

Evaluación de la resistencia de líneas mejoradas de frijol al virus del mosaico dorado amarillo

**Klever Alejandro Arroba López
Segundo Melchor Gavilanes Romero**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación de la resistencia de líneas mejoradas de frijol al virus del mosaico dorado amarillo

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Klever Alejandro Arroba López
Segundo Melchor Gavilanes Romero

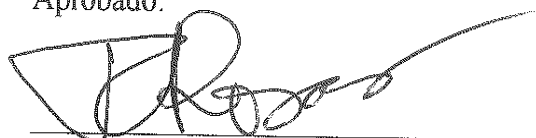
Zamorano, Honduras
Noviembre, 2017

Evaluación de la resistencia de líneas mejoradas de frijol al virus del mosaico dorado amarillo

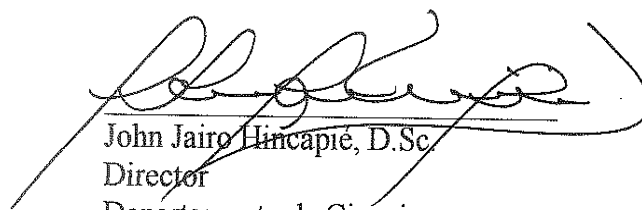
Presentado por:

Klever Alejandro Arroba López
Segundo Melchor Gavilanes Romero

Aprobado:



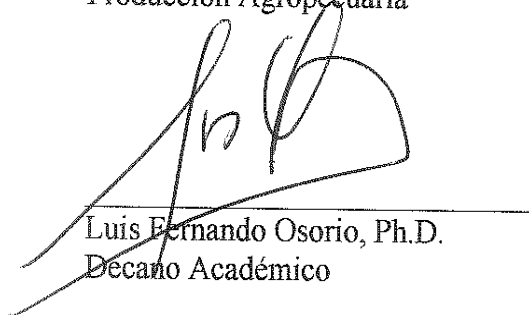
Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor Principal



John Jairo Hincapié, D.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



Cristian F. Quispe, Ph.D.
Asesor



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Decano Académico

Evaluación de la resistencia de líneas mejoradas de frijol al virus del mosaico dorado amarillo

Klever Alejandro Arroba López
Segundo Melchor Gavilanes Romero

Resumen. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es afectado por diversas enfermedades siendo el virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF) una de las más importantes en Centro América y El Caribe. El VMDAF es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y ocasiona pérdidas de rendimiento del 30-100 %. El objetivo del estudio fue evaluar la resistencia al VMDAF en 42 líneas avanzadas de los Viveros de Adaptación Centroamericanos de Frijol de grano rojo (VIDAC Rojo) y 55 de grano negro (VIDAC Negro) en condiciones de alta presión del virus en campo usando la escala de severidad 1-9 del CIAT (1987). El estudio también incluyó el análisis de la presencia del gen *bgm-1*, que confiere resistencia al VMDAF, usando el marcador molecular SCAR SR2. En campo sobresalieron tres líneas del VIDAC Rojo y cuatro líneas del VIDAC Negro por su resistencia al VMDAF y rendimiento de grano. El análisis Chi-Cuadrado confirmó que las líneas resistentes y susceptibles observadas en la evaluación en campo se ajustan a los datos de presencia y ausencia del marcador molecular SR2 del gen *bgm-1* en el laboratorio.

Palabras claves: gen *bgm-1*, mosca blanca (*Bemisia tabaci*), marcador SCAR SR2, *Phaseolus vulgaris* L., severidad de daño.

Abstract. The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is affected by different diseases, and the bean golden yellow mosaic virus (BGYMV) is one of the most important in Central America and the Caribbean. The BGYMV is transmitted by whiteflies (*Bemisia tabaci*) and cause yield losses of 30-100%. The objective of this study was to assess the resistance to BGYMV of 42 advanced red bean lines from the Viveros de Adaptación Centroamericanos de Frijol (VIDAC Rojo) and 55 black beans lines (VIDAC Negro) under high incidence of BGYMV in the field using the severity 1-9 scale from CIAT (1987). The study also included the analysis of the presence of the gene *bgm-1*, which confers resistance to BGYMV, using the molecular marker SCAR SR2. Three lines from the VIDAC Rojo and four from the VIDAC Negro were superior for BGYMV resistance and grain yield. The Chi-Square analysis confirmed that the lines resistant or susceptible in the field did show the presence or absence of the SR2 molecular marker of gene *bgm-1* obtained in the laboratory.

Key words: gene *bgm-1*, whitefly (*Bemisia tabaci*), SCAR marker SR2, *Phaseolus vulgaris* L., disease severity.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4. CONCLUSIONES	16
5. RECOMENDACIONES	17
6. LITERATURA CITADA.....	18

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Líneas avanzadas y testigos de frijol incluidos en el VIDAC Rojo. Zamorano, Honduras, 2016-2017.	4
2. Líneas avanzadas y testigos de frijol incluidos en el VIDAC Negro. Zamorano, Honduras, 2016.....	5
3. Marcador molecular SCAR SR2 usado para la identificación del gen <i>bgm-1</i> de resistencia al VMDA del frijol común. Zamorano, Honduras,2016-2017	7
4. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador molecular SCAR SR2. Zamorano, Honduras, 2016-2017	7
5. Perfil térmico para PCR del marcador molecular SCAR SR2. Zamorano, Honduras, 2016-2017	8
6. Severidad del daño (1-9) del virus del mosaico dorado amarillo del frijol en 44 líneas del VIDAC rojo. Zamorano, Honduras, 2016-2017	9
7. Rendimiento (kg/ha) de 44 líneas del VIDAC Rojo bajo incidencia del virus del mosaico dorado amarillo del frijol en las épocas de marzo-mayo 2016 y noviembre-enero 2017, Zamorano, Honduras.....	10
8. Evaluación fenotípica en campo y presencia del marcador SR2 del gen de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol de líneas del VIDAC Rojo, Zamorano, Honduras, 2016-2017.	12
9. Severidad de daño del virus del mosaico dorado amarillo del frijol (escala 1-9) en 57 líneas del VIDAC Negro en la época de marzo-mayo. Zamorano, Honduras, 2016.	13
10. Reacción de severidad de daño (1-9) al virus del mosaico dorado amarillo en el campo y la presencia del marcador SR2 del gen <i>bgm1</i> de resistencia de líneas del VIDAC Negro. Zamorano, Honduras, 2016-2017.	15
Figuras	Página
1. Rendimientos (kg/ha) de las 44 líneas de frijol del VIDAC Rojo bajo presión del virus del mosaico dorado amarillo del frijol en las épocas de marzo-mayo 2016 y noviembre-enero 2017, Zamorano, Honduras.....	11
2. Distribución del rendimiento de las líneas del VIDAC Rojo según su resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (escala de severidad 1-9) en la época de marzo-mayo 2016 y noviembre-enero 2017, Zamorano, Honduras.	11
3. Rendimiento (kg/ha) de las 57 líneas del VIDAC Negro con alta (época de	

siembra marzo-mayo) y baja (época de siembra septiembre-noviembre) presión del VMDAF. Zamorano, Honduras, 2016.....	14
4. Rendimiento de las líneas genotípicas sobresalientes del VIDAC Negro bajo alta presión (época de noviembre-enero) y baja presión (época de junio-agosto) del virus del mosaico dorado amarillo del frijol. Zamorano, Honduras, 2016.....	14

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los principales granos básicos para la alimentación de la mayoría de la población urbana y rural de bajos recursos en Centroamérica y el Caribe. Presenta cualidades de gran valor nutricional debido al alto contenido de aminoácidos esenciales superando a otros alimentos de la dieta básica (Rosas 2003). Su rendimiento es afectado por diversas enfermedades, plagas, sequía y fertilidad de los suelos. El constante crecimiento de la población en las últimas décadas ha hecho necesario disponer de alimentos en mayor cantidad por unidad de superficie cultivable mediante el control de agentes biológicos que afectan al rendimiento del cultivo y el uso de variedades resistentes que eviten la contaminación y propagación de patógenos no deseados (Rosas et al. 2011). El virus del mosaico dorado amarillo (VMDAF) del frijol que es transmitido por el vector *Bemisia tabaci*, es una de las principales limitantes en la producción de frijol en la región (Rosas 2001). Este virus también puede ser transmitido por áfidos, sin embargo, este no afecta la semilla del frijol (Morales et al. 1988).

La mosca blanca (*Bemisia tabaci*) es un insecto vector de geminivirus como VMDAF y que ocasiona daños económicos considerables por su alta resistencia a los insecticidas sistémicos. Además, es una plaga importante por la alta fecundidad, fertilidad y capacidad de transmisión de virus. Se estima que la mosca blanca tiene alrededor de 500 plantas como hospederos teniendo una capacidad invasiva de 200 km de radio (Lugo et al. 2011).

El VMDAF es una enfermedad viral presente en zonas cálidas y tropicales entre los 25-30 °C y una altitud máxima de 1,200 msnm. Puede ocasionar pérdidas del 30 – 100% dependiendo de la etapa fenológica del cultivo y de la población del vector (IICA 2014).

La planta infectada por el VMDAF presenta síntomas de clorosis con moteados de color verde oscuro en las hojas que luego se extienden y se tornan color amarillo, produciendo enanismo por la inhibición de fotosíntesis, ya que el virus se replica en la mayor parte de la lámina foliar. Las hojas pueden enrollarse formando un acucharamiento hacia la parte inferior haciendo que las venas se tornen más blancas de lo normal. Las vainas tienden a producir semillas pequeñas, deformes y pierden color. Incluso se puede observar necrosis de la raíz y rayas necróticas que se pueden expandir hacia el tallo y meristemos en variedades hipersensibles. Finalmente, la planta se marchita y muere ocasionando pérdidas significativas en la producción (IICA 2014).

La importancia del mejoramiento genético radica en poder corregir aquellas características no deseadas por medio de hibridaciones y métodos específicos de selección con el fin de disminuir pérdidas de grano a la cosecha, incrementar resistencia a plagas y enfermedades, y crear variedades tolerantes que eviten la contaminación y propagación de patógenos

resistentes a aplicaciones químicas. El primer paso en un programa de mejoramiento es recurrir a evaluaciones fenotípicas para identificar genotipos resistentes (Guimarães et al. 2007).

La evaluación fenotípica en campo para resistencia a VMDFAF consiste en identificar plantas con potencial genético estimando la incidencia y severidad del virus mediante escalas estandarizadas (CIAT 1987). Así también, la evaluación del efecto del VMDFAF en el rendimiento es una variable importante ya que el objetivo final de todo productor es obtener cosechas con el mayor rendimiento posible.

Estas evaluaciones son complementadas con estudios genéticos de laboratorio mediante la selección asistida con marcadores moleculares (SAM). La importancia de la SAM radica en diferenciar específicamente líneas resistentes de susceptibles por a la presencia de uno o varios genes evaluados mediante procesos de extracción, cuantificación, dilución, amplificación y visualización del ADN (Guimarães et al. 2007). Siendo de gran importancia los marcadores asistidos para la detección y transferencia de genes (Blair et al. 2007)

El gen de interés para este estudio que confiere resistencia al VMDFAF, es el gen recesivo *bgm-1*. Este gen es derivado del cultivar local Garrapato (México) que proporciona resistencia en respuesta a la infección del patógeno (Urrea et al.1996). El marcador molecular SR2 permite identificar la presencia del gen que amplifica las bandas a 570 y 530 pares de bases (pb), siendo su combinación homocigota recesiva (*bgm-1/bgm-1*) la que confiere resistencia al virus amplificando la banda a 530 pb y su combinación homocigota dominante (*Bgm-1/Bgm-1*) que presenta susceptibilidad al VMDFAF (Blair et al. 2007).

En este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- Identificar líneas avanzadas de frijol rojo y negro resistentes al VMDFAF en condiciones de alta incidencia del virus.
- Determinar la presencia o ausencia del gen *bgm-1* usando el marcador SCAR SR2 en líneas avanzadas de frijol rojo y negro.

2. METODOLOGÍA

El presente estudio se condujo en las instalaciones del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, localizadas en el departamento de Francisco Morazán, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras. Se hicieron evaluaciones fenotípicas en presencia del VMDAF en el lote B-C de Zorrales y evaluaciones genotípicas mediante el uso del marcador SR2 del gen *bgm-1* en el laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF.

Evaluaciones fenotípicas en campo

Se evaluaron líneas avanzadas de frijol de grano rojo y negro pertenecientes a los Vivero de Adaptación Centroamericano de Grano Rojo (VIDAC Rojo) y de Grano Negro (VIDAC Negro). Del VIDAC Rojo se evaluaron 42 líneas avanzadas de frijol, un testigo mejorado (Amadeus 77) y un testigo criollo susceptible (Seda) intercalados cada 10 surcos (Cuadro 1). Del VIDAC Negro se evaluaron 55 líneas avanzadas, un testigo mejorado regional (DOR 390) y la variedad Lenca Precoz liberada en Honduras en el 2016, intercalados cada 10 surcos (Cuadro 2). Las líneas del VIDAC Rojo provienen de los programas de frijol del CIAT y Zamorano, y las del VIDAC Negro de la Universidad de Puerto Rico, la Estación Experimental de Agricultura Tropical (TARS, por sus siglas en inglés) del USDA/ARS de Puerto Rico y Zamorano.

Cuadro 1. Líneas avanzadas y testigos de frijol incluidos en el VIDAC Rojo. Zamorano, Honduras, 2016-2017.

N°	Líneas	N°	Líneas	N°	Líneas
1	Testigo criollo	16	NIC 1241-13	31	MAB 484
2	FBN 1204-44	17	CCR 1262-10	32	CFS 1201R-94
3	BRT 942-34	18	FBN 1204-50	33	CCR 1262-52
4	FBN 1204-22	19	BCR 122-82	34	MNA 1231-57
5	CCR 1262-5	20	SMN 46	35	RSFC 18048-013
6	FBN 1212-25	21	FBN 1203-26	36	RSFC 18072-007
7	FBN 1204-11	22	FBN 1201-9	37	RSFC 18072-017
8	FBN 1201-57	23	MRA 1221-45	38	RSFC 18078-009
9	CCR 1262-35	24	BCR 122R-2	39	RSFD 18101-008
10	BCR 122-61	25	CCR 1262-34	40	RSFD 18101-010
11	Testigo mejorado	26	RSMC-17512-8	41	RSFD 18101-016
12	FBN 1204-32	27	MRA 1222-4	42	RSFD 18101-026
13	CFS 1202R-2	28	CCR 1262-43	43	BFS 47
14	BCR 122-12	29	CFS 1215-27	44	BFS 121
15	BCR 122R-4	30	MLY 1255-43		

Testigos: Seda (criollo) y Amadeus 77 (mejorado).

Cuadro 2. Líneas avanzadas y testigos de frijol incluidos en el VIDAC Negro. Zamorano, Honduras, 2016.

N°	Líneas	N°	Líneas	N°	Líneas
1	Testigo criollo	20	PR 1423-166	39	13IS-7910-12
2	BCN 113-103	21	PR 1423-168	40	13IS-7910-36
3	MEN 933-28	22	PR 1423-8	41	13IS-7910-37
4	BCN 113-65	23	PR 1423-207	42	13IS-7910-40
5	PR 1423-210	24	PR1416-111	43	13IS-7910-45
6	FBN 1210-32	25	PR1416-109	44	13IS-7910-47
7	PR 1423-99	26	13IS-7881-22	45	13IS-7910-59
8	PR 1423-143	27	13IS-7881-30	46	13IS-7910-62
9	FBN 1208-69	28	13IS-7881-65	47	13IS-7910-95
10	PR1416-101	29	13IS-7891-18	48	13IS-7910-96
11	Testigo mejorado	30	13IS-7891-27	49	13IS-7910-101
12	PR 1423-14	31	13IS-7891-45	50	13IS-7910-109
13	PR 1423-262	32	13IS-7902-10	51	13IS-7910-112
14	PR1416-119	33	13IS-7902-36	52	13IS-7910-115
15	PR 1423-170	34	13IS-7902-82	53	13IS-7911-1
16	BCN 113-26	35	13IS-7902-100	54	13IS-7911-58
17	PR1416-31	36	13IS-7902-102	55	13IS-7911-96
18	PR 1423-15	37	13IS-7902-127	56	13IS-7911-116
19	PR1416-20	38	13IS-7910-11	57	PR 1469-107-4

Testigos: Lenca precoz (nacional) y DOR 390 (mejorado).

Establecimiento de las parcelas. Quince días antes de sembrar las líneas avanzadas se establecieron surcos esparcidores compuestos de variedades criollas susceptibles al VMDF de frijol común y de frijol lima (*Phaseolus lunatus*), para facilitar el establecimiento y diseminación de la mosca blanca (vector) y el VMDF en el lote y lograr una incidencia deseable y uniforme del virus.

Las unidades experimentales fueron surcos individuales de 5 m de largo, y los distanciamientos en surcos a 0.7 m y entre plantas a 0.1 m, distribuidas en un diseño de bloques completos al azar. Las parcelas fueron fertilizadas con 130 kg/ha de 18-46-0 a la siembra y 65 kg/ha de urea al aporque, 25 días después de la siembra (DDS). Se hicieron controles recomendados de malezas y enfermedades (hongos y bacterias), pero no se controlaron las plagas para evitar afectar al vector mosca blanca.

Variables medidas. Al llenado de vainas (R8) se determinó la severidad de daño del VMDF usando una escala de 1-9 (1 = sin síntomas; 9 = 100% daño, muerte) del CIAT (1987).

A madurez de cosecha, se recolectaron 10 plantas por parcela para estimar el rendimiento en kg/ha ajustado al 14% de humedad, considerando una densidad de 142,847 plantas/ha.

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza y separación de medias mediante el método de diferencias mínimas significativas (DMS) al $P < 0.005$, utilizando el programa estadístico Statistix 8.1.

Evaluaciones genotípicas en laboratorio

Se analizaron las líneas con el marcador SCAR SR2 para identificar la presencia o ausencia del gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF gen *bgm-1* que evita los síntomas de clorosis.

Siembra. En casa de malla, se sembraron las líneas del VIDAC Rojo y Negro a razón de cuatro maceteros por línea y cuatro plantas por macetero. A los 15 DDS se colectaron los trifolios de los brotes más tiernos para hacer la extracción de ADN y seguir los procedimientos de PCR (siglas en inglés de la reacción en cadena de la polimerasa) según el protocolo de la Universidad de Wisconsin, adaptado al Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.

Extracción de ADN. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando brotes vegetativos de 15 días de edad, colocándolos en micro tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se agregó 50 μ L de buffer PEX (etil xantogenato de potasio) y con la ayuda de una barra de plexiglass se procedió a macerar el tejido; seguidamente se le adicionó 450 μ L de buffer PEX. Las muestras fueron colocadas en baño María a 65° C por 60 min. Para ser centrifugadas a 14,000 rpm (revoluciones por minuto) por 10 min. La precipitación de ácidos nucleicos se llevó a cabo, llenando los tubos Eppendorf con una mezcla 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M por 30 minutos a temperatura ambiente. Se peletizaron los ácidos nucleicos centrifugando las muestras a 3,000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante. Al pellet se añadió 300 μ L de RNAsa (100 μ g/mL) + buffer TE (Tris-ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA)) 0.1X; después se agitaron las muestras y se colocaron en baño María a 37°C por 1 hora para eliminar el ARN de las muestras. La tercera centrifugación se llevó a cabo a 14,000 rpm por 3 min para precipitar el ADN y lograr pellets más limpios y sin remanente de tejido. Después en tubos Eppendorf nuevos se llenó una mezcla de 10:1 etanol: acetato de sodio (3M). Se mezcló invirtiendo los tubos para permitir que se precipite el ADN a temperatura ambiente por 30 min. Para peletizar y precipitar el ADN de las muestras se centrifugarán a 3,000 rpm por 5 min. El pellet de ADN, previamente lavado con etanol al 70%, se centrifugó por 15 s a 14,000 rpm y la muestra se secó a temperatura ambiente por 3 horas. Se procedió a hidratar el pellet con 100 μ L de buffer TE 0.1X y se almacenó a -20°C.

Cuantificación de ADN. Las muestras a cuantificar se obtuvieron mezclando el ADN (1 μ L), el buffer TE 1X (99 μ L) en tubos termo sensibles con capacidad de 0.5 mL. El equipo utilizado es el fluorómetro Quantus®, previamente calibrado con dos muestras adicionales, el blanco y el ADN estándar. Para la preparación de la muestra blanco se debe mezclar el buffer TE 1X (100 μ L) y la solución de trabajo (100 μ L) en un tubo de 0.5 mL. La muestra estándar se obtuvo mezclando 2 μ L de ADN Lambda, 98 μ L de buffer TE 1X y 100 μ L de solución de trabajo. Todas las muestras fueron incubadas durante 5 min a temperatura ambiente.

Dilución del ADN. La dilución se efectuó en buffer TE 0.1X a un volumen final de 100 μ L con una concentración de 30 ng/ μ L. La finalidad es estandarizar las muestras para que tengan

igual probabilidad de ser amplificadas. La dilución se desarrolló mediante la siguiente ecuación:

$V_i = (C_f \times V_f / C_i) (-1)$, donde V_i : Volumen inicial de ADN (μL), C_f : Concentración final ($\text{ng}/\mu\text{L}$), V_f : Volumen final del buffer de dilución TE 0.1X (100 μL) y C_i : Concentración inicial ($\text{ng}/\mu\text{L}$).

Amplificación de ADN. El ADN se amplificó en un termociclador Techne Unit® TC-512 utilizando el marcador SR2 para el gen *bgm-1* siguiendo el protocolo de perfil térmico utilizado en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada (Cuadro 5).

Cuadro 3. Marcador molecular SCAR SR2 usado para la identificación del gen *bgm-1* de resistencia al VMDA del frijol común. Zamorano, Honduras, 2016-2017.

SCAR	Patógeno	Tamaño (bp) / orientación	Secuencia del SCAR	GEN
SR2	VMDAF	530/ 570	CAC AGC TGC CCT AAC AAA AT CAC AGC TGC CAC AGG TGG GA	<i>bgm-1</i>

Fuente: SR2 (Urrea et al. 1996; Blair et al. 2007).

Cuadro 4. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador molecular SCAR SR2. Zamorano, Honduras, 2016-2017.

Reactivos	Cantidad (μL)
dd H ₂ O	9.4
PCR Buffer	2.0
dNTP's + MgCl ₂	0.7
Primer (F)	SR 2 0.3
Primer (R)	SR 2 0.3
Taq (Enzima)	0.3
ADN Template	2.0
Total	15.0

Fuente: Alvarado (2009)

Cuadro 5. Perfil térmico para PCR del marcador molecular SCAR SR2. Zamorano, Honduras, 2016-2017.

Perfil térmico	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	30 s	
Desnaturalización	94	1 min	35
Acoplamiento	60	1 min	35
Extensión	72	3 min	35
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	15		

Fuente: SR2 (Urrea et al. 1996; Blair et al. 2007)

Electroforesis y visualización de ADN. Los productos de PCR se observaron en geles de agarosa al 1.1% en solución tampón TBE 1X (Tris-HCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA) en tanques de electroforesis. Antes de la descarga de las muestras sobre los pozos del gel de agarosa, a cada muestra producto del PCR se añadió 3 μ L de buffer de carga (tinción). Se utilizó una escalera molecular de 100 pares de bases (pb) y las bandas fueron separadas en un Transphor/ Electrophoresis® de 2.5 amperios a 110 Voltios durante 1 h 15 min. Posteriormente, los geles de agarosa fueron sumergidos en una solución de TBE 0.5X mezclada con el tinte para ácidos nucleicos Diamond® a una concentración de 0.01% con la finalidad de teñir las bandas de ADN.

La presencia/ausencia de bandas polimórficas de ADN se visualizaron en el trans-iluminador Benchtop®, UVP, modelo M- 26 VX (95-0413-01) a una longitud de onda de 302 nm. A los geles de agarosa se les tomó una fotografía con una cámara convencional bajo luz ultravioleta para registrar los resultados.

Los datos de campo y de laboratorio fueron analizados mediante un análisis de Chi cuadrado para determinar si los datos de campo de severidad de daño causados por el VMDAF en las líneas de frijol del VIDAC Rojo y Negro se relacionan. a la presencia del marcador molecular para el gen *bgm1* determinados en el laboratorio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de campo del VIDAC Rojo

Las líneas RSFD 18101-010, BCR 122R-2 y FBN 1203-26 del VIDAC Rojo mostraron resistencia al VMDAF (3) comparado con el testigo mejorado Amadeus 77 (3.3). El testigo criollo Seda presentó una alta susceptibilidad (8.8) al VMDAF, lo que nos sugiere que la severidad en el ensayo fue la deseada. Otras seis líneas también presentaron resistencia (≤ 3.3) en este estudio con alta presión del VMDAF (Cuadro 8). De las 42 líneas evaluadas para rendimiento destacaron con un alto rendimiento (>2000 kg/ha) MRA 1222-4, RSMC-17512-8 y MLY 1255-43 que fueron significativamente superiores al testigo criollo Seda (Cuadro 9).

Cuadro 6. Severidad del daño (1-9) del virus del mosaico dorado amarillo del frijol en 44 líneas del VIDAC Rojo. Zamorano, Honduras, 2016-2017.

Genotipo	Escala (1-9)	Genotipo	Escala (1-9)	Genotipo	Escala (1-9)
Testigo criollo	8.8	SMN 46	4.7	CCR 1262-5	3.7
FBN 1201-57	7.7	CCR 1262-34	4.7	BCR 122-61	3.7
BFS 47	7.3	CFS1215-27	4.7	BCR 122R-2	3.7
FBN 1204-44	7.0	RSFC18072-007	4.7	MAB 484	3.7
FBN 1201-9	6.7	RSFD18101-008	4.7	BCR 122-12	3.3
RSFC 18072-017	6.3	BFS 121	4.7	NIC 1241-13	3.3
RSFD18101-026	6.0	CFS 1202R-2	4.3	BCR 122-82	3.3
BRT 942-34	6.0	CCR 1262-35	4.0	MRA 1222-4	3.3
FBN 1204-22	5.7	FBN 1204-32	4.0	CFS 1201R-94	3.3
FBN 1204-11	5.3	BCR 122R-4	4.0	CCR 1262-52	3.3
RSFC 18078-009	5.3	MRA 1221-45	4.0	Testigo mejorado	3.3
CCR 1262-10	5.0	RSMC-17512-8	4.0	FBN 1203-26	3.0
FBN 1204-50	5.0	CCR 1262-43	4.0	BCR 122R-2	3.0
RSFC 18048-013	4.8	RSFD18101-016	4.0	RSFD 18101-010	3.0
FBN 1212-25	4.7	MLY 1255-43	4.0		
CV %	25.79				
P	0.0001				
DMS	1.9305				

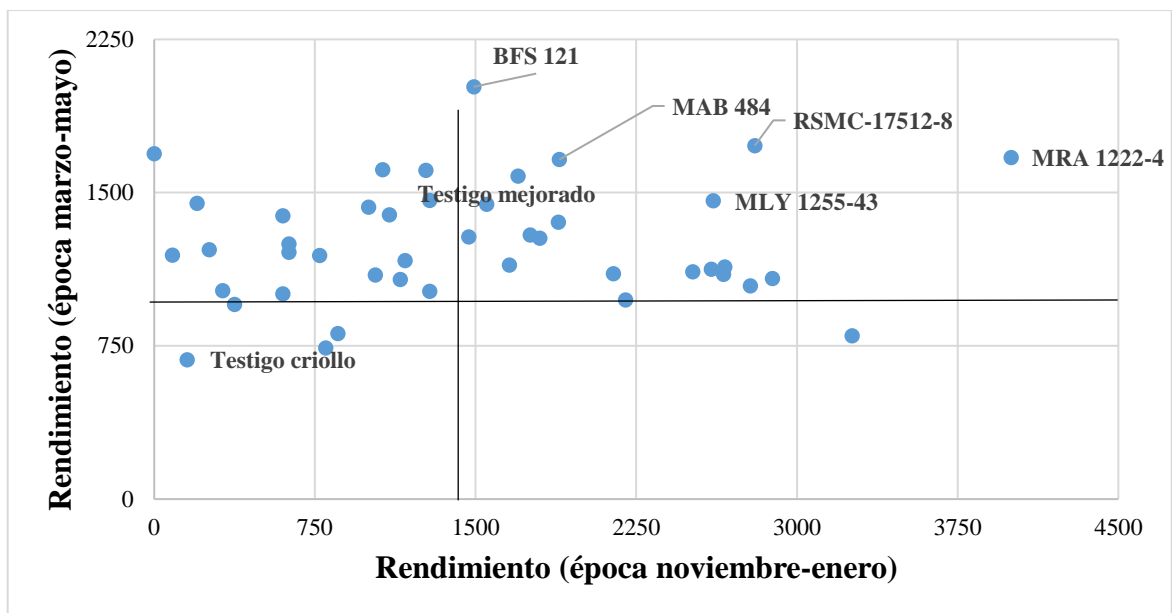
Testigos: Seda (criollo) y Amadeus 77 (mejorado).

Cuadro 7. Rendimiento (kg/ha) de 44 líneas del VIDAC Rojo bajo incidencia del virus del mosaico dorado amarillo del frijol en las épocas de marzo-mayo 2016 y noviembre-enero 2017. Zamorano, Honduras.

Línea	Rend. (kg/ha)	Línea	Rend. (kg/ha)	Línea	Rend. (kg/ha)
MRA 1222-4	2835	BCR 122-61	1587	RSFC 18072-007	994
RSMC-17512-8	2267	CFS 1202R-2	1538	RSFD 18101-016	982
MLY 1255-43	2034	BCR 122-12	1523	FBN 1204-32	938
NIC 1241-13	2028	RSFC18078-009	1497	FBN 1204-11	919
CCR 1262-10	1983	RSFD 18101-008	1439	BRT 942-34	845
CFS 1201R-94	1913	CCR 1262-5	1401	FBN 1204-50	833
FBN 1203-26	1900	CCR 1262-43	1376	FBN 1204-44	824
MNA 1231-57	1879	RSFD 18101-010	1374	FBN 1201-9	802
CCR 1262-52	1862	RSFC 18048-013	1339	FBN 1212-25	770
BCR 122-82	1813	RSFD 18101-026	1244	BFS 47	739
MAB 484	1777	CCR 1262-35	1214	RSFC 18072-017	670
BFS 121	1755	MRA 1221-45	1169	FBN 1204-22	663
Testigo mejorado	1628	SMN 46	1152	FBN 1201-57	640
CCR 1262-34	1623	CFS 1215-27	1112	Testigo criollo	381
BCR 122R-2	1620	BCR 122R-4	1064		
CV %	50.65				
P	0.351				
DMS	1391.6				

Testigos: Seda (criollo) y Amadeus 77 (mejorado).

Al comparar el rendimiento de las 44 líneas obtenidos en las épocas de primera y postrera, se observa que las líneas MRA 1222-4, RSMC-17512-8, MLY 1255-43, MAB 48 y BFS 121 superan a los testigos mejorado Amadeus 77 y criollo susceptible Seda (Figura 1).



Testigos: Seda (criollo) y Amadeus 77 (mejorado).
 Figura 1. Rendimientos (kg/ha) de las 44 líneas de frijol del VIDAC Rojo bajo presión del virus del mosaico dorado amarillo del frijol en las épocas de marzo-mayo 2016 y de noviembre-enero 2017. Zamorano, Honduras.

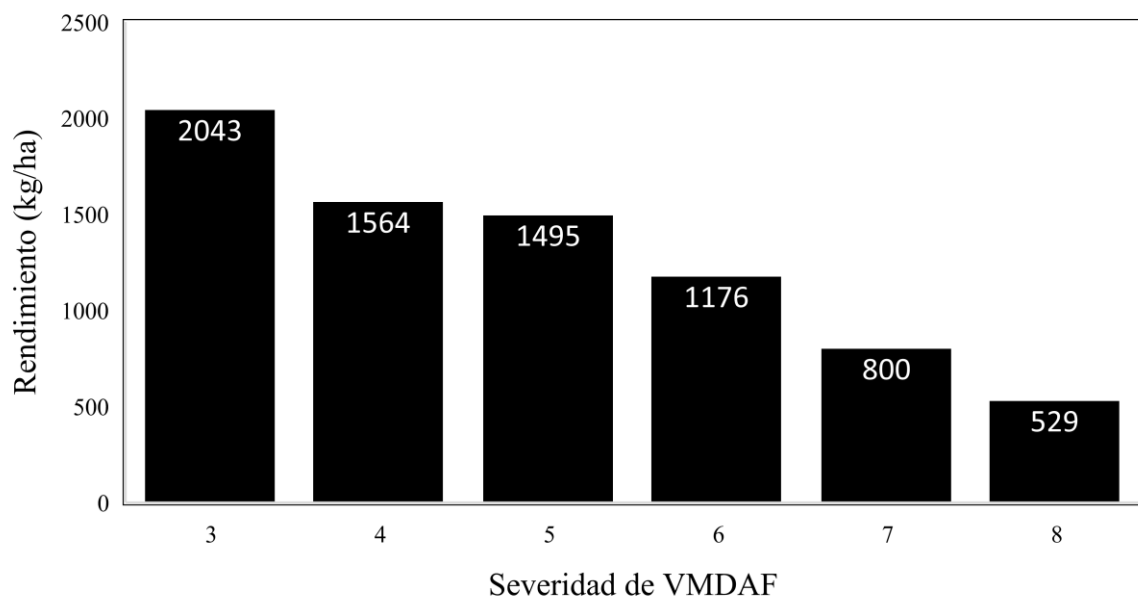


Figura 2. Distribución del rendimiento de las líneas del VIDAC Rojo según su resistencia al Virus del mosaico dorado amarillo del frijol (escala de severidad 1-9) en la época de marzo-mayo 2016 y de noviembre-enero 2017. Zamorano, Honduras.

Cuadro 8. Evaluación fenotípica en campo y presencia del marcador SR2 del gen de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol de líneas del VIDAC Rojo. Zamorano, Honduras, 2016-2017.

VIDAC Rojo					
Líneas	E. fenotípica	E. genotípica	Líneas	E. fenotípica	E. genotípica
FBN 1203-26	3.0	+	CFS 1202R-2	4.3	+
MNA 1231-57	3.0	+	FBN1212-25	4.7	-
RSFD18101-010	3.0	+	SMN 46	4.7	+
Testigo mejorado	3.3	+	CCR 1262-34	4.7	-
BCR 122-12	3.3	+	CFS 1215-27	4.7	+
NIC 1241-13	3.3	+	RSFC18072-007	4.7	+
BCR 122-82	3.3	+	RSFD18101-008	4.7	+
MRA 1222-4	3.3	+	BFS 121	4.7	+
CFS 1201R-94	3.3	+	RSFC18048-013	4.8	+
CCR 1262-52	3.3	+	CCR 1262-10	5.0	+
CCR 1262-5	3.7	+	FBN 1204-50	5.0	-
BCR 122-61	3.7	+	FBN 1204-11	5.3	+
BCR 122R-2	3.7	-	RSFC18078-009	5.3	+
MAB 484	3.7	+	FBN 1204-22	5.7	+
CCR 1262-35	4.0	+	BRT 942-34	6.0	+
FBN 1204-32	4.0	+	RSFD18101-026	6.0	+
BCR 122R-4	4.0	+	RSFC18072-017	6.3	+
MRA 1221-45	4.0	-	FBN 1201-9	6.7	+
RSMC-17512-8	4.0	-	FBN 1204-44	7.0	-
CCR 1262-43	4.0	+	BFS 47	7.3	-
MLY 1255-43	4.0	+	FBN 1201-57	7.7	+
RSFD18101-016	4.0	+	Testigo criollo	8.8	-

Chi cuadrado= 0.085, 1 GL P= 0.60>0.05

Testigos: Seda (criollo) y Amadeus 77 (mejorado).

Presencia del gen *bgm-1* (+); ausencia del gen *bgm-1* (-).

Evaluación (E.)

Ensayo de campo VIDAC Negro.

En la evaluación de la severidad de las 55 líneas del VIDAC Negro se identificaron 14 líneas de grano negro resistentes (≥ 3.0) al VMDF que superaron al testigo mejorado DOR 390 (6.2), el cual mostró susceptibilidad, indicando que la severidad producido por el virus del mosaico dorado amarillo del frijol en el ensayo fue la deseada (Cuadro 9).

Cuadro 9. Severidad de daño del virus del mosaico dorado amarillo del frijol (escala 1-9) en 57 líneas del VIDAC Negro en la época de marzo-mayo. Zamorano, Honduras, 2016.

Línea	Escala (1-9)	Línea	Escala (1-9)	Línea	Escala (1-9)
13IS-7902-100	6.5	13IS-7902-36	5.0	PR 1423-8	3.5
BCN 113-26	6.3	13IS-7910-95	5.0	PR1416-111	3.5
Testigo mejorado	6.2	13IS-7891-18	4.5	13IS-7910-37	3.5
13IS-7891-45	6.0	Testigo nacional	4.1	13IS-7910-96	3.5
13IS-7902-102	6.0	MEN 933-28	4.0	PR 1423-210	3.0
13IS-7910-40	6.0	BCN 113-65	4.0	FBN 1210-32	3.0
13IS-7910-45	6.0	PR1416-20	4.0	PR 1423-99	3.0
13IS-7910-47	6.0	PR 1423-166	4.0	PR 1423-143	3.0
BCN 113-103	5.5	PR 1423-168	4.0	PR 1423-14	3.0
13IS-7881-30	5.5	13IS-7891-27	4.0	PR 1423-262	3.0
13IS-7902-10	5.5	13IS-7910-36	4.0	PR1416-31	3.0
13IS-7902-82	5.5	13IS-7910-101	4.0	PR 1423-15	3.0
13IS-7902-127	5.5	13IS-7910-109	4.0	PR1416-109	3.0
13IS-7910-59	5.5	13IS-7910-112	4.0	13IS-7881-22	3.0
13IS-7910-62	5.5	13IS-7911-96	4.0	13IS-7910-11	3.0
13IS-7910-115	5.5	FBN 1208-69	3.5	13IS-7911-1	3.0
13IS-7911-58	5.5	PR1416-101	3.5	PR 1469-107-4	3.0
13IS-7911-116	5.5	PR1416-119	3.5	13IS-7910-12	2.5
13IS-7881-65	5.0	PR 1423-170	3.5		
CV %	30.4				
P	0.05				
DMS	2.62				

Testigos: Lenca Precoz (nacional) y DOR 390 (mejorado).

De las 55 líneas evaluadas para rendimiento en las épocas de marzo-mayo 2016 con alta presión del virus y de septiembre-noviembre 2016 con baja presión del virus, destacó el testigo mejorado DOR 390 con un rendimiento promedio de 2,836 kg/ha y las líneas 13IS-7881-65, 13IS-7910-37, 13IS-7902-127 y PR 1423-262 con rendimientos promedios de 2,249, 2,301, 2,167 y 2,162 kg/ha, respectivamente.

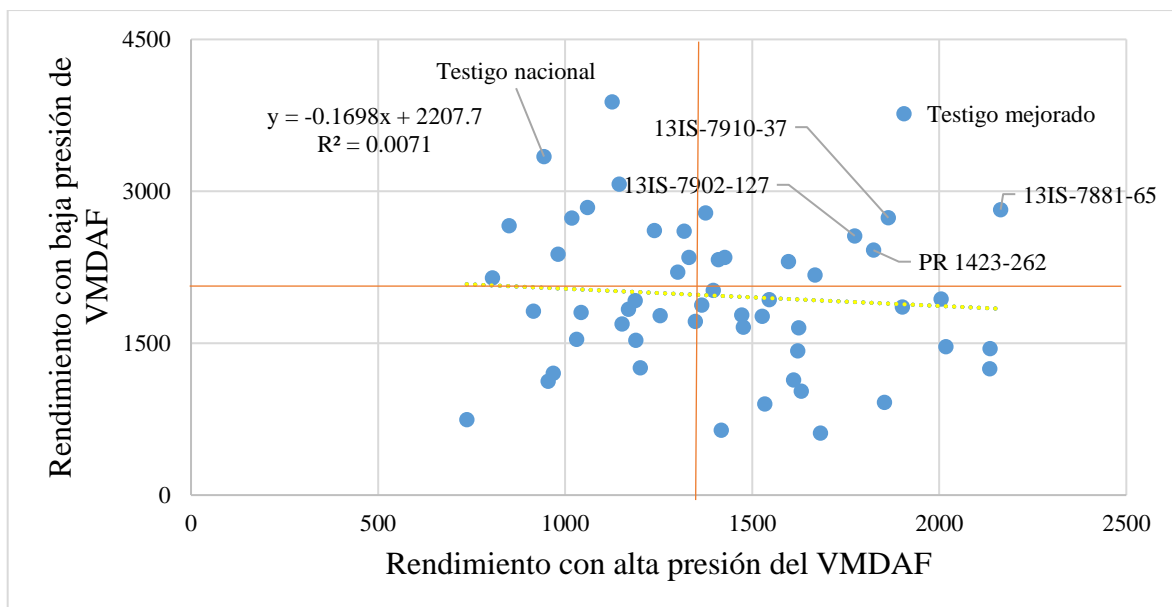


Figura 3. Rendimiento (kg/ha) de las 57 líneas del VIDAC Negro con alta (época de siembra marzo-mayo) y baja (época de siembra septiembre-noviembre) presión del VMDAF. Zamorano, Honduras, 2016.

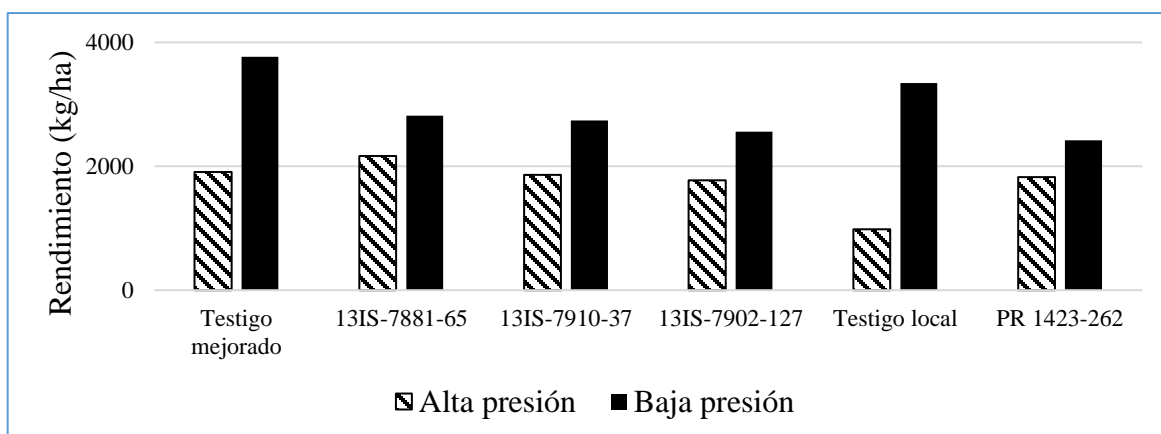


Figura 4. Rendimiento de las líneas genotípicas sobresalientes del VIDAC Negro bajo alta presión (época de noviembre-enero) y baja presión (época de junio-agosto) del virus del mosaico dorado amarillo del frijol. Zamorano, Honduras, 2016.

Evaluación de VIDAC Negro en laboratorio

Las líneas de frijol del VIDAC Negro que resultaron resistentes al VMDAF (≤ 3) en el campo presentaron la banda de resistencia de 530 pb del marcador SR2 del gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF (cuadro 12).

Cuadro 10. Reacción de severidad de daño (1-9) al virus del mosaico dorado amarillo en el campo y la presencia del marcador SR2 del gen *bgm-1* de resistencia de líneas del VIDAC Negro. Zamorano, Honduras, 2016-2017.

VIDAC Negro					
Líneas	E. fenotípica	E. genotípica	Líneas	E. fenotípica	E. genotípica
13IS-7910-12	2.5	+	13IS-7910-36	4	+
PR 1423-210	3.0	+	13IS-7910-101	4	+
FBN 1210-32	3.0	+	13IS-7910-109	4	-
PR 1423-99	3.0	+	13IS-7910-112	4	+
PR 1423-143	3.0	+	13IS-7911-96	4	+
PR 1423-14	3.0	+	Testigo criollo	4.1	-
PR 1423-262	3.0	+	13IS-7891-18	4.5	+
PR1416-31	3.0	+	13IS-7881-65	5	-
PR 1423-15	3.0	+	13IS-7902-36	5	+
PR1416-109	3.0	+	13IS-7910-95	5	-
13IS-7881-22	3.0	+	BCN 113-103	5.5	-
13IS-7910-11	3.0	+	13IS-7881-30	5.5	+
13IS-7911-1	3.0	+	13IS-7902-10	5.5	+
PR 1469-107-4	3.0	+	13IS-7902-82	5.5	+
FBN 1208-69	3.5	+	13IS-7902-127	5.5	-
PR1416-101	3.5	+	13IS-7910-59	5.5	+
PR1416-119	3.5	+	13IS-7910-62	5.5	-
PR 1423-170	3.5	+	13IS-7910-115	5.5	+
PR 1423-8	3.5	+	13IS-7911-58	5.5	-
PR1416-111	3.5	+	13IS-7911-116	5.5	+
13IS-7910-37	3.5	+	13IS-7891-45	6	+
13IS-7910-96	3.5	+	13IS-7902-102	6	+
MEN 933-28	4	+	13IS-7910-47	6	+
BCN 113-65	4	-	13IS-7910-45	6	-
PR1416-20	4	+	13IS-7910-40	6	-
PR 1423-166	4	+	Testigo mejorado	6.2	-
PR 1423-168	4	+	BCN 113-26	6.3	-
PR 1423-207	4	+	13IS-7902-100	6.5	-
13IS-7891-27	4	+			

Chi cuadrado= 0.048, 1 GL P= 0.50>0.05

Testigos: Lenca Precoz (nacional) y DOR 390 (regional).

Presencia del gen *bgm-1* (+); ausencia del gen *bgm-1* (-).

Evaluación (E.)

4. CONCLUSIONES

- Se identificaron tres líneas avanzadas del VIDAC Rojo MRA 1222-4, RSMC-17512-8 y MLY 1255-43, y cuatro líneas del VIDAC Negro 13IS-7881-65 13IS-79010-37, 13IS-7902-127 Y PR 1423-262 resistentes al VMDAF y con mayor rendimiento que los testigos en la evaluación fenotípica de campo.
- Se determinó la presencia y ausencia del gen *bgm-1* con el marcador molecular SCAR SR2 en la evaluación genotípica, confirmando la presencia del gen en las líneas resistentes del VIDAC Rojo y Negro evaluadas.

5. RECOMENDACIONES

- Ampliar la evaluación de las líneas resistentes del VIDAC Rojo y Negro con el marcador molecular SCAR SW12 que identifica la presencia del *QTL mayor* de resistencia al VMDAF.
- Continuar con el uso del marcador molecular SR2 del gen *bgm-1* para confirmar la resistencia en la evaluación y selección de líneas avanzadas antes de ser distribuidas en Centro América y El Caribe.

6. LITERATURA CITADA

- Alvarado P. 2009. Optimización del protocolo para el marcador molecular SR21 del gen *bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol. [tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 23 p.
- Blair MW, Rodriguez LM, Pedraza F, Morales F, Beebe S. 2007. Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 114:261-271.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Aart van Schoonhoven y Marcial A. Pastor-Corrales. Cali, Colombia. 56 p.
- Erazo EV. 2001. Uso de marcadores moleculares SCAR para la selección por resistencia múltiple a enfermedades virales en frijol común [tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 35 p.
- Guimaraes EP, Ruane J, Sonnino A, Dargie JD, 2007. Marker-assisted selection. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations 469 p.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2014. Enfermedades del Frijol en Centro América. Managua (Nicaragua): Red Sicta. 37 p.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2014. Plagas del frijol en Centro América. Managua (Nicaragua): Red Sicta. 47 p.
- López E, Becerra E, Cano O, López V. 2002. Detección de líneas y variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con Resistencia Múltiple a Enfermedades en el Trópico Húmedo de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 193-199.
- Lugo M, Ofelia Y, Guzmán R, García E, Raymundo S, León FJ. 2011. *Geminivirus* transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en tomate en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29 (2): 109-118.
- Morales F. Castaño M. Arregocés O. y Medina LM. 1988. Principales enfermedades virales del frijol en América Latina y su control. Cali (Colombia): CIAT. 36 p.

- Rosas JC. 2003. El cultivo de frijol común en América Tropical. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano (Honduras): Zamorano Academic Press. 55 p.
- Rosas JC. 2011. Contribuciones del Programa de Investigaciones en Frijol en Centro América y El Caribe. CEIBA 52(1):65-73.
- Urrea CA, Miklas PN, Beaver JS. y Riley RH. 1996. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of BGMV resistance in common bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:1035-1039.