

Selección de líneas de frijol con resistencia múltiple a enfermedades causadas por virus

**Marco David Goyzueta Altamirano
Suleyma Danila Chicas Márquez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Octubre, 2014**

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Selección de líneas de frijol con resistencia múltiple a enfermedades causadas por virus

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

Presentado por

Marco David Goyzueta Altamirano
Suleyma Danila Chicas Márquez

Zamorano, Honduras

Octubre, 2014

Selección de líneas de frijol con resistencia múltiple a enfermedades causadas por virus

Marco David Goyzueta Altamirano
Suleyma Danila Chicas Márquez

Resumen. El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los granos más importantes en Centro América y el Caribe por ser una fuente valiosa de proteína en la nutrición humana. Este cultivo es afectado por tres virus que ocasionan pérdidas considerables a los productores de frijol. El virus del mosaico común del frijol (VMCF) es una de las enfermedades más importantes transmitida por áfidos y semillas; el virus del mosaico común necrótico del frijol (VMCNF), transmitido por medio de la semilla y áfidos; y el virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF) transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de marcadores moleculares para la selección asistida con marcadores (SAM) de la resistencia múltiple a enfermedades causadas por virus, con los marcadores SCAR asociados a los genes *I*, *bc-3*, *bgm-1* y *QTL mayor*. El estudio incluyó 43 líneas avanzadas F7 de las poblaciones RRH 332, RRH 333, RRH 335 y RRH 336, provenientes de las cruzas Milenio/BelMiDak RMR12, Amadeus 77/BelMiDak RMR 12, Tío Canela 75/BelMiDak RMR 17, y Milenio/BelMiDak RMR 18, respectivamente; y 105 plantas de la población F2 AMM 1365, provenientes de la cruce de las variedades Sankara/Mantega. De las 43 líneas avanzadas F7 de las poblaciones RRH 332, 333, 335 y 336, 36 líneas mostraron presencia del marcador molecular SW13 del gen dominante *I* que confiere resistencia al VMCF; 37 líneas presentaron el marcador ENM del gen recesivo *bc-3* que confiere resistencia al VMCNF; y 38 líneas mostraron la presencia del marcador molecular SR2 del gen recesivo *bgm-1* y 41 la presencia del marcador SW12 del *QTL mayor* que confieren resistencia al VMDAF. Estos resultados facilitaron la identificación de 30 líneas avanzadas con resistencia múltiple a los virus VMCF, VMCNF y VMDAF. En la población F2 AMM 1365, 55 plantas de las 105 evaluadas presentaron el marcador SW13, y 75 plantas el marcador molecular ENM; de estas, 41 presentaron ambos genes *I* y *bc-3* de resistencia al VMCF y VMCNF. La prueba del X^2 (*Chi-cuadrado*) en la población F2 indicó el ajuste de los datos observados a los datos de la segregación esperada (resistentes: susceptibles), obteniéndose un valor significativo ($P=0.58 > 0.05$) para el marcador SW13 del gen de resistencia *I*, y ($P=0.36 > 0.05$) para el marcador ENM del gen de resistencia *bc-3*.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., selección asistida con marcadores, virus del mosaico común del frijol, virus del mosaico común necrótico del frijol, virus del mosaico dorado amarillo del frijol.

Abstract. Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is one of the most important grains in Central America and the Caribbean because it is an important source of protein in human nutrition. The bean crop is affected by three viruses which cause considerable losses to bean producers. Bean Common Mosaic Virus (BCMV) is one of the most important diseases and it's transmitted by aphids; Bean Common Necrotic Mosaic Virus (BCNMV), transmitted by seed and aphids; and Bean Golden Yellow Mosaic Virus (BGYMV) transmitted by whitefly (*Bemisia tabaci*). The objective of this study was to evaluate the use of molecular markers for marker assisted selection (MAS) of the multiple resistance to diseases caused by viruses, with markers associated with *bgm-1*, *major QTL*, *I* and *bc-3* genes. The study included 43 F7 advanced lines of populations RRH 332, RRH 333, RRH 335 and RRH 336, derived from the crosses Milenio/BelMiDak RMR12, Amadeus 77/BelMiDak RMR 12, Tío Canela 75/BelMiDak RMR 17 and Milenio/BelMiDak RMR 18, respectively; and 105 F2 plants of the population AMM 1365, derived from the cross Sankara/Mantega. From the 43 F7 advanced lines, 36 lines of populations RRH 332, 333, 335 and 336, showed the presence of the SW13 molecular marker of the *I* dominant gene which confers resistance to BCMV; and 37 showed the presence of the ENM molecular marker which confers resistance to BCNMV; and 38 lines showed the presence of the SR2 molecular marker of the *bgm-1* recessive gene, and 41 showed the presence of the SW12 molecular marker for the *major QTL*, both confer resistance to BGYMV. These results facilitated the identification of 30 advanced lines with multiple resistance to BCMV, BCNMV and BGYMV. From 105 F2 plants of the population AMM 1365, 55 plants showed the presence of the SW13 molecular marker, and 75 showed the presence of the ENM molecular marker; from these, 41 plants showed the presence to both molecular markers. The X^2 Chi-squared test in the F2 population indicated an adjustment of the observed data to the expected segregation (resistant: susceptible), obtaining a significant value ($P=0.58 > 0.05$) for the *I* resistance gene, and a significant value ($P=0.36 > 0.05$) for the *bc-3* resistance gene.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., Bean Common Mosaic Virus, Bean Common Necrotic Mosaic Virus, Bean Golden Yellow Mosaic Virus, Marker-assisted selection.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	24
5. RECOMENDACIONES.....	25
6. LITERATURA CITADA.....	26
7. ANEXOS	28

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador SR2.....	5
2. Perfil térmico para la PCR del marcador SR2.....	6
3. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador SW12.....	6
4. Perfil térmico para la PCR del marcador SW12.....	7
5. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador SW13.....	7
6. Perfil térmico para la PCR del marcador SW13.....	8
7. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador ENM.....	8
8. Perfil térmico para la PCR del marcador ENM.....	9
9. Protocolo de mezcla maestra para enzima <i>Rsal</i> [®] para amplificación de los alelos <i>elF4E</i>	9
10. Resultados de la evaluación de líneas avanzadas F7 de las poblaciones RRH 332, RRH 333, RRH 335 y RRH 336 con los marcadores moleculares SCAR que indican la presencia de los genes de resistencia al Virus del Mosaico Común del Frijol (SW13 del gen <i>I</i>) y al Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (SR2 y SW12 del gen <i>bgm-1</i> y <i>QTL mayor</i> , respectivamente).	12
11. Resultados de la evaluación de líneas avanzadas F7 de las poblaciones RRH 332, RRH 333, RRH 335 y RRH 336 con los marcadores ENM con enzima <i>Rsal</i> [®] que indican la presencia del <i>bc-3</i> y sus alelos <i>elF4E</i> de resistencia al Virus del Mosaico Común Necrótico del Frijol.....	16
12. Resultados de la evaluación de plantas F2 de la población AMM 1365 con los marcadores moleculares SCAR que indican la presencia de genes de resistencia (gen <i>I</i>) al Virus del Mosaico Común del Frijol (marcador SW13) y gen <i>bc-3</i> al Virus del Mosaico Común Necrótico del Frijol (marcador ENM).....	20
13. Análisis estadístico de <i>Chi</i> cuadrado para la presencia del gen <i>I</i> en la población F2 (Sankara/Mantega) usando el marcador SW13.	23
14. Análisis estadístico de <i>Chi</i> cuadrado para la presencia del gen <i>bc-3</i> en la población F2 AMM 1365 (Sankara/Mantega) usando el marcador ENM.	23

Figuras Página

1. Presencia del gen <i>I</i> en líneas de las poblaciones F7.	10
2. Presencia del gen <i>bgm-1</i> en líneas de las poblaciones F7.	11
3. Presencia del <i>QTL mayor</i> en líneas de las poblaciones F7.....	12
4. Presencia del gen <i>bc-3</i> en líneas de las poblaciones F7	14
5. Presencia de los alelos <i>elF4E</i> en líneas de las poblaciones F7.....	15
6. Presencia del gen <i>I</i> en plantas de la población AMM 1365	18
7. Presencia del gen <i>bc-3</i> en plantas de la población AMM 1365	19

Anexos Página

1. Protocolo para la extracción de ADN (Universidad de Wisconsin).....	28
2. Protocolo de Cuantificación de ADN con el Promega® Quantus™ Fluorometer.....	29
3. Dilución de ADN (30 ng/mL) por el método de la Universidad de Wisconsin.	30

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es cultivado principalmente por pequeños productores en regiones de América Latina, África y Asia, donde los países en vías de desarrollo son los mayores productores con aproximadamente el 77% de la producción mundial. El grano de frijol es un componente esencial en la dieta de la población rural y en algunos casos de la urbana, en los países en vías de desarrollo, donde representa la fuente principal de proteínas. El contenido proteico de este grano supera al de otros alimentos debido al mayor contenido de aminoácidos esenciales (Rosas 1998).

El virus del mosaico común del frijol (VMCF) es uno de los primeros agentes patógenos virales reportados en el mundo (CIAT 1980), causante de una de las enfermedades más serias que afectan la producción de frijol común (Johnson *et al.* 1997). Recibió prioridad en los programas de mejoramiento en los años 80, principalmente por tener una gran distribución geográfica y ocasionar altas pérdidas económicas, que llevó a la identificación de diversas fuentes de resistencia (CIAT 1985). Este virus es transmitido por un gran número de especies de áfidos resultando en la pérdida en el rendimiento de los cultivos (Mukeshimana *et al.* 2003).

Debido a que la mayoría de los cultivares de frijol en América Latina eran susceptibles a este virus, los programas de mejoramiento genético iniciaron una estrategia para incorporar el gen dominante *I*, que confiere la resistencia a este virus, en las variedades mejoradas (Erazo 2001). El marcador molecular SCAR SW13, desarrollado a partir del marcador RAPD OW13, amplifica un fragmento único a 690 pares de bases ligado al gen dominante *I* que permite la identificación consistente de plantas resistentes al VMCF (Melotto *et al.* 1996).

El virus del mosaico común necrótico del frijol (VMCNF) se originó en el este de África como resultado de una recombinación de las cepas del virus del mosaico común del frijol; y es causante de una de las enfermedades de frijol más serias en el mundo. El virus es transmitido por semilla y se propaga fácilmente mediante áfidos. Esto ocurre en regiones productoras de frijol a nivel mundial donde las variedades de frijol cultivadas son susceptibles (Mukeshimana *et al.* 2003).

El mejor control del VMCF y el VMCNF se logra a través del mejoramiento genético de cultivares resistentes. El control genético es controlado por el gen dominante *I* y seis genes recesivos *bc-u*, *bc-1*, *bc-1²*, *bc-2*, *bc-2²* y *bc-3* (Pasev *et al.* 2013). El marcador molecular ENM del tipo CAPS, amplifica un fragmento único a 541 pares de bases ligados al gen recesivo *bc-3*. Debido a una mutación en el factor de iniciación en la traducción de la proteína, las plantas que presentan la variante alélica homocigótica

(*elf4E²/elf4E²*) presente en el gen *bc-3* muestran la ausencia de síntomas comunes del VMCNF (Naderpour *et al.* 2010).

El virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF) es causante de una enfermedad que se convirtió en un factor limitante muy importante en la producción de frijol (Rosas, 1998). Desde los años 90, la incidencia del VMDAF, fue en aumento llegando a ser una enfermedad peligrosa en regiones de Centro América y el Caribe (Rosas, 1998). La característica principal de esta enfermedad consiste en el amarillamiento de las hojas infectadas, presentando en algunos casos necrosis sistémica (Morales *et al.* 1988).

Este virus VMDAF es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) que presenta hábitos alimenticios y reproductivos en varias especies de plantas que favorecen un incremento poblacional de la plaga (Rosas 2003). También es transmitido mecánicamente y por áfidos; sin embargo, no es transmitido en la semilla de frijol, dicha característica resulta en una limitante para su distribución geográfica (Morales *et al.* 1988).

La fuente de resistencia aplicada ampliamente al VMDAF es el gen recesivo *bgm-1* derivado del cultivar local Garrapato (México) que condiciona una resistencia parcial sin mosaico como respuesta al patógeno (Urrea *et al.* 1996). El marcador molecular SCAR SR2 derivado del marcador RAPD R2 amplifica dos bandas a 570 y 530 pares de bases (pb), presentando resistencia en su combinación homocigota recesiva (*bgm-1/bgm-1*) y susceptibilidad en su combinación homocigota dominante (*Bgm-1/Bgm-1*) y heterocigota (*Bgm-1/bgm-1*) lo que permite la identificación de plantas resistentes al virus (Blair *et al.* 2007).

En este estudio, la presencia de los genes de resistencia a estos tres virus se determinó mediante el uso de marcadores moleculares tipo SCAR. Para el VMCF se utilizó el SCAR SW13 del gen *I*. Para el VMCNF se utilizó el SCAR ENM del gen *bc-3*. Para el VMDAF se utilizaron los SCAR SR2 del gen *bgm1* y SW12 para el *QTL mayor*.

El presente estudio tiene como objetivos:

- Evaluar la efectividad de la selección asistida con marcadores (SAM) moleculares en la identificación de líneas con resistencia múltiple (presencia de genes *I*, *bc-3*, *QTL mayor* y *bgm-1*) a los virus del mosaico común, virus del mosaico común necrótico y virus del mosaico dorado amarillo para su uso como variedades o como progenitores en mejoramiento.
- Evaluar la resistencia a virus en líneas avanzadas F7 de las poblaciones RRH 332 (Milenio/BelMiDak RMR12), RRH 333 (Amadeus 77/BelMiDak RMR 12), RRH 335 (Tio Canela 75/ BelMiDak RMR 17) y RRH 336 (Milenio/BelMiDak RMR 18), usando marcadores SCAR, para determinar la efectividad de la SAM para la resistencia múltiple a virus del frijol en generaciones avanzadas.
- Evaluar la resistencia a virus en plantas de la población F2 AMM 1365 (Sankara/Mantega), usando marcadores SCAR, para determinar la efectividad de

la SAM en la selección por resistencia múltiple a virus del frijol en generaciones tempranas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras ubicada en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa carretera a Danlí.

Este trabajo de investigación consistió en la evaluación de la resistencia a los virus del VMCF, VMCNF y VMDAF, por medio de la selección asistida por marcadores (SAM) moleculares, en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Programa de Investigaciones de Frijol, utilizando los marcadores moleculares SW13 (gen *I*) ligado a la resistencia del VMCF; ENM (gen *bc-3*) y la enzima de restricción *Rsal*[®] (alelos *elf4E*) ligados a la resistencia al VMCNF; y SR2 (gen *bgm-1*) y SW12 (*QTL mayor*) ligados a la resistencia al VMDAF.

Líneas avanzadas F7 de poblaciones RRH. Cuarenta y tres (43) líneas avanzadas de las poblaciones RRH 332 (Milenio/BelMiDak RMR12), RRH 333 (Amadeus 77/BelMiDak RMR 12), RRH 335 (Tío Canela 75/ BelMiDak RMR 17) y RRH 336 (Milenio/BelMiDak RMR 18) fueron evaluadas con los marcadores SR2, SW12, SW13 y ENM con la enzima de restricción *Rsal*[®], con los cuales se determinó la presencia/ausencia de los genes de resistencia a los virus del VMDAF VMCF y VMCNF. Los progenitores Milenio, Amadeus 77 y Tío Canela 75 poseen los genes *I* y *bgm-1*; y BelMiDak RMR 12, RMR17 y RMR 18, poseen los genes *I* y *bc-3*.

Plantas F2 de la población AMM 1365. Ciento cinco (105) plantas F2 de la población AMM 1365 (Sankara/Mantega) fueron evaluadas con los marcadores SW13 y ENM para determinar la resistencia a los virus del VMCF y VMCNF. Los progenitores Sankara posee los genes *bgm-1*, *I* y *bc-3*, y Mantega posee el gen *I*.

La germinación de las semillas se realizó en un medio de agar: agua en platos Petri, al 20% de concentración, colocando 8 semillas de cada una de las líneas. Todos los materiales usados para la germinación fueron esterilizados previamente durante 30 minutos en el autoclave. Las semillas germinadas se trasplantaron, bajo condiciones controladas en el invernadero N° 3 del PIF, en bandejas con celdas para plántulas de 53 × 26.5 cm, usando musgo como sustrato. Después de cinco días se trasplantaron las plántulas en maceteros de 20.5 cm de altura × 13 cm de diámetro en la base, conteniendo un sustrato suelo y compost (2:1), a los cuales se les aplicó 25 gramos del fertilizante 18-46-0 al momento de la siembra. Cuando las plantas alcanzaron una altura de 10 cm fueron tutoradas usando varillas de 50 cm.

Las muestras de ADN de la población AMM 1365 provienen de una parcela de 500 plantas F2 sembradas en el Lote 24 de Zona II en parcelas de cinco surcos de 10 m de

largo, a una distancia entre surcos de 60 cm y 10 cm entre plantas. La parcela se fertilizó con 121.36 kg/ha de 18-46-0 al momento de la siembra y 60.45 kg/ha de Urea a las 4 semanas después de la siembra.

Extracción de ADN. A los 20 días después de la siembra, se tomaron muestras de los folíolos superiores para la extracción de ADN mediante el Protocolo de la Universidad de Wisconsin (Skroch *et al*, 1998) (Anexo 1).

Cuantificación de ADN. La cuantificación de ADN se realizó utilizando el Protocolo Adjunto en el Manual Operativo del Fluorómetro Quantus™ (Anexo 2).

Dilución de ADN. La dilución del ADN se realizó según el protocolo de la Universidad de Wisconsin (Anexo 3) para llegar a una concentración final de 30 ng/mL.

Amplificación del gen *bgm-1*. La amplificación se realizó por el método de la “Polymerase Chain Reaction” (PCR). Para la reacción se utilizaron los marcadores moleculares SR2-F y SR2-R (10 ng/μL), buffer 5X Green Go Taq®, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP’s) (4 μM) con cloruro de magnesio, enzima Go Taq® Flexi DNA polymerase, agua destilada y esterilizada y ADN de las líneas seleccionadas (30 ng/mL).

La secuencia de los marcadores que se utilizaron para la amplificación del gen *bgm-1* fueron:

SR2-R (5’ CAC AGC TGC CCT AAC AAA AT 3’)

SR2-F (5’ CAC AGC TGC CAC AGG TGG GA 3’) (Blair *et al*. 2007).

El marcador SR2 indica la presencia del gen *bgm-1* resistente al VMDF. Posee un tamaño de 530/570 pares de bases (pb) por lo que es co-dominante, y expresa resistencia en 530 pb (homocigota recesivo *bgm-1/bg-1*), susceptibilidad en 570 pb (homocigota dominante *Bgm-1/Bmg-1*) y cuando en las dos bandas están presentes (heterocigota *Bgm-1/bg-1*) (Alvarado 2009).

Se usaron los siguientes protocolos de mezcla y térmicos para la amplificación del gen *bgm-1*:

Cuadro 1. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador SR2.

Reactivos	Cantidad (μL)
ddH ₂ O	9.4
PCR Buffer	2.0
dNTP’s + MgCl ₂	0.7
Primer SR2 (F)	0.3
Primer SR2 (R)	0.3
Taq (Enzima)	0.3
ADN	2.0
Total	15.0

Fuente: Alvarado (2009).

Cuadro 2. Perfil térmico para la PCR del marcador SR2.

Fase	Temp. °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	30 s
Desnaturalización	94	1 min
Acoplamiento	60	1 min
Extensión	72	3 min
Extensión final	72	5 min
Ciclos		36

Fuente: Alvarado (2009).

Amplificación del *QTL mayor*. La amplificación se realizó por el método de la PCR. Para la reacción se utilizaron los marcadores moleculares SW12-F y SW12-R (10 ng/μL), buffer 5X Green Go Taq[®], desoxinucleotidos trifosfatos (dNTP's) (4 μM) con cloruro de magnesio, enzima Go Taq[®] Flexi DNA polymerase, agua destilada y esterilizada y ADN de las líneas seleccionadas (30 ng/mL).

La secuencia de los marcadores que se utilizaron para la amplificación del *QTL mayor* fueron:

SW12-R (5' TGG GCA GAA GCA CAG TAT GAT TTG 3')

SW12-F (5' TGG GCA GAA GTT CTA GCA TGT GGC 3') (Singh *et al.* 1996).

El marcador SW12 indica la presencia del *QTL mayor* que controla la resistencia al VMDAF aumentando la eficiencia del gen *bgm-1*. Posee un tamaño de 700 pares de bases (pb) y expresa presencia del *QTL mayor* en 700 pb. Este marcador es usado como complemento del marcador SR2 ya que por sí solo no proveerá la protección adecuada contra el VMDAF severo (Singh *et al.* 1996).

Se usaron los siguientes protocolos de mezcla y térmicos para la amplificación del *QTL mayor*:

Cuadro 3. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador SW12.

Reactivos	Cantidad (μL)
ddH ₂ O	9.4
PCR Buffer	2.0
dNTP's + MgCl ₂	0.7
Primer SW12 (F)	0.3
Primer SW12 (R)	0.3
Taq (enzima)	0.3
ADN	2.0
Total	15.0

Fuente: Singh *et al.* (2000).

Cuadro 4. Perfil térmico para la PCR del marcador SW12.

Fase	Temp. °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	1 min
Desnaturalización	94	30 s
Acoplamiento	70	30 s
Extensión	72	1 min
Extensión final	72	15 min
Ciclos		31

Fuente: Singh *et al.* (2000).

Amplificación del gen *I*. La amplificación se realizó por el método de la PCR. Para la reacción se utilizaron los marcadores moleculares SW13-F y SW13-R (10 ng/μL), buffer 5X Green Go Taq[®], desoxinucleotidos trifosfatos (dNTP's) (4 μM), cloruro de magnesio (MgCl₂) (10 mM/μL), enzima Go Taq[®] Flexi DNA polymerase, agua destilada y esterilizada y ADN de las líneas seleccionadas (30 ng/mL).

La secuencia de los marcadores que se utilizaron para la amplificación del gen *I* fueron:

SW13-R (5' CAC AGC GAC AGG AGG AGC TTA TTA 3')

SW13-F (5' CAC AGC GAC ATT AAAT TTT CCT TTC 3') (Melotto *et al.* 1996).

El marcador molecular SW13 indica la presencia del gen *I* en los genotipos homocigota dominante o heterocigota (*II* o *Ii*) en 690 pb confiriendo la resistencia al VMCF, y no muestra la presencia de la banda del gen homocigota recesivo (*ii*) (Erazo 2001).

Se usaron los siguientes protocolos de mezcla y térmicos para la amplificación del gen *I*:

Cuadro 5. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador SW13.

Reactivos	Cantidad (μL)
ddH ₂ O	12.0
PCR Buffer	3.0
MgCl ₂	1.5
dNTP's	2.0
Primer W13-7XP	2.5
Primer W13-4RP	2.5
GoTaq	0.5
ADN	1.0
Total	25.0

Fuente: Erazo (2001).

Cuadro 6. Perfil térmico para la PCR del marcador SW13.

Fase	Temp. °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	10 s
Desnaturalización	94	10 s
Acoplamiento	67	40 s
Extensión	72	2 min
Extensión final	72	5 min
Ciclos	34	

Fuente: Erazo (2001).

Amplificación del gen *bc-3* y sus alelos *elF4E*. La amplificación se realizó por el método de la PCR. Para la reacción se utilizaron los marcadores moleculares ENM-F y ENM-R (10 ng/μL), buffer 5X Green Go Taq[®], desoxinucleotidos trifosfatos (dNTP's) (4 μM), cloruro de magnesio (MgCl₂) (10 mM/μL), enzima Go Taq[®] Flexi DNA polymerase, agua destilada y esterilizada y ADN de las líneas seleccionadas (30 ng/mL).

La secuencia de los marcadores que se utilizaron para la amplificación del *bc-3* y sus alelos *elF4E* fueron:

ENM-R (5' CAA CCA ACT GGT ATC GGA 3')

ENM-F (5' ACC GAT GAC CCA AAC CCT 3') (Narderpour *et al.* 2010).

El gen *bc-3* tiene un peso de 541 pb. La combinación alélica homocigota resistente al VMCNF (*elF4E²/elF4E²*) presenta bandas de 381 y 160 pb. La combinación alélica homocigota susceptible (*elF4E¹/elF4E¹*) presenta bandas de 541 y 160 pb, y el heterocigota susceptible (*elF4E¹/elF4E²*) presenta bandas de 541, 381 y 160 pb (Montejo y Pantigoso 2013).

Se usaron los siguientes protocolos de mezcla y térmicos para la amplificación del gen *bc-3*:

Cuadro 7. Reactivos para la mezcla maestra de PCR para el marcador ENM.

Reactivos	Cantidad (μL)
ddH ₂ O	12.1
PCR Buffer	3.0
MgCl ₂	1.5
dNTP's	2.0
Primer ENM-F	2.5
Primer ENM-R	2.5
GoTaq	0.4
ADN	1.0
Total	25.0

Fuente: Montejo y Pantigoso (2013).

Cuadro 8. Perfil térmico para la PCR del marcador ENM.

Fase	Temp. °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	95.0	3 min
Desnaturalización	94.0	20 s
Acoplamiento	61.6	25 s
Extensión	72.0	40 s
Extensión final	72.0	5 min
Ciclos	40	

Fuente: Montejo y Pantigoso (2013).

Luego de haber identificado las líneas que presentan el gen *bc-3* se mezcló el producto del PCR con la enzima de restricción *Rsal*[®] para la separación de los alelos *elF4E* siguiendo el siguiente protocolo:

Cuadro 9. Protocolo de mezcla maestra para enzima *Rsal*[®] para amplificación de los alelos *elF4E*.

Reactivos	Cantidad (μL)
ddH ₂ O	7.3
Buffer 10X	2.0
BSA	0.2
Enzima (10 μ/μL)	0.5
Producto PCR	10.0
Total	20.0

Fuente: Montejo y Pantigoso (2013).

Controles positivos. Se usaron como controles positivos las variedades DOR 364 que presenta el *QTL mayor* y el gen *bgm-1*, Tío Canela 75 que presenta los genes *I* y *bgm-1*, y Raven que presenta el gen *bc-3* y los alelos *elF4E*.

Visualización del ADN. Se cargó el ADN en un gel de agarosa a 1.2% en solución tampón TE 0.5X en los pozos electroforéticos. Las bandas fueron separadas a 110 voltios durante 1 h 15 min, luego se tiñó el gel en una solución 1:10 de bromuro de etidio, para eliminar excesos de bromuro de etidio se sumergió el gel en agua durante 15 minutos. Se visualizaron las bandas de ADN en el transluminador Bench Top, se fotografiaron los geles bajo luz ultravioleta donde se identificaron cada una de las bandas y se confirmó la presencia o ausencia del gen de interés.

Análisis Estadístico. Se utilizó la prueba de ajuste de X^2 (Chi-cuadrado) para determinar la concordancia entre los valores esperados y los observados de la población F2 AMM1365 con una probabilidad ≤ 0.05 para los genes de resistencia *I* y *bc-3*.

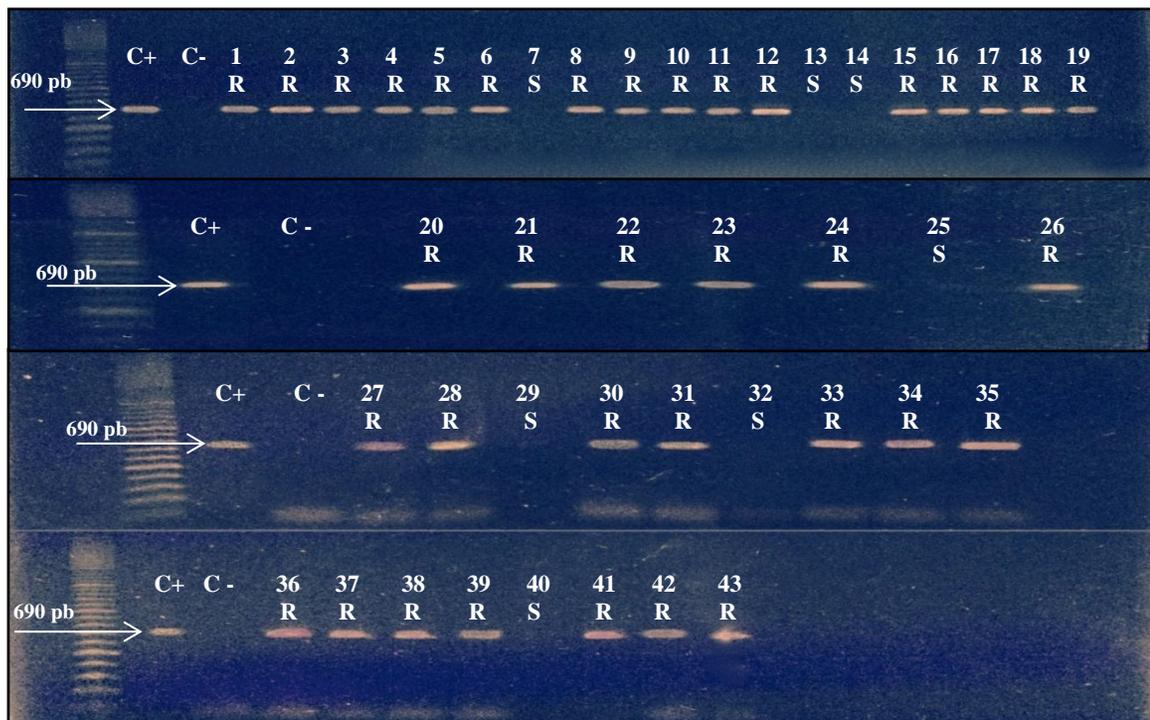
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de líneas avanzadas F7 de poblaciones RRH

Resistencia al virus del mosaico común del frijol. De las 43 líneas avanzadas F7 de las cuatro poblaciones RRH evaluadas con el marcador SCAR SW13, 36 líneas amplificaron la banda a 690 pb que indica la presencia del gen dominante *I* (Figura 1) que confiere resistencia al VMCF (Cuadro 10).

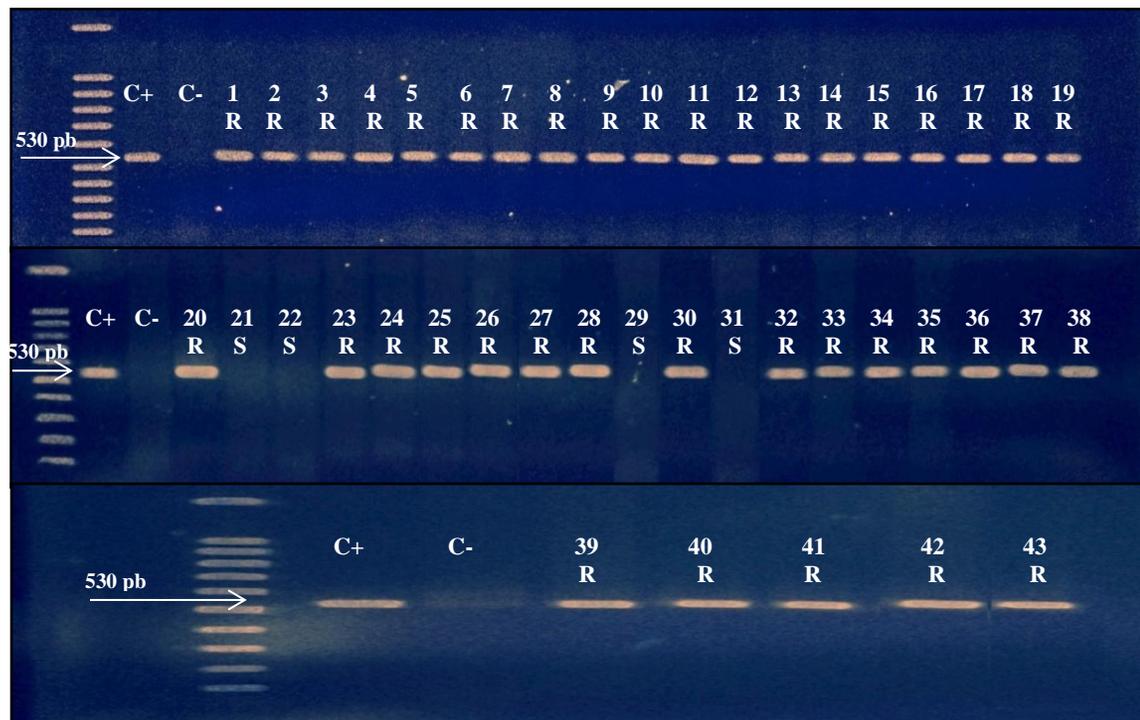
Las seis líneas de la población RRH 332 mostraron la presencia de la banda a 690 pb que indica la presencia del marcador del gen de resistencia *I*. En la población RRH 333, cinco de las seis líneas presentaron el marcador del gen de resistencia *I*. La línea RRH 333-8 no presentó el marcador. En la población RRH 335, ninguna de las dos líneas presentó el marcador del gen de resistencia *I*. En la población RRH 336 conformada por 29 líneas F7, solamente cuatro (RRH 336 -28, -49, -57 y -86) no presentaron el marcador del gen *I*.

Figura 1. Presencia del gen *I* en líneas de las poblaciones F7.



Resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol. De las 43 líneas avanzadas F7 de cuatro poblaciones RRH evaluadas con el marcador SCAR SR2 del gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF, 14 líneas de las poblaciones RRH 332, RRH 333 y RRH 335 amplificaron la banda polimórfica a 530 pb que indica la presencia del gen recesivo *bgm-1* (Figura 2). En la población RRH 336, solamente cuatro líneas (RRH 336 -16, -18 -50 y -57) no presentaron el marcador. (Cuadro 10).

Figura 2. Presencia del gen *bgm-1* en líneas de las poblaciones F7.

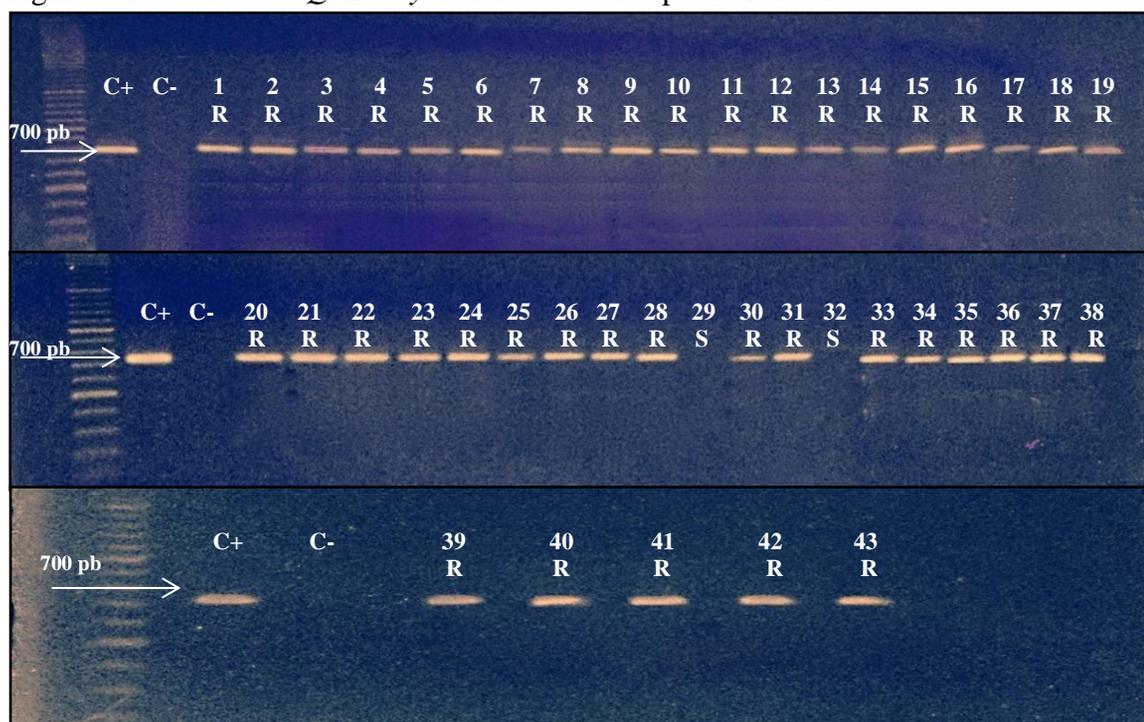


Por otro lado en la evaluación con el marcador SCAR SW12, 41 líneas amplificaron la banda a 700 pb que indica la presencia del *QTL mayor* (Figura 3) que confiere resistencia al VMDAF (Cuadro 10).

Todas las líneas de las poblaciones RRH 332, RRH 333 y RRH 335 presentaron el marcador del *QTL mayor*. En la población RRH 336 solo las líneas RRH 336-49 y RRH 336-57 presentaron ausencia de la banda del marcador del *QTL mayor*.

Un total de 38 líneas F7 presentaron las combinaciones deseadas de resistencia al VMDAF, es decir la presencia de los marcadores del gen *bgm-1* y del *QTL mayor*.

Figura 3. Presencia del *QTL mayor* en líneas de las poblaciones F7.



Cuadro 10. Resultados de la evaluación de líneas avanzadas F7 de las poblaciones RRH 332, RRH 333, RRH 335 y RRH 336 con los marcadores moleculares SCAR que indican la presencia de los genes de resistencia al Virus del Mosaico Común del Frijol (SW13 del gen *I*) y al Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (SR2 y SW12 del gen *bgm-1* y *QTL mayor*, respectivamente).

N°	Línea	Marcador (gen de resistencia)		
		SW13 (<i>I/I</i> o <i>I/i</i>)	SR2 (<i>bgm-1</i>)	SW12 (<i>QTL mayor</i>)
1	RRH 332-10	+	+	+
2	RRH 332-19	+	+	+
3	RRH 332-76	+	+	+
4	RRH 332-77	+	+	+
5	RRH 332-92	+	+	+
6	RRH 332-100	+	+	+
7	RRH 333-8	-	+	+
8	RRH 333-12	+	+	+
9	RRH 333-83	+	+	+
10	RRH 333-127	+	+	+
11	RRH 333-130	+	+	+
12	RRH 333-136	+	+	+
13	RRH 335-12	-	+	+

14	RRH 335-23	-	+	+
15	RRH 336-4	+	+	+
16	RRH 336-5	+	+	+
17	RRH 336-8	+	+	+
18	RRH 336-11	+	+	+
19	RRH 336-12	+	+	+
20	RRH 336-15	+	+	+
21	RRH 336-16	+	-	+
22	RRH 336-18	+	-	+
23	RRH 336-21	+	+	+
24	RRH 336-22	+	+	+
25	RRH 336-24	-	+	+
26	RRH 336-28	+	+	+
27	RRH 336-37	+	+	+
28	RRH 336-40	+	+	+
29	RRH 336-49	-	+	-
30	RRH 336-50	+	-	+
31	RRH 336-56	+	+	+
32	RRH 336-57	-	-	-
33	RRH 336-61	+	+	+
34	RRH 336-63	+	+	+
35	RRH 336-67	+	+	+
36	RRH 336-70	+	+	+
37	RRH 336-76	+	+	+
38	RRH 336-77	+	+	+
39	RRH 336-78	+	+	+
40	RRH 336-86	-	+	+
41	RRH 336-87	+	+	+
42	RRH 336-89	+	+	+
43	RRH 336-91	+	+	+
Total Resistentes		36	39	41
Total Susceptibles		7	4	2
Total		43	43	43

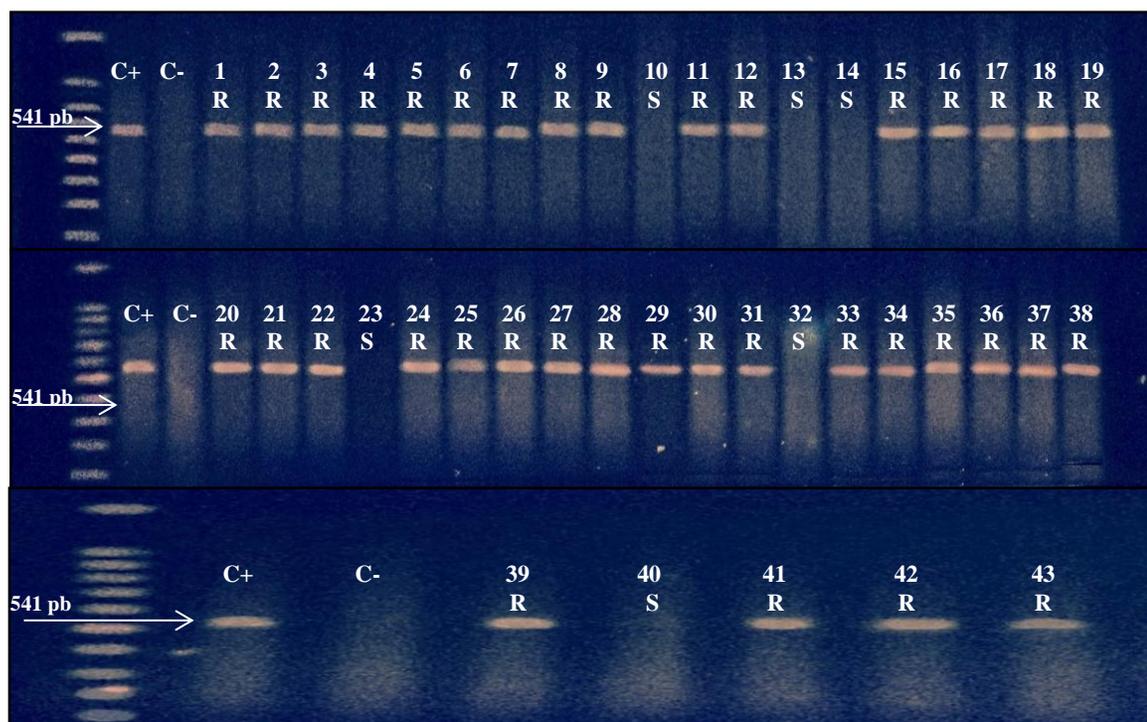
+ Presencia de banda de 530 pb con el marcador SR2, lo que indica el genotipo resistente homocigota recesivo (*bgm-1/bg m-1*); presencia de banda de 700 pb del marcador SW12 para la presencia del *QTL mayor*; y presencia de la banda de 690 pb del marcador SW13 de genotipo homocigota dominante (*I/I*) o heterocigota (*I/i*).

- Ausencia de banda 530 pb, indica ausencia del marcador SR2 en plantas de genotipos susceptibles homocigotas dominante (*Bgm-1/Bgm-1*) y heterocigota (*Bgm-1/bg m-1*); ausencia del marcador SW12 del *QTL mayor*; ausencia del marcador SW13 en plantas susceptibles de genotipo homocigota recesivo (*i/i*).

Resistencia al virus del mosaico común necrótico del frijol. De las 43 líneas avanzadas F7 de las cuatro poblaciones RRH evaluadas con el marcador SCAR ENM, 37 plantas amplificaron la banda a 541 pb que indica la presencia del gen recesivo *bc-3* (Figura 4) que confiere resistencia al VMCNF (Cuadro 11).

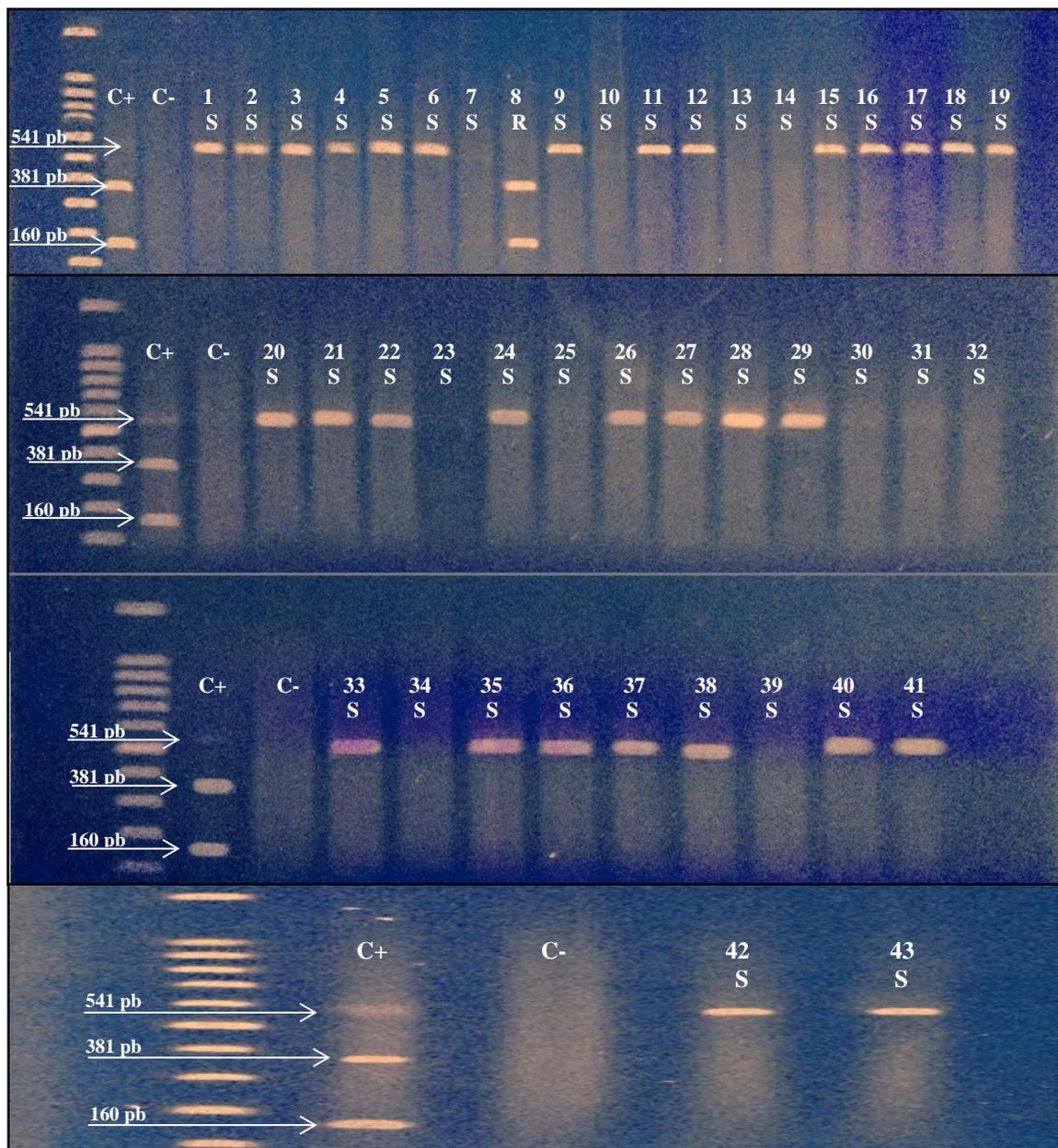
Las seis líneas de la población RRH 332 mostraron la presencia de la banda a 541 pb que indica la presencia del marcador del gen de resistencia *bc-3*. En la población RRH 333 cinco de las seis líneas presentaron el marcador del gen de resistencia *bc-3*. La línea RRH 333 -127 no presentó el marcador. En la población RRH 335, ninguna de las líneas presentó el marcador del gen de resistencia *bc-3*. En la población RRH 336 conformada por 29 líneas F7, solamente tres (RRH 336 – 21, 57 y 78) no presentaron el marcador del gen *bc-3*.

Figura 4. Presencia del gen *bc-3* en líneas de las poblaciones F7



Por otro lado, cuando se evaluaron las 43 líneas con el marcador SCAR ENM y la enzima *RsaI*[®], solo la línea RRH 333 -12 amplificó las bandas de 381 y 160 pb que indican la presencia de los alelos *elF4E* en su combinación homocigota recesiva *elF4E*²/*elF4E*² (Figura 5) que confiere resistencia al VMCNF (Cuadro 11).

Figura 5. Presencia de los alelos *elf4E* en líneas de las poblaciones F7



Cuadro 11. Resultados de la evaluación de líneas avanzadas F7 de las poblaciones RRH 332, RRH 333, RRH 335 y RRH 336 con los marcadores ENM con enzima *Rsal*[®] que indican la presencia del *bc-3* y sus alelos *elF4E* de resistencia al Virus del Mosaico Común Necrótico del Frijol.

N°	Línea	Marcador (gen y alelos de resistencia)			
		ENM (<i>bc-3</i>)	ENM + <i>Rsal</i> [®] (<i>elF4E</i> ² / <i>elF4E</i> ²)	ENM + <i>Rsal</i> [®] (<i>elF4E</i> ¹ / <i>elF4E</i> ²)	ENM + <i>Rsal</i> [®] (<i>elF4E</i> ¹ / <i>elF4E</i> ¹)
1	RRH 332-10	+	-	-	-
2	RRH 332-19	+	-	-	-
3	RRH 332-76	+	-	-	-
4	RRH 332-77	+	-	-	-
5	RRH 332-92	+	-	-	-
6	RRH 332-100	+	-	-	-
7	RRH 333-8	+	-	-	-
8	RRH 333-12	+	+	-	-
9	RRH 333-83	+	-	-	-
10	RRH 333-127	-	-	-	-
11	RRH 333-130	+	-	-	-
12	RRH 333-136	+	-	-	-
13	RRH 335-12	-	-	-	-
14	RRH 335-23	-	-	-	-
15	RRH 336-4	+	-	-	-
16	RRH 336-5	+	-	-	-
17	RRH 336-8	+	-	-	-
18	RRH 336-11	+	-	-	-
19	RRH 336-12	+	-	-	-
20	RRH 336-15	+	-	-	-
21	RRH 336-16	+	-	-	-
22	RRH 336-18	+	-	-	-
23	RRH 336-21	-	-	-	-
24	RRH 336-22	+	-	-	-
25	RRH 336-24	+	-	-	-
26	RRH 336-28	+	-	-	-
27	RRH 336-37	+	-	-	-
28	RRH 336-40	+	-	-	-
29	RRH 336-49	+	-	-	-
30	RRH 336-50	+	-	-	-
31	RRH 336-56	+	-	-	-
32	RRH 336-57	-	-	-	-
33	RRH 336-61	+	-	-	-

34 RRH 336-63	+	-	-	-
35 RRH 336-67	+	-	-	-
36 RRH 336-70	+	-	-	-
37 RRH 336-76	+	-	-	-
38 RRH 336-77	+	-	-	-
39 RRH 336-78	-	-	-	-
40 RRH 336-86	+	-	-	-
41 RRH 336-87	+	-	-	-
42 RRH 336-89	+	-	-	-
43 RRH 336-91	+	-	-	-
Total Resistentes	37	1	0	0
Total Susceptibles	6	42	43	43
Total	43	43	43	43

+ Presencia de banda de 541 pb del marcador ENM indica el genotipo homocigota recesivo (*bc-3/bc-3*), y las bandas de 381 y 160 pb con el marcador ENM+*Rsal*[®] indica la combinación alélica homocigota resistente (*elf4E*²/*elf4E*²) del gen *bc-3*.

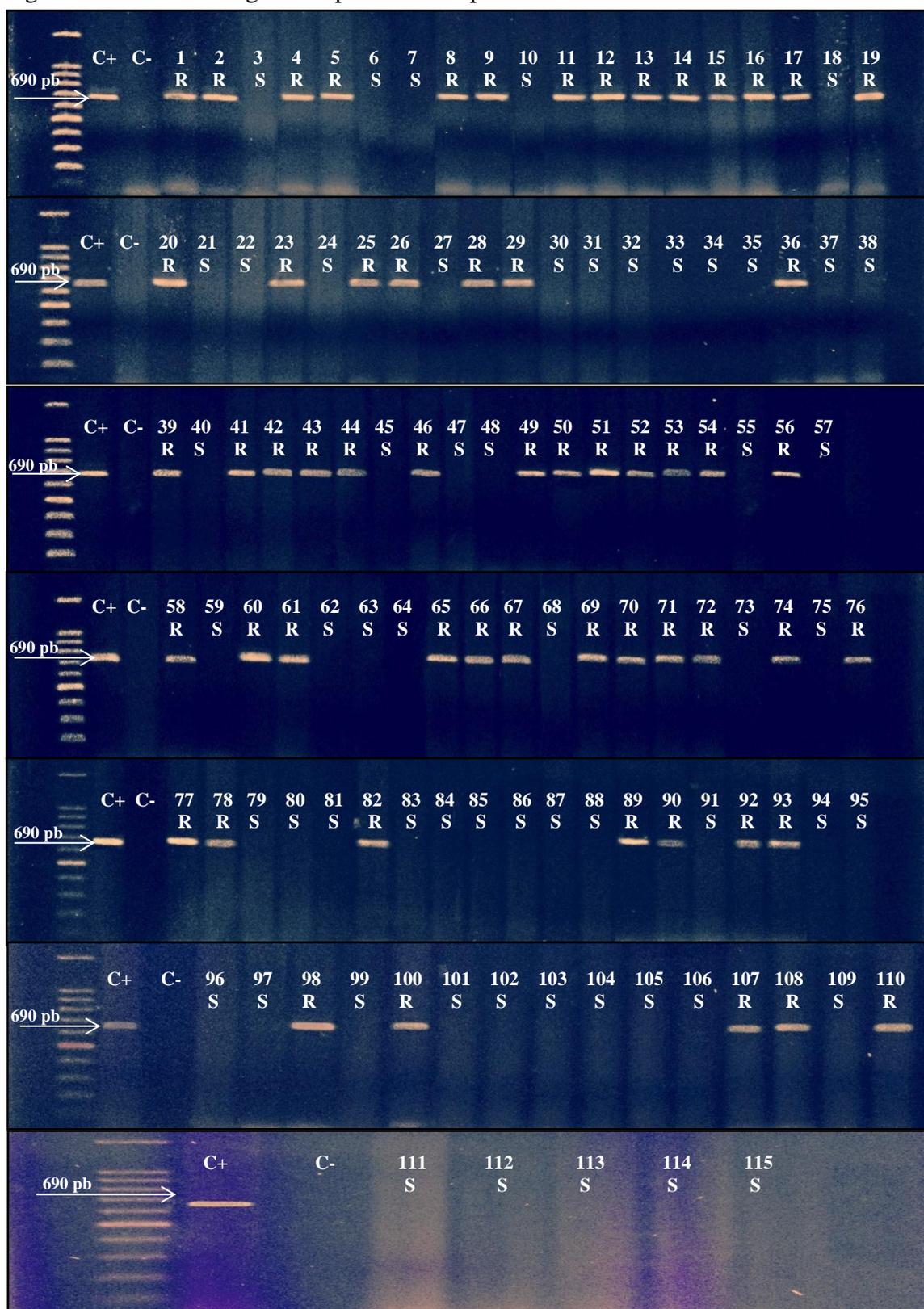
- Ausencia de banda de 541 pb indica ausencia del marcador ENM en plantas susceptibles homocigotas dominantes (*Bc-3/Bc-3*) y heterocigotas (*bc-3/bc-3*) y del marcador ENM + *Rsal*[®] indicando combinaciones alélicas homocigota susceptibles (*elf4E*¹/*elf4E*¹) y heterocigota susceptible (*elf4E*¹/*elf4E*²) de los alelos *elf4E*.

Resistencia múltiple a virus del frijol en las poblaciones RRH. De las 43 líneas F7 evaluadas de las poblaciones RRH 332, 333, 335 y 336 con los marcadores moleculares SW13, ENM, SR2 y SW12, se encontró que 36 presentaban el gen *I* que confiere resistencia al VMCF, 37 líneas presentaron el gen *bc-3* de resistencia al VMCNF, y 38 líneas presentaron resistencia al VMDAF debido a la presencia del *bgm-1* y el *QTL mayor*. Finalmente 30 líneas presentaron la combinación de la resistencia a los tres virus, por lo tanto estas pueden ser utilizadas en Centroamérica y el Caribe como potenciales variedades o progenitores de mejoramiento.

Evaluación de plantas F2 de la población AMM 1365.

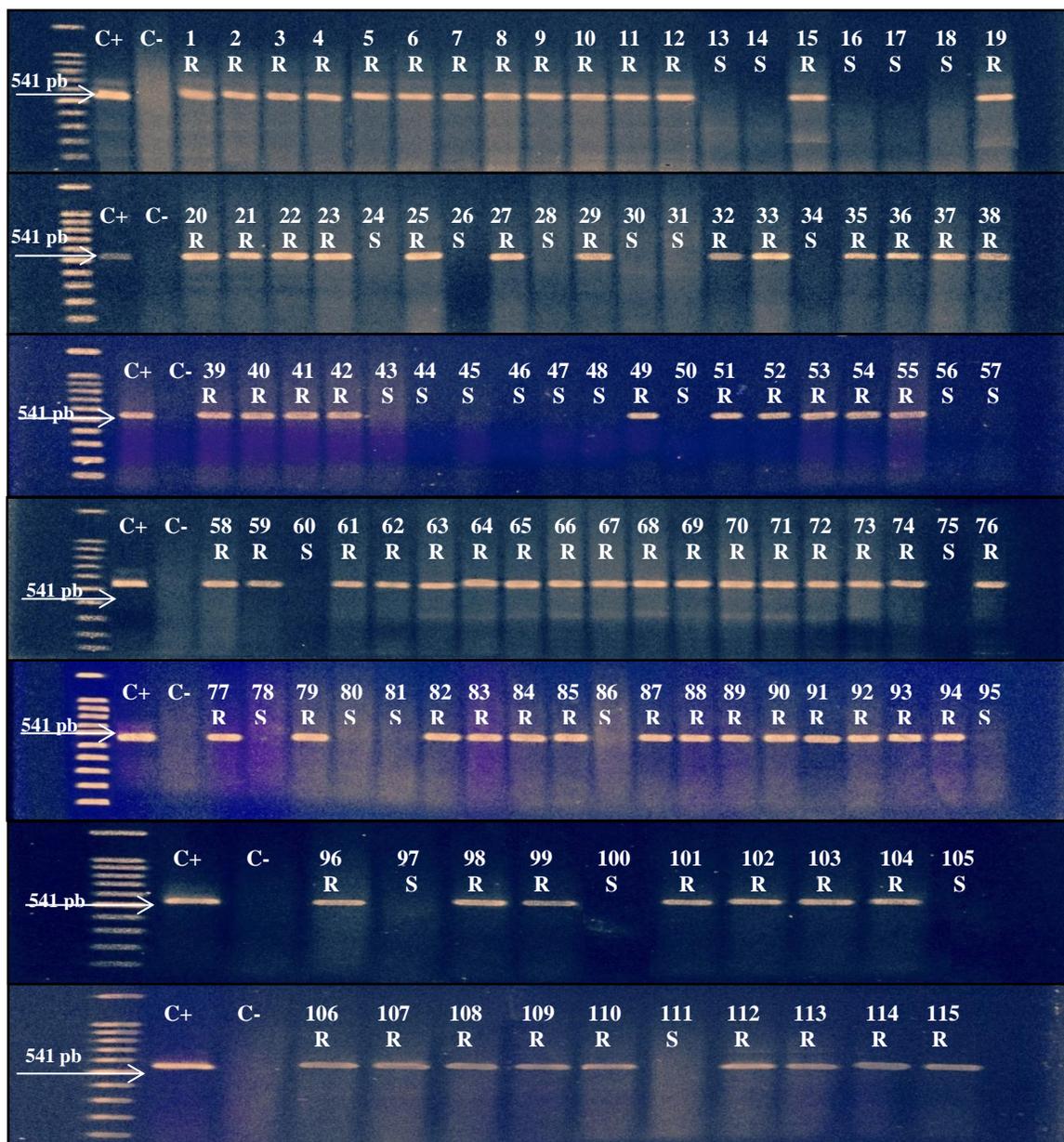
Resistencia al virus del mosaico común del frijol. De 105 plantas F2 de la población AMM 1365 derivada de la cruce Sankara/Mantega evaluadas con el marcador SCAR SW13, 55 plantas amplificaron la banda a 690 pb lo que indica la presencia del gen dominante *I* (Figura 6) que confiere resistencia al VMCF (Cuadro 12). También se evaluaron cinco plantas de cada uno de los padres (Sankara y Mantega). Sankara presentó el marcador SW13 del gen *I* de resistencia al VMCF en tres plantas, sugiriendo segregación para el gen *I*. El progenitor Mantega no presentó el marcador en ninguna de las plantas evaluadas, indicando presencia del genotipo homocigota recesivo *i/i*.

Figura 6. Presencia del gen *I* en plantas de la población AMM 1365



Resistencia al virus del mosaico común necrótico del frijol. De 105 plantas F2 de la población AMM 1365 derivada de la Sankara/Mantega evaluadas con el marcador SCAR ENM, 75 plantas amplificaron una banda a 541 pb lo cual indicó la presencia del gen recesivo *bc-3* (Figura 7) que confiere resistencia al VMCNF (Cuadro 12). También se evaluaron cinco plantas de cada uno de los padres (Sankara y Mantega). Sankara presentó el marcador ENM del gen de resistencia *bc-3* al VMCNF en todas las plantas y Mantega presentó el marcador ENM del gen de resistencia *bc-3* en cuatro plantas, por lo que se asume que esta variedad criolla está todavía segregando por este gen.

Figura 7. Presencia del gen *bc-3* en plantas de la población AMM 1365



Cuadro 12. Resultados de la evaluación de plantas F2 de la población AMM 1365 con los marcadores moleculares SCAR que indican la presencia de genes de resistencia (gen *I*) al Virus del Mosaico Común del Frijol (marcador SW13) y gen *bc-3* al Virus del Mosaico Común Necrótico del Frijol (marcador ENM)

Planta	Marcador (gen de interés)		
	SW13 (<i>I/I</i> o <i>I/i</i>)	ENM (<i>bc-3</i>)	Presencia de ambos marcadores
AMM 1365 - 1	+	+	✓
AMM 1365 - 2	+	+	✓
AMM 1365 - 3	-	+	
AMM 1365 - 4	+	+	✓
AMM 1365 - 5	+	+	✓
AMM 1365 - 6	-	+	
AMM 1365 - 7	-	+	
AMM 1365 - 8	+	+	✓
AMM 1365 - 9	+	+	✓
AMM 1365 - 10	-	+	
AMM 1365 - 11	+	+	✓
AMM 1365 - 12	+	+	✓
AMM 1365 - 13	+	-	
AMM 1365 - 14	+	-	
AMM 1365 - 15	+	+	✓
AMM 1365 - 16	+	-	
AMM 1365 - 17	+	-	
AMM 1365 - 18	-	-	
AMM 1365 - 19	+	+	✓
AMM 1365 - 20	+	+	✓
AMM 1365 - 21	-	+	
AMM 1365 - 22	-	+	
AMM 1365 - 23	+	+	✓
AMM 1365 - 24	-	-	
AMM 1365 - 25	+	+	✓
AMM 1365 - 26	+	-	
AMM 1365 - 27	-	+	
AMM 1365 - 28	+	-	
AMM 1365 - 29	+	+	✓
AMM 1365 - 30	-	-	
AMM 1365 - 31	-	-	
AMM 1365 - 32	-	+	
AMM 1365 - 33	-	+	
AMM 1365 - 34	-	-	

AMM 1365 - 35	-	+	
AMM 1365 - 36	+	+	✓
AMM 1365 - 37	-	+	
AMM 1365 - 38	-	+	
AMM 1365 - 39	+	+	✓
AMM 1365 - 40	-	+	
AMM 1365 - 41	+	+	✓
AMM 1365 - 42	+	+	✓
AMM 1365 - 43	+	-	
AMM 1365 - 44	+	-	
AMM 1365 - 45	-	-	
AMM 1365 - 46	+	-	
AMM 1365 - 47	-	-	
AMM 1365 - 48	-	-	
AMM 1365 - 49	+	+	✓
AMM 1365 - 50	+	-	
AMM 1365 - 51	+	+	✓
AMM 1365 - 52	+	+	✓
AMM 1365 - 53	+	+	✓
AMM 1365 - 54	+	+	✓
AMM 1365 - 55	-	+	
AMM 1365 - 56	+	-	
AMM 1365 - 57	-	-	
AMM 1365 - 58	+	+	✓
AMM 1365 - 59	-	+	
AMM 1365 - 60	+	-	
AMM 1365 - 61	+	+	✓
AMM 1365 - 62	-	+	
AMM 1365 - 63	-	+	
AMM 1365 - 64	-	+	
AMM 1365 - 65	+	+	✓
AMM 1365 - 66	+	+	✓
AMM 1365 - 67	+	+	✓
AMM 1365 - 68	-	+	
AMM 1365 - 69	+	+	✓
AMM 1365 - 70	+	+	✓
AMM 1365 - 71	+	+	✓
AMM 1365 - 72	+	+	✓
AMM 1365 - 73	-	+	
AMM 1365 - 74	+	+	✓
AMM 1365 - 75	-	-	

AMM 1365 - 76	+	+	✓
AMM 1365 - 77	+	+	✓
AMM 1365 - 78	+	-	
AMM 1365 - 79	-	+	
AMM 1365 - 80	-	-	
AMM 1365 - 81	-	-	
AMM 1365 - 82	+	+	✓
AMM 1365 - 83	-	+	
AMM 1365 - 84	-	+	
AMM 1365 - 85	-	+	
AMM 1365 - 86	-	-	
AMM 1365 - 87	-	+	
AMM 1365 - 88	-	+	
AMM 1365 - 89	+	+	✓
AMM 1365 - 90	+	+	✓
AMM 1365 - 91	-	+	
AMM 1365 - 92	+	+	✓
AMM 1365 - 93	+	+	✓
AMM 1365 - 94	-	+	
AMM 1365 - 95	-	-	
AMM 1365 - 96	-	+	
AMM 1365 - 97	-	-	
AMM 1365 - 98	+	+	✓
AMM 1365 - 99	-	+	
AMM 1365 - 100	+	-	
AMM 1365 - 101	-	+	
AMM 1365 - 102	-	+	
AMM 1365 - 103	-	+	
AMM 1365 - 104	-	+	
AMM 1365 - 105	-	-	
Total Resistentes	55	75	41
Total Susceptibles	50	30	64
Total	105	105	105

+ Presencia de banda de 541 pb con marcador ENM indica el genotipo homocigota recesivo (*bc-3/bc-3*); la presencia de banda de 690 pb con el marcador SW13 indica la combinación homocigota dominante (*I/I*) o heterocigota (*I/i*).

- Ausencia de banda de 541 pb indica ausencia del marcador ENM en plantas susceptibles homocigotas dominantes (*Bc-3/Bc-3*) y heterocigotas (*Bc-3/bc-3*); y ausencia del marcador SW13 en plantas homocigotas recesivos (*i/i*) susceptibles.

✓ Plantas que presentan ambos marcadores (ENM y SW13) de resistencia.

El análisis *Chi* cuadrado (X^2) de los resultados con el marcador SW13 del gen *I*, fueron $\chi^2 = 0.0346$ con un valor de probabilidad $P = 0.58$ (> 0.05), para grados de libertad = 1 (Cuadro 13). De acuerdo a los resultados de este análisis, se acepta la hipótesis nula (H_0) para la segregación resistente: susceptible de la población AMM 1365 debido a que los valores observados se ajustan estadísticamente a los esperados para el gen dominante *I* de resistencia al VMCF.

Cuadro 13. Análisis estadístico de *Chi* cuadrado para la presencia del gen *I* en la población F2 (Sankara/Mantega) usando el marcador SW13.

Genotipo	Observado	Esperado	O-E	(O-E) ² /E
Resistentes	55	58	-3	0.155
Susceptibles	50	47	3	0.191
Total	105	105	0	$X^2 = 0.346$

Valor $P = 0.58 > 0.05$ ($X^2 = 2.48$, 1 GL)

Para los resultados de la presencia del gen *bc-3* con el marcador ENM en plantas F2 de la población AMM 1365, el análisis de *Chi* Cuadrado indica un valor de $\chi^2 = 0.817$, con un valor de probabilidad $P = 0.360$ (> 0.05) para grados libertad = 1. Por lo tanto, se acepta la H_0 de la segregación susceptible: resistente, debido a que los valores observados se ajustan estadísticamente a los esperados para el gen recesivo *bc-3*.

Cuadro 14. Análisis estadístico de *Chi* cuadrado para la presencia del gen *bc-3* en la población F2 AMM 1365 (Sankara/Mantega) usando el marcador ENM.

Genotipo	Observado	Esperado	O-E	(O-E) ² /E
Resistentes	75	79	-4	0.202
Susceptibles	30	26	4	0.615
Total	105	105	0	$X^2 = 0.817$

Valor $P = 0.36 > 0.05$ ($X^2 = 0.817$, 1 GL).

Resistencia múltiple a VMCF y VMCNF. De las 105 plantas evaluadas de la población AMM 1365, se encontró que 55 plantas presentaron el gen de resistencia *I* que confiere resistencia al VMCF, y 75 plantas que presentaron el gen *bc-3*. De estas 105 plantas, 41 presentaron la combinación de los dos genes (*I* y *bc-3*) que confieren la resistencia al VMCF y al VMCNF. Hay que tener en cuenta que todavía falta analizar las plantas que presentan el gen *bc-3* con el marcador ENM + enzima *Rsal*[®] para determinar las combinaciones alélicas *elF4E*, y la selección de las plantas homocigotas *elF4E*²/*elF4E*² que son las que expresan la resistencia del gen *bc-3* al VMCNF (Naderpour *et al.* 2010). Otra alternativa de continuar la selección por este gen, es enviar semillas F3 de las plantas seleccionadas por el gen *bc-3* para la prueba con la cepa necrótica NL3 del VMCNF a Puerto Rico.

4. CONCLUSIONES

- La selección asistida con marcadores (SAM) moleculares fue efectiva en identificar líneas avanzadas F7 de las poblaciones RRH, resistentes a cada uno de los tres virus; así como líneas que combinan los genes de resistencia a dos y a tres virus. Estas líneas con resistencia múltiple pueden ser validadas para su liberación como variedades o ser utilizadas como progenitores en el mejoramiento genético del frijol común para Centro América, El Caribe y África.
- La utilización de marcadores moleculares en la población F2 AMM 1365 fue efectiva en facilitar la caracterización en generaciones tempranas de una población por la presencia de recombinantes potenciales para la resistencia múltiple a enfermedades causadas por virus del frijol. Esto permitiría el avance de un grupo de familias seleccionadas con mayor potencial para la generación de líneas resistentes a virus.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar la SAM para la selección por resistencia múltiple a virus del frijol de manera complementaria a la selección fenotípica por reacción a los virus que causan las enfermedades del virus del mosaico común, mosaico común necrótico y mosaico dorado amarillo bajo campo e invernadero, teniendo en cuenta factores que inciden en la efectividad de las técnicas para la selección.
- Validar el comportamiento agronómico y características comerciales y de consumo de las líneas avanzadas F7 con resistencia múltiple a virus del frijol para su uso potencial como variedades o como progenitores en mejoramiento genético.
- Continuar el avance por selección en campo e invernadero de las plantas F2 seleccionadas por resistencia múltiple a virus del frijol, para el potencial desarrollo de líneas mejoradas útiles en programas de mejoramiento y para la validación comercial.

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 Ing. Agr. Valle del Yeguaré, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 23 p.

Aranda, L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común. Tesis Ing. Agr. Valle del Yeguaré, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 24 p.

Blair, M.W., L.M. Rodríguez, F. Pedraza, F. Morales y S. Beebe. 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.). Theoretical and Applied Genetics 114(2): 261 – 271.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1980. Bean production problems: Disease, insect, soil and climatic constraints of *Phaseolus vulgaris*. Eds. H.F. Schwartz; G.E. Gálvez. Cali, Colombia, 424 p.

CIAT. 1985. Frijol: Investigación y producción. Eds. M. López; F. Fernández; A. van Schoonhoven. s.n.t. 417 p.

Erazo, E. 2001. Uso de marcadores moleculares SCAR para la selección por resistencia múltiple a enfermedades virales en frijol común. Tesis Ing. Agr. Valle del Yeguaré, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 54 p.

Johnson, W.C., P. Guzmán, D. Mandala, A.B.C. Mkandawire, S. Temple, R.L. Gilbertson y P. Gepts. 1997. Cell biology and molecular genetics: Molecular tagging of *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. Crop Science 37:248-254.

Melotto, M., L. Afanador y J.D. Kelly. 1996. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. Genome 39:1216-1219.

Montejo, L.M y H.A. Pantigoso. 2013. Optimización del protocolo para el marcador molecular de los alelos *elF4E* del gen *bc-3* de resistencia al virus del mosaico común necrótico en frijol. Tesis Ing. Agr. Valle del Yeguaré, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 20 p.

Morales, F., M. Castaño., O. Arregocés, y L.M. Medina. 1988. Principales enfermedades virales del frijol en América Latina y su control. Cali, Colombia. 36 p.

Mukeshimana, G., L.P. Hart y J.D. Kelly. 2003. Bean Common Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus. Michigan State University Extension. 2 p.

Narderpour, M., O.S. Lund, R. Larsen y E. Johansen. 2010. Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated *elF4E* allele. *Molecular Plant Pathology* 11(2):255-263.

Pasev, G., D. Kostrova y S. Sofkova. 2013. Identification of genes for Resistance to Bean Common Mosaic Virus and Common Mosaic Necrosis Virus in Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding lines using conventional and molecular methods. *Journal of Phytopathology*. 7 p.

Rosas, J.C. 1998. El Cultivo del Frijol Común en América Tropical. Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press. 52 p.

Rosas, J.C. 2003. Recomendaciones para el Manejo Agronómico del Cultivo del Frijol. Programa de Investigaciones en Frijol. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Imprenta LitoCom, Tegucigalpa, Honduras. 33p.

Singh, S.P., F.J. Morales, P.N. Miklas y H. Terán. 2000. Selection for Bean Golden Mosaic Resistance in Intra- and Interracial Bean Populations. *Crop Science* 40(6):1565-1672.

Skroch, P.W., J. Nienhuis, S. Beebe, J. Tohne y F. Pedraza. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. *Crop Sci.* 38 (2): 488-496.

Urrea, C.A., P.N. Miklas, J.S. Beaver, y R.H. Hiley. 1996. A Codominant Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker Useful for Indirect Selection of Bean Golden Mosaic Virus Resistance in Common Bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121(6):1035-1039.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN (Universidad de Wisconsin).

1. Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes).
2. Agregar 50 μ L del buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga Eppendorf de 1.5 mL.
3. Lo más pronto posible (antes de 1 hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 min.
4. Centrifugar la muestra durante 10 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejido (pellet).
5. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
6. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletizar los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una micro centrífuga.
7. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300 μ l de RNAasa A (concentración de 100 μ g/mL) + buffer TEa 0.1X (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.
8. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por 1 min (3 min si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de micro centrífuga de 1.5 mL.
10. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol: acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
11. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletizar. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
12. Vaciar el etanol/acetato de sodio y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
13. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.
14. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).
15. Rehidratar los pellets agregando 100-200 μ l de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos en baño maría a 65 °C durante 15 minutos.

16. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN (ng/mL), con el fin de preparar las diluciones necesarias para efectuar las reacciones para su amplificación.

a Buffer TE (TRIS HCl 1 M, pH= 7.5; EDTA 0.5 M; pH=8.0

b Usar acetato de sodio 3H₂O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

Anexo 2. Protocolo de Cuantificación de ADN con el Promega® Quantus™ Fluorometer.

1. Prepare la solución de trabajo teniendo en cuenta que se necesitan 100 µL de solución por cada muestra, por motivos de error se sugiere añadir 4 muestras al total de muestras. La solución de trabajo estará compuesta por buffer TE 1X y el tinte Quantilfluor® Dye.

La cantidad de tinte Quantilfluor® Dye a utilizar estará dada por la siguiente fórmula, y la cantidad de buffer TE 1X estará dada por la diferencia del total de solución de trabajo y la cantidad de tinte a utilizar:

$$(x \mu\text{L de solución de trabajo} \times 17 \mu\text{L de Tinte})/3400$$

*Donde x es la cantidad total de la solución de trabajo.

2. Prepare el buffer TE 1X teniendo en cuenta que para cada muestra a analizar se necesitará 100 µL de buffer TE 1X y 99µL de solución de trabajo. La cantidad total de buffer TE 1X estará dada por la suma de la cantidad de buffer total para las muestras y la cantidad de buffer TE 1X a utilizar para preparar la solución de trabajo. El buffer TE 1X será preparado a partir de Buffer TE 20X y agua Libre de Nucleasa. La cantidad de Buffer TE 20X estará determinada por

$$(x \mu\text{L} \times 200 \mu\text{L}) / 4000 \mu\text{L}$$

*Donde x es la cantidad total de buffer TE 20X a utilizar

3. Para realizar la cuantificación mezclar en microtubos de 500 µL: 99 µL de Solución de trabajo, 100 µL de buffer TE 1X y 1 µL de ADN.
4. Para introducir el volumen de la muestra, presione los botones arriba o abajo hasta encontrar el volumen deseado. Seleccione de 1-10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 o 200µl.
5. Para seleccionar las unidades de concentración que se mostraran en los datos, presione el botón de arriba o abajo. Seleccione entre ng/µl, ng/ml, µg/ml, mg/ml o automático.
Nota: si automático esta seleccionado el aparato asignará unidades automáticamente para colocar la concentración en un rango de 1.0 a 1000.0.
6. Cuando las unidades deseadas estén resaltadas presione “enter”.

7. Coloque las muestras dentro del soporte para tubos y cierre la tapa. El aparato medirá automáticamente la fluorescencia cuando la tapa esté cerrada, y la concentración calculada de ácidos nucleicos será mostrada en la pantalla.

Anexo 3. Dilución de ADN (30 ng/mL) por el método de la Universidad de Wisconsin.

1. Agregar 100 μ L de *buffer* TE 0.1 X + Tartrazine en tubos eppendorf de 1.5 mL.
2. Agregar el volumen inicial de la muestra de ADN extraído de tejido, estimado mediante la fórmula $V_i = C_f \cdot V_f / C_i$
3. Diluir las muestras en platos de 96 celdas con fondo redondeado (Microplate TM96, Polypropylene, MJ Research, INC.). Cubrir las celdas del plato con tapa selladora, y almacenarlo en el congelador (o refrigerador si se va a usar en los siguientes días). Guardar el resto de ADN en el congelador.