

Uso de marcadores moleculares SCAR para la selección por resistencia múltiple a enfermedades virales en frijol común

Elisa Verónica Erazo Villegas

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Noviembre de 2001

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Uso de marcadores moleculares SCAR para
la selección por resistencia múltiple a
enfermedades virales en frijol común**

Tesis presentada como requisito parcial
para optar al título de Ingeniero Agrónomo
en el Grado Académico de Licenciatura

presentado por
Elisa Verónica Erazo Villegas

Zamorano, Honduras
Noviembre de 2001

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Elisa Verónica Erazo Villegas

Zamorano, Honduras

Noviembre de 2001

Uso de marcadores moleculares SCAR para la selección por resistencia múltiple a enfermedades virales en frijol común

Presentado por

Elisa Verónica Erazo Villegas

Aprobada:

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor Principal

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.
Coordinador, Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Aracely Castro, M. Sc.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D.
Decano

Pablo Emilio Paz, Ph. D.
Coordinador PIA – Fitotecnia/CCPA

Keith L. Andrews, Ph. D.
Director General

Alfredo Rueda, Ph. D.
Coordinador Área Temática/CCPA

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres Rosario y Victor, por confiar en mi.

A mis hermanas Gabriela y Geovanna por su apoyo.

A Peter por estar siempre conmigo y a mi bebe, mis dos apoyos.

A todas las personas que han estado a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por confiar en mi y darme su apoyo y comprensión en todo momento.

A Peter Larrea, por estar siempre a mi lado.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por su apoyo y confianza en la realización de este proyecto.

A la Ing. Aracely Castro por su tiempo y comprensión en la realización de este trabajo.

A la Ing. Luwbia Aranda, por su amistad, tiempo, dedicación y ayuda en todo momento.

A Felipe, Luis Ernesto, Carolina, Cristina, Beatriz, Fernando, Ana, Zully, Birgit, Cecy y todas las personas que me apoyaron.

A Byron y Deisy por su amistad.

A Tomasa , Luz y Roger por su amistad y colaboración en el trabajo.

A la familia Paz y a la familia Agudelo por su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

Al Programa Bean/Cowpea CRSP (Donación USAID No. DAN-1310-G-SS-6008-00) por el financiamiento para la realización del estudio a través del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de Zamorano.

Al Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador por el apoyo financiero para realizar mis estudios de Agrónomo.

RESUMEN

Erazo V., Elisa V. 2001. Uso de marcadores moleculares SCAR para la selección por resistencia múltiple a enfermedades virales en frijol común. Proyecto Especial, Programa de Ingeniería Agronómica, Zamorano, Honduras.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es susceptible a múltiples enfermedades virales de las regiones tropicales, las principales son el mosaico común (VMCF) y el mosaico dorado amarillo (VMDAF). En los últimos años, la estrategia seguida en los programas de mejoramiento de este cultivo ha sido proveer resistencia mediante la introducción de los genes *I* y *bgm-1*. Posteriormente a la confirmación del gen *I* asociado a la susceptibilidad al virus del mosaico severo (VMSF) ha sido necesario reorientar el reemplazo del gen *I* por la forma recesiva (*ii*) y la incorporación del gen *bc-3*. La investigación consistió en la detección de estos genes a través de la selección asistida por marcadores (SAM) mediante técnicas moleculares. El estudio incluyó 160 plantas F2 (poblaciones MPS501 y MPS502) provenientes de la cruce de la variedad criolla Rojo de Seda con las líneas mejoradas UPR9901-77 y UPR9825-49-4, usadas como fuentes de los genes *ii*, *bc-3* y *bgm-1*; y en 67 líneas F6 (poblaciones BHC y BC3) del VVIDAC - 2001, no evaluadas en campo por estos virus. El método de análisis de ADN para el gen *bgm-1* fue el usado en el laboratorio de Biología Molecular; mientras que para el VMCF fue necesario adaptar los protocolos recomendados. La presencia de bandas para los genes *bc-3* y *bgm-1*, y la ausencia de banda del gen *I*, fueron las variables evaluadas usando la prueba de X^2 de Pearson para su ajuste a la segregación esperada. Todas las plantas F2 resultaron susceptibles, según el marcador, al VMDAF, probablemente por la ruptura del ligamiento genético en la cruce o por que no se produjeron recombinantes deseados, por lo que se recomienda conducir estudios complementarios. Se encontraron 103 plantas resistentes al VMCF (~65%) usando el gen *bc-3*, concluyéndose que Rojo de Seda posee el gen de forma heterocigota. De forma indirecta, se comprobó que ninguna planta es susceptible al VMSF, por no tener el gen *I* debido a su ausencia en los padres. Las líneas F6 presentaron segregación múltiple; en la población BCH se encontraron dos líneas (BCH 9901-3 y BCH9901-60) segregando por los tres genes en estudio y 12 líneas por dos; en la población BC3 se encontraron 15 líneas segregando por dos genes. Se concluye que el uso de marcadores moleculares es efectivo para la selección genotípica en generaciones tempranas y avanzadas; y que el material mejorado distribuido a nivel regional tiene el potencial de resistencia a múltiples enfermedades virales.

Palabras claves: Bandas, detección, gen, segregación, susceptible.

NOTA DE PRENSA

Variedades de frijol resistentes a mosaico para Centroamérica

En las últimas variedades probadas en el vivero de adaptación centroamericano del año 2001, a ser distribuidas en Centroamérica, se han encontrado varias líneas que presentan resistencia a múltiples enfermedades virales que muestran como característica común la presencia de mosaico.

Las variedades BCH9901-3 y BCH9901-60, de generaciones avanzadas (F6), presentan esta resistencia múltiple, comprobado mediante técnicas moleculares realizadas en el laboratorio de Biotecnología de Zamorano. Se probó que contienen genes que dan resistencia a dos virus importantes de la región, el mosaico dorado amarillo y el mosaico común, y no presentan susceptibilidad al mosaico severo.

Estos virus han recibido gran atención en los programas de mejoramiento genético de la región debido a que producen reducción en la producción y las variedades locales son muy susceptibles a las mismas. Sin embargo, en los últimos años, se ha presentado una brote de mosaico severo, que ataca gran parte de la producción de México, Guatemala, El Salvador y Honduras, y que presenta un problema para los programas de mejoramiento debido a que su presencia está condicionada al gen de resistencia *I* incluido en todas las variedades mejoradas desde los años 80, por lo que la estrategia empleada para evitarlo ha sido el remover este gen de las mismas mediante métodos de cruce.

Las técnicas moleculares (estudio del ADN de las plantas) utilizadas en Zamorano envuelven la selección asistida por marcadores o SAM, tanto en generaciones tempranas de cruce como avanzadas. La SAM fue probada también en plantas de segunda generación (F2), de la cruce de Rojo de Seda, una variedad criolla de El Salvador y dos variedades mejoras que presentaban la resistencia a las enfermedades antes descritas. Esto se realizó con el fin de producir una variedad de Rojo de Seda con resistencia a cualquiera de los mosaicos mencionados.

Lamentablemente en esta generación no se pudo encontrar plantas que presentaran las tres resistencias porque uno de los genes (*bgm-1*) que brinda la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol, no se presentó en el estudio de laboratorio.

Debiendo probar las plantas descendientes de éstas en Comayagua, una zona de alta presencia del virus, para conocer su reacción a la enfermedad. Sin embargo más del 60% de las plantas evaluadas si son resistentes al mosaico común y no son susceptibles al mosaico severo, lográndose un gran avance en cuanto al mejoramiento de esta variedad.

Lic. Sobeyda Alvarez

CONTENIDO

	Portada	i
	Autoría	ii
	Página de firmas	iii
	Dedicatoria	iv
	Agradecimiento	v
	Agradecimiento a patrocinadores	vi
	Resumen	vii
	Nota de Prensa	viii
	Contenido	x
	Índice de Cuadros	xiii
	Índice de Figuras	xiv
	Índice de Anexos	xv
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	OBJETIVOS	2
1.1.1	Objetivos Generales	2
1.1.2	Objetivos Específicos	2
2	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1	IMPORTANCIA DEL CULTIVO	4
2.2	PRINCIPALES ENFERMEDADES VIRALES QUE AFECTAN AL FRIJOL COMÚN	5
2.2.1	Virus del Mosaico Común del Frijol	5
2.2.1.1	Generalidades	5
2.2.1.2	Etiología y transmisión	6
2.2.1.3	Sintomatología	6
2.2.1.4	Control	7
2.2.1.4.1	Control Cultural	7
2.2.1.4.2	Control Genético	7
2.2.1.4.3	Control Químico de Vectores	7
2.2.2	Virus del Mosaico Común del Frijol	8
2.2.2.1	Generalidades.....	8
2.2.2.2	Etiología y transmisión	8
2.2.2.3	Sintomatología	8
2.2.2.4	Control	8
2.2.2.4.1	Control Cultural	8
2.2.2.4.2	Control Genético	9
2.2.2.4.3	Control Químico de Vectores	9
2.2.3	Virus del Mosaico Severo del Frijol.....	9

2.2.3.1	Generalidades.....	9
2.2.3.2	Etiología y transmisión	10
2.2.3.3	Sintomatología	10
2.2.3.4	Control	11
2.2.3.4.1	Control Cultural	11
2.2.3.4.2	Control Genético	11
2.2.3.4.3	Control Químico de Vectores	11
2.3	MARCADORES MOLECULARES DE ADN	12
2.3.1	Marcadores Moleculares tipo SCAR	13
2.3.2	Utilización de marcadores moleculares en el mejoramiento de frijol	14
2.3.2.1	Resistencia al Virus del Mosaico Común del Frijol: genes <i>I</i> y <i>bc-3</i>	14
2.3.2.2	Resistencia al Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol: gen <i>bgm-1</i>	15
3	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1	UBICACIÓN DEL ESTUDIO	16
3.2	CARACTERIZACIÓN DEL GERMOPLASMA	16
3.2.1	Plantas F2	16
3.2.2	Líneas F6	17
3.2.3	Testigos	17
3.2.4	Muestreo de ADN	17
3.3	PROTOCOLOS USADOS EN EL LABORATORIO	17
3.3.1	Adaptación de protocolos en la fase de amplificación de ADN ..	18
3.4	EVALUACIÓN	18
3.4.1	Extracción de ADN	18
3.4.2	Cuantificación y amplificación de ADN.....	18
3.5	VARIABLES ANALIZADAS	19
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1	ADAPTACION DE PROTOCOLOS PARA EL VIRUS DEL MOSAICO COMÚN DEL FRIJOL	21
4.1.1	Extracción de ADN	21
4.1.2	Cuantificación y dilución de ADN	22
4.1.3	Amplificación de ADN mediante PCR	22
4.1.4	Electroforesis	22
4.2	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS PADRES DE LAS CRUZAS	23
4.2.1	Padres de plantas F2	23
4.3	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS F2 Y DE LÍNEAS F6 DE FRIJOL	24
4.3.1	Evaluación genotípica y fenotípica-molecular de plantas F2	24
4.3.1.1	Virus del Mosaico Dorado Amarillo de Frijol	24
4.3.1.2	Virus del Mosaico Común del Frijol	25
4.3.1.3	Virus del Mosaico Severo del Frijol	27

4.3.1.4	Reacción de plantas F2 por resistencia múltiple a enfermedades virales	27
4.3.2	Líneas F6: evaluación genotípica y fenotípica-molecular.....	28
4.3.2.1	Reacción al VMDAF, VMCF y VMSF de líneas F6 de la población BCH	28
4.3.2.2	Reacción al VMDAF, VMCF y VMSF de líneas F6 de la población BC3	29
5	CONCLUSIONES	31
6	RECOMENDACIONES	32
7	BIBLIOGRAFÍA	33
8	ANEXOS	35

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Marcadores moleculares SCAR usados en la evaluación de la resistencia a enfermedades virales del frijol común	19
2.	Segregación fenotípica de plantas F2 de las poblaciones MPS501 y MPS502 por resistencia al VMCF, según su evaluación con el marcador molecular SCAR ROC11.....	26
3.	Líneas F6 de la población BCH seleccionadas por resistencia a tres enfermedades virales mediante determinación con marcadores moleculares	29
4.	Líneas F6 de la población BC3 que presentan resistencia múltiple a enfermedades virales mediante determinación con marcadores moleculares.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura

1. Genealogía de plantas F2 de las poblaciones MPS501 y MPS502 23
2. Bandas del gen *bgm-1* en gel de electroforesis 24
3. Modelo esperado de segregación mendeliana del gen *bgm-1* en plantas F2..... 25
4. Expresión de la banda del gen recesivo *bc-3* de Jalo EEP558 (420 pb) en la electroforesis 25
5. Bandas del gen *I* presentes en plantas de la variedad Tío Canela-75 en gel de electroforesis..... 27

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Programa de Cruzas, Poblaciones y líneas- 1999/2000	37
2.	Extracción de ADN para el análisis de RAPDs (Método de la UW-Madison)	38
3.	Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Hofer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant TM 200)	40
	Método de dilución de ADN (a 20 ng/μl).....	41
4.	Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores tipo SCAR	43
5.	Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR para el gen <i>bgm-1</i> (Método de la Universidad de Puerto Rico).....	44
6.	Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR para el gen <i>bc-3</i>	45
7.	Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR para el gen <i>I</i>	46
9.	Electroforesis para la amplificación de ADN	47
10.	Resultados de evaluación de plantas F2 usando marcadores moleculares SCAR para la resistencia a VMCF, VMDAF y VMSF.....	48
11.	Resultados de evaluación en de líneas F6 de población BCH.....	52
12.	Resultados de evaluación en de líneas F6 de población BC3.....	53

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un alimento básico en la mayoría de países de América Latina, constituyendo una de las fuentes más importantes de proteína para sus pobladores, especialmente los de bajos recursos económicos. En América tropical y subtropical la producción de este cultivo es de más de cuatro millones de toneladas al año, y el consumo *per cápita* varía entre 10 y 20 kg (Morales, 2000a).

El frijol común es susceptible a varias enfermedades producidas por virus. En Centroamérica, el cultivo es muy afectado por encontrarse en una zona propicia para el desarrollo de plagas, incluyendo los virus y sus agentes vectores (Morales, 1999a). Las principales enfermedades virales que afectan al cultivo son el mosaico común (VMCF) y el mosaico dorado amarillo (VMDAF), los que están extensamente diseminadas en la región centroamericana y de El Caribe.

El VMCF ha sido la enfermedad viral de mayor prioridad en los programas de mejoramiento genético de frijol en América Tropical, ya que es la de mayor distribución geográfica y causa una disminución del rendimiento de hasta el 80%, según la susceptibilidad de la variedad, el estado de desarrollo del cultivo y las condiciones ambientales al momento de la infección (Castro *et al.*, 2001). El VMDAF también afecta significativamente la producción de frijol común, convirtiéndose en la última década en una gran limitante para su cultivo en zonas bajas e intermedias de las regiones tropicales y subtropicales de América (Rosas, 1998).

En los últimos 20 años, la resistencia al VMCF se ha basado en la incorporación mediante mejoramiento genético tradicional, de un gen dominante denominado *I*. Sin embargo, en los últimos años se ha determinado que la presencia de este gen está ligada a la susceptibilidad a otra enfermedad virótica, el virus del mosaico severo del frijol (VMSF). Se ha reportado que las plantas que presentan el gen *I* en su forma homocigota o heterocigota, existente en las primeras variedades mejoradas para resistencia al VMCF, son susceptibles al VMSF, aunque la homocigocidad incrementa la severidad del mismo (Morales y Cardona, s.f.). En la actualidad se conoce que la resistencia al VMCF también puede ser conferida por el gen recesivo *bc3*, que no está ligado a la susceptibilidad al VMSF. Considerando lo anterior, la nueva estrategia adoptada para el control de estos patógenos consiste en la introducción del gen *bc3* y la remoción del gen *I*, mediante el reemplazo por su forma homocigota recesiva (*ii*).

En el caso del VMDAF, el gen más efectivo vinculado a la resistencia del cultivo es el recesivo *bgm-1*, el cual está siendo utilizado por los programas de mejoramiento en la generación de nuevas variedades para Centroamérica y El Caribe.

El mejoramiento tradicional de los cultivos, realizado con base en su comportamiento fenotípico, es un trabajo relativamente efectivo pero que requiere muchos recursos, esfuerzo y tiempo. En los cultivos a ser mejorados, la selección de plantas se realiza escogiendo las que presentan características específicas deseadas. Sin embargo, la selección es complicada porque las características genéticas son influenciadas por factores externos o ambientales, por lo que durante el proceso de selección se requiere la presencia de las condiciones bióticas y abióticas específicas para efectuar una selección confiable.

El uso de marcadores moleculares de ADN en el proceso de selección, o Selección Asistida por Marcadores (SAM), representa un avance relevante en el mejoramiento genético de plantas; sin embargo, y pese a sus ventajas, su aplicación hasta la actualidad ha sido muy limitada. La SAM es una herramienta de mejoramiento complementaria a la selección tradicional, pues generalmente sólo se utiliza para la detección de genes individuales para caracteres específicos. Ha tomado mucha importancia en la última década, debido a que facilita el avance generacional de sólo el material genético que presente las características deseadas, permitiendo concentrar la identificación de las plantas con genotipo superior.

En Zamorano ya se ha empezado a emplear el marcador ligado a la resistencia al VMDAF. Sin embargo, para la selección por resistencia múltiple a virus se requiere la adaptación de protocolos de marcadores ligados a otros genes para poder desarrollar estrategias que permitan el manejo de la resistencia al VMCF y eviten la susceptibilidad al VMSF.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Determinar la utilidad potencial del uso de marcadores moleculares tipo SCAR en la aplicación de selección asistida con marcadores (SAM) para el mejoramiento por resistencia genética a los virus del mosaico común, mosaico dorado amarillo y mosaico severo del frijol.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Implementar protocolos para la aplicación de SAM de dos genes de resistencia al virus del mosaico común.
2. Identificar plantas que combinen resistencias a los virus del mosaico común, mosaico dorado amarillo y mosaico severo del frijol, mediante la SAM en poblaciones tempranas (F2).

3. Validar la aplicación de la SAM en la identificación de líneas avanzadas (F6) con resistencia múltiple a los virus del mosaico común, mosaico dorado amarillo y mosaico severo del frijol.
4. Estimar el valor potencial del germoplasma de mejoramiento distribuido en la región, con respecto a las resistencias a los virus del mosaico común y del mosaico dorado amarillo, y al manejo de la susceptibilidad al mosaico severo del frijol.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA DEL CULTIVO

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo originario de América Latina. El grano seco es un alimento básico en la dieta por su importante aporte de proteínas (15–35%) y calorías (340 cal./100 g), especialmente para la población de bajos recursos de esta región. En América tropical y subtropical se producen más de cuatro millones de toneladas al año, con un consumo *per capita* de 10 a 20 kg (Morales, 2000a), por ser incluido hasta tres veces en la alimentación diaria.

Brasil es el mayor productor de frijol en América Latina, cultivando hasta cinco millones de hectáreas, seguido por México con dos millones de hectáreas. En América Central se cultivan aproximadamente 500,000 hectáreas de frijol, lo que con relación al área geográfica representa una de las mayores densidades de siembra del cultivo en América Latina. El frijol es también un alimento básico en El Caribe, donde se cultiva un cuarto de millón de hectáreas.

En Honduras el frijol común es parte fundamental de la dieta diaria, ocupando el segundo lugar después del maíz tanto en superficie sembrada como en producción. Se estima que el 75% de su cultivo está en manos de agricultores de pequeña escala (Morales, 2000a). Para el año 2000, el área sembrada con frijol en el país fue de 79,512 ha, en las que se obtuvo una producción de 56,155 TM para un rendimiento promedio de 706 kg/ha (10.9 qq/mz). Debido a la baja productividad del cultivo, el país importó este grano (2.08 TM) para satisfacer un consumo *per capita* de 9.63 kg (INE, 2001).

A pesar del área destinada a la siembra de frijol en Centroamérica, la producción no satisface la demanda interna de la región debido a la baja productividad del cultivo, cuyo promedio fluctúa entre 500 y 700 kg/ha. Estos bajos rendimientos con relación a su potencial de producción están asociados a diversos factores como la falta de asistencia técnica y crediticia, marginalidad de las áreas de producción, bajo uso de insumos, problemas fitosanitarios y fluctuaciones de mercado (Morales, 2000a). Entre los factores mencionados, la incidencia de plagas que afectan severamente a las variedades susceptibles, principalmente a las criollas ampliamente utilizadas en el país, junto con la falta de capacidad técnica y económica para su adecuado manejo, resultan en un complejo que reduce significativamente la producción y productividad de cultivo.

2.2 PRINCIPALES ENFERMEDADES VIRALES QUE AFECTAN AL FRIJOL COMÚN

Según Morales (1999), los virus del mosaico común (VMCF), mosaico dorado amarillo (VMDAF) y mosaico severo (VMSF) del frijol, siguen siendo el objetivo principal de las actividades de selección y mejoramiento que realiza el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), principalmente para América Latina y El Caribe. El Programa de Investigaciones en Frijol (PIF/Zamorano) y otros programas de mejoramiento de esta región también enfatizan en la generación de variedades con resistencia múltiple a estas enfermedades. Estos virus a menudo se presentan simultáneamente como mezcla de infecciones, reduciendo significativamente el rendimiento del frijol de manera complementaria o sinérgica.

El VMCF está presente en todas las zonas productoras de frijol, mientras que el VMSF afecta su producción en México, Guatemala, El Salvador y Honduras. El VMDAF, transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), es una enfermedad devastadora en las tierras bajas y en los valles de altitud media de México, América Central y El Caribe. En general, los genotipos de frijol desarrollados por los programas regionales de mejoramiento en colaboración con los programas nacionales de Centro América, deben incorporar resistencia al VMCF y al VMDAF. La resistencia al primero ha sido tradicionalmente de tipo monogénica y dominante, mediante la incorporación de un gen que también es responsable de la reacción de hipersensibilidad ante cepas necróticas del VMCF (gen *I*). Sin embargo, esta estrategia debe modificarse para las zonas afectadas por el VMSF, por la interacción que se presenta entre este virus y el gen indicado. Además, se ha reportado que el gen dominante de la necrosis presenta problemas de ligamiento con un color indeseable de la semilla. La existencia de genes recesivos que también protegen a los genotipos de frijol contra el VMCF anulan estos problemas genéticos.

2.2.1 Virus del Mosaico Común del Frijol

2.2.1.1 Generalidades. El 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 las altas pérdidas económicas que ocasionó y por ser la enfermedad de más amplia distribución geográfica, identificándose diversas fuentes de resistencia (CIAT, 1985). Debido a que la mayoría de los cultivares de frijol en América Latina eran susceptibles a este virus, la estrategia de los programas de mejoramiento para conferir resistencia a la enfermedad fue la incorporación del gen dominante *I* en todas las variedades mejoradas.

En la actualidad se conoce que la presencia del gen *I* produce una reacción de hipersensibilidad letal en la planta en presencia del VMSF, por lo que en las nuevas estrategias de mejoramiento este gen es reemplazado por su forma recesiva y son

introducidos otros genes de resistencia específica como el *bc-3*, que protege al cultivo contra el VMCF y limita su susceptibilidad al VMSF (Melotto *et al.*, 1996).

2.2.1.2 Etiología y transmisión. Las partículas del VMCF tienen forma de bastón, con una longitud de 700 a 800 nanómetros (nm) y un diámetro de 12 a 15 nm. Pertenecen al grupo de los potyvirus, caracterizados por adquirir forma de espiral dentro de la célula. El virus puede ser inactivado a 80 °C, perdiendo su capacidad de infectar entre los 56 a 58 °C (Campos, 1991; Castaño-Zapata y del Río, 1994).

La incidencia y severidad de la infección depende de la variedad y la época en que esta se presente. Según Campos (1991), la enfermedad puede transmitirse por semilla únicamente en plantas que presentan resistencia recesiva; sin embargo, la infección más importante es por medio de agentes vectores, ya que varias especies de áfidos lo transfieren de forma no persistente. Entre estos se encuentran *Macrosiphum solanifolii*, *M. pisi* y *M. ambrosiae*, *Mysus persicae* y *Aphis rumicis*, los que son buenos vectores de las partículas del virus y responsables de su diseminación dentro del cultivo.

La infección mecánica es sencilla y efectiva, siendo empleada para evaluar materiales promisorios o con fines experimentales (CIAT, 1985). El polen también puede transmitir la enfermedad; se han encontrado partículas de virus en los granos de polen y en óvulos de cruces entre plantas infectadas y sanas (Campos, 1991).

2.2.1.3 Sintomatología. Según el CIAT (1985), se pueden distinguir dos sintomatologías principales en las variedades susceptibles: el mosaico y la necrosis sistémica. Sin embargo, algunas variedades pueden sufrir la infección sistémica y no presentar ninguno de estos síntomas. También se pueden presentar lesiones localizadas en la planta. El síntoma característico del mosaico es la distribución uniforme a lo largo de la hoja de áreas de color verde oscuro sobre un fondo de color verde más claro, que puede ir acompañado de otros síntomas como el enrollamiento y el ampollamiento (CIAT, 1980).

En infecciones por semilla la sintomatología se inicia en las hojas primarias, presentando un moteado tenue y enrollamiento hacia abajo debido a un crecimiento desigual del tejido, dando como resultado la formación de hojas más largas y angostas en comparación con el follaje de plantas sanas (CIAT, 1980; CIAT, 1985). En ataques severos el crecimiento de la planta es afectado, y si produce vainas estas se deforman y son de menor tamaño, disminuyendo significativamente el rendimiento del cultivo (Campos, 1991).

La necrosis sistémica o síndrome de la raíz negra puede aparecer en cultivares que poseen resistencia dominante (gen *D*) al mosaico sistémico y son infectadas a temperaturas altas (26–32 °C) o bajas (20 °C), provocando infecciones que van del 40 al 100%. Temperaturas entre 15 a 25 °C favorecen la aparición de los síntomas de la enfermedad, mientras que temperaturas mayores o menores los enmascaran.

2.2.1.4 Control

2.2.1.4.1 Control Cultural. Según Campos (1991), la época de siembra y el uso de semilla libre de virus son prácticas efectivas utilizadas para disminuir la incidencia de la enfermedad. Se ha determinado que la época de siembra está directamente relacionada con los niveles de áfidos en la plantación, por lo que de preferencia debe sembrarse en épocas y/o circunstancias que no favorezcan altas poblaciones de estos vectores. Si es necesario, estos deben controlarse con insecticidas para reducir la transmisión del virus de otras plantas de frijol o de hospederos alternos (CIAT, 1980; CIAT, 1985; Campos, 1991). No existen tratamientos químicos o de otra naturaleza que remuevan o destruyan las partículas de VMCF presentes en las semillas infectadas (CIAT, 1980).

2.2.1.4.2 Control Genético. Según el CIAT (1985), el uso de variedades mejoradas resistentes al mosaico común es la principal forma de manejo. Se dispone de resistencia genética al VMCF desde hace más de 80 años, cuando se descubrió esta cualidad en el cultivar 'Robust'. Se determinó que esta reacción era conferida por un gen recesivo, existiendo variedades derivadas de este cultivar que poseían resistencia al virus. Aproximadamente 20 años después se identificó otra fuente de resistencia en 'Corbett Refugee', determinándose que era conferida por el gen dominante *I* (gen hipersensitivo afectado por raíz negra), siendo la mayoría de los cultivares usados en Estados Unidos y Latinoamérica derivados de cruces con esta fuente (CIAT, 1980).

En la actualidad, los cultivares de frijol que poseen el gen dominante *I* son resistentes a todas las razas conocidas de VMCF. Sin embargo, cuando las plantas son infectadas por el VMSF la presencia del gen *I* causa una reacción de hipersensibilidad vascular letal en la planta. Combinando el gen *I* con otros genes de resistencia específicos (*bc-1*, *bc-2* y/o *bc-3*) se puede proteger la planta contra el VMSF, aunque, en pruebas de campo no es posible detectar la presencia del gen *I* en la combinación genética *I/bc-3*, porque este último enmascara epistáticamente la acción del gen *I* (Melotto *et al.*, 1996).

Gracias al conocimiento de esta enfermedad y a los avances en el mejoramiento para resistencia por el cultivo, los esfuerzos de evaluación en poblaciones de mejoramiento se han reducido drásticamente, ya que se está usando cada vez más material parental con resistencia como progenitores masculinos y femeninos.

La fácil transmisión del virus por semilla y la abundancia de áfidos vectores en la mayor parte de las áreas de producción de frijol, constituyen una amenaza constante de introducción de cepas necróticas del virus capaces de romper la resistencia genética del tipo monogénica dominante. En consecuencia, la incorporación de la resistencia genética deberá estar apoyada por un estricto manejo fitosanitario, con relación al uso de semilla libre de cepas exóticas de VMCF.

2.2.1.4.3 Control Químico de Vectores. El control químico de áfidos es efectivo únicamente cuando se aplica a las plantas de donde proceden. No es recomendable fumigarlos en el cultivo pues tienden a producir un mayor número de piquetes sobre el follaje antes de morir, diseminando más el virus en la plantación (Campos, 1991).

2.2.2 Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol

2.2.2.1 Generalidades: Según Urrea *et al.* (1996) el VMDAF es una de las enfermedades virales más serias en Latinoamérica. Este nombre se usó por primera vez en Puerto Rico en 1972, para referirse a una nueva enfermedad que causaba un amarillamiento generalizado en las plantas de frijol lima y frijol común; y se siguió utilizando recientemente, al detectarse una virosis producida por un mosaico que atacaba de manera similar a las plantas de frijol común en toda América. Esta enfermedad fue observada en la República Dominicana en los años 60, continuando su diseminación cronológica por El Caribe para aparecer en los años 70 en Cuba y Haití (Morales, 2000a).

La enfermedad está ampliamente distribuida en Centroamérica, en el suroriente de Guatemala, en los valles medios y bajos de El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. En Honduras apareció en los años 80, pero es a partir de 1990 que la enfermedad se considera una limitante para la producción del cultivo (Morales, 2000a).

2.2.2.2 Etiología y transmisión El agente causal del VMDAF permaneció más de una década sin conocerse. Las partículas que lo conforman son cuasi-isométricas (18 nm de diámetro) y se presentan en pareja (dímeros). Es clasificado con otros virus dentro del grupo de los “geminivirus”. Mediante estudios de laboratorio se determinó que este virus es genéticamente diferente al del mosaico dorado del frijol (VMDF), con el que se confundía anteriormente, concluyéndose que existen dos especies de virus que causan síntomas similares en el frijol común, la sudamericana (VMDF) y la mesoamericana (VMDAF), (Morales, 2000a).

Estos dos virus son ahora clasificados como especies del género Begomovirus (por las iniciales de Bean Golden Mosaic Virus). Una diferencia importante entre las dos especies es que el VMDAF es transmitido por la mosca blanca (*B. tabaci* y *B. argentifolii*) y mecánicamente, mientras que el VMDF sólo es transmitido por la mosca blanca (Morales, 2000a; Urrea *et al.*, 1996).

2.2.2.3 Sintomatología. El principal síntoma del VMDAF es el desarrollo de una coloración intensa amarilla brillante a dorada, con aparición ocasional de desteñimiento blanco casi transparente, que se inicia en las nervaduras. En las hojas, se puede observar enrollamiento y rugosidad, presentándose con intensidad desde la segunda semana del cultivo cuando las poblaciones de mosca blanca son altas. Sin embargo, las variedades menos susceptibles pueden recuperarse dependiendo de la etapa del cultivo al momento de la infección.

Si la infección se presenta en etapas reproductivas, generalmente los síntomas incluyen la deformación de vainas, y la decoloración, malformación y reducción en tamaño y peso de la semilla. En algunos casos, las plantas presentan enanismo y no producen vainas (Rosas, 1998)

2.2.2.4 Control

2.2.2.4.1 Control Cultural. Se basa en manejar al agente vector con barreras vivas, cultivos trampa, cambio de fechas de siembra y/o trampas que lo afecten directamente. Se

ha comprobado que las barreras vivas no disminuyen la incidencia del vector en los campos de cultivo, y que por el contrario aumentan los costos de producción y obstaculizan las labores culturales. El uso de cultivos trampa depende de las preferencias de la mosca blanca por ciertos cultivos, variando la presencia de acuerdo a factores del ecosistema. Las trampas amarillas no son muy utilizadas, debido a que también atraen a enemigos naturales del vector (Morales, 2000a).

2.2.2.4.2 Control Genético. Morales (2000a), señala que el control del VMDF y del VMDF ha sido difícil debido a las altas poblaciones de mosca blanca en las regiones frijoleras afectadas; al abuso indiscriminado de pesticidas para su control, que ha inducido su resistencia a los mismos; y a la patogenicidad extrema de los virus causales.

Se ha comprobado que la resistencia genética es una alternativa efectiva para el control de esta enfermedad. Los primeros cultivares resistentes al VMDF ('ICTA Jutiapán', 'ICTA Ostúa' e 'ICTA Quetzal', entre otros) fueron desarrollados por el CIAT y por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) de Guatemala, bajo la red de colaboración del Programa Cooperativo Regional de Frijol para Centroamérica, México y El Caribe (PROFRIJOL). Nuevos cultivares como 'Dorado' (DOR 364), 'Don Silvio' (DOR 482) y 'Turbo III', son la culminación de aproximadamente 16 años de cruces, evaluación y selección para resistencia a este virus (Urrea *et al.*, 1996). A estos cultivares se suma 'Tío Canela-75' (derivado de la cruce múltiple de DOR 483, DOR 391 y 'Pompadour J'), que fue desarrollado en Honduras (Rosas *et al.*, 1997).

La primera fuente de resistencia genética al virus, presente en la variedad Dorado, es de carácter cuantitativo; sin embargo, esta resistencia es frágil bajo condiciones de alta presión de la enfermedad y/o de su vector. La segunda fuente de resistencia al VMDF es conferida por un gen recesivo presente en las variedades recientemente liberadas, denominado *bgm-1*. En la actualidad, este gen es el más ampliamente usado por los programas de mejoramiento genético para dar resistencia al VMDF a los cultivares a ser liberados en la región. Sin embargo, la resistencia conferida por este gen se considera parcial, pues también se observan bajos rendimientos y deformaciones de yemas cuando la incidencia de la enfermedad es de moderada a alta (Urrea *et al.*, 1996).

2.2.2.4.3 Control Químico de Vectores. El control químico es posible ya que el agente vector requiere de cierto tiempo para adquirir y transmitir el virus, permitiendo a los plaguicidas actuar antes de su transmisión. Se puede usar cualquier insecticida que afecte a la mosca blanca, siendo más recomendables los de contacto al iniciar el período de crecimiento de la planta o cuando las poblaciones del vector son muy altas (Morales, 2000a).

2.2.3 Virus del Mosaico Severo del Frijol

2.2.3.1 Generalidades. Según Morales (2000b), el VMSF es un nombre genérico asignado a una enfermedad compleja causada por diferentes cepas del virus del mosaico severo del caupí (VMSC) en América Latina. Este problema es mayor en cultivares que poseen resistencia monogénica dominante al VMCF (gen *D*), siendo una amenaza para los

materiales mejorados de Centroamérica por la reacción de hipersusceptibilidad ante el agente patógeno (Morales, 1998).

Este complejo es transmitido eficientemente por una de las plagas más comunes del frijol en la región, los crisomélidos. La enfermedad se presenta como mosaico en materiales no mejorados y como necrosis en los mejorados, incidiendo con mayor frecuencia en El Salvador, Honduras, Guatemala y Nicaragua. La asociación frijol-maíz, que disminuye la incidencia del VMCF, agrava el problema debido a la relación biótica existente entre el maíz y ciertas especies de crisomélidos, en especial *Diabrotica* spp.

2.2.3.2 Etiología y transmisión. El VMSF es una enfermedad causada por diversas variantes de virus pertenecientes al grupo de los comovirus (grupo del virus del mosaico del caupí). Estos virus poseen partículas isométricas con un diámetro de 30 nm, y son transmitidos por especies de crisomélidos principalmente de los géneros *Diabrotica* y *Cerotoma*. Otros coleópteros como el coccinélido *Epilachna* spp., también actuar como agentes vectores.

Los comovirus son fácilmente transmitidos por medios mecánicos, pudiéndose conocer la reacción de un genotipo a estos virus inoculando manualmente una planta con una solución de hojas afectadas. Los comovirus que transmiten el VMSF son transmitidos por semilla en el caupí, pero aparentemente este mecanismo no es efectivo en el frijol común.

La presencia del virus está directamente relacionada con la presencia de los agentes vectores, los que tienen mejor desarrollo en climas cálidos y relativamente húmedos. Sin embargo, las mayores poblaciones de crisomélidos en frijol se presentan en las épocas secas, con daños importantes en condiciones de baja fertilidad de suelo. Los adultos de estos crisomélidos atacan el follaje y las flores, y en casos excepcionales las vainas del frijol. Los ataques se inician por los bordes del cultivo y progresan hacia el centro si la población del vector aumenta y no se efectúa ningún control. Se ha encontrado que los ataques de crisomélidos son más severos en siembras de frijol tardías y bajo condiciones de mínima labranza, porque estas prácticas facilitan el aumento de las poblaciones de larvas en el suelo (Morales y Cardona, s.f.).

2.2.3.3 Sintomatología. Los síntomas de mosaico o necrosis y el grado de deformación de las plantas pueden variar en intensidad de suaves a severos según la variedad, la etapa de infección y las condiciones ambientales. Entre más temprana sea la infección, mayor es la intensidad de los síntomas. Se observan en variedades criollas que no poseen genes de resistencia al VMCF, aunque el mayor grado de deformación foliar y general se presenta en variedades con resistencia del tipo dominante al VMCF. La presencia de genes recesivos de resistencia al VMCF en genotipos de frijol que también poseen resistencia monogénica dominante a este virus, puede incrementar la severidad de los síntomas.

Los síntomas de necrosis se dividen en dos clases principales: localizada y sistemática. La necrosis localizada se presenta en trifolios jóvenes, nervaduras de hojas y en tallos. Estos síntomas son característicos de variedades de frijol que poseen resistencia monogénica al

VMCF, en las que también se presenta deformación de la planta. La necrosis sistémica comienza con una necrosis apical y generalmente causa la muerte de la planta como resultado de la reacción de hipersensibilidad condicionada por un gen dominante diferente al que confiere la resistencia al VMCF (CIAT, 1996; Morales y Cardona, s.f.).

2.2.3.4 Control

2.2.3.4.1 Control Cultural. Según Morales y Cardona (s.f.), se debe evitar la siembra de frijol en épocas y áreas donde las poblaciones de crisomélidos son altas debido a la abundancia de otros hospederos, como el maíz y la soya, especialmente cuando estos están en plena madurez o próximos a la cosecha. El control de malezas en el cultivo y en áreas adyacentes (caminos y canales entre otros), contribuye a disminuir la infestación por crisomélidos. Estas medidas son justificables en plantaciones destinadas a la producción de semilla. El control integrado será posible cuando se desarrollen variedades que presenten resistencia.

2.2.3.4.2 Control Genético. La estrategia más recomendable para el control del VMSF sería la utilización de variedades resistentes. Desafortunadamente, aún no se han desarrollado variedades mejoradas con resistencia específica a esta enfermedad (Morales y Cardona, s.f.).

En el frijol existe resistencia del tipo recesivo, que gobierna la interacción entre los genotipos y el virus, dando como resultado la expresión de diferentes grados de mosaico. Existe también la interacción entre el gen dominante *I* de resistencia al VMCF y el VMSF, la que en la mayoría de los casos resulta en la expresión de necrosis y posterior muerte de la planta. Por último, se ha detectado un gen dominante diferente al gen *I*, el cual es responsable de la muerte apical de plantas jóvenes de frijol expuestas al VMSF (Morales, 1998).

Debido a que ninguna de las accesiones evaluadas en la colección núcleo del banco de germoplasma del CIAT es inmune al VMSF, es importante señalar el riesgo de mejorar genotipos de frijol para América Central sin considerar la amenaza potencial de este virus en la región (Morales, 1999b).

Actualmente, se están conduciendo trabajos para la incorporación de resistencia múltiple a los virus del frijol que atacan la región centroamericana. Para el año 2000 se seleccionó en el CIAT, una colección básica de frijol por su resistencia al VMCF y al VMSF, con el fin de identificar fuentes de resistencia desprovistas del gen dominante que confiere susceptibilidad extrema (necrosis sistémica) a los genotipos atacados por este último (Morales, 2000b). Una estrategia alterna para controlar simultáneamente ambos virus consiste en emplear los genes recesivos que confieren resistencia al VMCF pero que no reaccionen frente a las cepas del mosaico severo del caupí. Estos materiales no son portadores de genes de ligamiento indeseables entre el color rojo del grano y la resistencia al VMCF. El gen recesivo más valioso y deseable es el *bc-3*, que ya ha sido incorporado a varias líneas adaptadas a las condiciones del trópico (Morales, 2000b).

2.2.3.4.3 Control Químico de Vectores. Cuando las poblaciones de crisomélidos vectores son bajas o intermedias, se pueden reducir mediante el uso de insecticidas. Entre estos, los

más efectivos son el carbaril (Sevin), diazinon (Diazinon o Basudín), y pirimifos metil (Actellic); los piretroides también pueden ser usados, aunque son menos efectivos (Morales y Cardona, s.f.).

2.3 MARCADORES MOLECULARES DE ADN

Según Weising *et al.* (1995), el análisis de la diversidad genética y las relaciones entre y a través de diferentes especies, poblaciones e individuos, es la tarea central de muchas disciplinas de las ciencias biológicas. Desde los años 80, las estrategias clásicas para evaluar la variabilidad genética como comparaciones anatómicas, morfológicas, embriológicas y físicas, han sido complementadas en forma creciente con técnicas moleculares. Estas incluyen el análisis de los constituyentes químicos y, aún más importante, la caracterización de macromoléculas. El desarrollo de los llamados “marcadores moleculares”, que se basan en polimorfismos encontrados en proteínas o ADN, ha facilitado la investigación en una variedad de disciplinas como la taxonomía, filogenia, ecología, genética y el mejoramiento de plantas.

Por un largo período de tiempo, las isoenzimas fueron los marcadores moleculares más importantes. Sin embargo, en los últimos años la atención se centró en la molécula de ADN. Al ser la secuencia individual de ADN única, esta información puede ser usada para cualquier estudio de diversidad genética y relaciones entre organismos. En pocos años una amplia variedad de técnicas para visualizar la secuencia de ADN polimórfico se han desarrollado, desarrollándose de estos los marcadores moleculares derivados (Weising *et al.*, 1995). Estos análisis han contribuido a la identificación de marcadores moleculares asociados con características morfológicas útiles en la determinación de variabilidad genética en bancos de germoplasma, al desarrollo de mapas genéticos, y a la identificación de genes específicos que puedan ser utilizados en los programas de mejoramiento (Haley *et al.*, 1994).

Ventajas importantes que presentan los marcadores moleculares es que no son afectados por el ambiente y que no varían con la edad de la planta. Pueden estar en regiones codificantes (exones), aunque en su mayoría los polimorfismos ocurren en regiones no codificantes (intrones). Algunos de los aspectos que se deben considerar para el uso de marcadores en estudios de biodiversidad y fitomejoramiento son el propósito del estudio, la base genética del polimorfismo, los aspectos técnicos y las ventajas y limitaciones implícitas del método a usar (Castro *et al.*, 2001).

Según Beebe y Pedraza (1998), las ventajas y usos potenciales de los marcadores moleculares han sido citados con más frecuencia de lo que han sido comprobados. Estos incluyen entre otros, la selección de caracteres sin la necesidad de evaluar materiales en el campo bajo un ambiente particular para lograr la expresión del fenotipo buscado; selección segura de caracteres que en el campo presentan gran variabilidad ambiental y baja heredabilidad; selección simultánea de varios caracteres en un sistema común; y la posibilidad de piramidar genes de resistencia en combinaciones que serían difíciles de reconocer mediante el fenotipo.

Los marcadores de ADN presentan limitaciones, entre ellas que se requiere mucho trabajo para identificarlos, generalmente son costosos y algunos, especialmente los RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), dan resultados inconsistentes cuando las condiciones de laboratorio varían. En el mejoramiento genético, quizás la limitante más importante para su uso práctico y extenso es la necesidad de que el polimorfismo (presencia y ausencia de una banda específica de ADN ligada a un carácter de interés) sea detectable con relación a los demás padres con los cuales la fuente del carácter será cruzada. En este sentido, los polimorfismos que distinguen acervos y razas de frijol son útiles para introducir genes de uno a otro.

La mayoría de caracteres para los cuales hay marcadores identificados son controlados por genes mayores y muchos son de resistencia. Los caracteres de genes menores o cuantitativos son por su naturaleza más problemáticos para detectar por varias razones, como la dificultad de recopilar datos de campo confiables esenciales para identificar los marcadores, ya que la expresión de estos genes es menos estable. La identificación de estos marcadores ligados a genes múltiples, llamados QTL (Loci de Carácter Cuantitativo), requiere de más trabajo, y de modelos matemáticos más complejos.

2.3.1 Marcadores Moleculares tipo SCAR

En 1993, Michelmore y sus colaboradores introdujeron un nuevo tipo de marcador derivado del polimorfismo provisto por la técnica de RAPDs, pero que superaba muchas de sus limitaciones. Estos marcadores eran generados de la clonación y secuenciación de los fragmentos RAPD de interés, designando iniciadores ('primers') de 24 oligonucleótidos complementarios de manera específica al final del fragmento de RAPD (ahora se utilizan iniciadores de 15 a 30 pb).

Cuando este iniciador es usado en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con el ADN original, se amplifican de manera específica loci simples llamados 'Regiones Amplificadas de Secuencia Caracterizada' o 'SCARs'. Los SCAR son un tipo de marcador que como los RAPDs que emplean el proceso de PCR; sin embargo, los SCAR son más estables y permiten mayor confianza que los RAPDs. En muchos casos es necesario convertir los marcadores RAPD (u otros que generan polimorfismo) en SCARs, para que su uso sea factible en un alto nivel de confianza (Beeve y Pedraza, 1998). Estos SCARs pueden retener el comportamiento de segregación dominante del RAPD del que se originan, o ser convertidos en marcadores codominantes (Weising *et al.*, 1995).

Según Weising *et al.* (1995), comparado con los RAPDs y otros marcadores basados en la PCR, los SCARs presentan varias ventajas entre las que sobresale su facilidad de reproducción. Debido a que en la PCR usa un iniciador largo para una secuencia genómica específica, no tienen competencia por el sitio de ubicación del iniciador en la molécula de ADN. Esto resulta en la expresión de bandas específicas que son menos sensibles a las condiciones de la reacción. La principal desventaja de estos marcadores es que requieren de la secuenciación de bases para la construcción del iniciador (Castro *et al.*, 2001).

2.3.2 Utilización de marcadores moleculares en el mejoramiento de frijol

Según Haley *et al.* (1994), el mejoramiento de plantas de cultivos tradicionales ha contribuido al desarrollo de nuevas variedades con mayor rendimiento y mejor desempeño general favorable a los agricultores. Sin embargo, los mejoradores se han encontrado con limitaciones en la rapidez y precisión con que muchas de las características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas y utilizadas en los programas de mejoramiento.

Aunque el frijol es un cultivo de menor importancia en los países desarrollados, ha recibido mucha atención en el desarrollo de marcadores moleculares por varias razones. Entre estas se encuentra su corto ciclo de cultivo, que se presta para estudios genéticos diversos; su notoria susceptibilidad a patógenos, que lo hace atractivo para marcar genes de resistencia que muchas veces son mayores y relativamente fáciles de encontrar; y sus acervos genéticos, que permiten muchos polimorfismos para estudios de ADN (Beebe y Pedraza, 1998).

Estos trabajos han generado una amplia gama de marcadores de ADN para caracteres útiles, encontrándose tres posibles formas de emplearlos: en la selección asistida por marcadores (SAM); en la retrocruza (inclusive para caracteres controlados hasta por cuatro genes), y en la selección gamética incluyendo generaciones tempranas para aplicar selección negativa, eliminando plantas que ya han fijado alelos no deseables. Los primeros trabajos importantes con marcadores de ADN en frijol fueron la creación de mapas de su genoma, utilizando marcadores tipo RFLPs (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción) (Haley *et al.*, 1994; Beebe y Pedraza, 1998).

Muchos investigadores de frijol hacen uso de marcadores en sus programas de mejoramiento. Trabajos con marcadores bioquímicos (proteínas e isoenzimas) como los de Koenig y Gepts en 1989 y Sprecher en 1988 han permitido la clasificación de frijol en dos grandes grupos de variabilidad genética, correspondientes a los dos grandes centros de domesticación del frijol: el Andino y el Mesoamericano. No obstante sus implicaciones biológicas, las isoenzimas presentan limitaciones como marcadores debido a la poca variabilidad que permiten detectar en cada grupo genético (Haley *et al.*, 1994). El primer marcador molecular reportado en frijol fue un RAPD ligado a un gen de resistencia determinado por Miklas *et al.* en 1983 (Beebe y Pedraza, 1998). En la actualidad, existen estudios para el mejoramiento de frijol en los que se pretende desarrollar líneas que combinen la resistencia a varias enfermedades mediante el uso de marcadores moleculares de tipo SCAR (Angel *et al.*, 1998)

2.3.2.1 Resistencia al VMCF: genes *I* y *bc-3*. Según Melotto *et al.* (1996), la única forma efectiva de prevenir la ocurrencia del VMCF es el desarrollo de cultivares resistentes. Los cultivares de frijol que posee el gen *I* dominante son resistentes a todas las razas conocidas de VMCF, al igual que los que presentan el gen *bc-3* recesivo.

El uso del marcador RAPD OW13 (banda en los 690 pb) ligado al gen *I*, es restringido por ser muy sensible a variaciones en las condiciones de reacción. Al contrario, el

iniciador SCAR SW13 derivado de este RAPD puede amplificar un loci simple que aparece en una sola banda, siempre a 690 pb.

En la selección tradicional mediante la reacción fenotípica a la enfermedad, no es posible detectar la presencia del gen *I* en la combinación *I/bc-3* porque el gen *bc-3* afecta de forma epistática a la reacción del gen *I*, lo que constituye un problema para los programas de mejoramiento (Haley *et al.*, 1994; Melotto *et al.*, 1996). En estudios para encontrar marcadores ligados al gen *bc-3*, se detectaron varias bandas en pruebas de RAPDs (ROC20/460 pb y ROC11/420 pb, entre otros). Estos marcadores fueron verificados al confirmarse el polimorfismo relacionado con la reacción a la enfermedad por lo que posteriormente se desarrolló su marcador SCAR, mediante mapeo genético de los dos RAPDs mencionados que amplifican una banda polimórfica simple (Johnson *et al.*, 1997).

2.3.2.2 Resistencia al VMDAF: gen *bgm-1*

El VMDAF es una enfermedad controlada de forma efectiva mediante resistencia varietal. La fuente disponible de resistencia al VMDAF más estable es el gen *bgm-1*, derivado del cultivar de frijol Garrapato (México), que condiciona a una resistencia parcial al patógeno. Los primeros cultivares de resistencia fueron desarrollados por el CIAT y el ICTA, para la región centroamericana. La combinación del gen *bgm-1* con los genes cuantitativos de la variedad Dorado (ambos presentes en la variedad Tio Canela-75, TC-75), confieren alta resistencia al VMDAF (Rosas *et al.*, 1997).

El SCAR utilizado para la identificación de este gen de resistencia es el SR-2. Este marcador, compuesto por dos cebadores de 20 pb cada uno hace posible la selección de líneas resistentes al VMDAF mediante pruebas de laboratorio (Morales, 2000a). Este SCAR fue derivado del RAPD R2 (5'-CACAGCTGCC) y es codominante en 530 y 570 pb (Urrea *et al.*, 1996), donde la banda de 570 pb identifica al genotipo susceptible homocigoto, la de 530 pb al resistente homocigoto, y la presencia de ambas bandas indica heterocigocidad para el carácter (Angel *et al.*, 1998).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria en la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano. Las parcelas para el desarrollo de las poblaciones F2 y F6 evaluadas fueron las utilizadas para el incremento y mantenimiento de germoplasma del PIF/Zamorano.

Las plantas F2 evaluadas provienen de dos poblaciones la MPS501 y la MPS502. La cruce de los padres involucrados se realizó de forma manual; las plantas F1 obtenidas se llevaron al campo hasta obtener la población F2 empleada en este estudio. Las plantas F2 de las dos poblaciones fueron sembradas en 20 surcos de 10 m de largo cada una.

Las familias F6 provienen de evaluaciones de varias poblaciones generadas en el año 1999. En la F2 se seleccionó el 20% de las plantas sembradas (\approx 1000 plantas), hasta la generación F6 mediante selección de las mejores plantas de las familias con comportamiento agronómico superior, bajo condiciones de manejo con fertilidad media y sin control químico de enfermedades. Las líneas avanzadas usadas en el estudio provienen de un incremento de candidatos al Vivero de Adaptación Centroamericano del año 2001 (VIDAC rojo 2001), del que se analizaron las poblaciones BCH y BC3 .

3.2 CARACTERÍSTICAS DEL GERMOPLASMA

3.2.1 Plantas F2

Proviene de las cruces de Rojo de Seda x UPR9901-77 y Rojo de Seda x UPR9825-49-4. Rojo de Seda es una variedad criolla comercial de El Salvador. Las líneas UPR9901-77 y UPR9825-49-4 son derivadas de la cruce de TC-75 x PR9357-107, usados como fuentes de los genes *bgm-1*, *bc-3* e *ii*.

El progenitor PR9357-107 fue desarrollado en 1997 por las universidades de Puerto Rico, Nebraska y Michigan State, el USDA-ARS y la Escuela Agrícola Panamericana/Zamorano, como germoplasma resistente a múltiples enfermedades (Beaver *et al.*, 1998). Presenta resistencia a la roya causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.:Pers.) Unger var. *appendiculatus*; y posee el gen *bc-3*, de resistencia al virus VMCF, y carece del gen *I*, lo que le permite evadir la susceptibilidad al VMSF. Sin embargo, esta línea presenta susceptibilidad al VMDAF y a la bacteriosis común causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* (Xcp). El progenitor TC-75 desarrollado por la

Escuela Agrícola Panamericana/Zamorano, como una variedad con resistencia alVMDAF, Xcp y roya del frijol, entre otras enfermedades; y tolerancia a la sequía. El gen *bgm-1* y el bloque de alelos múltiples aportados por sus padres DOR391 y DOR 483, le conceden la alta resistencia al VMDAF (Rosas *et al.*, 1997).

3.2.2 Líneas F6

Se analizaron dos poblaciones de líneas de diversas procedencias generadas mediante cruza triples. La primera era un grupo de 33 líneas de cruza élites de Tío Canela-75 compuestas por las poblaciones BCH 9901, BCH 9902 y BCH 9903, esta población se esperaba, de acuerdo a sus progenitores que segreguen por los genes *bgm-1* e *I* (dominante). El segundo grupo de líneas evaluadas proviene de cruza de rojos élites con fuentes de los genes *ii* y *bc-3*, compuesto por las poblaciones BC3-9901, BC3-9902, BC3-9903 y BC3-9904; estas líneas se esperaba que segreguen por los genes *bgm-1*, *bc-3* e *ii*.

3.2.3 Testigos

Las líneas testigos de la presencia de los genes fueron TC-75 para el gen *I* de resistencia al VMCF (marcador SW13) y para el gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF (marcador SR2); y 'Jalo EEP558' para el gen *bc-3* (marcador ROC11) de resistencia al VMCF. Estas líneas se cultivaron en la casa de malla junto a los progenitores (UPR 9901-77, UPR 9825-49-4 y PR9557-107), para su evaluación por los genes a estudiar.

3.3.4 Muestreo de ADN

El muestreo se realizó tomando brotes jóvenes de plantas de las dos poblaciones F2. Este se efectuó cuatro semanas después de la siembra, previo al inicio de la floración para obtener una alta cantidad de brotes terminales y permitir a las plantas continuar un desarrollo normal. En los testigos se tomó muestras a los 14 días después de siembra.

3.3 PROTOCOLOS USADOS EN LABORATORIO

El protocolo usado como base para la evaluación en laboratorio fue el de la Universidad de Winsconsin-Madison. Este fue adaptado a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología de Zamorano, realizándose modificaciones en las fases de amplificación (PCR) y de separación de fragmentos de ADN por medio de electroforesis.

Para la evaluación del gen *bgm-1*, el protocolo ya había sido adaptado para su uso en el laboratorio por Aranda Rocha (2000). Este protocolo fue utilizado para la evaluación de los tres genes, realizándose cambios específicos para cada gen en la etapa de amplificación.

3.3.1 Adaptación del protocolo en la fase de amplificación de ADN

Para cada gen se utilizó un perfil térmico específico en el termociclador, cambiándose las temperaturas en la fase de acoplamiento y en el tiempo de exposición del ADN (Anexo 6, 7 y 8). También se realizaron cambios en las cantidades de mezcla maestra para la amplificación de cada gen. Además se utilizó perlas de PCR (beads, Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) reconstituidas con 18 μL de agua y 1 μL de cada cebador, agregando 4 μL de ADN para el análisis de las líneas F6 por el gen *I* (Anexo 5).

Para la separación de ADN se utilizó una concentración de 1% de agarosa y un buffer TBE 0.5X, sometiéndolos a una electroforesis de 140 voltios durante 50 a 60 min. para los genes *bc-3* e *I*. Para el gen *bgm-1*, la expresión de bandas fue mejor al incrementar el porcentaje de agarosa a 1.2% durante la electroforesis, a 150 voltios por 90 min. En la preparación de las geles se incluyó 2 μL de bromuro de etidio (10 mg/ μL) por gel, para la tinción de las bandas y su posterior visualización. Se colocó una escalera de ADN (1000 pb) en el primer y último orificio de la gel, seguido por el control positivo o testigo para cada gen, luego un control negativo, que es una mezcla sin ADN, y finalmente con las muestras (36 por cada gel de 40 pozos).

3.4 EVALUACION

Para la evaluación se tomaron los brotes jóvenes que poseen mayor cantidad de ADN, por estar en crecimiento y tener tejido menos lignificado. Las muestras fueron recolectadas en tubos `ependorf` rotulados. Para las plantas F2 se recolectaron muestras de plantas individuales las que se marcaron en el campo para su cosecha. En las F6, se tomó muestras al azar de cuatro plantas de cada línea, asumiendo que cada línea tiene una composición genética similar (altamente homocigota).

3.4.1 Extracción de ADN

Se utilizaron barras de `pexiglass` estériles para macerar cada muestra de forma separada en los tubos eppendorf, junto con el buffer PEX para permitir una mejor destrucción de las paredes celulares (Anexo 2), usando una microcentrífuga y micropipetas (0.5-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL) con puntas desechables. El protocolo utilizado en la extracción es el de la Universidad de Wisconsin-Madison usado para RAPDs, para conseguir ADN más puro.

3.4.2 Cuantificación y amplificación de ADN

La cuantificación se realizó en un fluorómetro (Hofer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant TM200) que expresa la cantidad en ng/ μL , usando buffer TE de cuantificación para

las muestras y ADN bovino estándar (100 ng/ μ L) para la calibración, descrito en el manual.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador (PCR-100™, Programable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling); y la separación en un tanque de electroforesis (EC Maxicell EC 360M, 40 orificios), empleando una fuente de aplicación y regulación de voltaje (Hoefler Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP). También se utilizó una escalera de ADN de 1000 pb para determinar la longitud de los fragmentos observados. Para la observación de bandas, se utilizó un transiluminador de rayos ultravioleta (Fotodyne, Foto/UV®26) y una cámara Polaroid® para fotografiar geles y registrar los resultados (Aranda, 2000).

3.5 VARIABLES ANALIZADAS

La variable analizada en el laboratorio fueron la presencia de la banda indicadora de resistencia correspondiente al gen *bc-3* en 420 pb; la presencia de las bandas codominantes para el gen *bgm-1* que expresan la resistencia en 530 pb, susceptibilidad en 570 pb y heterocigocidad en las dos bandas; y la ausencia de la banda para el gen *I* (en 690 pb), que evita la susceptibilidad al VMSF (Cuadro 1).

Cuadro 1. Marcadores moleculares SCAR usados en la evaluación de la resistencia a enfermedades virales del frijol común.

SCAR	RAPD de origen	VIRUS	TAMAÑO (pb)	Secuencia del SCAR	GEN
SW13	W13	VMCF	690 (Dominante)	CACAGCGACATTAA TTTTCTTTTC CACAGCCACAGGAG GAGCTTATTA	<i>I</i>
ROC11	C11	VMCF	420 (Dominante)	CCAATTCTCTTTCAC TTGTAACC GCATGTTCCAGCAA ACC	<i>bc-3</i>
SR2	R2	VMDAF	530/570 (Codominante)	CACAGCTGCCCTAA CAAAAT CACAGCTGCCACAG GTGGGA	<i>bgm-1</i>

Fuente: USDA (2000). DNA markers (SCARs) for resistance traits (en línea). <http://www.usda.prosser.wsu.edu/Scartable3.htm> (Febrero, 2001).

Las bandas fueron identificadas mediante su observación y determinación del peso molecular en la gel de agarosa, visualizadas en un transiluminador y registradas en fotografías instantáneas. Los análisis estadísticos se realizaron usando la Distribución de

χ^2 (Chi cuadrado) de Pearson, para relacionar la concordancia entre los valores esperados y los observados de acuerdo a la segregación genotípica de cada caso.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS PARA EL VIRUS DEL MOSAICO COMÚN DEL FRIJOL

En el Laboratorio de Biotecnología en Zamorano, en estudios anteriores se adaptó un protocolo para el análisis por medio de marcadores moleculares SCAR para el VMDAF, sin embargo no se había probado con marcadores para otras enfermedades.

Para las otras dos enfermedades virales estudiadas (VMCF y VMSF), los marcadores moleculares usados identifican plantas que poseen resistencia al virus del mosaico común del frijol, a pesar de que los marcadores seleccionan para resistencia a enfermedades diferentes. La presencia del marcador ROC11 nos indica una resistencia a todas las razas conocidas del VMCF, al igual que el marcador SW13 que indica la presencia del gen *I* dominante; sin embargo, lo que se busca es no seleccionar por el gen *I*, porque produce susceptibilidad al VMSF, sino por el gen recesivo *ii*.

4.1.1 Extracción de ADN

En esta etapa se evaluó dos métodos de extracción, el utilizado en CIAT conocido como extracción alcalina y la extracción limpia utilizada en la Universidad de Wisconsin-Madison. En estudios anteriores para el VMDAF (Aranda, 2000), se utilizó la extracción alcalina del CIAT con muy buenos resultados. En el presente estudio se probó los dos métodos, pero se prefirió una extracción limpia ya que se debía realizar muchas pruebas de laboratorio con este ADN y este método permite guardar el ADN por más tiempo (Anexo 2).

El método limpio de la Universidad de Wisconsin-Madison lleva mucho más tiempo que la extracción alcalina y requiere de más equipo y reactivos; pero para este estudio era importante la conservación del ADN de una forma óptima para realizar múltiples pruebas hasta establecer un protocolo efectivo para cada enfermedad. Una vez adaptados los protocolos para cada enfermedad, es importante ver el costo y el tiempo que implica realizar este tipo de extracción y ver si es conveniente realizar esta extracción o usar la alcalina.

4.1.2 Cuantificación y dilución de ADN

Para la cuantificación y dilución del ADN de cada muestra, se procedió de acuerdo al protocolo sugerido por Aranda (2000) para los marcadores moleculares SCAR DOR 21A y 21B del gen de resistencia *bgm-1* al VMDAF (Anexo 3).

El ADN de todas las muestras se diluyó a 20 ng/ μ l para obtener resultados más uniformes. Este paso es importante si la cantidad de muestra no fue pesada en el momento de la extracción, para que no ocurran errores al momento de la amplificación que puedan llevar a resultados erróneos (Anexo 4).

4.1.3 Amplificación de ADN mediante PCR

Para la amplificación de cada gen se empleó una mezcla de reactivos diferente. Para los genes *bc-3* e *ii* se evaluó la mezcla maestra utilizada para el marcador DOR 21A y 21B, encontrándose respuesta sólo para el marcador ROC11 F y R (gen *bc-3*); para el marcador SW13 (gen *I*) no se presentaron bandas. Estas pruebas se realizaron con los controles positivos, Jalo EEP 558 para el gen *bc-3* y Tío Canela-75 para el gen dominante *I*.

Para el gen *bc-3* se utilizó 0.3 μ l de cada cebador, 0.7 μ l de dNTPs, 2.0 μ l de Buffer, 0.5 μ l de *Taq* polimerasa, 9.2 μ l de agua bidestilada para amplificación y 2 μ l de ADN de la muestra a analizar (mezcla para una muestra).

Para el gen *I* se realizaron varias pruebas, utilizando beats y la mezcla maestra, para realizar la reacción y obtener una buena visualización de bandas en la electroforesis. En el primer método se utilizó $\frac{1}{2}$ beat, 9 μ l de agua bidestilada de amplificación, 1 μ l de cada cebador y 4 μ l de ADN. Con la mezcla maestra se usa 1.2 μ l de cada cebador, 1.5 μ l de dNTPs, 5 μ l de Buffer, 10.6 μ l de agua bidestilada de amplificación, 0.5 μ l de *Taq* polimerasa y 5 μ l de ADN por muestra.

Los valores de la mezcla maestra para el gen *I*, se determinaron luego de varias pruebas cambiando la cantidad de cebador, dNTPs y *Taq* polimerasa. Es conveniente analizar nuevas combinaciones de mezcla para disminuir los costos de análisis, ya que la dosis utilizada en el estudio contiene una cantidad alta de cebador y *Taq* polimerasa (Anexo 5).

Los programas térmicos seguidos por el amplificador de PCR se obtuvieron de la Universidad de Wisconsin-Madison y son los que se recomiendan para estos cebadores, de acuerdo a las personas que los desarrollaron (Anexo 7 y 8).

4.1.4 Electroforesis

Para el proceso de electroforesis se probó varias concentraciones de agarosa, cambiando también el voltaje y el tiempo de corrido de la gel, siendo la mejor, el uso de 1% de agarosa, y empleando 1 hora a 140 voltios en la electroforesis (Anexo 9).

4.2 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS PADRES DE LAS CRUZAS

Se realizó la caracterización de los padres para conocer la diversidad genética con la que se trabajó y poder explicar los resultados esperados de las cruzas. En cuanto a las líneas F6, sólo se hace una referencia de la recombinación de genes que podría esperarse, aunque no se pudo pronosticar la segregación de los mismos ya que no se hizo un estudio continuo de las plantas llevadas hasta esta generación. En las plantas F2 la caracterización se hizo de acuerdo a principios mendelianos de segregación.

4.2.1 Padres de plantas F2

Se sembraron aproximadamente 1000 plantas de cada una de las dos poblaciones. Se utilizó el 20% para el estudio, lo cual fue una muestra representativa de la segregación que se puede encontrar en las mismas. Las dos líneas que son fuentes de mejoramiento para Rojo de Seda (variedad criolla de El Salvador), están segregando por los genes en estudio. Estos dos progenitores mejorados (UPR 9901-77 y UPR9825-49-4) provienen de la cruce de TC-75, donador del gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF y del gen *I* de resistencia al VMCF pero susceptible al VMSF, con la línea mejorada PR9357-107 que contiene los genes *bc-3* e *ii* (recesivo) que le dan resistencia al VMCF sin que se produzca susceptibilidad al VMSF (Figura 1).

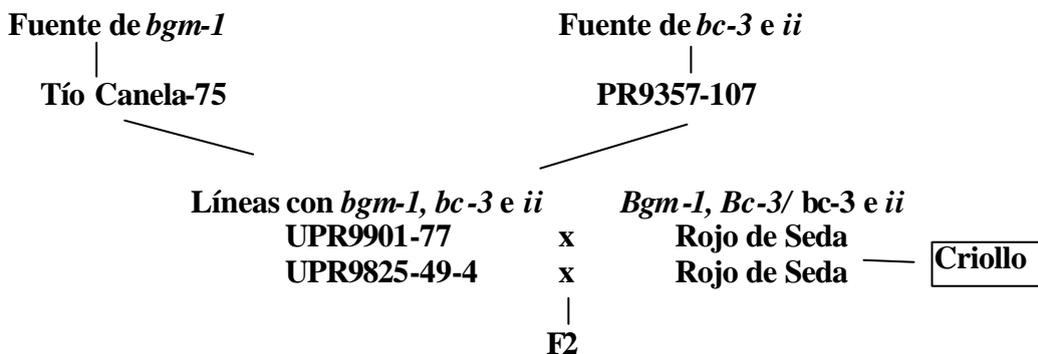


Figura 1. Genealogía de plantas F2 de las poblaciones MPS501 y MPS 502

Para confirmar la existencia de los genes en los padres, se probó en ellos los tres marcadores moleculares ligados a cada gen específico.

La variedad criolla Rojo de Seda, se esperaba que tuviera el gen *ii* recesivo útil para la cruce con las líneas mejoradas, y los genes *bc-3* y *bgm-1* se encontrarían como homocigotos dominantes o no se encontrarían en el genoma de la variedad. Las pruebas de laboratorio con cinco muestras de cada padre indicaron que esta variedad presenta el gen *ii* recesivo y posee el gen *bc-3* de forma heterocigota; mientras la mayoría de las

plantas presentaron el gen *bgm-1* de forma dominante. Por otro lado, los dos materiales mejorados presentaron los genes *bgm-1*, *bc-3* e *ii* de forma recesiva (Figura 1).

4.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS F2 Y DE LÍNEAS F6 DE FRIJOL

4.3.1 Evaluación genotípica y fenotípica-molecular de plantas F2

Debido a que los genes estudiados son de tipo recesivo, según una segregación mendeliana se debería encontrar en la generación F2 una distribución genética 1:2:1 en la que el carácter recesivo se expresaría solo en un 25% de los casos. Sin embargo, los alelos (o sus marcadores moleculares) en algunos casos, pueden estar ausentes en los genomas de los padres, pudiendo producirse otro tipo de resultados.

Las plantas F2 fueron evaluadas para conocer su composición genética y aplicar la SAM, para mejorar las técnicas actuales de selección de material mejorado. Se usaron los marcadores tipo SCAR específicos para cada gen ya descritos, para conocer si los genes de interés se encontraba en las plantas seleccionadas. Se hizo un muestreo de 200 plantas, de las cuales al final se analizaron 160 debido a condiciones de campo que no permitieron obtenerse semilla o no tener ADN suficiente para analizar, entre otros factores.

4.3.1.1 Virus del Mosaico Dorado Amarillo de Frijol. El marcador SCAR utilizado en este análisis fueron los cebadores DOR 21A y 21B, que presentan las bandas en 530 pb el estado homocigoto recesivo del gen, 570 pb el homocigoto dominante y las dos bandas (530/570) en caso de que el gen sea de carácter heterocigoto. Puede ocurrir la ausencia del gen y no aparecer ninguna banda. Esta codominancia es una ventaja para el análisis, porque se conoce si existe o no el gen en cada muestra analizada, contrario a los otros marcadores utilizados que solo señalan la presencia o ausencia de un gen en una banda determinada. Sin embargo, la desventaja es que las bandas pueden aparecer muy cercanas en la gel haciendo difícil su visualización e identificación (Figura 2).

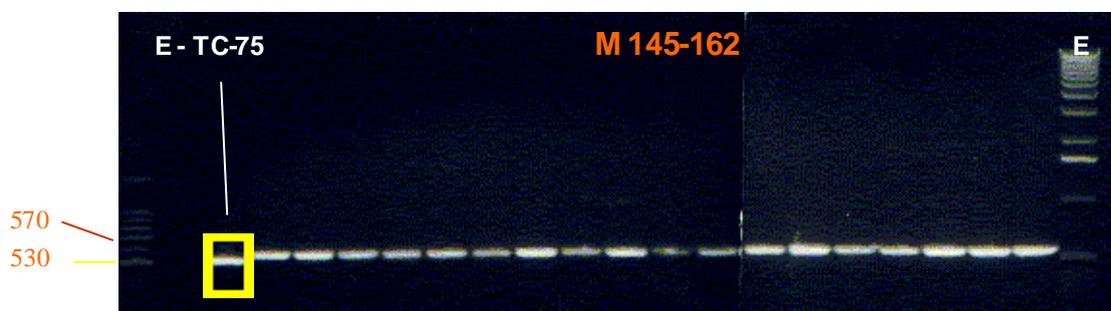


Figura 2. Bandas del gen *bgm-1* en gel de electroforesis. Zamorano, 2001.

En la evaluación molecular se encontró que todas las plantas estudiadas presentaban el gen *Bgm-1* dominante que es la forma susceptible (Anexo 10), contrario a lo esperado según el modelo mendeliano de segregación en la F2 (Figura 3). Los resultados fueron comprobados realizando las pruebas en todas las muestras y luego escogiendo muestras al azar.

Progenitores	<i>Bgm-1/Bgm-1</i>	x	<i>bgm-1/bg-1</i>
F1	<i>Bgm-1/bg-1</i>		
F2	<i>Bgm-1</i>		
<i>Bgm-1</i>	<i>Bgm-1/Bgm-1</i> Dominante	<i>Bgm-1/bg-1</i> Heterocigoto	
<i>bgm-1</i>	<i>Bgm-1/bg-1</i> Heterocigoto	<i>bgm-1/bg-1</i> Recesivo (Resistente)	

Figura 3. Modelo esperado de segregación mendeliana del gen *bgm-1* en plantas F2.

Debido a la respuesta encontrada se llegó a las posibles causas de este resultado. Primero, pudo deberse a que la cruce no produce los recombinantes deseados por falta de transferencia del gen deseado a la progenie. Una de las razones más probables es la ruptura del ligamiento entre el marcador y el gen *bgm-1* ocasionando a fallas en la detección por el SCAR. Se recomienda la siembra de la siguiente generación (F3) para realizar una evaluación molecular apoyada con una prueba de campo en Comayagua donde existe alta presencia de la enfermedad.

4.3.1.2 Virus del Mosaico Común del Frijol. Se incluyó el gen *bc-3* en la cruce que proporciona resistencia a todos las cepas del virus, al igual que el gen *I*, pero con la ventaja de que este gen no produce susceptibilidad al VMSF.

Los cebadores tipo SCAR utilizado para esta prueba fueron el DOR11-R y el DOR11-F que expresan la banda en 420 pb únicamente para el gen recesivo de resistencia (Figura 4).

En la evaluación molecular se probó las 160 muestras de plantas F2 mediante técnica moleculares para conocer el estado del gen *bc-3* en las plantas. Se encontró 103 plantas que presentaron el gen recesivo y 57 que no lo presentaron. Debido a que es un gen recesivo y de acuerdo a la segregación mendeliana utilizada, se puede decir que el progenitor criollo Rojo de Seda, posee el gen de forma heterocigota, usando un modelo de

segregación de 2:1, (62.5% resistentes y 37.5% susceptibles) con un grado de significancia mayor a 0.05.

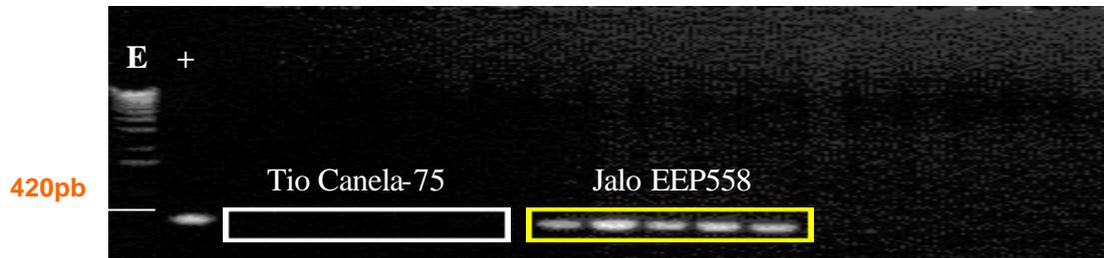


Figura 4. Expresión de la banda del gen recesivo *bc-3* de Jalo EEP558 (420 pb) en la electroforesis. Zamorano, Honduras, 2001.

La segregación fenotípica obtenida se separó para cada población en la generación F2. La población MPS501 cruza de Rojo de Seda x UPR9901-77 y población MPS502 cruza de Rojo de Seda x UPR9825-49-4. De cada uno se muestreó al azar 100 plantas. En la población MPS501 se estudiaron 76 plantas, se encontró 29 plantas susceptibles y 47 resistentes, correspondientes al modelo de segregación fenotípica mendeliana esperado de 2:1. En la población MPS502 se estudiaron 84 plantas, encontrando 28 susceptibles y 56 resistentes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Segregación fenotípica de plantas F2 de las poblaciones MPS501 y MPS502 por resistencia al VMCF, según su evaluación con el marcador molecular SCAR ROC11. Zamorano, Honduras, 2001.

Población MPS501

Clase (Genotipo)	Observado (SCAR)	Esperado (3:1)	Obs - Esp	$(O-E -0.5)^2/E$
<i>bc-3 bc-3</i> (resistente)	47	47.5	-0.5	0
<i>Bc-3/Bc-3</i> <i>Bc-3/bc-3</i> (susceptible)	29	28.5	0.5	0
Total	76	76		0*

* Nivel de significancia de $\alpha > 0.05$ ($>P$ 0.99)

Población MPS502

Clase (Genotipo)	Observado (SCAR)	Esperado (3:1)	Obs - Esp	$(O-E -0.5)^2/E$
<i>bc-3 bc-3</i> (resistente)	56	52.5	3.5	0.171
<i>Bc-3/Bc-3</i> <i>Bc-3/bc-3</i> (susceptible)	28	22.5	-3.5	0.400
Total	84	84		0.571*

* Nivel de significancia de $\alpha > 0.05$ ($0.50 > P > 0.25$)

La segregación genotípica mendeliana del tipo 1:2:1 no se puede conocer debido a que sólo se observa la banda en 420 pb (gen recesivo) que indica la resistencia a la enfermedad, siendo imposible predecir cuales segregan por el gen dominante homocigoto o heterocigoto.

4.3.1.3 Virus del Mosaico Severo del Frijol. Debido a que el gen *I* dominante fue muy utilizado en los programas de mejoramiento en los años 80 y recientemente se descubrió que produce susceptibilidad al VMSF, se están utilizando nuevos materiales mejorados que poseen este gen de forma recesiva (*ii*). Los dos progenitores usados (UPR9901-77 y UPR9825-49-4) en el desarrollo de las dos poblaciones (MPS501 y MPS502) evaluadas en F2. El progenitor Rojo de Seda, tampoco presenta este gen por ser un material criollo, lo que se comprobó mediante pruebas realizadas a los progenitores (Sección 4.1.1). Se utilizó como testigo positivo la variedad Tío Canela-75, que posee el gen *I* dominante (Figura 5).

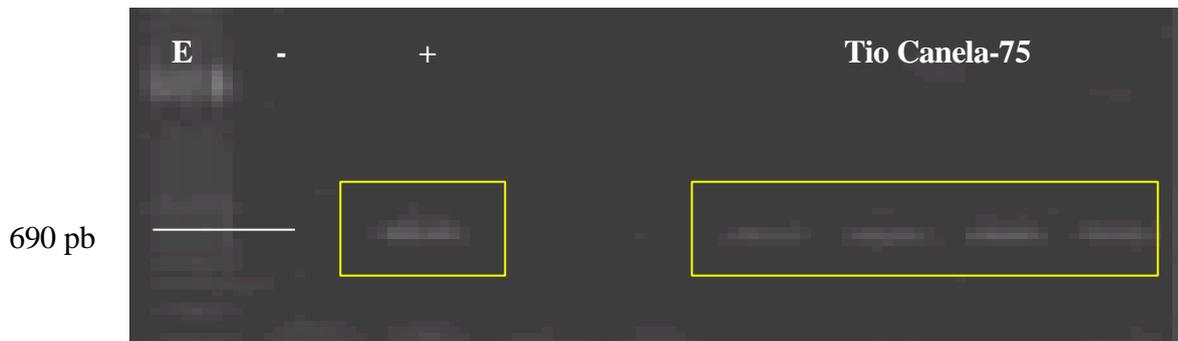


Figura 5. Bandas del gen *I* presentes en plantas de variedad Tío Canela-75 en gel de electroforesis. Zamorano, Honduras, 2001.

La progenie esperada, de acuerdo a los padres, era de homocigotos recesivos en un 100% (*ii/ii*), confirmándose con las pruebas realizadas en el laboratorio. Debido a que el marcador molecular SW13 indica la presencia del gen *I* de forma dominante homocigota o heterocigota (*II* o *I/i*), todas las plantas F2 no presentaron la banda en 690 pb, lo que indica la presencia del gen homocigota recesivo *ii*. Esta condición recesiva evita la expresión de susceptibilidad al VMSF.

4.3.1.4 Reacción de plantas F2 por resistencia múltiple a enfermedades virales. De las 160 plantas de las poblaciones estudiadas, el 64.4% (103) presentan el gen recesivo *bc-3* de la resistencia al VMCF, y el 100% de las plantas presentan el gen recesivo *ii* que evita la susceptibilidad al VMSF.

Debido a que no se pudo observar mediante el uso del SCAR la forma recesiva del gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF en las plantas F2, se recomienda hacer las pruebas de campo y laboratorio para comprobar la presencia del gen, en las familias F3 de las 103 plantas F2 que presentaron los genes recesivos *bc-3* e *ii* (Anexo 10).

4.3.2 Líneas F6: evaluación genotípica y fenotípica -molecular.

Se analizaron dos poblaciones en la generación filial F6, para conocer la presencia de los genes *bgm-1*, *bc-3* e *ii* en estas líneas avanzadas del PIF/Zamorano. Estos estudios se efectuaron de la misma forma que en las plantas F2.

Las líneas F6 de la población BCH se encuentran segregando por el gen *bgm-1* y por el gen dominante *I*, y la población BC3 están segregando por los genes *bgm-1*, *bc-3* e *ii* recesivo, de acuerdo a los progenitores empleados en su desarrollo. Se espera que la población BCH no este segregando por el gen *bc-3*, sin embargo, se la analizó con este marcador para confirmarlo.

4.3.2.1 Reacción al VMDAF, VMCF y VMSF de líneas F6 de la población BCH. De las 33 líneas de la población BCH evaluadas, se encontraron 18 que presentan resistencia para el VMDAF (*bgm-1/bg m-1*), 15 que son susceptibles (11 homocigotos *Bgm-1/Bgm-1* y cuatro heterocigotos *Bgm-1/bg m-1*).

En cuanto al VMCF (marcador *bc-3*) se encontraron 19 plantas que presentan resistencia (*bc-3/bc-3*) y 14 que presentaron susceptibilidad (*Bc-3/--*). Por otro lado, se encontraron sólo cinco líneas que presentaron el gen recesivo *ii*; las 28 líneas restantes presentaron la banda indicadora de la presencia del gen dominante *I*, confirmándose que estaban segregando por el gen dominante de susceptibilidad al VMSF (Anexo 11).

De las 33 líneas F6 de la población BCH, existen solo dos (BCH 9901-3 y BCH 9901-60) que poseen los tres genes de interés, o sea que presentan resistencia múltiple a las enfermedades virales. Ocho líneas poseen resistencia al VMDAF y al VMCF (genes *bgm-1* y *bc-3*); una línea posee resistencia al VMDAF y es no susceptible al VMSF (genes *bgm-1* e *ii*); una línea posee resistencia al VMCF y no susceptibilidad al VMSF (genes *bc-3* e *ii*) y dos líneas heterocigotas para el gen *bgm-1* (resistencia al VMDAF) y resistentes al VMCF (gen *bc-3*) (Cuadro 4).

De acuerdo a los resultados obtenidos es importante continuar el proceso de selección y mejoramiento con las líneas BCH 9901-3 y BCH 9901-60 que presentan resistencia múltiple. También es conveniente continuar con las 10 líneas que presentan dos genes de interés al igual que las dos que presentan heterocigocidad al gen *bgm-1*, para continuar la selección en la siguiente generación. Se debe descartar las líneas que presentan el gen *Bgm-1* homocigota dominante (susceptibles al VMDAF).

Cuadro 3. Líneas F6 de la población BCH que presentan resistencia a tres enfermedades virales determinadas por marcadores moleculares. Zamorano, Honduras, 2001.

Identificación	Genes de resistencia		
	<i>bgm-1</i> VMDAF	<i>bc-3</i> VMCF	<i>ii</i> VMSF
BCH 9901-3*	R	R	NS
BCH 9901-6	R		NS
BCH 9901-14	R	R	
BCH 9901-36	R	R	
BCH 9901-38R	R	R	
BCH 9901-54		R	NS
BCH 9901-56R	R	R	
BCH9901-57	H	R	
BCH 9901-60*	R	R	NS
BCH 9901-71	R	R	
BCH 9901-72	H	R	
BCH 9902-17B-1R	R	R	
BCH 9902-17B-2R	R	R	
BCH 9902-47	R	R	

* Líneas que contienen genes de resistencia (*bgm-1* y *bc-3*) y no susceptibilidad (*ii*).

NS= No susceptibles

R = resistente

H = heterocigoto (gen *Bgm-1/Bgm-1* o *Bgm-1/bgm-1*) susceptible

4.3.2.1 Reacción al VMDAF, VMCF y VMSF de líneas F6 de la población BC3. En la población BC3 se evaluaron 35 líneas. Se encontraron 21 líneas que presentan el gen *bgm-1* homocigota recesivo de resistencia al VMDAF, 13 que son susceptibles (*Bgm-1/Bgm-1*) y solo una línea heterocigota (*Bgm-1/bgm-1*). Para el VMCF se encontró cinco líneas resistentes, presentando el gen *bc-3* de forma homocigota recesiva (*bc-3/bc-3*) y 30 líneas susceptibles (*Bc-3/Bc-3* o *Bc-3/bc-3*), indicando que esta línea contiene plantas segregando para este gen. Se encontró 16 líneas que no presentaron la banda del gen *I*, o sea no susceptibles al VMSF (genotipo *ii/ii*), y 19 líneas susceptibles a este virus (*I/I* o *I/ii*) (Anexo 12).

En esta población ninguna línea contiene los tres genes en estudio. Se encontraron 15 líneas que segregaron por dos genes, incluyendo dos líneas resistentes al VMDAF y VMCF (genes *bgm-1* y *bc-3*), dos resistentes al VMCF y no susceptibilidad al VMSF (genes *bc-3* e *ii*); y 11 líneas resistentes al VMDAF y no susceptibilidad al VMSF (genes *bgm-1* e *ii*) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Líneas F6 de la población BC3 que presentan resistencia múltiple a enfermedades virales determinadas por marcadores moleculares. Zamorano, Honduras, 2001.

Identificación	Genes de resistencia		
	<i>bgm-1</i> VMDAF	<i>bc-3</i> VMDF	<i>li</i> VMSE
BC3 9911-30		R	NS
BC3 9911-31	R	R	
BC3 9911-39		R	NS
BC3 9912-23	R		NS
BC3 9912-37	R		NS
BC3 9912-41	R	R	
BC3 9913-52	R		NS
BC3 9913-83	R		NS
BC3 9914-1	R		NS
BC3 9914-10	R		NS
BC3 9914-11	R		NS
BC3 9914-37	R		NS
BC3 9914-49	R		NS
BC3 9914-71	R		NS
BC3 9914-76	R		NS

NS= no susceptibles

R = resistente

De acuerdo con los resultados obtenidos, se debe continuar trabajando con las 15 líneas que presentaron dos de los genes de resistencia o no susceptibilidad a las enfermedades en estudio.

5. CONCLUSIONES

1. Los protocolos para los marcadores moleculares SCAR ROC11 (presencia del gen *bc-3* recesivo) y SW13 (presencia del gen *I* dominante) del VMCF fueron adaptados para su uso en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano y en selección asistida por marcadores (SAM).
2. El uso de SAM es efectivo tanto en poblaciones tempranas como avanzadas, lo que permite avanzar plantas conteniendo los alelos de resistencia a los virus del mosaico común, mosaico dorado amarillo y mosaico severo desde generaciones tempranas, y/o confirmar las líneas avanzadas con resistencia múltiple a virus.
3. Las líneas avanzadas que se seleccionaron para ser distribuidas a nivel de la región Centroamericana y El Caribe en l 2001, poseen resistencia múltiple a los virus del mosaico común, mosaico dorado y mosaico severo del frijol, sugiriendo un avance adecuado en el mejoramiento de frijol para esta región.

6. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el uso del método de extracción de la Universidad de Wisconsin-Madison para obtener ADN más puro y en mayor cantidad para las pruebas múltiples que se requieran. En pruebas que exijan resultados inmediatos y que no requieren la conservación de ADN, se recomienda la utilización del método de extracción del CIAT para acelerar el proceso y reducir los costos.
2. Continuar evaluando las progenies de las plantas F2 seleccionadas mediante el uso de marcadores moleculares, en pruebas de campo para observar su comportamiento en presencia de los virus estudiados, en especial del VMDAF.
3. Estudiar la variedad criolla Rojo de Seda para depurarla y usarla en futuras cruzas para el mejoramiento.
4. En casos específicos, implementar el uso de perlas de PCR para acelerar el proceso durante la amplificación y evitar que durante la mezcla se utilice reactivos que confundan los resultados. En pruebas rutinarias se puede usar la mezcla maestra estandar por ser más barata que las perlas.
5. Utilizar los marcadores SCAR evaluados para VMCF, VMDF y VMSF en la selección de progenitores de generaciones tempranas, poblaciones intermedias y en líneas avanzadas, como parte de la aplicación de la SAM en las actividades de mejoramiento del PIF.
6. Ofrecer capacitación y servicios basados en estas técnicas moleculares a otros programas de la región.

7. BIBLIOGRAFÍA

Angel, JC; Beaver, JS; Kelly, JD. 1998. El uso de marcadores moleculares en la selección de líneas de frijol resistentes al mosaico dorado y común. s.l., s.n.t. 8 p.

Aranda Rocha, LL. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común. Tesis. Zamorano, HN, Zamorano. 78 p.

Beaver, JS; Minklas, PN; Kelly, JD. Steadman, JR; Rosas, JC. 1998. Registration of PR9357-107 small red dry bean germplasm resistant to BCMV, BMMNV, and Rust. *Crop Science* 38:1408-1409.

Beebe, S; Pedraza, F. 1998. Perspectivas para el uso de marcadores moleculares en mejoramiento del frijol. Taller internacional de mejoramiento genético de frijol negro Mesoamericano. Ed. R Lépiz , GT. PROFRIJOL. p. 129-139.

Campos, AJ. 1991. Enfermedades del frijol. México, DF, MX. Trillas. 132 p.

Castaño-Zapata, J; del Río M., L. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. 3ra Edición. Zamorano, HN, Zamorano Academic Press. 302p.

Castro, A, Rosas, JC, Aranda, L. 2001. Aplicación de los marcadores moleculares para la caracterización de la biodiversidad y el mejoramiento genético de plantas. (intranet). Zamorano, HN. Zamorano. Consultado 12 mar. 2001. Disponible en <http://clases/bin/frame.pl?/>.

CIAT. 1980. Bean production problems: Disease, insect, soil and climatic constrains of *Phaseolus vulgaris*. Eds. H.F. Schwartz; G.E. Gálvez. Cali, CO, s.e. 424 p.

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

CIAT. 1996. Taller de mejoramiento de frijol para el siglo XXI: bases para una estrategia para América Latina. Eds. S.P. Singh; O. Voysest. Cali, CO, CIAT. p. 110-117.

Haley, SD; Afanador, L; Kelly, JD. 1994. Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for the *I* gene (potyvirus resistance) in common bean. *The American Phytopathological Society* 84(2):157-160.

- INE (Instituto Nacional de Estadísticas, HN). 2001. Indicadores básicos sobre el desempeño agropecuario 1971-2000. Eds. D Cotty; M García; I Estrada; E Anchundia. s.n.t. p.30-80.
- Johnson, W.C.; Guzmán, P.; Mandala, D.; Mkandawire, A.B.C.; Temple, S.; Gilbertson, R.L.; Gepts, P. 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.; Afanador, L.; Kelly J.D. 1996. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. *Genome* 39:1216-1219.
- Morales, F; Cardona, C. s.f. El Mosaico Severo del Frijol. Publicación del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), CO (trifolio ilustrado).
- Morales, J.F. 1998. Informe Técnico Anual – POA 1997-98: Amplificación de la base genética y estudio de la diversidad patogénica. Cali, CO, s.e. p. 50-52.
- Morales, F. 1999. Informe Técnico Anual – POA 1998-99: Evaluación de padres potenciales para mosaico severo (VMSF) y mosaico dorado del frijol (VMDF). Cali, CO, s.e. p. 38-41.
- Morales, FJ. 1999a. Situación actual de las enfermedades virales del frijol común en América Latina, México y El Caribe. Hojas de PROFRIJOL (Guatemala) no. 6: 2-3.
- Morales, FJ. 1999b. Informe Técnico Anual – POA 1999-2000: Amplificación de la base genética y estudio de la diversidad patogénica. Cali, CO, s.e. p. 78-80.
- Morales, FJ. 2000a. El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en América Latina. Ed. F J Morales. Palmira, CO, CIAT. 144 p.
- Morales, F.J. 2000b. Informe Técnico Anual – POA 2000-2001: Amplificación de la base genética y estudio de la diversidad patogénica. Cali, CO, s.e. p. 83-84.
- Rosas, J.C. 1998. El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano, HN, Zamorano Academic Press. 52p.
- Rosas, J.C.; Varela, O.I.; Beaver, J.S. 1997. Registration of 'Tio Canela-75' small red bean (race Mesoamerica). *Crop Science* 37(4):1391.
- Urrea, C.A.; Miklas, P.N.; Beaver, J.S.; Riley, R.H. 1996. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. *American Society of Horticulture Science* 121(6):1035-1039.
- Weising, K; Nybom, H; Wolff, K; Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Ratón, US, CRC. 322

8. ANEXOS

Anexo1. Programa de Cruzas, Poblaciones y líneas - 1999/2000**I. Bean/Cowpea CRSP****A. Cruzas élites de TC-75**

BCH9901	TC-75//SRC1-1-18/SRC1-12-1	(127 F1)
BCH9902	TC-75//SRC1-18-1A/MD23-24	(13 F1)
BCH9903	TC-75//SRC1-1-18/Dicta 151	(93 F1)

SRC1-1-18/SRC1-12-1 = SRC2-2

SRC1-18-1/MD23-24 = SRC2-21

SRC1-1-18/Dicta 151 = SRC2-5

99X Obtención de F1

99A Autofecundación F1 (cesecha en bulk de semilla F2)

99B Selección de F2 (siembra de (500-1000 semillas; selección individual (20%)
PIF 99-29

00X Selección de familias F3 (PIF 00-14)

00A Selección de familias F4 (PIF 00-13)

00B Selección de familias F5

01X Selección de líneas F6

01A/B VIDAC

B. Cruzas rojos élites x fuentes ii bc3

BC3-9901	SRC-12-1/SRC1-18-1A//UPR9825-46-1	(22 F1)
BC3-9902	SRC-12-1/Dicta 151//UPR9825-48-2	(38 F1)
BC3-9903	SRC-12-1/UPR9606-2-2//UPR9825-49-4	(47 F1)
BC3-9904	SRC-12-1/MD23-24/UPR9825-49-4(42F1)	

Líneas UPR9825-46-1, 9825-48-2, 9825-49-3 y 9825-49-4 derivadas de la cruce TC-75 con PR9357-107 (contiene los genes bgm-1, ii y bc-3).

UPR9609-2-2 = DOR482/DOR364/XAN176

99X Obtención de F1 de cruces

99A Autofecundación F1 (cesecha en bulk de semilla F2)

99B Selección de F2 (siembra de (500-1000 semillas; selección individual (20%)
PIF 99-29

00X Selección de familias F3 (PIF 00-14)

00A Selección de familias F4 (PIF 00-13)

00B Selección de familias F5

01X Selección de líneas F6

01A/B VIDAC

Anexo 2. Extracción de ADN para el análisis de RAPDs (Método de la UW-Madison)

1. Cosecha 0.5-0.75 g de tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas primarias) a los 10 a 12 días después de siembra.
2. Agregar 50 (L de buffer de extracción (PEX) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Macerar el tejido en un tubo usando una barra (pestle) de plexiglass de laboratorio.
3. Agregar 450 (L adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.
4. 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.
5. Centrifugar las muestras durante 10 min a >14000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar (pellet) los residuos de tejido.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucléicos 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.
7. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucléicos precipitados, centrifugando las muestras a 3000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.
8. Eliminar el sobrenadante. Agregar a os tubos con los pellets 300 (L de RNAasa A (Concentración de 100 (g/mL) + buffer 0.1 TE^a (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37°C por 1 hora.
9. Centrifugar a (L >14000 RPM por 1 min (3 min si se desea muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejido remanentes.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL.
11. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de Etanol:Acetato de Sodio 3M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
12. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletearlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3000 RPM paraa peletizar el ADN.
13. Vaciar el etanol/Acetato de Sodio ^b y labar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
14. Colectar los pellets centrifugando por 15 seg a 14000 RPM.

15. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día al otro).
16. Rehidratar los pellets agregando 100-200 μ L de TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolver colocando los tubos a 65°C en baño maría durante 3 min.
17. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20°C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN (ng/ μ L), 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 3. Método de cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Hofer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant TM200).

1. Colocar 2 ml de buffer de cuantificación en un cubo (cuvette) limpio y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 μ l de muestra de ADN al buffer cuantificador.
3. Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.
4. Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/ml.
5. Vaciar el cubo, enjuagar con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

* Fluorómetro: (Hoefel) TKO-100, λ_{ex} + 365 nm, λ_{em} + 460 nm.

* Buffer de cuantificación:

10 μ l solución para tinción concentrada + 100 ml buffer TNE 1X (pH=7.4)

Anexo 4. Método de dilución de ADN (a 20 ng/ml).

1. Agregar 100 μ l de buffer TE 0.1 X + Tartrazine en un plato de 96 celdas con fondo redondeado (Microplate TM96 Polypropylene, MJ Research, INC.).
2. Agregar el volumen inicial de la muestra de ADN extraído de tejido, estimado mediante la fórmula $V_i = 20(100)/C_i \pm 20$.
3. Cubrir las celdas del plato y almacenarlo en el congelador a -20°C (o refrigerador si se usa en los siguientes días), al igual que el resto del ADN.

Anexo 5. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores tipo SCAR.

1. Realizar los cálculos pertinentes para preparar la mezcla de la reacción, según el cuadro de mezcla para cada tipo de “primer”.
2. Preparar la mezcla de la reacción sin incluir las muestras de ADN.
3. Colocar en un plato de 96 celdas para PCR, 13µl de mezcla de reacción en cada una (20 µl si la mezcla tienen un volumen final de 25µl).
4. Agregar 2µl del ADN de cada muestra por celda (5 µl si la mezcla tiene un volumen final de 25µl).
5. Tapar con papel plástico (Microseal TM “A”) la caja de reacción (plato de 96 celdas).
6. Realizar la amplificación mediante el perfil térmico para SCAR.

Cuadro 1. Mezcla de reacción para la amplificación del SCAR para el gen *bgm-1* y gen *bc-3*

Componentes	1 reacción (µl)
Agua	9.2
Buffer (5X) + Mg Cl ₂ (25 mM)	2.0
dNTPs (4 mM c/u)	0.7
^a Cebador A	0.3
^b Cebador B	0.3
Taq-polimerasa (5U/µl)	0.5
ADN	2.0
Volume final	15

^a ^bCebador A y B

Gen *bgm-1*: DOR21A y DOR 21B (10µl)

Gen *bc-3*: BC3-R y BC3-F (10µl)

Cuadro 2. Mezcla de reacción para la amplificación del SCAR para el gen *I*.

Componentes	1 reacción (μ l)
Agua	10.6
Buffer (5X) + Mg Cl ₂ (25 mM)	5.0
dNTPs (4 mM c/u)	1.5
Cebador W13-7XP	1.2
Cebador W13-4RP	1.2
Taq-polimerasa (5U/ μ l)	0.5
ADN	5.0
Volume final	25

Anexo 6. Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR para el gen *bgm-1* (Método de la Universidad de Puerto Rico).

Perfil térmico para la PCR del SCAR SR2

N°	Paso	Temperatura (C°)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización (denaturalization)	94	30 seg	1
2	Desnaturalización (denaturalitaton)	94	1 min	35
	Acoplamiento (annealing)	60	1 min	35
	Elongación (polimerization)	72	3 min	35
3	Elongación final	72	5 min	1

Perfil de programación del termociclador para la PCR del SCAR SR2

N°	Paso (step)	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)/ciclo
1	1	94	00:00:30
2	2	94	00:01:00
3	3	60	00:01:00
4	4	72	00:03:00
5	5		34 veces al paso 1
6	6	72	00:05:00
7	7	4	00:00:00
8	8	Final	

Anexo 7. Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR para el gen *bc-3*.

Perfil térmico para la PCR del SCAR ROC11

Nº	Paso	Temperatura (Cº)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización (denaturalitation)	94	10 seg	34
	Acoplamiento (annealing)	55	40 seg	34
	Elongación (polimerization)	72	2 min	34
2	Elongación final	72	5 min	1

Perfil de programación del termociclador para la PCR del SCAR ROC11

Nº	Paso (step)	Temperatura (º C)	Tiempo (hh:mm:ss)/ciclo
1	1	94	00:00:10
2	2	55	00:00:40
3	3	72	00:02:00
4	4		33 veces al paso 1
5	5	72	00:05:00
6	6	4	00:00:00
7	7	Final	

Fuente: USDA (2000). PCR Protocol (en línea).

<http://www.usda.prosser.wsu.edu/Scartable3.htm> (Febrero,2001).

Anexo 8. Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR para el gen *I*.

Perfil térmico para la PCR del SCAR SW13

Nº	Paso	Temperatura (Cº)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización (denaturalitation)	94	10 seg	34
	Acoplamiento (annealing)	67	40 seg	34
	Elongación (polimerization)	72	2 min	34
2	Elongación final	72	5 min	1

Perfil de programación del termociclador para la PCR del SCAR SW13

Nº	Paso (step)	Temperatura (º C)	Tiempo (hh:mm:ss)/ciclo
1	1	94	00:00:10
2	2	67	00:00:40
3	3	72	00:02:00
4	4		33 veces al paso 1
5	5	72	00:05:00
6	6	4	00:00:00
7	7	Final	

Fuente: USDA (2000). PCR Protocol (en línea).
<http://www.usda.prosser.wsu.edu/Scartable3.htm> (Febrero,2001).

Anexo 9. Electroforesis para la amplificación de ADN.

Preparación de geles al 1% de agarosa

1. Agregar 170 ml de buffer TBE 0.5X + 1.7 g de agarosa (1%) en un erlenmeyer, para bandejas de 22 o 40 orificios; ó 320 ml de buffer TBE 0.5X + 3.2 g de agarosa, para bandejas dobles.
2. Colocar el erlenmeyer en un horno microondas por 3 min. Retirar el erlenmeyer, agitarlo levemente y colocarlo de nuevo en el horno microondas por 1 min, usando guantes resistentes al calor.
3. Retirar el erlenmeyer del microondas y colocarlo en una bandeja con agua. Verificar la temperatura introduciendo un termómetro.
4. Cuando la temperatura baje entre 60-55°C agregar 2 µl de bromuro de etidio y vaciar la solución de agarosa y buffer TBE en una bandeja de electroforesis para correr las muestras. Colocar los peines de inmediato y dejar solidificar por 30-60min.

* Agarosa de pureza normal gelatiniza a 36-42°C.

* Buffer TBE (Trisborate).

* Para detalles de porcentaje de agarosa, revisar manuales; este varía de acuerdo a las características de las muestras (ADN, proteína, etc.), el tamaño del gel, el equipo de electroforesis y otros factores.

Electroforesis

1. Colocar 25 µl de cada muestra de ADN amplificado en cada orificio del gel.
2. Dejar correr la electroforesis de 1 a 1.5 horas a 140 V (depende del cebador utilizado).
3. Transferir la gel al transiluminador, usando guantes de latex desechables.
4. Revisar el nivel de tinción de las bandas en el transiluminador de rayo ultravioleta (UV).
5. Fotografiar las geles.

* El bromuro de etidio es altamente cancerígeno.

* Proteger los ojos y la piel de los rayos UV, usando equipo apropiado al visualizar y fotografiar los geles en el transiluminador.

* Para detalles del voltaje y tiempo de electroforesis, revisar manuales. Estos varían de acuerdo al tamaño del gel, el equipo, la estabilidad del voltaje y otros factores.

Anexo 10. Resultados de evaluación de plantas F2 usando marcadores moleculares SCAR para la resistencia a VMCF, VMDAF y VMSF.

Programa de Investigación en Frijol								
Población F2		Población MPS 501 1-100(84 pl)						
Julio 2001		Población MPS 502 101-200(76 pl)						
		Gen <i>bgm-1</i>			Gen <i>bc-3</i>		Gen <i>I</i>	
Nº T	IDENT.	R	H	S	R	S	R	S
1	1			+	+			+
2	3			+	+			+
3	4			+	+			+
4	7			+	+			+
5	12			+	+			+
6	14			+	+			+
7	15			+	+			+
8	17			+		+		+
9	22			+	+			+
10	25			+		+		+
11	26			+	+			+
12	27			+	+			+
13	28			+	+			+
14	29			+		+		+
15	30			+	+			+
16	31			+	+			+
17	32			+	+			+
18	33			+		+		+
19	35			+		+		+
20	36			+		+		+
21	38			+		+		+
22	39			+		+		+
23	40			+	+			+
24	41			+	+			+
25	42			+	+			+
26	43			+	+			+
27	44			+		+		+
28	45			+	+			+
29	46			+		+		+
30	47			+		+		+
31	49			+		+		+

Nº T	IDENT.	R	H	S	R	S	R	S
32	50			+	+			+
33	51			+	+			+
34	52			+	+			+
35	53			+		+		+
36	54			+		+		+
37	56			+	+			+
38	57			+	+			+
39	58			+	+			+
40	59			+	+			+
41	60			+		+		+
42	61			+	+			+
43	62			+	+			+
44	63			+	+			+
45	64			+	+			+
46	66			+	+			+
47	69			+	+			+
48	70			+	+			+
49	71			+	+			+
50	72			+	+			+
51	73			+		+		+
52	74			+	+			+
53	75			+	+			+
54	76			+	+			+
55	77			+	+			+
56	78			+	+			+
57	79			+	+			+
58	80			+	+			+
59	81			+	+			+
60	82			+		+		+
61	83			+		+		+
62	84			+		+		+
63	86			+	+			+
64	87			+	+			+
65	88			+		+		+
66	89			+		+		+
67	90			+		+		+
68	92			+		+		+
69	93			+		+		+
70	94			+		+		+
71	95			+		+		+
72	96			+	+			+
73	97			+		+		+
74	98			+		+		+
75	99			+		+		+

Nº T	IDENT.	R	H	S	R	S	R	S
76	100			+	+			+
77	101			+		+		+
78	102			+		+		+
79	104			+	+			+
80	105			+	+			+
81	106			+	+			+
82	107			+	+			+
83	108			+		+		+
84	110			+	+			+
85	111			+	+			+
86	112			+	+			+
87	113			+	+			+
88	114			+		+		+
89	115			+	+			+
90	117			+		+		+
91	118			+		+		+
92	119			+	+			+
93	121			+	+			+
94	125			+	+			+
95	126			+		+		+
96	127			+	+			+
97	128			+	+			+
98	129			+	+			+
99	130			+	+			+
100	133			+	+			+
101	134			+	+			+
102	135			+		+		+
103	136			+	+			+
104	137			+	+			+
105	138			+		+		+
106	139			+	+			+
107	140			+	+			+
108	141			+		+		+
109	142			+		+		+
110	143			+		+		+
111	144			+	+			+
112	145			+	+			+
113	146			+	+			+
114	147			+	+			+
115	148			+		+		+
116	149			+	+			+
117	150			+	+			+
118	151			+	+			+
119	152			+	+			+

Nº T	IDENT.	R	H	S	R	S	R	S
120	153			+	+			+
121	154			+		+		+
122	155			+	+			+
123	157			+	+			+
124	158			+	+			+
125	160			+	+			+
126	162			+		+		+
127	163			+		+		+
128	164			+		+		+
129	165			+		+		+
130	167			+	+			+
131	168			+		+		+
132	169			+	+			+
133	170			+	+			+
134	171			+	+			+
135	173			+	+			+
136	174			+	+			+
137	175			+	+			+
138	176			+	+			+
139	177			+	+			+
140	179			+	+			+
141	180			+	+			+
142	181			+	+			+
143	182			+	+			+
144	183			+	+			+
145	185			+	+			+
146	186			+		+		+
147	187			+	+			+
148	188			+		+		+
149	189			+		+		+
150	190			+		+		+
151	191			+		+		+
152	192			+	+			+
153	193			+	+			+
154	194			+	+			+
155	195			+		+		+
156	196			+		+		+
157	197			+		+		+
158	198			+		+		+
159	199			+	+			+
160	200			+	+			+
TOTAL		0	0	160	103	57	0	160

+ = genotipo presente

Anexo 11. Resultados de evaluación de líneas F6 de la población BCH.

Programa de Investigación en Frijol									
Población BCH F6					Líneas F6				
Fecha: Abril 2001					Nº líneas= 32				
Nº T	# P	IDENT.	Gen <i>bgm-1</i>			Gen <i>bc-3</i>		Gen <i>I</i>	
			R	H	S	R	S	R	S
1	10	BCH 9901-3	+			+			+
2	11	BCH 9901-6	+				+		+
3	12	BCH 9901-7	+				+	+	
4	13	BCH 9901-9	+				+	+	
5	14	BCH 9901-10	+				+	+	
6	15	BCH 9901-12	+				+	+	
7	16	BCH 9901-14	+			+		+	
8	17	BCH 9901-36	+			+		+	
9	18	BCH 9901-38R	+			+		+	
10	19	BCH 9901-39			+		+	+	
11	20	BCH 9901-53			+	+		+	
12	21	BCH 9901-54			+	+			+
13	22	BCH 9901-56R	+			+		+	
14	23	BCH 9901-57		+		+		+	
15	24	BCH 9901-60	+			+			+
16	25	BCH 9901-61	+					+	
17	26	BCH 9901-62	+				+	+	
18	27	BCH 9901-64			+	+		+	
19	28	BCH 9901-65	+				+	+	
20	29	BCH 9901-66			+	+		+	
21	30	BCH 9901-71	+			+		+	
22	31	BCH 9901-72		+		+		+	
23	32	BCH 9902-17B-1R	+			+		+	
24	33	BCH 9902-17B-2R	+			+		+	
25	34	BCH 9902-30			+	+		+	
26	35	BCH 9902-39A			+	+		+	
27	36	BCH 9902-44		+			+	+	
28	37	BCH 9902-47	+			+		+	
29	38	BCH 9902-48		+			+	+	
30	39	BCH 9902-68A			+		+		+
31	40	BCH 9902-68B			+		+	+	
32	41	BCH 9903-46			+			+	
33	42	BCH 9903-58A			+	+		+	
		TOTAL	18	4	11	19	12	28	5

Anexo 12. Resultados de evaluación de líneas F6 de la población BC3.

Programa de Investigación en Frijol									
Población BC3 F6							Líneas F6		
Fecha: Abril 2001							N° líneas= 35		
N° T	# P	IDENT.	Gen <i>bgm-1</i>			Gen <i>bc-3</i>		Gen <i>I</i>	
			R	H	S	R	S	R	S
1	43	BC3 9911-30			+	+			+
2	44	BC3 9911-31	+			+		+	
3	45	BC3 9911-39			+	+			+
4	46	BC3 9911-40			+		+		+
5	47	BC3 9911-42			+		+	+	
6	48	BC3 9911-45	+				+	+	
7	49	BC3 9911-64		+			+	+	
8	50	BC3 9912-12	+				+	+	
9	51	BC3 9912-23	+				+		+
10	52	BC3 9912-37	+				+		+
11	53	BC3 9912-41	+			+		+	
12	54	BC3 9913-32	+				+	+	
13	55	BC3 9913-52	+				+		+
14	56	BC3 9913-83	+				+		+
15	57	BC3 9914-1	+				+		+
16	58	BC3 9914-10	+				+		+
17	59	BC3 9914-11	+				+		+
18	60	BC3 9914-16			+		+	+	
19	61	BC3 9914-17	+				+	+	
20	62	BC3 9914-18	+				+	+	
21	63	BC3 9914-34A			+		+		+
22	64	BC3 9914-34B			+		+	+	
23	65	BC3 9914-37	+				+		+
24	66	BC3 9914-46			+		+	+	
25	67	BC3 9914-49	+				+		+
26	68	BC3 9914-54			+		+	+	
27	69	BC3 9914-56	+				+	+	
28	70	BC3 9914-58A			+		+	+	
29	71	BC3 9914-58B			+		+	+	
30	72	BC3 9914-65			+		+		+
31	73	BC3 9914-71	+				+		+
32	74	BC3 9914-73			+	+		+	
33	75	BC3 9914-76	+				+		+
34	76	BC3 9914-77	+				+	+	
35	77	BC3 9914-80	+					+	
		TOTAL	21	1	13	5	30	19	16

