lynch, J.P. 2003. Topsoil foraging and its role in plant competitiveness for phosphorus in common bean. *Crop Sci.* 43: 598-607.
51. Semagn, K., Bjornstad, Å., Skinnnes, H., Maroy, AG., Tarkegne, T., William, M. (2006). Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545–555.
52. Singh, S.P.; Muñoz, C.G. (1999). Resistance to common bacterial blight among Phaseolus species and common bean improvement. *Crop Sci.* 39: 80-89.
53. Staub, J.E., Kuhns, L.J., Grun, P., and May, B. 1982. Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107:405-408.
54. Terán H. y Singh, S. P. (2002) Comparisons of Sources and lines selected for drought resistances in common bean. *Crop Sci.* 42:64-70.
55. Tanksley, S. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27:205-233

56. Valdez, E., G. Kahl. (2002). Huella de ADN en genomas de plantas. Mundiprensa- Aedos, Barcelona.
57. Vallejos, C.E., Gepts, P. (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: 847-856.
58. Vallejo, F. y Estrada, E. (2002). Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.
59. Voysest, O. V. (2000). "Mejoramiento Genético de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)." Centro Internacional de Agricultura Tropical Publicacion CIAT 321
60. White, J. W. and S. P. Singh (1991). Breeding for adaptation to drought Common Beans Research for Crop Improvement. A. Schoonhoven and O. Voysest. Cali 501-560.
61. WHITE, J.W.; OCHOA-M., R.; IBARRA-PEREZ., F.; SINGH, S.P. 1994. Inheritance of seed yield, maturity and seed weight of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under semi-arid rainfed conditions. *J. Agr. Sci.* 122: 265-273.
62. Young, N.D. (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 479-501.
63. Yu, K. Park, S.J., Pousa, V., Gepts, P. (2000). Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity*91: 429- 434.



# ANÁLISIS DE SECUENCIAS GENÉTICAS PARA EL ESTUDIO DE RELACIONES FILOGENÉTICAS Y EVOLUCIÓN DEL GÉNERO *COFFEA*

## **Autores:**

Carlos Orozco Castillo<sup>1</sup>

Chalmers Kenneth<sup>2</sup>

Waugh Robbie<sup>3</sup>

Powell Wayne<sup>4</sup>

Recibido el 21 de junio de 2017.

Aprobado el 18 de julio de 2017.

---

<sup>1</sup>Carlos Orozco Castillo, Profesor Investigador FAUSAC.

<sup>2</sup>Chalmers Kenneth.

<sup>3</sup>Waugh Robbie.

<sup>4</sup>Powell Wayne Profesores investigadores, James Hutton Institute; Reino Unido.

## RESUMEN

Variabilidad genética, relaciones filogenéticas y evolución de las especies de *Coffea*, son aspectos importantes a considerar en la evaluación y conservación de recursos genéticos así como en programas de mejoramiento en el café.

Se han realizado investigaciones para determinar las afinidades genéticas entre las especies del género *coffea*, así como la evolución de las mismas, hasta llegar a la especie comercial actualmente más utilizada, el tetraploide *C. arabica*. Sin embargo, los análisis realizados aún no son definitivos.

En este estudio, secuencias genéticas específicas de regiones no codificantes del cloroplasto. (Espaciador intergénico TrnL-TrnF e Intrón TrnL), así como de la región V7 de la mitocondria fueron analizadas. Adicionalmente secuencias genéticas nucleares también fueron examinadas. El propósito fue encontrar las relaciones filogenéticas en el género *Coffea* y la ruta de evolución de *C. arabica*.

Los resultados reflejan las asociaciones genéticas así como el origen y distribución geográfica de las especies de café. Así también se demostró que la especie diploide *C. eugenioides* es el progenitor materno de la especie tetraploide *C. arabica* y una fuerte evidencia de que *C. canephora* sea el progenitor paterno Sin embargo los datos no descartan a *C. brevipes* como una de las especies paternas. Las inferencias de esta investigación pueden ser importantes en el mejoramiento genético de las especies del género *Coffea*.

## ABSTRACT

Genetic variability, phylogenetic relationships and evolution of *Coffea* species are important considerations in the evaluation and conservation of coffee genetic resources as well as in coffee breeding.

Research has been carried out to determine the genetic affinities between the species of the genus *Coffea*, as well as the evolution of them, to reach the commercial species currently most used, the tetraploid *C. arabica*. However, the analyzes performed are not yet definitive.

In this study, specific genetic sequences from chloroplast non-coding regions, (TrnL-Trn F intergenic spacer and Intron Trn L) and that of the V7 region of the mitochondria were analyzed. Additionally, nuclear genetic sequences were also examined. The purpose was to find phylogenetic relationships in the genus *Coffea* and the evolutionary path of *C. arabica*

The results reflect the origin and geographical distribution of coffee species. It has also been demonstrated that *C. eugenioides* is the maternal progenitor of the tetraploid *C. arabica*, and strong evidence is provided for *C. canephora* being the paternal donor. However the obtained data do not exclude *C. brevipes* as a paternal donor. The conclusion of this research could be important in genetic breeding of *Coffea* species.

## INTRODUCCIÓN

Se han realizado diversos estudios para investigar las afinidades genéticas entre las especies del género *Coffea*. A pesar de ello, tanto las relaciones entre las especies silvestres de café, así como el origen del tetraploide comercial; la especie *C. arabica* todavía no están claras. Sobre la base de observaciones cromosómicas en haploides ha sido sugerido que *C. arabica* podría ser un autotetraploide (Narasimhaswamy, 1962). Sin embargo, el comportamiento meiótico de algunos híbridos interespecíficos y el modo de herencia de los genes duplicados indican que *C. arabica* es una loloploide (Carvalho, 1952), o quizás un segmento de un tetraploide (Grassias y Kammacher, 1975). Su distribución geográfica es característica de los poliploides, ya que este se encuentra casi completamente fuera del rango de distribución de las especies diploides (Carvalho et al., 1969). Charrier y Berthaud (1985), sugieren que *C. arabica* podría haber surgido de la hibridación natural entre dos especies de café diploides ancestrales, seguidas de formación de gametos no reducidos.

En este estudio, dos regiones no codificantes del ADN del cloroplasto seleccionados por Taberlet et al. (1991) se han utilizado para examinar la filogenia molecular en *Coffea* spp. La variación en ADN mitocondrial en la región V7 del gen srRNA también ha sido estudiado. (Este segmento de ADN mitocondrial fue previamente usado por Russell (1994)). Para complementar la información, una secuencia nuclear derivada de un clon anónimo de PstI también fue utilizado. El objetivo principal fue investigar las relaciones filogenéticas dentro del género *Coffea* y la posible evolución de *C. arabica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El material vegetal utilizado se describe en el Cuadro 1. En análisis de secuencias nucleares, no se incluyó N39, en el supuesto que la mayor parte de las accesiones de *C. arabica* tienen el mismo patrón de secuencia. Cuatro accesiones representando cuatro géneros diferentes en la familia *Rubiaceae* fueron utilizados como especies fuera del grupo. Estas fueron *Vangueria edulis*, *Gardenia thumbergia*, *Mitrostigma axillare* y *Ixora Findlaysoniana*.

Especies -	accesiones-	origen-	fuelle
<i>C. stenophylla</i>	Don G.DBA	Ivory Coast	ORSTOM
<i>C. racemosa</i>	Anon	East Africa	ORSTOM
<i>C. pseudozanguebariae</i> Brieds.	Diani	Kenya	ORSTOM
<i>C. humilis</i>	Anon	Ivory Coast	ORSTOM
<i>C. congensis</i> Froehner	D7	Central Africa	ORSTOM
<i>C. sessiliflora</i>	Anon	Central Africa	ORSTOM
<i>C. brevipes</i>	Anon	Ivory Coast	ORSTOM
<i>C. liberica</i>	Anon	Guatemala	ANACAFE
<i>C. liberica</i> (Excelsa)*	Anon	Guatemala	ANACAFE
<i>C. canephora</i>	Robusta 3751	Indonesia	ANACAFE
<i>C. canephora</i>	Robusta 3753	Indonesia	ANACAFE
<i>C. canephora</i>	Robusta 3580	Congo	ANACAFE
<i>C. eugenioides</i> Moore	Anon	Kenya	ORSTOM
<i>C. eugenioides</i> Moore	Anon	Kenya	ORSTOM
<i>C. arabica</i>	ET57A216737	Ethiopia	CATIE
<i>C. arabica</i>	ET52A216733	Ethiopia	CATIE
<i>C. arabica</i>	N39	Tanzania	LARI
<i>C. arabica</i>	Caturra	Brazil	ANACAFE

*Coffea liberica* (excelsa) es también conocida como *c. dewevrei*.

## **Procedimientos moleculares y análisis de datos de secuencias genéticas**

Los cebadores de cloroplasto específicos utilizados fueron idénticos a los utilizados por Taberlet et al. (1991) para amplificar la región espaciadora intergénica trnL Exón-trnF y el trnL Intrón. Los cebadores mitocondriales utilizados fueron diseñados por Russell (1994) para amplificar la región V7 del ADN mitocondrial ribosomal de la planta. Cebadores para la amplificación del ADN nuclear fueron diseñados a partir de uno de seis clones secuenciados de una biblioteca PstI de café. Todos los cebadores se enumeran en los cuadros 2 y 3.

### **Clonación de productos PCR**

Los productos amplificados de PCR fueron purificados usando el sistema de limpieza de ADN (PROMEGA); el método está basado en unir largos fragmentos de ADN con resina insoluble, lo cual permite una posterior limpieza y purificación.

Los productos de PCR purificados fueron ligados en pGEM<sup>R</sup>-T por procedimientos ya estandarizados. La máxima eficiencia de células DH5 (delta) (Gipco-BRL) fueron usados para transformación. La identificación de los clones fue basada en una evaluación azul/blanco; las colonias blancas generalmente contienen ADN insertado (recombinantes) mientras las colonias azules no los tienen (no recombinantes). Stocks permanentes de los clones seleccionados fueron realizados y almacenados (Maniatis et al., 1982). El secuenciador Applied Biosystems 373 ADN automatizado, fue usado para secuenciar los fragmentos de ADN clonado.

## **Análisis de datos**

Para el análisis de coordenadas principales, se usó el paquete estadístico de Higgins (1992). El análisis de coordenadas principales está basado en la matriz de similitud derivada de los coeficientes Nei and Li (1979), conducidos con el paquete estadístico GENSTAT 5. Para los análisis de las secuencias se utilizó el método de GGENS Y SHARP (1988). El programa PHYLIP, (Felsenstein 1993) fue utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos. Para evaluar estadísticamente los arboles filogenéticos la técnica conocida como “bootstrapping” fue utilizada; este es un procedimiento intensivo estadístico computarizado que requiere el uso de los programas PHYLIP (SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR and CONSENSE). El árbol filogenético fue construido utilizando un método de matriz de distancias (programa NEIGHBOR, paquete estadístico PHYLIP). Las distancias genéticas fueron corregidas con sustituciones múltiples usando el método de dos parámetros de Kimura’s (Kimura’s 1983).

Los promedios de sustitución de bases en el ADN nuclear y del cloroplasto (espaciador intergénico e intrón) fueron obtenidos usando el programa fast DNA ml (Olsen et al., 1994) que usa el máximo algoritmo de probabilidad (Felsenstein, 1981). Todos los cálculos de sustituciones de bases fueron fundamentados en el árbol filogenético construido, usando los programas DNADIST y PHYLIP NEIGHBOR. Los porcentajes de divergencia entre las secuencias, fue estimado con la fórmula utilizada por O’Donell (1992).

**Cuadro 2.** Secuencias de cebadores utilizados para amplificar y secuencia del genoma nuclear del café.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Región amplificada</b>
COC1 (adelante)	5’TGGGAGAAGGAGACTGAA3’	anónimo nuclear
COC2 (reverso)	5’CGAAAGCCAAATAGAAA3’	anónimo nuclear

**Cuadro 3.** Secuencias de cebadores específicos (regiones de cloroplasto y mitocondria) usados para la detección de diversidad genética en especies del género *coffea*.

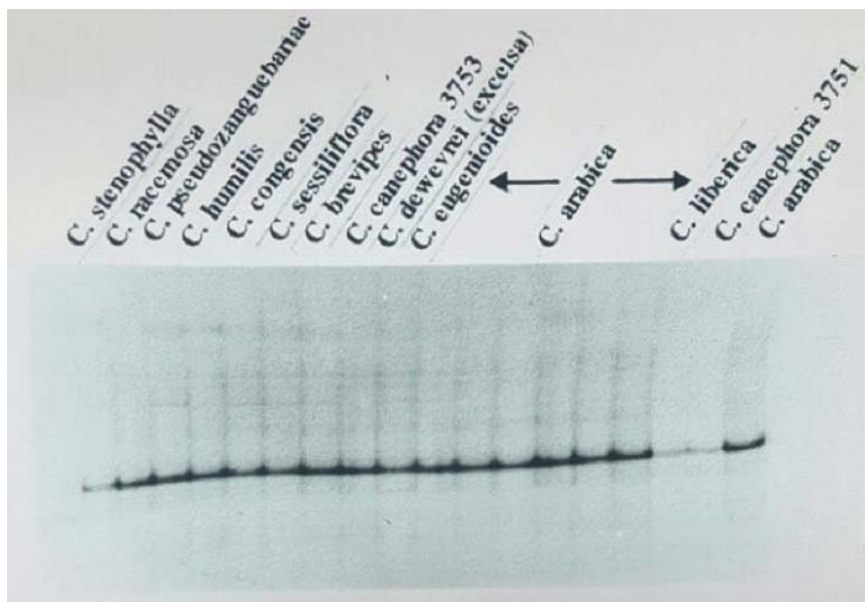
NOMBRE	SECUENCIA	REGIÓN AMPLIFICADA
CH-A	5' CATTACAANTGCGATGCTCT 3'	Chloroplast DNA trnT(UGU to trnL(UUA) intergenic region
CH-B	5' TCTACCGATTTCGCCATATC 3'	
CH-C	5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3'	Chloroplast DNA trnL(UUA) intron
CH-D	5' GGGGATAGAGGGACTTGAAC 3'	
CH-E	5' GGTTC AAGTCCCTCTATCCC3'	Chloroplast DNA trnL(UAA) to trnF(GAA) intergenic region
CH-F	5' ATTTGAACTGGTGACACGAG3'	
MT-P1V7	5' CTTTCATACAGGTGCTGC 3'	V7 region of plant mitochondrial rRNA
MT-P2V7	5' TCAC TGGCAGTCCCTCGT 3'	

CH = Cloroplasto MT= Mitocondria.

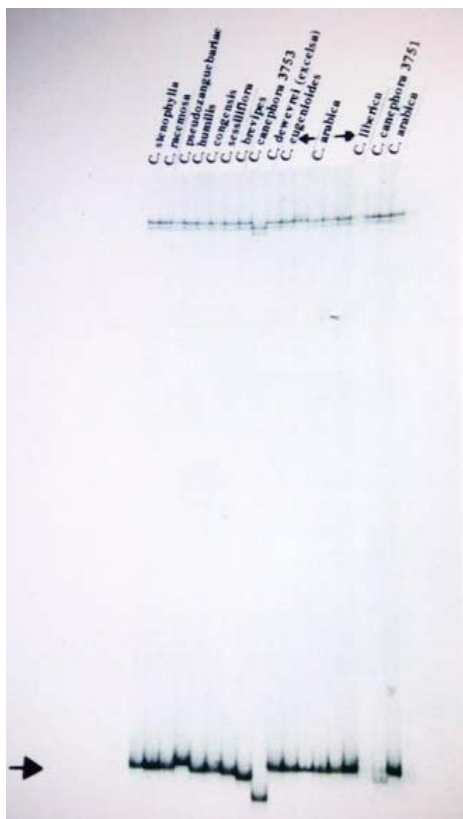
## Resultados

### Detección del polimorfismo usando una hebra simple de polimerorismo conformacional por sus siglas en inglés (SSCP)

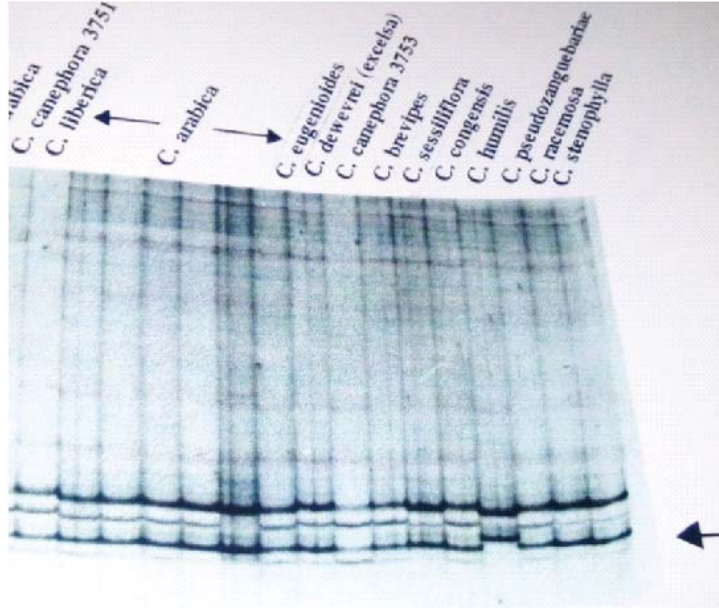
Después de la amplificación del espaciador intergénico trnL-trnF y trnL intrón del cloroplasto y de la región V7 de la mitocondria, los productos se examinaron por separación en geles SSCP. El espaciador intergénico y el intrón fueron polimórficos en diferentes especies (Figuras 1 y 2 respectivamente), mientras que los productos mitocondriales fueron monomórficos (figura 3). La presencia del polimorfismo SSCP indica que estas regiones podrían revelar diferencias al nivel de secuencias, lo cual podría ser valioso en cuanto a la información sobre la filogenia del género *Coffea*.



**Figura 1.** Polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) de especies de *Coffea* para el espaciador intergénico trnL-trnF de cloroplasto.



**Figura 2.** Polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP) de la especie *Coffea* para el intrón trnL-trnF del cloroplasto.



**Figura 3.** Análisis secuencial de las regiones del espaciador intergénico trnL-trnF y del intrón trnL del cloroplasto.

### **Análisis de la secuencia del Cloroplast TRNL-TRNF espaciador intergénico y regiones TRNL INTRON**

Fragmentos de ADN de 18 accesiones que representan 12 especies fueron clonados y secuenciados. Para el espaciador intergénico trnL-trnF cuatro especies adicionales clasificadas en la familia *Rubiaceae* también fueron secuenciadas para comparar las distancias genéticas dentro del género *Coffea* en relación a la de los otros géneros diferentes. Para el intrón trnL sólo *I. findlaysoniana* fue secuenciado y utilizado como un especie fuera de grupo. Los cuadros 4 y 5 muestran el tamaño del espaciador intergénico trnL-trnF del cloroplasto amplificado y las regiones del intrón trnL respectivamente para

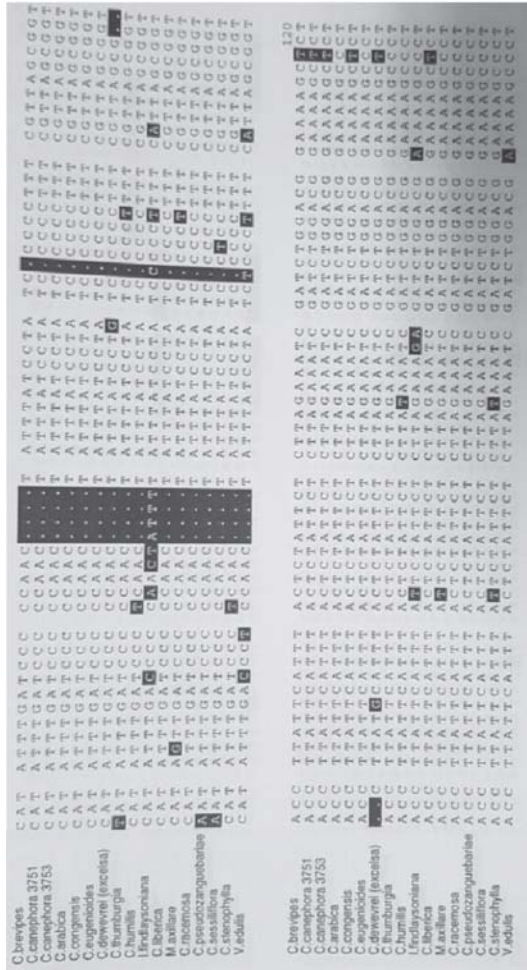
todos los genotipos estudiados. No hubo diferencias entre *C. arabica*, por lo tanto, sólo un material de esta especie se incluyó en el análisis posterior. La figura 4 muestra la alineación completa para 13 accesiones de café y especies fuera del grupo para la región del espaciador intergénico trnL-trnF. La tasa global de sustituciones de nucleótidos fue superior a la tasa de inserciones/delesiones (16 sustituciones de nucleótidos contra 1 inserción-delección). La transición / transversión fue del orden de 1.2 (véase Cuadro 6). La figura 5 muestra la alineación completa de las accesiones de café y las especies fuera del grupo para el intrón trnL. Al igual que en el espaciador intergénico trnL-trnF, el porcentaje de la tasa de sustitución de nucleótidos en el intrón trnL fue superior a la de inserciones / delesiones (13 sustituciones contra 1 inserción / supresión). La transición / transversión fue de 2,2 (Cuadro 6).

**Cuadro 4.** Tamaño del fragmento (pb) para el espaciador intergénico del cloroplasto trnL-trnF en especies del *Coffea* y especies comparativas fuera de grupo.

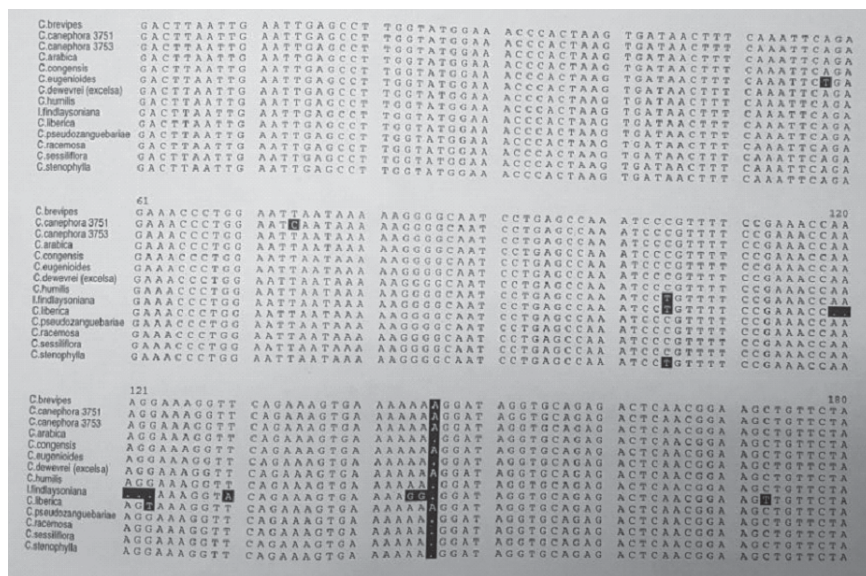
GENÓTIPOS	TAMAÑO DE FRAGMENTO (pb)
1. <i>C. brevipes</i>	394
2. <i>C. canephora</i> 3753	394
3. <i>C. canephora</i> 3751	394
4. <i>C. arabica</i> (cinco accesiones)	394
5. <i>C. congensis</i>	394
6. <i>C. eugenioides</i>	394
7. <i>C. dewevrei</i> ( <i>exelsa</i> )	383
8. <i>G. thurbergia</i>	385
9. <i>C. humilis</i>	394
10. <i>I. findlaysoniana</i>	390
11. <i>C. libertad</i>	394
12. <i>M. axilar</i>	391
13. <i>C. racemosa</i>	394
14. <i>C. pseudozanguebariae</i>	394
15. <i>C. sessiliflora</i>	394
16. <i>C. stenophylla</i>	394
17. <i>V. edulis</i>	371

**Cuadro 5.** Tamaño del fragmento (pb) para el intrón trnL del cloroplasto en especies del género *Coffea* y especies comparativas fuera de grupo.

<b>GENÓTIPOS</b>	<b>TAMAÑO DE FRAGMENTO DE (pb)</b>
1. <i>C. brevipes</i>	531
2. <i>C. canephora</i> 3753	531
3. <i>C. canephora</i> 3751	531
4. <i>C. arabica</i> (5 accessions)	530
5. <i>C. congensis</i>	531
6. <i>C. eugenoides</i>	530
7. <i>C. dewevrei</i> ( <i>exelsa</i> )	531
8. <i>C. humilis</i>	530
9. <i>I. findlaysoniana</i>	525
10. <i>C. liberica</i>	531
11. <i>C. pseudozanguebariae</i>	530
12. <i>C. racemosa</i>	530
13. <i>C. sessiliflora</i>	530
14. <i>C. stenophylla</i>	530



**Figura 4.** Alineamiento Múltiple de secuencias del género *Coffea* y especies fuera del grupo para las secuencias del espacio intergénico trnl tnf. Los puntos sombreados son secuencias no identificadas.



**Figura 5.** Alineamiento múltiple de secuencias de especies del género *Coffea* e *I. findlaysoniana* para el intron trnl.

**Cuadro 6.** Tasa de transición-transversión derivada de sustituciones de nucleótidos en ADN de cloroplasto y núcleo en el género *Coffea*.

<b>Tipo de sustitución</b>	<b>Espaciador intergénico</b>	<b>Intrón</b>	<b>Cloroplastos totales</b>	<b>Nuclear</b>
Transición (Ts)				
A--G	3	6	9	7
T--C	7	5	12	9
Total				
Transición	10	11	21	16
Transversion (Tv) I				
A--T	0	1	1	3
C--G	0	1	1	6
Transversion (Tv) II				
A--C	3	0	3	0
T--G	3	0	3	1
Total				
transversion	6	2	8	10
Ts/Tv rate	1.2	2.2	1.8	1.6
Ts/Tv interval	(0.6-2.1)	(0.9-4.9)	(0.9-2.8)	(0.7-3.5)

Distancias genéticas y árbol filogenético derivado de los análisis combinados de secuencias del espacio intergénico TRNL-TRNF y del intron TRNL del cloroplasto.

El análisis secuencial de ambas regiones del cloroplasto generó resultados similares, por lo que sus secuencias fueron colocadas conjuntamente para estimar la distancia genética combinada y el árbol filogenético. (*I. findlaysoniana* fue utilizado como una especie fuera de grupo). Un promedio total de 3,7% de divergencia en las secuencias fue encontrado en las especies del género *Coffea*. Las sustituciones y adiciones / deleciones de nucleótidos parecían distribuidos aleatoriamente (véanse las alineaciones figura 5) y la ocurrencia de la transición / transversión y su tasa se sintetizan en la Cuadro 6.

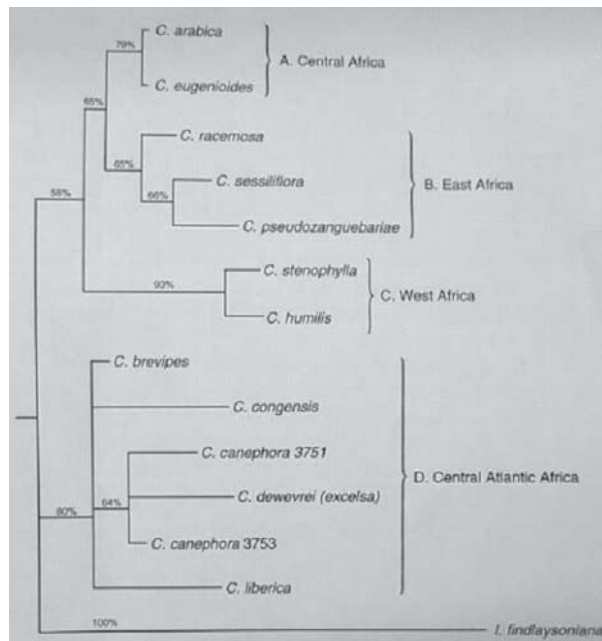
Las distancias genéticas en pares, basadas en los datos combinados son mostradas en forma de una matriz en el Cuadro 7. Los bajos valores de las distancias genéticas son indicativos de la alta similitud entre las accesiones comparadas. No se encontraron diferencias entre *Coffea arabica* y *Coffea eugenioides*. El más alto valor de distancia genética estuvo entre la especie fuera de grupo *I. Findlaysoniana* y *Coffea congensis* (0.0456). *Coffea liberica* y *Coffea dewevrei* (excelsa), que han sido previamente consideradas una sola especie, mostraron grandes valores de distancias genéticas (0.0088). Dos accesiones de *Coffea canephora* pudieron también ser diferenciadas (0.0022).

**Cuadro 7.** Matriz de distancia de pares para los datos combinados de las secuencias del cloroplasto (Espaciamientos intergénicos (tniL-trnF e intron trnL). Utilizando parámetros de distancia Kimura's 2.

	2	3	4	5	6	7	8
1	0.0022						
3	0.0076	0.0054					
3	0.0076	0.0054	0.0087				
3	0.0076	0.0054	0.0000	0.0087			
4	0.0055	0.0033	0.0088	0.0088	0.0088		
7	0.0120	0.0098	0.0065	0.0131	0.0065	0.0133	
9	0.0444	0.0420	0.0432	0.0456	0.0432	0.0449	0.0456
3	0.0076	0.0054	0.0087	0.0087	0.0087	0.0088	0.0131
6	0.0109	0.0087	0.0054	0.0120	0.0054	0.0122	0.0098
4	0.0087	0.0065	0.0033	0.0098	0.0033	0.0099	0.0076
5	0.0098	0.0076	0.0043	0.0109	0.0043	0.0111	0.0087
7	0.0120	0.0098	0.0065	0.0131	0.0065	0.0133	0.0022

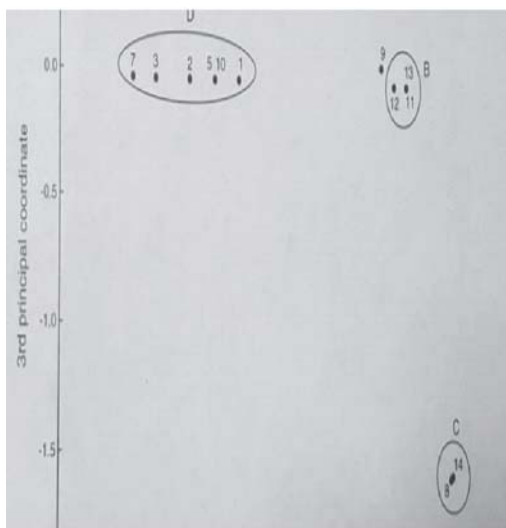
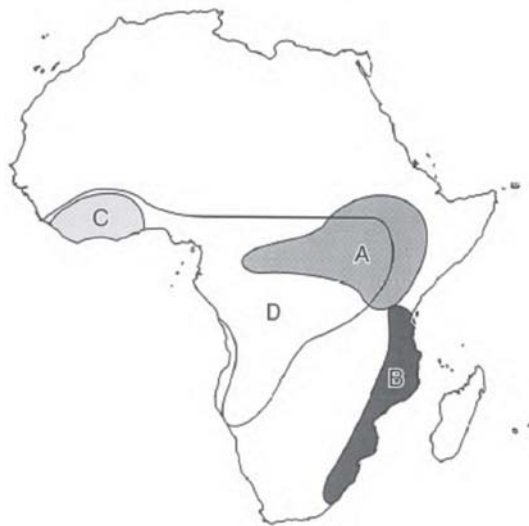
Un árbol representativo basado en los datos combinados es mostrado en la figura 6. La topología del árbol separó la especie del género *Coffea* en cuatro clados principales: Clado A, que comprende *C. arabica* y *C. eugenoides*; Clado B, que comprende *C. racemosa*, *C. pseudozanguebariae* y *C. sessiliflora*; Clado C, que comprende *C. stenophylla* y *C. humilis*; y Clado D, que comprende *C. canephora*, *C. liberica*, *C. dewevrei* (Excelsa), *C. congensis* y *C. brevipes*. Clado C (*C. stenophylla* y *C. humillis*) es claramente diferente de la otros (93% bootstrap). La separación de los otros Clados también están bien sustentados {> 58% bootstrap}. La especie fuera de grupo *I. findlaysoniana* fue significativamente diferente de las especies del género *Coffea* (100% bootstrap). La figura 7 muestra la asociación entre los clados en el árbol filogenético y la distribución de las especies en el Continente Africano.

Como un enfoque alternativo para ilustrar gráficamente las diferencias entre estas especies, se utilizó un análisis de coordenadas principales (Figura 8). El segundo y el tercer componente que reflejaban la mejor separación de las especies representan el 32% de la variación. Los resultados apoyan la separación de las especies expuestas en topología del árbol (Figura 6) en la distribución de las accesiones de café en cuatro grupos principales. El segundo eje distingue entre los grupos A, B y D, y el tercero entre el grupo C y el resto.



**Figura 6.** Árbol filogenético (diagrama) de todas las especies de *Coffea* e *I. findlaysoniana* para datos combinados de secuencias (espaciamientos intergénicos TrnL-trnF e intron trnL del cloroplasto). el origen de las especies está también indicado.

**Figura 7.** Distribución de las especies de *Coffea* en África, pertenecientes a los cuatro clados que se muestran en el árbol filogenético derivados de las secuencias genómicas del cloroplasto.



**Figura 8.** Análisis de coordenadas principales de 14 accesiones de café, representando 12.

## **Análisis de la secuencia de la región mitocondrial srARNv7**

Aunque el análisis de SSCP no reveló diferencias en la región mtr ARN V7, el tamaño de los fragmentos analizados eran demasiado grandes para revelar efectivamente mutaciones puntuales o diferencias menores. En un intento de revelar ramas más diferenciadas en la filogenia del café, se decidió realizar también análisis de secuencia en esta región. La figura 9. muestra la secuencia de la región mitocondrial sr ARN V7 para *C. arabica*, var. *Typica*. Desafortunadamente, no se encontraron diferencias entre las especies de esta región.

```
CTTTCATACA GGTGCTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTC GTGAGATGTT  
TGGTCAAGTC CTATAACGAG CGAAACCCTC GTTTGTGTT GCTGAGACAT  
GCGCCTAAGG ATAAAGTCTT TGCAACCGAA GTGAGCCGAG GAGCCGAGTG  
ACGTGCCAGC GCTACTAATT GAGTGCCAGC ACGTAGCTGT GCTGTCAGTA  
AGAAGGTAGC CGGCGCCTTT CGAAGCACTT TCTAGTTAGC GCTTTAGTTT  
GATTGCAGCT AGCGCGCTTG ACTAATAAGA AGACTCGGCA TTCAGGGCAG  
CCGCCCGGTG GTGTGGTATG TAGTGGGTTT AGTACGCCCC GCCAAAAGGG  
CTCCGAAACA AAGAAAAGG TGCGTGCCGC ACTCACGAGG GACTGCCAGT  
GA 402
```

**Figura 9.** Secuencia completa del srARN ribosómico v7 de la región mitocondrial de *C. arabica*, variedad *Typica*. Cebadores están subrayados.

## **Diseño de los cebadores para la amplificación de secuencias nucleares**

Se tomaron seis clones de una biblioteca de ADN de café Pst I y se determinó su secuencia de ADN. Una de las secuencias se utilizó para diseñar un par de cebadores (Cuadro 2), para amplificar la región de ADN nuclear correspondiente en las diversas accesiones y especies.

## **Análisis de la secuencia de la región del ADN nuclear**

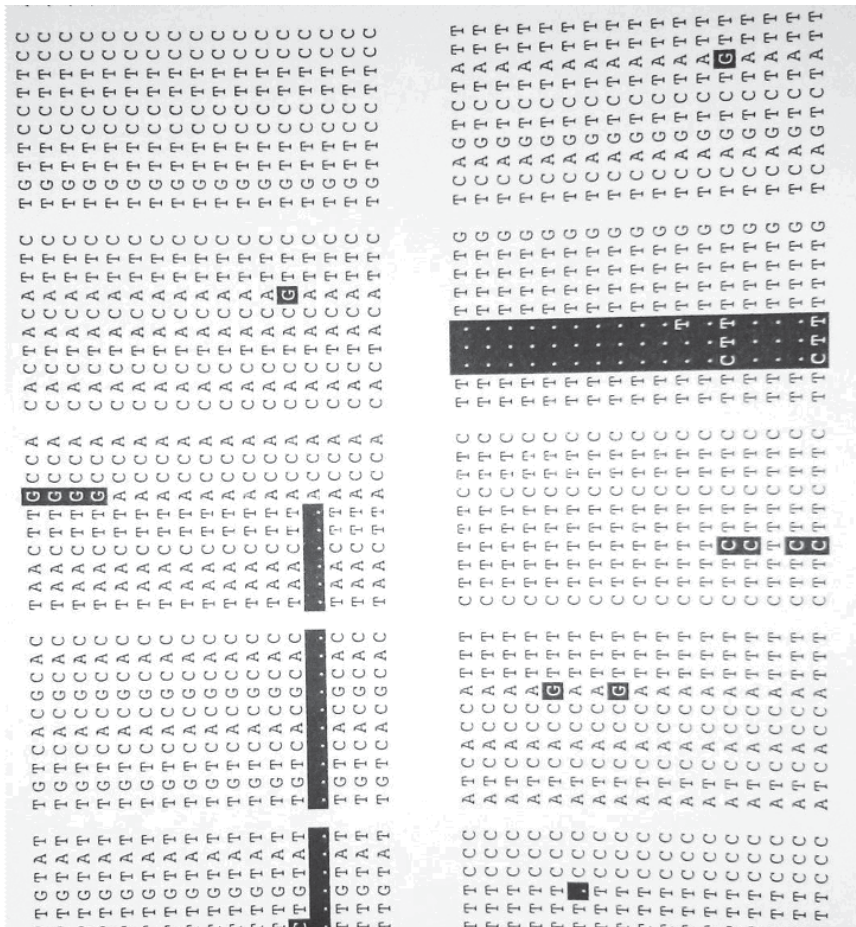
Fragmentos de ADN de 17 accesiones que representan 12 especies fueron amplificados, clonados y secuenciados. Debido al potencial heterocigótico, cuatro clones individuales de cada accesión fueron secuenciados. El Cuadro 8 muestra el tamaño del fragmento específico de ADN nuclear para todos los genotipos estudiados. Estos estuvieron en un rango entre 419 a 424 bases. *C. racemosa* contenía una delección de 61 bases, con un tamaño de fragmento de 359.

La figura 10 muestra la alineación completa de las 17 secuencias. La tasa de sustitución de nucleótidos fue mayor que la tasa de inserción/delección (23 sustituciones de nucleótidos contra ocho inserciones/delecciones) y el promedio de la transición / transversión fue de 1.6 (ver Cuadro 6).

**Cuadro 8.** Tamaño del fragmento (pb) para la región nuclear en especies de *Coffea*.

<b>Genotipos</b>	<b>Tamaño del fragmento (bp)</b>
1 <i>C. brevipes</i> 421	421
2 <i>C. canephora I</i> 421	421
3 <i>C. canephora II</i> 421	421
4 <i>C. arabica I</i> 421	421
5 <i>C. arabica II</i> 420	420
6 <i>C. congensis J</i> 419	419
7 <i>C. congensis II</i> 420	420
8 <i>C. eugenioides</i> 420	420
9 <i>C. dewevrei (exelsa) I</i> 419	419
10 <i>C. dewevrei (exelsa) II</i> 419	419
11 <i>C. humilis</i> 421	421
12 <i>C. liberica</i> 419	419
13 <i>C. pseudozanguebariae</i> 424	424
14 <i>C. racemosa</i> 359	359
15 <i>C. sessiliflora</i> 419	419
16 <i>C. stenophylla I</i> 421	421
17 <i>C. stenophylla II</i> 424	424

**Figura 10.** Múltiple alineación de especies de *Coffea* spp. Para las secuencias nucleares; dos secuencias diferentes para la misma especie, significa dos alelos distintos. Las áreas sombreadas muestran secuencias no identificadas.





sustituciones y tres delecciones) y las dos secuencias de *C. dewevrei* (excelsa) difieren en sustitución de 1 base. *C. liberica* se difiere de los genotipos *C. dewevrei* (excelsa) I y II en dos y tres sustituciones de bases respectivamente.

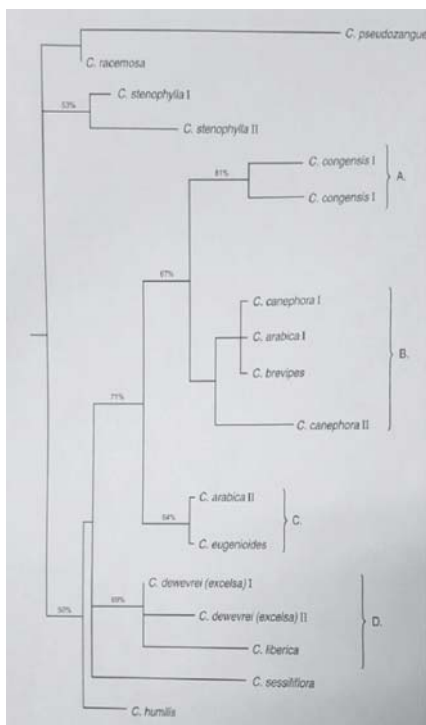
### **Distancias genéticas y árbol filogenético del género de especies *Coffea* basadas en secuencias nucleares**

Las distancias genéticas entre pares de accesiones se indican en el Cuadro 9. Un árbol filogenético derivado de las distancias genéticas se muestra en la figura 12. Sólo bootstraps más arriba del 50% se muestran en el árbol. Como se indica (Figura 10), *C. arabica* exhibió dos alelos diferentes que se separan en dos grupos distintos, *C. canephora* también tuvo dos alelos diferentes, situados en el mismo clado (Figura 12). Observaciones similares pueden hacerse para *C. congensis*, *C. stenophylla* y *C. dewevrei* (excelsa).

Aunque un número de clones también fueron secuenciados para cada uno de las otras especies de café, sólo se reveló un alelo. Es importante notar que una secuencia de *C. arabica* está en el mismo clado que *C. canephora* y *C. brevipes*, y una secuencia diferente de *C. arabica* comparte el mismo clado con *C. eugenioides* (Figura 12).

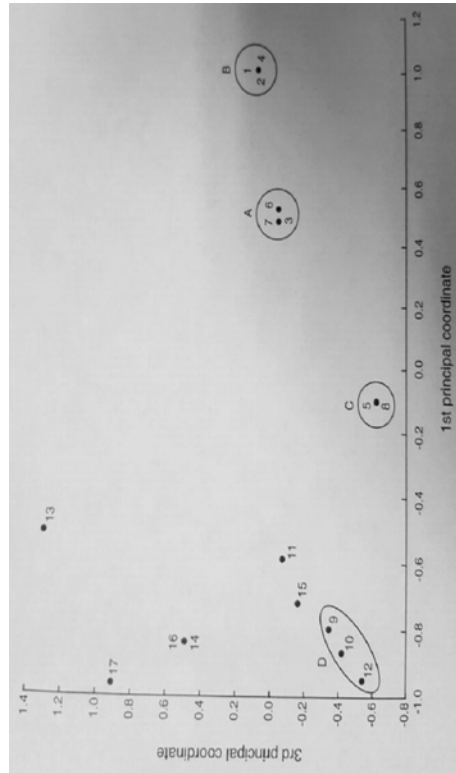
**Cuadro 9.** Matriz de distancias genéticas en pares para las secuencias nucleares del género *coffea* sp. (Utilizando parámetros de distancia Kimura's 2.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>C. brevipes</i>														
2. <i>C. canephora</i> 3751	0.0032													
3. <i>C. canephora</i> 3753	0.0011	0.0022												
4. <i>C. arabica</i>	0.0043	0.0076	0.0054											
5. <i>C. congenis</i>	0.0043	0.0076	0.0054	0.0087										
6. <i>C. eugenioides</i>	0.0043	0.0076	0.0054	0.0087	0.0087									
7. <i>C. oliveriei</i>	0.0044	0.0055	0.0033	0.0088	0.0088	0.0088								
8. <i>C. humilis</i>	0.0087	0.0120	0.0098	0.0055	0.0131	0.0065	0.0133							
9. <i>C. finlaysonianna</i>	0.0409	0.0444	0.0420	0.0432	0.0456	0.0432	0.0449	0.0456						
10. <i>C. iberica</i>	0.0043	0.0076	0.0054	0.0087	0.0087	0.0087	0.0088	0.0131	0.0444					
11. <i>C. pseudogambiarum</i>	0.0076	0.0109	0.0087	0.0054	0.0120	0.0054	0.0122	0.0098	0.0445	0.0120				
12. <i>C. racemosa</i>	0.0054	0.0087	0.0065	0.0033	0.0098	0.0033	0.0099	0.0076	0.0445	0.0098	0.0043			
13. <i>C. sessiliflora</i>	0.0065	0.0098	0.0076	0.0043	0.0109	0.0043	0.0111	0.0087	0.0457	0.0109	0.0033	0.0011		
14. <i>C. stenophylla</i>	0.0087	0.0120	0.0098	0.0065	0.0131	0.0065	0.0133	0.0022	0.0433	0.0131	0.0098	0.0076	0.0087	



**Figura 12.** Árbol filogenético (diagrama) de especies de *Coffea* derivado de secuencias genómicas nucleares.

**Figura 13.** Análisis de coordenadas principales de 17 clones de café que representan 12 especies para las secuencias nucleares. Los números en la figura corresponden al número de orden en la Tabla 5.6.



Se formaron clados para los clones de *C. congestis* (Clado A), *C. arabica*, *C. canephora* y *C. brevipes* (Clado B), *C. arabica* y *C. eugenioides* (Clado C), y *C. dewevrei* (Excelsa) y *C. liberica* (Clado D). Los alelos de las otras especies son claramente diferentes de los grupos ya indicados y no forman ningún grupo en particular.

El análisis de coordenadas principales de los datos nucleares se muestra en la Figura 13. El primero y el tercer componente muestran la mejor separación

de las especies y son representativos para el 55% de la variación total. El análisis de componentes principales de los datos nucleares refleja ampliamente la misma separación como en el árbol filogenético.

### **Comparaciones de los promedios de sustitución en genomas nucleares y del cloroplasto**

El valor estimado del promedio de sustitución para el espaciador intergénico/intrón del cloroplasto fue de 1.5 y para la combinación núcleo/cloroplasto 2.2 (Cuadro 10). Aunque la tasa de sustitución de nucleótidos no fue significativamente diferente, la región intergénica parece evolucionar más rápido que el intrón. La tasa de sustitución del nucleótido en la región nuclear fue significativamente diferente de la observada en el cloroplasto, lo que sugiere que el primero evoluciona más rápido.

**Cuadro 10.** Rangos de sustitución del nucleótido en secuencias de regiones nucleares y del cloroplasto.

<u>Comparación</u>	<u>Promedio</u>	<u>95 % de intervalo de confianza</u>
Espaciador intergénico/intrón del cloroplasto	1.5	0.9-2.5
Núcleo/Cloroplasto	2.2	1.3-2.8

### **Discusión**

Al determinar relaciones filogenéticas, comparaciones directas de la secuencia de nucleótidos de fragmentos de ADN homólogos muestran la más alta resolución posible y en consecuencia son adecuadas para determinar las relaciones genéticas y evolución a diferentes niveles taxonómicos (Olmstead y Palmer, 1994). En este estudio la secuenciación por PCR se ha utilizado con la intención de determinar las relaciones filogenéticas entre especies de *Coffea* y para rastrear la posible evolución de la especie tetraploide *C. arabica*.

## Secuencias organelares

Como se podría haber esperado, relaciones ampliamente similares se obtuvieron a partir de ambos, es decir la comparación de secuencias tanto del espaciador intergénico como del intrón del cloroplasto. De tal manera que los datos combinados de estas secuencias fueron considerados para obtener una mayor resolución del análisis. Cuatro clados distintos fueron evidentes (Figura 6). Estos Clados están en congruencia con la asociación de las especies según distribución biogeográfica (Figuras 7 y Cuadro 2). Las especies del clado A proceden de África Central, especies en el clado B de África Oriental, Clado C, de África Occidental y el clado D del Atlántico región de África. Las distancias genéticas y los análisis de coordenadas principales son también coherentes y nuevamente reflejan las mismas asociaciones, lo que sugiere que factores geográficos pueden haber jugado un rol importante rol en el proceso de especiación.

*C. racemosa*, *C. sessiliflora* y *C. pseudozanguebariae* en Clado B están bien separados de los otros clados (Figura 6). Lo anterior está de acuerdo con los estudios de Louarn (1993), quien observó que los cruces interespecíficos entre miembros del clado B eran interfértiles, mientras que barreras de fertilidad se observaron entre estas y las otras especies. Cros et al. (1993) encontraron que estas especies tienen el menor contenido de ADN por núcleo (alrededor de 1 pg), sugiriendo que esta barrera de fertilidad podría estar relacionada con la diferencia en el tamaño del genoma.

También existe una clara separación de *C. stenophyla* y *C. humilis* (93% bootstrap, Clado C) de las otras especies y esto probablemente refleja el aislamiento geográfico de estas especies.

El Clado D incluye *C. canephora*, *C. congensis*, *C. brevipes*, *C. liberica* y *C. dewevrei* (excelsa). Este grupo es de nuevo consistente con el observado por Cros et al. (1993), quien observó en su estudio una mayor separación entre un grupo que contenía estas especies y las otras que fueron analizadas; aun y cuando la variación interespecífica fue baja a este nivel. En este estudio, *C. liberica* y *C. dewevrei* (Excelsa) se asimilan dentro de este grupo. Sin embargo, aunque estas dos últimas especies están en el mismo clado, las asociaciones dentro del grupo están relativamente separadas.

*C. liberica* y *C. dewevrei* (excelsa) han sido previamente consideradas como una sola especie (Anthony et al., 1985). Los resultados presentados aquí (Cuadro 6 y Figura 6) sugieren que son distintas y justifican la división de las especies. Ambas pertenecen a la subsección *Pachy coffea*. Por lo tanto los resultados de este estudio están de acuerdo con los de Berthou et al (1980) quien utilizando el análisis de isoenzimas encontró que la distancia genética entre *C. liberica* y *C. dewevrei* (Excelsa) era del mismo orden que entre *C. liberica* y *C. humilis*.

Dos sustituciones de nucleótidos separaron las dos accesiones de *C. canephora*. Esto puede explicarse por el hecho de que *C. canephora* es una especie alógama y ambas accesiones provinieron de diversos sitios de colecta. En contraste, todas las accesiones de *C. arabica* eran idénticas, lo que presumiblemente refleja su estrecha base genética y naturaleza endogámica.

Un hallazgo importante fue que, sobre la base de su secuencia organelar, *C. arabica* y *C. eugenioides* no fueron diferenciadas. Los resultados sugieren que *C. eugenioides* podría ser el progenitor materno de *C. arábica*. Según Carvalho (1958), Cramer (1957), y Berthou y Trouslot (1977), los antepasados de *C. arabica* parecen ser *C. eugenioides* y *C. canephora*, *C. liberica* o *C. congensis*. Estos resultados son entonces consistentes con estudios

previos. Sin embargo los resultados presentados aquí van más allá; al sugerir que *C. eugenioides* es el ancestro materno de *C. arabica*.

La divergencia total de secuencias en el ADN del cloroplasto (Espaciador Intergénico e intrón) fue del 3,7%, superior a lo obtenido previamente por RFLP sobre el genoma total del cloroplasto (Cros et al., 1993). Este resultado indica que los datos obtenidos por análisis de secuencias genéticas son más informativos que los obtenidos por RFLP. El tamaño y frecuencia de adiciones y deleciones observadas en los análisis de secuencias genéticas fueron similares a las encontradas por Zurawski y Clegg (1987) y la tasa de sustitución en el espaciador intergénico mostró ser más alta que la encontrada en el intrón trnL. Observaciones previas sugieren que se producen cambios más frecuentemente en regiones intergénicas que en intrones (Zurawski y Clegg, 1987, Clegg et al., 1991). Esto quizás no es sorprendente ya que el intrón trnL pertenece a la clase del grupo I de intrones que exhiben estructuras secundarias y tienen actividad autocatalítica (Taberlet et al., 1991). En contraste, Gielly y Taberlet (1994) observaron que el intrón trnL evoluciona a una tasa cercana a la del espaciador intergénico.

Tanto para el intrón como para las regiones espaciadoras intergénicas, la aparición de sustituciones de nucleótidos fue mucho mayor que la aparición de inserciones/deleciones. Esto está en contraste con los resultados de Golenberg et al. (1993), quien indicó que la tasa de inserción / deleciones es igual o superior que la tasa de sustituciones de nucleótidos dentro de grupos de taxones estrechamente relacionados en la familia de gramíneas en regiones no codificantes entre los genes *rbcL* y *atpB* del cloroplasto. Sin embargo, los resultados presentados aquí están de acuerdo con las de Zurawski et al. (1984), que indicaba que eventos de pequeñas adiciones / deleciones ocurren aproximadamente una cuarta parte tan a menudo como diferencias de nucleótidos en la región no codificante entre *rbcL* y *atpB* del cloroplasto en una comparación cebada-maíz.

## Secuencias nucleares

Las secuencias nucleares de ADN se han utilizado previamente para evaluar relaciones genéticas en las plantas (Delseny et al., 1990; Furnier et al., 1990) y altas tasas de sustitución hacen útil este procedimiento para los estudios de diversidad genética. Sin embargo, el ADN nuclear es heredado de dos progenitores distintos, y la recombinación ocurre, afectando potencialmente las comparaciones de secuencias genéticas. Esto debería entonces ser considerado, cuando se infieren relaciones filogenéticas. No obstante, la variación en el ADN nuclear proporciona información complementaria a la obtenida por análisis de ADN de organelos. En este estudio se consideró, que el análisis de las secuencias genéticas nucleares podría ser útil en el rastreo de los progenitores de la especie tetraploide *C. arabica* entre las especies estudiadas de diploides del género *Coffea*.

Las secuencias nucleares muestran dos alelos distintos para *C. arabica* (Figura 10). Esto pudo haber sido esperado, ya que *C. arabica* es un alotetraploide (Carvalho, 1952; Grassias y Kammacher, 1975). En el árbol filogenético derivado (Figura 12), los dos alelos se ubican en clados diferentes (64% y 67% de bootstrap, respectivamente).

La separación de los dos alelos también se observa claramente en el análisis de coordenadas principales (Figura 13). Adicionalmente, las especies diploides altamente heterocigóticas *C. canephora*, *C. congensis*, *C. stenophylla* y *C. dewevrei* (Excelsa) también contienen dos alelos diferentes. Siendo especies diploides alógamas, la presencia de dos secuencias representa simplemente la heterocigosidad en este locus.

Cabe señalar que, aunque la región secuenciada del microsatélite no se incluyó en el análisis filogenético, también mostró la misma separación de alelos como el análisis más amplio de la secuencia nuclear (excepto para

*C. dewevrei* (Excelsa), que mostró sólo un alelo). La región secuenciada del microsatélite fue inesperadamente idéntica para *C. arabica* y *C. eugenioides*.

Una de las dos secuencias de *C. arabica* fue idéntica a *C. canephora* y *C. brevipes* y la otra secuencia idéntica a la de *C. eugenioides*. Estos hallazgos sugieren que el tetraploide *C. arabica* pudo haberse derivado de *C. eugenioides* (el progenitor madre) y *C. canephora* o *C. brevipes*. En ese sentido, es interesante notar que *C. brevipes* y *C. canephora* también comparten secuencias genéticas idénticas en el intrón trnL del cloroplasto (Figura 5).

Como se indicó anteriormente, los ancestros de *C. arabica* han sido asumidos que son *C. eugenioides* y *C. canephora*, *C. liberica* o *C. congensis* (Carvalho, 1952, Cramer, 1957; Narasimhaswamy, 1962; Berthou et al., 1983). Mientras que los resultados aquí mostrados concuerdan en general con la anterior propuesta también añaden a *C. brevipes* como posible antepasado paterno, y excluyen a *C. liberica* o *C. congensis*.

### **Comparación general entre secuencias genéticas, secuencias nucleares y organelares como herramientas para análisis filogenético y evolución de la especie de *Coffea***

Los datos de secuencias de ADN de las plantas disponibles permiten ahora investigaciones detalladas de las tasas de sustitución de nucleótidos en genomas de plantas (Wolfe et al., 1987), la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre algunas plantas superiores (Gielly y Taberlet, 1994), y comparación de las tasas de evolución entre linajes (Zurawski et al., 1984). En el estudio aquí presentado se compararon, regiones no codificantes de ADN nuclear, de la mitocondria y del cloroplasto. La variación en el ADN nuclear fue mayor que la encontrada en el ADN del núcleo/cloroplasto (tasa de sustitución- núcleo cloroplasto 2,2) y con respecto al ADN

mitocondrial la variación fue cero. Los datos limitados aquí obtenidos indican que la tasa de evolución del ADN nuclear es el doble que la del genoma del cloroplasto, lo cual está de acuerdo con Wolfe et al. (1987). Wolfe et al., (1987) también sugieren que el ADN de mitocondrias en angiospermas evoluciona al menos 5 veces más lentamente que las secuencias nucleares, y considera que el ADN de mitocondria es más conservativo que el ADN del cloroplasto, debido a la mayor tasa de sustitución sinónima en los genes del cloroplasto (3 veces mayor).

Las secuencias genéticas nucleares se han utilizado menos frecuentemente para reconstrucciones de filogenia que secuencias de ADN del cloroplasto. Sin embargo, la información generada por secuencias nucleares ha sido importante en la evaluación de las relaciones filogenéticas (Barbier et al., 1991; Gepts y Clegg, 1989). Para relaciones lejanas de taxones, secuencias de codificación altamente conservadas, permiten determinación precisa de homología permitiendo comparaciones distintas.

Para los taxones estrechamente relacionados que evolucionan rápidamente, las secuencias no codificantes en el núcleo debieran proveer información de variación en los nucleótidos para análisis filogenéticos. En esta investigación, las secuencias nucleares no codificantes mostraron ser informativas para el rastreo de la evolución de la especie tetraploide *C. arabica*.

Las secuencias de ADN mitocondrial fueron poco informativas reflejando la naturaleza altamente conservadora de este ADN genómico. Las bajas tasas de mutaciones hacen que esta molécula sea prácticamente no útil para los estudios filogenéticos a niveles taxonómicos reducidos. Sin embargo, la baja tasa de sustituciones de ADN de mitocondrias de planta sugiere que comparaciones de secuencias podrían ser más útiles en amplios niveles filogenéticos en los cuales el ADN de cloroplastos es actualmente aplicado.

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este estudio son consistentes con aquellos inferidos de comparaciones taxonómicas clásicas y reflejan el origen y la distribución geográfica de especies del género *Coffea*. Se ha demostrado que *C. eugenioides* es el progenitor materno de la especie tetraploide *C. arabica*, y una fuerte evidencia se proporciona para sugerir que *C. canephora* sea como el donante paterno. Sin embargo, los datos no excluyen a *C. brevipes* como donador paterno. Estudios más detallados en el nivel genómico nuclear debería coadyuvar a consolidar estos resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Anthony, F., Couturon, E. & de Namur, C. (1985) Les cafeiers sauvages du Cameroun: résultats d'une mission de prospection effectuée par l'IRSTOM en 1983. Ileme Colloque de l'A.S.I.C., Lomé (Togo).
2. Barbier, P., Morishima, H. & Ishihama, A. (1991) Phylogenetic relationships of annual and perennial wild rice: probing by direct DNA sequencing. *Theoretical and Applied Genetics*, 82, 693-702.
3. Berthou, F. & Trouslot, P. (1977) L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série, premiers résultats, 8ème Colloque Scientifique International sur le Café. 8th conference of ASIC Abidjan, Ivory Coast. 373-384.
4. Carvalho, A. (1952) Taxonomia de *Coffea arabica* L. 6. Caracteres morfológicos dos haploides. *Bragantia*, 12, 201-212.
5. Carvalho, A., Ferwerda, F.P., Frahm-Leliveld, J.A., Medina, D.M., Mendes, A.J.T. & Monaco, L.C. (1969) *Coffee (Coffea arabica* L. and *C. canephora* Pierre ex Froehner). In: Ferwerda, F.P. & Wit, F. (eds) *Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Veenman & Zonen, Wageningen. Pp. 189-241.
6. Charrier, A. & Berthaud, J. (1985) Botanical classification of coffee. In: Clifford, M.N. & Wilson, K.C. (eds) *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Croom Helm Ltd Publishers, Beckenham, UK.
7. Clegg, M.T. & Zurawski, G. (1992a) Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny. In: Soltis, D.E. & Doyle, J.J. (eds) *Molecular Systematics of Plants*, Chapman and Hall, New York, 1-13.
8. Clegg, M.T., Learn, G.H. & Golenberg, E.M. (1991) Molecular Evolution of Chloroplast DNA. Selander, R.K., Clark, A.G., & Whittam, T.S. (eds) *Evolution at the Molecular Level*, Sinauer Associates, Sunderland, pp 135-149.
9. Cramer, P.J.S. (1957) Review of literature on coffee research in Indonesia. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica, (Miscellaneous publication No. 15).
10. Cros, J., Lashermes, Ph., Marmey, Ph., Anthony, F., Hamon, S. & Charrier, A. (1993) Molecular analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *Coffea*. In: Proceedings of 15th International Conference on *Coffee Science (ASIC)*, Montpellier, pp. 41-46.

11. Delseny, M., McGrath, J.M., This, P., Chevre, A.M. & Quiros, C.F. (1990) Ribosomal RNA genes in diploid and amphidiploid *Brassica* and related species: organisation, polymorphism, and evolution. *Genome*, 33, 733-744.
12. Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368-376.
13. Gepts, P. & Clegg, M.T. (1989) Genetic diversity in Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) at the DNA sequence level. *Journal of Heredity*, 80, 203-208.
14. Gielly, L. & Taberlet, P. (1994) Chloroplast DNA polymorphism at the intrageneric level and plant phylogenesis. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris, Lifesciences, Evolution*, 317, 685-692.
15. Golenberg, E.M., Clegg, M.T., Durbin, M.L., Doebley, J. & Din Pow, M. (1993) Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 2, No. 1, March, pp. 52-54.
16. Grassias, M. & Kammacher, P. (1975) Observations sur la conjugaison chromosomique de *Coffea arabica* L. *Café, Cacao, The*, 19, 177-190.
17. Gepts, P. & Clegg, M.T. (1989) Genetic diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) at the DNA sequence level. *Journal of Heredity*, 80, 203-208.
18. Gielly, L. & Taberlet, P. (1994) Chloroplast DNA polymorphism at the intrageneric level and plant phylogenies. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris, Lifesciences, Evolution*, 317, 685-692.
19. Higgins, D.G. (1992) Sequence ordination: a multivariate analysis approach to analysing large sequence data sets. *CABIOS*, 8, pp 15-22.
20. Kimura, M. (1983) *The natural theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
21. Narasimhaswamy, R.L. (1962) Some thoughts on the origin of *Coffea arabica*. *Coffee*, 4(12), 1-5-Turrialba, Costa Rica.
22. O'Donell, K. (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic fungus *Fusarium ambucinum* (Gibberellapulicaris). *Current Genetics*, 22, 213-220.
23. Olmstead, R.G. & Palmer, J.D. (1994) Chloroplast DNA systematics: a review of methods and analysis. *American Journal of Botany*, 81(9), 1205-1224.
24. Russel, J.R. (1994) *Molecular variation on Theobroma species*, PhD thesis. University of Reading, U.K.

25. Taberlet, P., Gielly, L. Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of tree non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
26. Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson T.J. (1994) Clustal-w-Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
27. Wolfe, K.H., Li, W.-H. & Sharp, P.M. (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA's. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84, 9054-9058.
28. Zurawaski, G., Clegg, M.T. & Brown A.H.D. (1984) The nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. *Genetics*, 106, 735-749.
29. Zurawaski, G., Clegg, M.T. (1987) Evolution of higher-plant chloroplast DNA encoded genes: implications for structure-function and phylogenetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 391-418.



## RESÚMENES DE TESIS

# **Evaluación de la aplicación de distintas dosis de *Trichoderma harzianum* para acelerar el proceso de compostaje de subproductos de la extracción de aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis* Jacq.), diagnóstico y servicios prestados en Finca Yalcobé, Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz, Guatemala, C. A.**

*Roger Ernesto Montejo López*

## **RESUMEN**

El Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía -EPSA-, realizado de febrero a noviembre de 2014, en el Área de Investigación Agrícola de Naturaceites S.A., se diagnosticó el Área del Departamento Técnico Agrícola de esta empresa, describiendo cada una de sus áreas según sus funciones y un FODA, para cada una de las Debilidades y Amenazas se presentó una estrategia para convertirlas en Fortalezas y Oportunidades. En la investigación inferencial, se evaluó el efecto descomponedor de celulosa, por el hongo *Trichoderma harzianum*, sobre el raquis de palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.), en la compostera, en Finca Yalcobé, Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz; se evaluaron tres dosis de *T. harzianum* (0, 200, 800 1,600 mm (1x10<sup>7</sup> UFC) / Tonelada métrica de raquis); formando 16 unidades experimentales, que consistieron en camas de 10 metros de longitud con un volumen de 17-20 Tm de raquis, a las cuales se le aplicó la misma cantidad de efluentes; se voltearon las camas, con una Menart

®manteniendo la humedad en un rango de 60-70%. Se concluye que *Trichoderma* no se reproduce óptimamente en la etapa termofílica, no reportó diferencia estadística en los valores de relación Carbono/ Nitrógeno, porcentaje de Materia orgánica, pH y contenido de nutrientes (Nitrógeno, Fósforo y Potasio), tiempo de compostaje. Los servicios fueron 1) Implementación de buenas prácticas agrícolas en la aplicación de ácido fosfórico. 2) Apoyo en la coordinación y supervisión de actividades de campo. 3) Actualización de manuales de procedimiento y creación de formatos para actividades de investigación agrícola.

**Palabras clave:** Palma africana, *Elaeis guineensis*, *Trichoderma harzianum*, Celulosa, Compost, Tiempo de descomposición

## ABSTRACT

The Supervised Professional Exercise of Agronomy - EPSA -, from February to November 2014, in the Agricultural Research Area of Naturaceites SA, a diagnosis was made on this Area of the Agricultural Technical Department of this company, describing each of its areas according to their Functions, a SWOT, for each of the Weaknesses and Threats a strategy was presented to turn them into Strengths and Opportunities. In the inferential investigation, the decomposing effect of cellulose, by the *Trichoderma harzianum* fungus, on the African palm rachis (*Elaeis guineensis* Jacq.) Was evaluated in the composter, at Finca Yalcobé, Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz; Three doses of *T. harzianum* (0, 200, 800, 1,600 mm (1x10<sup>7</sup> CFU) / metric tons of rachis) were evaluated; Forming 16 experimental units, which consisted of beds of 10 meters in length with a volume of 17-20 Tm of rachis, to which the same amount of effluents was applied; They turned the beds, with a Menart ® maintaining the humidity in a range of 60-70%. It was

concluded that *Trichoderma* does not reproduce optimally in the thermophilic stage, did not report statistical difference in the values of Carbon / Nitrogen ratio, percentage of organic matter, pH and nutrient content (Nitrogen, Phosphorus and Potassium), composting time. The services were 1) Implementation of good agricultural practices in the application of phosphoric acid. 2) Support in the coordination and supervision of field activities. 3) Updating of procedure manuals and format creation for agricultural research activities.

African palm, *Elaeis guineensis*, *Trichoderma harzianum*, Cellulose, Compost, Decay time.

# **Evaluación de cuatro diferentes momentos de aplicación de hidróxido de cobre para la poda química de raíces en la elaboración de pilones de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) bajo sistema Floating, diagnóstico y servicios prestados a la Empresa Casa Export Limited, Guatemala, C.A.**

*Enrique Antonio Ramírez Pérez*

## **RESUMEN**

En el Ejercicio Profesional Supervisado realizado en la empresa Casa Export Limited, de febrero a noviembre del 2016, se realizó un diagnóstico sobre las labores de campo, en Catarina, San Marcos y Teculután, Zacapa, se identificaron como problemas principales, el no uso del equipo de protección personal en la aplicación de productos fitosanitarios y el desconocimiento del uso de los Depósitos de Biodegradación (BIODEP) para realizar el triple lavado de los envases de productos fitosanitarios y equipos de aplicación. La investigación inferencial fue sobre la evaluación de cuatro diferentes momentos de aplicación de hidróxido de cobre para la poda química de raíces en la elaboración de pilones de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) bajo sistema de Floating en Teculután, Zacapa, Guatemala; se utilizó un bloque completamente al azar, con cinco tratamientos (0, 15, 25, 35 y el testigo) y dos repeticiones el mejor tratamiento: 100 g por modulo, a los 25 días después de la siembra, presenta buena calidad, excelente porcentaje de pegue y desarrollo en campo definitivo. Los servicios realizados fueron capacitaciones del personal sobre el uso del BIODEP y el manejo de los residuos sólidos generados en el cultivo de tabaco, para minimizar el impacto al medio ambiente y generar conciencia entre los productores, sobre el uso seguro de productos fitosanitarios.

**Palabras clave:** Tabaco, *Nicotiana tabacum*, Hidróxido de cobre, Podas, Raíces,

## ABSTRACT

In the Supervised Professional Exercise carried out at Casa Export Limited, from February to November 2016, a diagnosis was made on field work in Catarina, San Marcos and Teculután, Zacapa. Personal protection equipment in the application of phytosanitary products and the lack of use of Biodegradation Deposits (BIODEP) to carry out the triple washing of the containers of phytosanitary products and application equipment. The inferential investigation was on the evaluation of four different times of application of copper hydroxide for the chemical pruning of roots in the elaboration of tobacco pylons (*Nicotiana tabacum* L.) under Floating system in Teculután, Zacapa, Guatemala; A completely randomized block was used, with five treatments (0, 15, 25, 35 and the control) and two replicates the best treatment: 100 g per module, 25 days after sowing, presented good quality, excellent percentage Of stick and development in definitive field. The services provided were training of personnel on the use of BIODEP and the management of solid waste generated in tobacco cultivation, in order to minimize the impact on the environment and raise awareness among producers about the safe use of phytosanitary products.

**Keywords:** Tobacco, *Nicotiana tabacum*, Copper hydroxide, Pruning, Roots.

# **Evaluación del efecto de cuatro tiempos de secado en las características organolépticas y presencia de hongos en arveja dulce (*Pisumsativum* L.) para la exportación, en la Empresa Tierra de Árboles, S.A., Santo Domingo Xenacoj, Sacatepéquez, Guatemala, C.A.**

*Antonia Juana de Jesús Vásquez Quiñónez*

## **RESUMEN**

El Ejercicio Profesional Supervisado se realizó en la Empresa Empacadora y Exportadora Tierra de Árboles, S.A., de septiembre 2015 a junio 2016. El diagnóstico de las áreas y procesos de la arveja china y dulce (*Pisumsativum* L.), especialmente la recepción de materia prima, el muestreo de calidad, almacenamiento, clasificado, despunte y el empaque; deben realizar una clasificación, desinfección, despunte, empaque y almacenado en cuartos fríos, para poder ser exportado y cumplir con estándares de calidad exigidos por los países importadores. En la investigación los tiempos de secado, tuvo como objetivo aumentar la vida en anaquel y disminuir el rechazo de producto por presencia de hongos y cambio en las propiedades organolépticas de la arveja dulce (*Pisumsativum* L.), se utilizó un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos (tiempos de secado de arveja: 0, 8, 12, 16 y 20 horas), se observó que a mayor tiempo de secado existe menos incidencia de patógenos y se conservan las características organolépticas de la arveja dulce; para aumentar la vida de anaquel en arveja dulce se debe secar en frío en períodos de 20 horas. Los servicios fueron: inspección de calidad de materia prima en pre empaque y empaque y llenado de registros en donde

se documentó algunas de las actividades que se realizan diariamente durante los procesos de manufactura, bajo la norma APPCC.

**Palabras clave:** Arveja dulce, *Pisumsativum*, Secado, Rendimiento, Propiedades organolépticas,

## ABSTRACT

The Supervised Professional Exercise was carried out in the Packing and Exporting Company Tierra de Árboles, SA, from September 2015 to June 2016. The diagnosis of the areas and processes of the Chinese and sweet pea (*Pisumsativum* L.), especially the reception of Raw material, quality sampling, storage, sorting, blasting and packaging; Must be classified, disinfected, dismantled, packaged and stored in cold rooms, in order to be exported and meet the quality standards demanded by the importing countries. In the research the drying times, had as objective to increase the life on shelf and to diminish the rejection of product by presence of fungi and change in the organoleptic properties of sweet pea (*Pisumsativum* L.), a completely random design was used , With five treatments (peas drying times: 0, 8, 12, 16 and 20 hours), it was observed that during a longer drying period there is less incidence of pathogens and the organoleptic characteristics of sweet peas are conserved; To increase shelf life in sweet peas should be dried in cold in periods of 20 hours. The services were: quality inspection of raw material in prepacking and packing and filling of records in which some of the activities that are realized daily during the manufacturing processes, under the HACCP norm, were documented.

**Keywords:** Sweet pea, *Pisumsativum*, Drying, Yield, Organoleptic properties.

## **Diagnóstico, investigación y servicios realizados en la Asociación Nacional del Café –ANACAFÉ–**

*Bárbara Yadarí López Rodríguez*

### **RESUMEN**

El Ejercicio Profesional Supervisado se realizó en la Asociación Nacional del Café -ANACAFÉ-, oficinas centrales, de febrero a noviembre del 2016. El diagnóstico provee desde una vista macro como se distribuyen las actividades que se realizan. La investigación fue en finca La Virgen, municipio de Villa Canales, departamento de Guatemala; se evaluó el desarrollo de los cafetales (Caturra) al sol y con grama, se evaluaron dos tratamientos: A) sombra (Inga, Cushin, Caspirol, Aguacate), distanciamiento de 1 por 1.7 m; B) pleno sol, pasto Ruzzi, distanciamiento de 3 por 0.7 m; cuatro parcelas de cinco plantas cada una; el análisis de T Student, para las variables: área foliar, humedad, análisis químico del suelo y análisis químico foliar en el segundo muestreo, no mostraron diferencia significativa por lo que se asume que ambos tratamientos son iguales; se recomienda evaluar rendimiento de grano y calidad de tasa, para tener datos mas determinantes. Los servicios fueron: A) evaluación de las aguas residuales tratadas del beneficiado húmedo de café con fines de nutrición en el cultivo de café y B) implementación de diseño experimental para evaluación del contenido nutricional en plantas de café a partir de la aplicación de aguas provenientes de un sistema de tratamiento de aguas residuales del proceso de beneficiado húmedo de café; ambas en Santo Tomas Pachu, San Lucas Tolimán, Sololá.

**Palabras clave:** Café, *Coffea arabica*, Sombra, Pasto Ruzzi, *Brachiaria ruziziensis*, Calidad de sitio.

## ABSTRACT

The Supervised Professional Exercise was held at the National Coffee Association (ANACAFÉ), central offices, from February to November 2016. The diagnosis provides a macro view of how the activities are distributed. The research was in La Virgen estate, municipality of Villa Canales, department of Guatemala; The development of coffee (Caturra) in the sun and with grass, two treatments were evaluated: A) shade (Inga, Cushin, Caspirol, Avocado), distance of 1 by 1.7 m; B) full sun, Ruzzi grass, distancing of 3 by 0.7 m; Four plots of five plants each; The T Student analysis, for the variables: leaf area, moisture, soil chemical analysis and leaf chemical analysis in the second sampling, did not show a significant difference, so it is assumed that both treatments are equal; Re recommends evaluating grain yield and rate quality, to have more determining data. The services were: A) evaluation of the treated waste water of the wet coffee beneficiary for the purpose of nutrition in the coffee crop and B) implementation of an experimental design to evaluate the nutritional content in coffee plants from the application of incoming water Of a waste water treatment system of the humid coffee processing process; Both in Santo Tomás Pachuj, San Lucas Tolimán, Sololá.

**Keywords:** Coffee, *Coffea arabica*, Shade, Pasture Ruzzi, *Brachiaria ruziziensis*, Quality of site.



# REVISTA TIKALIA



## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La **Revista Tikalia** es editada por la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC). Se publica semestralmente.

En la revista se publican trabajos originales de contribución técnico-científica (artículos) en el campo de las ciencias sociales, biológicas, agrícolas y forestales; en las áreas de: desarrollo rural, conservación de la biodiversidad y medio ambiente, manejo y mejoramiento de plantas, protección de plantas, ingeniería agrícola, manejo de suelo y agua, administración y comercialización agrícola, silvicultura, tecnología y utilización de productos forestales. Asimismo se publican trabajos de revisión bibliográfica, únicamente a invitación del Consejo Editorial.

Exclusivamente se presentan trabajos escritos en idioma Español para su publicación, los mismos serán evaluados en su contenido científico-tecnológico por el Consejo Editorial de la Facultad de Agronomía, quien podrá invitar “referees” anónimos, dependiendo de la naturaleza del artículo presentado. Los trabajos pueden aprobarse sin correcciones, sujetos a correcciones, o no ser aceptados para su publicación.

## **POLÍTICA EDITORIAL**

Mantener conducta ética en relación a la publicación y a sus colaboradores, rigor con la calidad de los artículos científicos y revisiones bibliográficas, integrar el Consejo Editorial con profesionales de calidad científica y ética con carácter imparcial en el proceso de análisis de los trabajos.

## **PÚBLICO OBJETIVO**

Comunidad nacional e internacional vinculada con las ciencias agrícolas y forestales o campos afines. Estudiantes de licenciatura, postgrado y Profesores de las ciencias agrícolas y forestales.

## **FORMA Y PREPARACIÓN DE LOS TRABAJOS**

Los trabajos deben presentar las siguientes características: espacio 1,5; papel tamaño carta (21.59 x 27.94mm), con márgenes superior, inferior, izquierda y derecha de 2,5cm; fuente Arial 12; y contener un máximo de 10 páginas, incluyendo cuadros y figuras.

En la primera página deberá contener el título del trabajo, el resumen y las palabras clave. En los trabajos en Español, los títulos de cuadros y figuras deberán ser escritos también en inglés; y para los artículos en Inglés en Español. Los cuadros y figuras deberán ser numerados con números arábigos consecutivos y aparecer referidos en el texto.

Los títulos deben identificarse con números arábigos y escribirse con letras mayúsculas (en negrita); los subtítulos, si necesarios, deben identificarse con dos números arábigos (ejemplo: 1.1) y escribirse con letra inicial mayúscula (en negrita).

Los títulos de las figuras deberán aparecer en la parte inferior anteceditos de la palabra "Figura" seguida de su número de

orden (en negrita). Los títulos de los cuadros deberán aparecer en la parte superior y ser anteceditos de la palabra “Cuadro” seguida de su número de orden (en negrita).

En la figura, la fuente (sí es pertinente) debe de escribirse por arriba del título, sin punto final; en el Cuadro, en la parte inferior y con punto final. Las figuras deberán estar exclusivamente en escala de grises elaboradas en Microsoft Excel. A las fotografías se aplican los mismos criterios que para las figuras, deben estar en formato JPG.

Los trabajos deben presentarse de acuerdo con el siguiente esquema: TÍTULO en Español, RESUMEN (seguido de palabras clave), TÍTULO DEL ARTÍCULO en Inglés, ABSTRACT (seguido de key words); 1. INTRODUCCIÓN (incluyendo revisión de literatura); 2. MATERIAL Y MÉTODOS; 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN; 4. CONCLUSIONES; 5. AGRADECIMIENTOS (si pertinente); y 6. LITERATURA CITADA, alineadas a la izquierda.

### **ENVÍO DE TRABAJOS (ARTÍCULOS Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)**

Para enviar un trabajo para publicación el o los autores pueden hacerlos llegar al Consejo Editorial, por vía electrónica a: [ceditorialfausac@gmail.com](mailto:ceditorialfausac@gmail.com) El Consejo Editorial le notificará sobre la recepción de su trabajo.

#### **Recomendaciones de edición:**

##### **Presentación**

Los trabajos deben iniciarse con el título, luego abajo colocar los apellidos y nombres del o los autor(es). En esa misma hoja, como pié de página, los títulos y el cargo y lugar de trabajo del o los autor(es).

**Título:** Conciso e indicar el contenido del trabajo.

**Resumen:** Presenta una frase introductoria que justifica el trabajo, describe lo que fue estudiado, presenta los principales resultados y conclusiones. Es seguido de las palabras clave.

**Abstract:** Consiste en la traducción del resumen al idioma Inglés. Es seguido de key words.

**Introducción:** Breve, esclareciendo la problemática estudiada, plantea hipótesis con base en revisión bibliográfica y finaliza con la indicación del objetivo del trabajo.

**Material y métodos:** reúne la información necesaria para la reproducción del trabajo por otros investigadores, los diferentes métodos deben referenciarse con base en la bibliografía.

**Resultados:** Presentación concisa de resultados, incluye cuadros, figuras y fotos.

**Discusión:** Análisis y discusión de los resultados obtenidos con base en la información bibliográfica.

**Conclusión:** Con base en la información discutida.

**Agradecimiento(s):** Sucinto(s), no deben aparecer en el texto. Opcional(es).

**Literatura citada:** incluye solo las referencias citadas en el texto. Ejemplos:

**Periódicos científicos:** Nombre de todos los autores, Título del artículo. Título abreviado del periódico, volumen: páginas inicial y final, año de publicación. Ejemplo:

KERN, J.S. & JOHNSON, M.G. Conservation tillage impacts on national soil and atmosphere carbon levels. Soil Sci. Soc. Am. J., 57: 200-210, 1993.

**Libro:** Autores. Título de la publicación. Número de edición. Local, Editora, año de publicación. Número de páginas. Ejemplo:

FISHER, R.F. & BINKLEY, D. 3.ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 2000. 489p.

**Participación en obra colectiva:** Autores. Título de la parte referenciada seguida de In: Nombre del editor. Título de la publicación, número de edición. Ciudad de Publicación, Editorial, año. Páginas inicial y final. Ejemplo:

**Capítulo de libro:**

ECK, H.V. & STEWART, B.A. Manures. In: RECHCIGL, J.E., ed. Soil amendments and environmental quality. 2.ed. Florida, CRC press, 1995. p.169-198.

**Publicación en Memorias:**

VETTORI, L. Ferro “livre” por cálculo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15., Campinas, 1975. Anais. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1976. p.127-128.

**CD-ROM**

LIMA, P.C.; MOURA, W.M.; LIMA, W.A.; HIZUMI, S.; MATOS, E.S.; PENNA, B.A., PERTEL, J. Avaliação de leguminosas utilizadas na adubação verde de cafezais orgânicos na zona da Mata de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 4., 2005. Memórias. Londrina, PR., EMBRAPA, 2005. CD-ROM.

**Internet:**

Cambio climático y calentamiento global en:< <http://www.cambioclimaticoglobal.com>.> Consultada el 13 julio 2007.

La literatura citada en el texto se presenta como: Fisher & Binkley (2000) o (Fisher & Binkley, 2000). Cuando se trata de más de dos autores usar la forma reducida (Hedley et al., 1982). Cuando se trate de más de dos obras del mismo autor en el mismo año, identificar con letras minúsculas. Ejemplo: Martens, 2002a,b.

Revista **etikalia** se terminó de imprimir en el mes de marzo de 2017, en los talleres de Editora Arizandieta, con una tirada de 300 ejemplares en papel bond beige de 80 gramos.

