ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Luwbia Ludmila Aranda Rocha

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2000

RESUMEN

Aranda R., Luwbia L. 2000. Uso de marcadores -moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al Virus del Mosaico Dorado Amarillo en frijol común. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 81 p.

El 77% de la producción mundial de frijol común *(Phaseolus vulgaris* L.) se genera en países subdesarrollados. Ésta es afectada por el Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF), que causa del 20-80% de pérdidas en rendimiento. El gen mayor *bgm-1* de resistencia a esta enfermedad, puede ser introducido mediante mejoramiento genético tradicional; sin embargo, la selección de plantas de frijol portadoras del mismo es más eficiente, usando marcadores moleculares como SCAR ligado a este gen. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología para el uso de marcadores moleculares como herramienta en el mejoramiento genético de frijol común, con énfasis en la resistencia al VMDAF. Los materiales genéticos usados para la adaptación de protocolos, fueron variedades de frijol portadoras y no portadoras del gen *bgm-l;* plantas de poblaciones F2 segregantes para este gen; y familias F5. Para la identificación de genotipos portadores del gen en laboratorio, se usaron equipos, instrumentos, buffer y reactivos moleculares necesarios para la extracción, cuantificación, dilución, amplificación y separación de ADN. Para la identificación fenotípica, se evaluó en Comayagua la reacción de éstas al VMDAF. Los métodos adaptados para la extracción y amplificación del ADN provienen del CIA T y de la Universidad de Puerto Rico, respectivamente. La mejor combinación de factores en la separación de ADN resultó en gel de agarosa al l %, buffer TBE 0.5X, y 150 V por 1 :30 hr. De las 125 plantas F2 evaluadas en el laboratorio con el marcador SCAR ligado al gen *bgm-l,* 27 fueron resistentes y 98 susceptibles al VMDAF, con una segregación genotípica ajustada a los modelos 1:2:1 y 3:1; mientras que de las evaluadas en el campo, 30 resultaron resistentes y 95 susceptibles, con ajuste al modelo 3:1. De las 54 familias F5 evaluadas en el laboratorio y en el campo, siete resultaron resistentes y 47 susceptibles. Los resultados muestran que las evaluaciones de laboratorio tienen un ajuste medio con las de campo; y sugieren el uso de SCAR como herramienta en el mejoramiento de frijol en Zamorano.

Palabras claves: Alelos recesivos, evaluación genotípica, gen *bgm-l,* segregación fenotípica, segregación genotípica, técnicas moleculares.

NOTA DE PRENSA

MARCADORES MOLECULARES AYUDAN EN LA SELECCIÓN DE PLANTAS RESISTENTES AL VIRUS DEL MOSAICO DORADO AMARILLO DEL FRIJOL

En Honduras y Centro América. la producción de frijol es afectada por diferentes virus. Uno de ellos es el Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF), enfermedad que causa pérdidas severas en el rendimiento de este cultivo. El agente causal de esta enfermedad es un geminivirus, el cual es trasmitido por la mosca blanca.

Para obtener variedades de frijol resistentes al VMDAF, se realizan cruzas entre padres resistentes y los descendientes se seleccionan siguiendo procedimientos tradicionales de mejoramiento genético, hasta obtener variedades resistentes a este virus y con otras características deseables. El proceso de selección podría ser más eficiente con la ayuda de los marcadores moleculares tipo SCAR (Región Amplificada de Secuencia Caracterizada), ligados al gen recesivo *bgm-1* de resistencia del VMDAF.

En un estudio realizado en Zamorano y en Comayagua, mediante el análisis genético en laboratorio y el fenotípico en el campo, se determinó que los marcadores moleculares se pueden utilizar eficientemente en la selección de plantas de frijol por resistencia al VMDAF. .

El estudio se realizó con plantas y familias avanzadas de frijol (generaciones F2 y F5, respectivamente). Las evaluaciones en laboratorio con marcadores moleculares SCAR y en el campo mediante observación visual, resultaron con una eficiencia similar en la detección de plantas con resistencia al VMDAF.

El estudio concluye que sí es factible el uso de marcadores moleculares SCAR como herramienta en el mejoramiento de frijol en Zamorano, para la obtención de nuevas variedades resistentes a este virus.

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Autoría	ii
	Página de firmas	iii
	Dedicatoria	iv
	Agradecimientos	v
	Agradecimientos a patrocinadores	vi
	Resumen	vii
	Nota de prensa	viii
	Contenido	ix
	Índice de Cuadros	xi
	Índice de Figuras	xiv
	Índice de Anexos	xv
1.	**INTRODUCCIÓN**	1
1.1	OBJETIVOS	2
1.1.1	Objetivo general	2
1.1.2	Objetivos específicos	2
2.	**REVISIÓN DE LITERATURA**	3
2.1	IMPORTANCIA DEL FRIJOL	3
2.2	VIRUS DEL MOSAICO DORADO AMARILLO DEL FRIJOL (VMDAF)	5
2.2.1	Importancia	5
2.2.2	Distribución geográfica	5
2.2.3	Virus Causal	7
2.2.3.1	Gemivirus	7
2.2.3.2	Clasificación de gemivirus	7
2.2.3.3	Epidemiología	7
2.2.4	Sintomatología	8
2.2.5	Control	8
2.2.6	Resistencia genérica	9
2.2.6.1	Control cultural	9
2.2.6.2	Control biológico	11
2.2.6.3	Control legal	11
2.2.6.4	Control químico	11
2.2.6.5	LA MOSCA BLANCA *(Bemisia tabaci)*	12
2.3	Importancia	12
2.3.1	Taxonomía	12
2.3.2		12

	Biología	13
2.3.3	Ciclo de vida	13
2.3.4	Tiempo de desarrollo	13
2.3.5	Plantas hospederas	14
2.3.6	Biotipos	14
2.3.7	Control de la mosca blanca	14
2.3.8	MARCADORES PARA EL FITOMEJORAMIENTO	15
2.4	Marcadores moleculares	16
2.4.1	Tipos de marcadores moleculares	17
2.4.2	Marcadores moleculares utilizados para el mejoramiento genético de	
2.4.3	fríjol	17
2.4.4	Uso de marcadores moleculares tipo SCAR	18
2.4.4.1	Extracción de ADN	18
2.4.4.2	Amplificación de ADN	19
2.4.4.3	Separación de ADN	19
2.5	PRINCIPIOS GENÉTICOS DE SEGREGACIÓN APLICADOS AL FITOMEJORAMIENTO	20
2.5.1	Principios Mendelianos	21
2.5.2	Cruzas monohíbridas	22
2.5.3	Alelos recesivos	22
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS	24
3.1.1	Localización del estudio	24
3.1.2	Características del germoplasma	24
3.1.3	Variables evaluadas y su medición	25
3.1.4	Siembra	25
3.1.5	Muestreo	25
3.1.6	Equipo y material de laboratorio	25
3.1.7	Adaptación de la extracción de ADN	26
3.1.8	Adaptación de la amplificación de ADN	27
3.1.9	Adaptación de la separación de ADN	27
3.2	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE PLANTAS F2 Y FAMILIAS F5 DE FRIJOL	28
3.2.1	Localización del estudio	28
3.2.2	Características del germoplasma	28
3.2.2.1	Plantas F2	28
3.2.2.2	Familias F5	29
3.2.3	Siembra	29
3.2.4	Variables y su medición	30
3.2.4.1	Campo	30
3.2.4.2	Laboratorio	30
3.2.5	Muestreo	31
3.2.5.1	Evaluación de campo	31
3.2.5.2	Evaluación de laboratorio	31
3.2.5.2.1	Extracción de ADN	31
3.2.5.2.2	Cuantificación y dilución de ADN	31

3.2.5.2.3	Amplificación de ADN	32
3.2.5.4.4	Separación de ADN.....	32
3.2.5.2.5	Visualización y registro de resultados.....	32
3.2.6	Análisis Estadístico..	32
4.	**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**.....	33
4.1	ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS	33
4.1.1	Extracción de ADN	33
4.1.2	Amplificación de ADN (PCR).....	34
4.1.3	Separación de ADN (electroforesis).	35
4.2	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS F2 Y DE FAMILIA F5 DE FRIJOL.....	37
4.2.1	Plantas F2.....	37
4.2.1.1	Evaluación genotípica y fenotípica-molecular de la reacción de plantas F2 al VMDAF	38
4.2.1.2	Evaluación fenotípica de campo de la reacción de plantas F2 al VMDAF.....	39
4.2.1.3	Comparación de la segregación genética-molecular (marcadores SCAR) y la fenotípica (observación de campo) de plantas F2, por su resistencia al VMDAF	40
4.2.1.4	Correlación entre la evaluación genética-molecular (marcadores SCAR) y la fenotípica (observación de campo).....	41
4.2.2	Poblaciones F5 (PRF-98 Y CIAT).....	41
4.2.2.1	Evaluación genotípica molecular de la reacción de familias F5 al VMDAF	41
4.2.2.2	Evaluación fenotípica de campo de la reacción de familias F5 al VMDAF.	43
4.2.2.3	Correlación entre la evaluación genética molecular (marcadores SCAR) y la fenotípica (observación de campo).	43
5	**CONCLUSIONES**.....	45
6	**RECOMENDACIONES .....**	46
7	**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....	47
8	**ANEXOS**..... .	51

1. INTRODUCCIÓN

El fríjol común *(Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de grano más importante para pequeños agricultores en los países subdesarrollados (América Latina, África y Asia), quienes generan el 77% de la producción mundial de este grano. En países desarrollados (América del Norte, Europa y la región Pacífica), el fríjol es cultivado con altas tecnologías y principalmente para exportación, representando el 23% de la producción mundial. El grano de fríjol es un componente esencial de la dieta de la población rural y de la urbana en países pobres y subdesarrollados (Rosas, 1998); en América Latina, representa una de las fuentes más importantes de calorías (340 cal/100g) Y proteínas (15-35%), (CIAT, 1994). A diferencia de la proteína animal, las fuentes de proteína vegetal como el fríjol generalmente son de bajo costo (Rodríguez, 1996).

En la actualidad, el cultivo del fríjol es susceptible a varios virus que afectan su productividad. La situación geográfica de las regiones tropicales y subtropicales de América Central, México y El Caribe hace posible su producción en diferentes épocas del año, lo que favorece el desarrollo continuo de enfermedades virales y de altas poblaciones de insectos vectores (Morales, 1999). El Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF) causa una enfermedad que se encuentra entre los mayores factores limitantes de la producción de fríjol en estas regiones. En Honduras, su importancia se debe a los daños severos causados al cultivo y a que su incidencia se ha incrementado en los últimos años, convirtiéndose en una enfermedad peligrosa en distintas regiones productoras de este grano básico (EAP, 1994).

Según Kelly *et al.* (1994), el mejoramiento genético tradicional del fríjol ha contribuido a la generación de variedades con mayor rendimiento, pero su éxito ha sido limitado por el tiempo necesario para la expresión de caracteres deseables que puedan ser identificados, seleccionados y usados, como los asociados a la resistencia a enfermedades. Varios autores aseguran que el fitomejoramiento tradicional sería más eficiente si se usaran como herramienta marcadores moleculares ligados a genes de resistencia, con el fin de seleccionar las líneas más rápidamente y en ausencia de patógenos.

En la actualidad se han identificado genes mayores de resistencia al VMDAF, como el *bgml,* que puede ser introducido mediante mejoramiento genético tradicional. Mediante técnicas moleculares empleando marcadores tipo SCAR (siglas en inglés de región amplificada de secuencia caracterizada, en relación al ADN), se puede determinar si un genotipo tiene el gen *bgm-l,* evitando llevar al campo una cantidad excesiva de material y reduciendo el tiempo y costos de investigación, ya que la evaluación y selección por resistencia se realiza a nivel de laboratorio.

En general, el trabajo con marcadores moleculares es útil porque se pueden usar en la selección mediante la identificación de genes, trabajo que tradicionalmente se hace de forma visual en líneas de mejoramiento segregantes. La aplicación de esta herramienta en el fitomejoramiento es generalmente conocida como selección asistida por marcadores (SAM), (Singh, 1996).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Desarrollar la metodología para el uso de marcadores moleculares tipo SCAR, como herramienta en el mejoramiento genético del fríjol común en la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano.

1.1.2 Objetivos específicos

l. Adaptar protocolos de técnicas moleculares para el uso de marcadores moleculares tipo SCAR en la selección asistida por marcadores del Programa de Investigaciones en Frijol.

2. Caracterizar molecularmente con marcadores moleculares tipo SCAR, generaciones tempranas y avanzadas de genotipos de mejoramiento de fríjol común por la presencia del gen *bgm-1* de resistencia al Virus del Mosaico Dorado Amarillo.

3. Evaluar la reacción fenotípica al Virus del Mosaico Dorado de generaciones tempranas y avanzadas de líneas de mejoramiento de fríjol común, para correlacionarla con la caracterización genotípica del gen *hgm- J* de resistencia a esta enfermedad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA DEL FRIJOL

El fríjol es una leguminosa considerada una de las fuentes principales de proteína vegetal (24%), aunque su contenido puede variar de acuerdo a la variedad. Su grano posee un alto valor nutricional, concentrando en sus cotiledones la mayoría de sus componentes químicos incluyendo carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y minerales (Cuadro 1), (CIAT, 1991). Adicionalmente, esta leguminosa es rica en fibras naturales y otros elementos, por lo que es un buen complemento a la alimentación con cereales y otras fuentes de carbohidratos (Singh, 1996).

A nivel mundial, la producción y consumo del fríjol común son mayores que los de otras leguminosas con excepción de la soya *(G1ycine max* (L.) Merr.) y el maní *(Arachis hypogaea* L.). Estudios clínicos realizados en los Estados Unidos indican que el fríjol es muy efectivo en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, hipertensión, cáncer y enfermedades del tracto digestivo (Singh, 1996).

Cuadro 1. Valor nutritivo del fríjol comparado con otros alimentos.

	Componente				
Alimento	Agua (%)	Calorías (p/100g)	Proteínas (%)	Grasas (%)	Carbohidratos (%)
Frijol	11.0	341	22.1	1.7	61.4
Soya	8.0	654	38.0	18.0	31.3
Arroz	13.0	360	6.7	0.7	78.9
Maíz	12.0	360	9.3	4.0	73.5
Trigo	13.0	360	6.7	0.0	78.9
Harina de yuca	11.0	338	3.8	0.6	81.5
Huevos	74.0	158	13.0	11.0	0.7
Leche entera en polvo	2.5	498	27.5	2.6	28.0
Carne de res	67.0	198	19.0	13.0	0.0
Pescado	65.0	75	16.4	0.5	0.0

Fuente: CIAT, 1991 (tomado de Zaumeyer, 1968)

De acuerdo a: la variedad y costumbres locales, el fríjol se consume como hojas tiernas (África), vainas verdes (habichuelas), granos verdes y granos secos, aunque su consumo más generalizado es en las dos últimas formas (Singh, 1996; Voysest, 1983).

Según Singh (1996), los principales productores y consumidores de fríjol en forma de grano seco son América Latina (45%) y África (25%). Los otros productores son América del Norte (13%), Europa (8%) y Asia (9%). En América Latina, los principales países productores y consumidores son Brasil (>5.3 millones ha) y México (1.8 millones ha), mientras que en Colombia, Argentina y Nicaragua se siembran entre 150 y 250,000 ha.

El país mayor productor de fríjol en el mundo es Brasil, donde el consumo *per capita* es de aproximadamente 20 kg/año. El segundo país productor de fríjol en América Latina es México, donde se consumen alrededor de 1.2 millones de toneladas métricas de fríjol por año. En este país, generalmente la demanda interna no puede ser satisfecha debido a la baja productividad del cultivo. Aunque en los Estados Unidos se siembra la mitad del área cultivada por México, sus productores obtienen una mayor producción por unidad de superficie. La baja productividad del cultivo no sólo se presenta en México sino en el resto de América Latina, donde el promedio de 700 kg/ha es significativamente inferior a los 1,600 kg/ha obtenidos en los Estados Unidos, como consecuencia de los problemas bióticos y abióticos que afectan al cultivo, y de la falta de recursos de los productores para afrontar estos factores adversos. En estas regiones donde el clima es cálido, el fríjol se produce a una altitud que oscila entre los 0-1200 msnm, donde varias enfermedades incluyendo el Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF) alcanzan su mayor incidencia (CIAT, 1994).

En América Latina, el fríjol es importante por su contribución de proteína y calorías a la dieta alimenticia diaria. En esta región, que es el centro de origen de esta especie, se producen más de cuatro millones de toneladas de fríjol por año equivalente al 88% de su producción en el trópico. Actualmente, en Centro América se cultivan más de 480,000 ha con fríjol de los tipos comerciales negro, rojo, moteado y rosado, en las que se producen 461,000 TM. En esta región, el rendimiento promedio es inferior a los 700 kg/ha (Viana, 1999) y el consumo *per cápita* es de 9.8 kg/año (Rosas, 1998), siendo incluido hasta tres veces por día en la alimentación de la mayoría de estos países (CIAT, 1994).

En Honduras esta leguminosa es consumida por familias de escasos recursos, y entre los granos básicos ocupa el segundo lugar después del maíz en superficie sembrada y cantidad incluida en la dieta de la población (SAG, 1998). El 75% del fríjol producido en este país es cultivado por productores de pequeña escala, y su consumo *per cápita* varía según la disponibilidad y estrato social en cantidades que van desde 9 a 21 kg/año, para un promedio de 11.6 kg/año (Escoto, 2000; SAG, 1998).

2.2 VIRUS DEL MOSAICO DORADO AMARILLO DEL FRIJOL (VMDAF)

Morales (2000), indica que en la actualidad el mosaico del fríjol observado en Latinoamérica no es una sola especie de virus como se creía, sino que existen dos especies que causan síntomas parecidos. Estas especies son el Virus del Mosaico Dorado del Frijol (VMDF), de origen suramericano, y el Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF), originario de la región Mesoamericana. Ambos virus están clasificados como especies del género *Begomovirus* (siglas en inglés por *"bean golden mosaie virus").* La diferencia entre ellas radica en que los aislamientos del VMDAF son transmitidos por mosca blanca *(Bemisia tabaci)* y mecánicamente, mientras que los aislamientos del VMDF sólo son transmitidos por *B. tabaci.*

2.2.1 Importancia

Morales (1999), señala que la incidencia de virus del fríjol en América es mayor en zonas de producción localizadas desde el nivel del mar hasta los 1000 m, donde hay más hospederos alternas e insectos vectores. Las principales enfermedades virales en estas regiones son causadas por geminivirus transmitidos por la mosca blanca, siendo el VMDAF una de las más importantes por su amplia distribución geográfica y efecto sobre el rendimiento.

Según el CIAT (1994), el VMDAF es una de las enfermedades más devastadoras en la historia de la agricultura latinoamericana, donde este virus y su vector la mosca blanca, han sido declarados las mayores pestes del Siglo XX. El VMDAF causa infecciones que reducen el número de vainas por planta y de semillas por vaina, así como el peso de las semillas (Rosas, 1998), resultando en pérdidas de producción que varían entre el 20 y 80% (Morales, 1999), y pueden alcanzar hasta el 100% (SAG, 1998).

En Honduras, estudios realizados por el Programa Nacional de Frijol sobre la distribución de las enfermedades del cultivo han permitido identificarlas y priorizarlas, resultando las más importantes el VMDAF, la mustia hilachosa *(Thanatephorus cucumeris),* la bacteriosis *(Xanthomonas eampestris* pv. *phaseoli)* y la mancha angular *(Phaeoisariopsis gríseo/a),* (SAG, 1998).

2.2.2 Distribución geográfica

El nombre "Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol" (del inglés *"Bean Golden Yellow Mosaie")* fue usado por primera vez por Bird *et al.* (1972), al referirse al amarillamiento intenso que presentaban los frijoles lima *(Phaseolus lunatus* L.) Y común en la isla de Puerto Rico. Sin embargo, recientemente se usaba el nombre VMDF para referirse al VMDAF, debido al parecido de los síntomas producidos por ambos virus en cultivos de frijol en países Latinoamericanos (Morales, 2000).

La diseminación cronológica del VMDAF continuó por El Caribe y en 1972 fue detectado en la Isla de La Hispaniola en Haití (Prophete, 1994). Actualmente, esta enfermedad está distribuida en todos los países centroamericanos. En Costa Rica apareció en 1960, en Nicaragua se le observó a inicios de 1970 y en Honduras fue identificado en los años 80s, siendo una limitante de la producción de fríjol en Costa Rica y Honduras hasta 1987 y 1990, respectivamente (Gámez, 1970). En México, el VMDAF fue observado desde 1977, y se ha reportado su diseminación a varias regiones productoras de fríjol (López-Salinas y Becerra, 1994).

El VMDAF se observó por primera vez en Honduras en 1985, en la región sur-oriental del país (valles de Siria y de El Zamorano), con una incidencia baja y severidad moderada. En la época de producción de postrera (agosto-diciembre) de 1989, se reportó su incidencia en un rango de 10-1000.10 en regiones productoras de fríjol del país (Escoto, 2000). Según este informe, las siembras de este ciclo son las más afectadas por el VMDAF, principalmente en las regiones de producción Centro-oriental (departamentos de El Paraíso y Francisco Morazán), Nor Oriental (Olancho), Centro-occidental (Comayagua) y Occidental (Copán) del país (Figura 1).

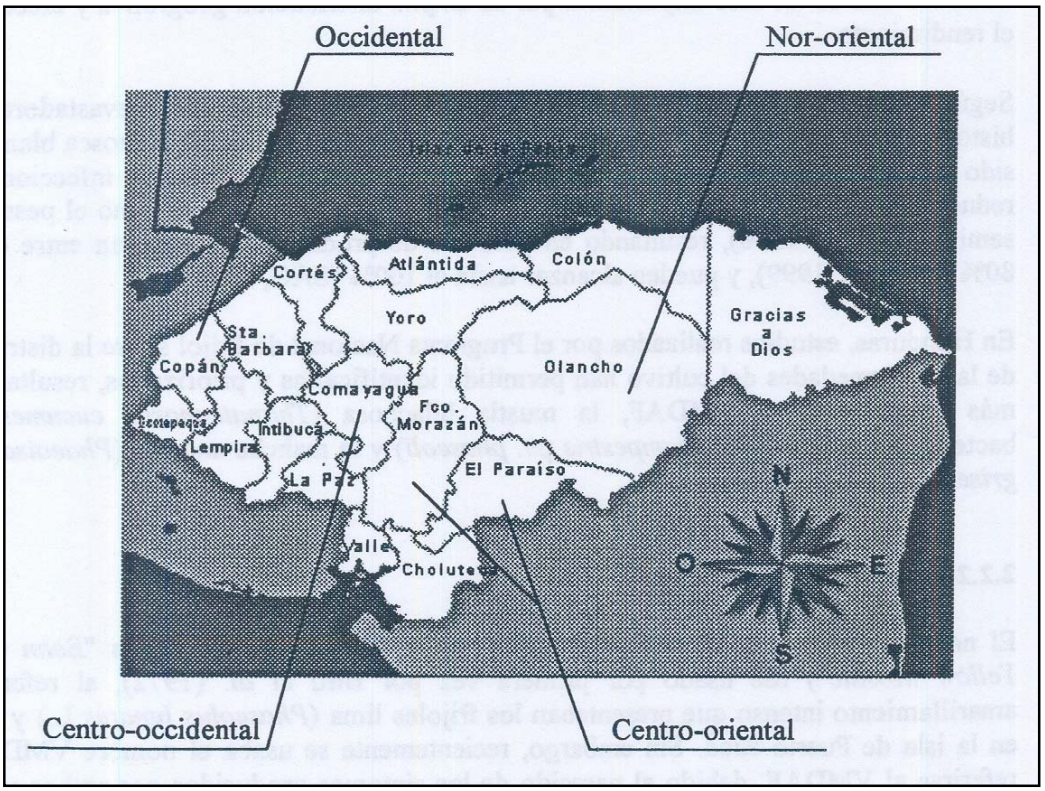


Figura 1. Distribución regional del VMDAF en el cultivo de fríjol en Honduras.

2.2.3 Virus causal

El VMDAF, agente causal de la enfermedad con el mismo nombre, permaneció más de una década sin ser identificado. La primera micro-fotografía de esta enfermedad fue tomada por Gálvez y Castaño en 1976, en Colombia, observándose que las partículas tenían forma isométrica con un diámetro de 18 nm y estaban en parejas (CIAT, 1994).

Estudios posteriores han descrito las partículas de este virus como cristalinas, de forma icosahédrica y con una sóla molécula de ADN circular, covalentemente correcta. Generalmente, estas partículas se encuentran organizadas en pares aplanadas en el punto de unión y miden IOx32 nm (largo por ancho), mientras que las partículas individuales tienen un diámetro de 12-20 nm (Castaño y Del Río, 1994; CIAT, 1994). Debido a sus características, el VMDAF ha sido reconocido en la clase de los Geminivirus (Castaño y Del Río, 1994).

2.2.3.1 Geminivirus. La mayoría de los virus de plantas (80-90%) tienen como componente genético ARN de cadena sencilla. Los demás virus fitopatógenos contienen ADN portando su genoma. Actualmente, existe una familia de virus fitopatógenos cuyo genoma se encuentra en moléculas de ADN de cadena sencilla circular y de dimensiones reducidas (cada cadena tiene de 2.5 a 3.0 kilobases, kb), la familia *Geminiviridae.* Esto virus se componen de una o dos moléculas de ADN por lo que el tamaño de genoma varía de 2.5-6.0 kb, lo que los coloca entre los virus más pequeños con genomas de replicación independiente, y como los únicos con genoma dividido (Rojas, 2000).

2.2.3.2 Clasificación de geminivirus. Según Rojas (2000), por su estructura genómica, el vector que los transmite y los hospederos que infectan, la familia *Geminiviridae* se divide en cuatro géneros. *Mastrevirus,* cuyo nombre se deriva del *Maize streak virus* (MSV); *Curtovirus,* del *Beet curly top virus* (BCTV); *Begomovirus,* del *Bean golden mosaic virus* (BGMV); y *Topocuvirus,* del *Tomato pseudo-curly top virus.* Los tres primeros están distribuidos en el Viejo y Nuevo Mundo, tienen uno o dos componentes genómicos, infectan solamente dicotiledóneas y son transmitidos por la mosca blanca incluyendo el biotipo B, conocido como *B. argentifolii;* mientras que el último es transmitido por el membrácido *Micrutalis malleifera.*

2.2.3.3 Organización genómica de los begomovirus. Los begomovirus tienen un genoma bipartito compuesto de ADN, denominados ADN-A y ADN-B, que codifican para las funciones virales necesarias para establecer la infección sistemática. Especies de este género tienen diferente organización genómica, lo que refleja la diversidad biológica (evolución) de los geminivirus (Rojas, 2000).

2.2.4 Epidemiología

Morales (1996), enfatiza que el VMDAF es la enfermedad más devastadora que han conocido los agricultores en las zonas bajas de América Latina. En Honduras, su importancia se debe a que su incidencia se ha incrementado en los últimos años, convirtiéndose en una enfermedad potencialmente peligrosa en distintas regiones del país. El VMDAF se presenta en áreas de producción localizadas a elevaciones menores de 1200 msnm, donde las temperaturas son elevadas y el inóculo más abundante (EAP, 1994). Su desarrollo es mayor en ambientes favorables, con temperaturas medias (18-25 °C) a altas (28°C), (SAG, 1998).

El VMDAF es una enfermedad no transmisible por medio de la semilla (Campos-Ávila, 1991). Su agente vector la mosca blanca, tiene hábitos alimenticios y reproductivos que varían en diversas especies de plantas, lo que sugiere la existencia de biotipos y razas del mismo. La mosca blanca adulta transmite el VMDAF en forma persistente-circulante, es decir que el virus adquirido por el insecto durante su alimentación circula dentro de su cuerpo a través del intestino y la hemolinfa hasta llegar a las glándulas salivales (Sponagel y Fúnez, 1994). No existen evidencias de que el virus se transmita por sus ovarios ni de que se multiplique dentro de la misma. Aunque *B. tabaci* no adquiere el virus tan rápido como los áfidos, tiene la capacidad de retenerlo por más de 20 días (Campos-Ávila, 1991).

El VMDAF causa una infección que afecta de manera específica el desarrollo de la planta en cada fase de desarrollo, es decir las hojas y tallos durante la fase vegetativa y de las vainas y semillas durante la reproductiva. El rendimiento del cultivo puede ser reducido por diferentes causas, incluyendo la susceptibilidad de la variedad, la edad en que la planta ës infectada, y la virulencia de la cepa del VMDAF presente (Rosas, 1998).

2.2.5 Sintomatología

Como reacción a la infección por el VMDAF y dependiendo de su susceptibilidad, las variedades de fríjol desarrollan en el follaje una coloración intensa amarilla brillante a dorada (u ocasionalmente un desteñimiento blanco casi transparente), la que generalmente se inicia en las nervaduras. Adicionalmente, las hojas pueden mostrar distorsión enrollándose hacia abajo, y rugosidad. Estos síntomas pueden presentarse con intensidad desde la segunda semana después de germinado el cultivo, en las etapas juveniles de la planta (primeras hojas trifoliadas), especialmente cuando la población de mosca blanca es alta (Rosas, 1998; Castaño y Del Río, 1994; Campos-Ávila, 1991). Algunas variedades tienen la capacidad de recuperarse, dependiendo de la etapa del cultivo al momento de la infección (Rosas, 1998).

Rosas (1998), afirma que la sintomatología causada por esta enfermedad en las etapas reproductivas puede incluir la deformación de las vainas; y la decoloración, malformación y reducción del tamaño y peso de las semillas. Algunas plantas pueden presentar enanismo y no producir vainas. La escala con que se evalúa los dados causados por el VMDAF al cultivo del fríjol es de tipo cualitativa, e incluye su nivel de incidencia y la severidad de sus síntomas. También se pueden utilizar una evaluación cuantitativa, considerando variables como el rendimiento.

2.2.6 Control

Según Morales (2000), el control del VMDAF ha sido difícil debido a las altas poblaciones de mosca blanca en las regiones productoras afectadas y al abuso en el empleo de pesticidas para su control, generando poblaciones resistentes; y a la patogenicidad extrema del virus.

2.2.6.1 Resistencia genética. El control genético del VMDAF implica el uso de variedades tolerantes o resistentes, capaces de producir bajo incidencia de la enfermedad sin sufrir pérdidas en el rendimiento.

Desde que se iniciaron las epidemias del VMDAF, se observó que no existían variedades de frijol inmunes a su incidencia (Morales, 2000). En términos generales, el control genético del VMDAF ha tenido un avance que se divide en cuatro etapas. En la primera se liberó en Guatemala tres variedades tolerantes a la enfermedad, "ICTA-Jutiapan" (DOR 42 = ICA-Pijao x Turrialbal), "ICTA-Quetzal" (DOR 41 = Porrillo sintético x ICA-Pijao) e "ICTA-Tamazulapa" (DOR 44 = línea hermana de ICA-Pijao x Turrialba 1), (Morales, 2000; Beebe, 1994). En la segunda etapa se desarrolló la variedad "ICTA-Ostúa", que presentaba un mejor nivel de resistencia en comparación a las anteriores. En la tercera se liberó en Centroamérica a la línea DOR 364, que fue la primera de grano rojo resultante de acumulación de genes de resistencia al virus. La cuarta etapa representa la nueva generación de líneas rojas, incluyendo DOR 482, 48~, 474 Y 476, así como la línea negra "ICTA ID 90-4". Estos últimos genotipos tienen genes derivados de la línea IIA 429", cuya resistencia se deriva de los genes de Parrillo Sintético; y del genotipo "Garrapato", proveniente de la raza Durango del reservorio Mesoamericano (Beebe, 1994).

Actualmente, el número de fuentes utilizadas para mejorar la resistencia del cultivo al VMDAF es reducido. Básicamente, existen tres fuentes de resistencia al VMDAF en la genealogía de líneas dorado resistentes a este virus. La primera es "Porrillo Sintético" y selecciones de esta variedad (porrillo fue la principal fuente de resistencia utilizada para obtener las variedades ICTA y líneas rojas DOR). La segunda es "BAT 1215", que es susceptible en la expresión del mosaico dorado pero logra producir vainas. La tercera y más consistente de las fuentes de resistencia al VMDF es A 429, que combina en su genoma los genes de Porrillo y Garrapato (Beebe, 1994).

El genotipo A 429, de grano pequeño y con color de semilla crema pintado, fue seleccionado por su arquitectura y nivel de resistencia al VMDAF en condiciones de campo (Singh *el al.,* 1991). Esta línea sigue siendo la mejor fuente de resistencia al VMDAF. Investigaciones han demostrado que el gen *bgm-J,* proveniente de su progenitor Garrapata, es responsable de la reacción de no-amarillamiento de A 429 ante la incidencia de la enfermedad (Blair y Beaver, 1993).

Según Beebe (1994), uno de los factores que ha dificultado el mejoramiento genético para el VMDAF en las variedades de fríjol rojo pequeño Mesoamericano, ha sido la necesidad de recombinar en su genoma diferentes clases comerciales de grano. Todas las fuentes originales de resistencia y las primeras variedades mejoradas para resistencia a esta enfermedad eran de color negro. Finalmente, después de dos ciclos cruzamientos se obtuvo la línea DOR 364, que aunque podía ser comercializada era de un color rojo oscuro que no es totalmente aceptado para el consumo. Después de otros dos ciclos de cruzamiento y selección, se obtuvo tonalidades más claras de grano rojo.

La SAG (1998), afirma que en Honduras se cultiva una amplia diversidad de variedades de fríjol, con tonalidades que varían de color rojo claro a negro. Con el fin de minimizar el riesgo de la pérdida del cultivo, en este país se recomienda la siembra de variedades mejoradas de grano rojo como Don Silvio, Dorado y Tío Canela-75 las que se adaptan mejor a mayor número de ambientes, principalmente a los que tienen problemas con el VMDAF incluyendo los valles de Orica y Siria (departamento de Francisco Morazán), Salamá y el Valle del Guayape (Olancho), y los departamentos de Comayagua y Copán (Cuadro 2).

Cuadro 2. Reacción a las principales enfermedades de las variedades mejoradas de fríjol en Honduras.

	Enfermedad[Z] y Reacción[Y]						
Variedad	VMCF	VMDAF	BAT	MH	ANT	ROY	MA
DICTA 113	R	I	I	I	I	I	I
DICTA 122	R	I	I	I	I	I	I
Tío Canela-75	R	R	I	I	I	I	S
Don Silvio	R	R	I	I	1	I	I
Dorado	R	R	I	I	I	I	I
Catrachita	R	I	S	S	I	I	S
Danlí 46	S	S	S	S	I	S	S
Chingo IR	R	S	S	S	S	S	S
Parrilla Sintético	R	I	S	S	S	I	S

Fuente: SAG (1998).
[Z] VMCF= Virus del Mosaico Común del Frijol; VMDAF= Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol; BAT= Bacteriosis Común; MH= Mustia Hilachosa; ANT= Antracnosis; ROY= Roya; MA= Mancha Angular
[Y] R= Resistente; 1= Intermedio; S= Susceptible

2.2.6.2 Control cultural. En varios países de Latinoamérica se ha evaluado la siembra de barreras vivas de maíz *(Zea mays L.)* y sorgo *(Sorghum bicolor* [L.] Moench) alrededor de campos de frijol, con el fin de evitar la llegada de la mosca blanca al cultivo; sin embargo, esta medida no ha demostrado una disminución significativa en la incidencia del geminivirus. Además, generalmente el uso de barreras vivas aumenta los costos de producción y obstaculiza las labores culturales (Morales, 2000).

La siembra de los cultivos trampa es una estrategia basada en que la mosca blanca prefiere ciertas especies vegetales, en las que se puede reproducir abundantemente. La preferencia de la mosca blanca por un cultivo varía por diferentes factores del eco sistema donde se encuentre, por lo que su comportamiento puede cambiar de una región a otra (Morales, 2000).

El cambio de la fecha de siembra es una práctica muy utilizada en varios países, y se basa en la información de la distribución temporal de la mosca blanca de acuerdo a fluctuación de sus poblaciones. Generalmente, las poblaciones más altas de mosca blanca se encuentran en los meses de escasa precipitación, cuando la temperatura y baja humedad ambiental son favorables para su desarrollo (EAP, 1994).

Las trampas pegajosas han sido aplicadas utilizando diversos modelos, como tableros de diferentes tamaños y cintas de diferentes longitudes y anchura, colocadas en puntos estratégicos del campo de cultivo. Los materiales pegajosos empleados son también diversos, incluyendo productos grasosos y aceitosos. La mayoría de las superficies usadas son de color amarillo para atraer a *B. tabaci,* aunque su uso ya no es recomendado debido a que también atraen otros insectos incluyendo sus predadores naturales (Morales, 2000).

2.2.6.3 Control biológico. Morales (2000), señala que el control biológico de *B. tabaci* se ha realizado con insectos depredadores y organismos entomopatógenos. Los predadores más empleados son *Eretmocerus mundus, E. tejanus, E eremicus, Enearsia formosa, E. pergandiella* y *Amitus* spp. En general, la especie que se utilice dependerá de las condiciones ecológicas y ambientales predominantes. Otros depredadores son los coccinélidos *(Serangium, Clitosteehus* y *De/phastus* spp.) y chinches *(Maerolphus ealiginosus).* Entre los microorganismos entomopatógenos más usados se encuentran los hongos *Vetieillium leeanii, Beauveria bassiana, Paeeilomyees fumosoroseus* y *Asehersonia* spp., y bacterias como *Baeillus thuringiensis.*

2.2.6.4 **Control legal.** Morales (2000), afirma que las medidas legislativas han dado resultados extraordinarios para el control de epidemias de la mosca blanca y geminivirus, en cultivos básicos e industriales. La República Dominicana es uno de los países líderes en la implementación de medidas legales para el control de virus transmitidos por *B. tabaci.*

Las grandes pérdidas causadas por geminivirus en este país, en diferentes cultivos como fríjol, tomate *(Lycopersicon esculentum* L.), pimiento *(Capsicum annum),* berenjena *(Solanum melongena)* y melón *(Cucumis melo),* obligaron al gobierno a implementar medidas como la prohibición de siembra de algodón y de cultivos hospederos de mosca blanca de las familias Cucurbitaceae, Solanaceae y Leguminosa; prohibición de traslado de material vegetativo hospedero de mosca blanca a cualquier región del país; restricción de asistencia técnica y crediticia para los cultivos prohibidos, y eliminación de residuos de cosecha.

2.2.6.5 Control químico. Morales (2000), señala que por su naturaleza el control de la enfermedad causada por este geminivirus debe estar dirigido a su vector (ver control de la mosca blanca).

2.3 LA MOSCA BLANCA *(Bemisia tabaci.)*

2.3.1 Importancia

En los últimos años las moscas blancas, especialmente *B. tabaci,* han sido las plagas más importantes en los trópicos y subtrópicos del mundo, incluyendo Centroamérica. Existen aproximadamente 1,200 especies de moscas blancas, las cuales se parecen mucho entre sí (Caballero, 1994).

La preocupación por la presencia de la mosca blanca se debe a que en Centro América y El Caribe, este organismo es responsable de grandes pérdidas en la agricultura por su capacidad de transmitir enfermedades y difícil manejo (Valarezo y Cañarte, 1995). Según Escota (2000), en Honduras generalmente las poblaciones de mosca blanca aumentan durante el ciclo de postrera. Sin embargo, estudios realizados en Comayagua, en la región Centro-occidental de producción del país (Figura 1), demuestran que las mayores cantidades de la mosca blanca se presentan en los meses enero-marzo (siembras con riego) y de mayo-junio (época de primera).

2.3.2 Taxonomía

La mosca blanca es un insecto perteneciente al Orden Homóptera y familia Aleyrodidae (Sponagel y Fúnez, 1994). Existen 20 especies de moscas blancas con mayor presencia e importancia económica en Centroamérica. Seis de estas especies son de la familia más primitiva, Aleurodicinae, y 14 de la más evolucionada, Aleyrodinae. *B. tabaci* pertenece a esta última. Las características morfológicas de estas especies varían en forma, color y tamaño de ninfas, que son visibles bajo aumentos de 5 a 20X Otras características usadas para su diferenciación son la forma y color de las secreciones de cera marginales y dorsales (Caballero, 1994).

2.3.3 Biología

La mosca blanca por naturaleza es un insecto picador-chupador. Se alimenta mediante la succión de savia al introducir su proboscis (localizado en el estilete), al tejido foliar en el envés de la hoja. Al mismo tiempo inyecta saliva al sistema vascular con el fin de que un complejo enzimático suavice las células para facilitar la succión. Tiene una metamorfosis incompleta que consta de seis estadíos, huevo, gateador, dos ninfas sésiles, pupa y adulto, que viven en el envés de las hojas de plantas hospederas. Su reproducción puede ser de tipo sexual y asexual (partenogénesis), (Sponagel y Fúnez, 1994).

Todos los ínstares larvales y el adulto de la mosca blanca se alimentan del hospedero, a excepción del estadío pupal que no se alimenta. Mientras los estadíos larvales se alimentan de la savia de las hojas bajeras de la planta, por su limitado movimiento, los adultos migran hacia la parte superior del hospedero para alimentarse principalmente de tejido joven (Sponagel y Fúnez, 1994).

2.3.4 Ciclo de vida

Según Eichelkraut y Cardona (1989), el ciclo de vida de la mosca blanca se resume como se describe a continuación. Coloca los huevos en posición vertical en el envés de las hojas, algunas veces en forma aislada, otras en grupos irregulares y ocasionalmente en semicírculo. El huevo es de textura lisa y de forma ovalada, con la parte superior terminada en punta y la inferior redondeada. Su color es blanco verdoso, pero a medida que madura se toma amarillo y próximo a eclosionar cambia a café claro.

Cuando el huevo eclosiona sale el "crawler" ("gateador"), que es el nombre con el que se conoce a la ninfa móvil del primer estadío. Horas después, ésta se fija para convertirse en la ninfa verdadera del primer estadío, y permanece en esta posición hasta llegar a su tercer instar. Seguidamente, la ninfa pasa por dos fases; mientras en la primera se alimenta, en la segunda deja de hacerlo y sufre cambios morfológicos para transformarse en una pupa en forma de "T" invertida. Para emerger, el adulto rompe la pupa y sale por movimientos de contracción y expansión de su cuerpo. Minutos después se alimenta, y de dos a cuatro horas después las hembras pueden comenzar a ovipositar. Las hembras vírgenes colocan huevos viables, de los cuales emergen sólo machos (Eichelkraut y Cardona, 1989). La mosca blanca puede tener hasta 15 progenies al año, y ovipositar de 38 a 106 huevos durante su vida (Campos-Ávila, 1991).

2.3.5 Tiempo de desarrollo

El tiempo de desarrollo de *B. tabaci;* está determinado por la temperatura y la planta hospedante. En Brasil, Colombia, Cuba, Ecuador, El Salvador, los Estados Unidos y Puerto Rico, se realizaron estudios sobre el tiempo de desarrollo de *B. tabaci;* en *P. vulgaris.* Los resultados demuestran que el tiempo de desarrollo entre las etapas de huevo a adulto varía de 13-38 días, dependiendo de la temperatura (22-28 °C), la humedad relativa (40-94%) y la variedad del frijol (Eichelkraut y Cardona, 1989).

2.3.6 Plantas hospederas

Los principales hospederos de la mosca blanca identificados en Honduras, son *Sitia* spp., algodón *(Gossypium hirsutum* L.) y cultivos de cucurbitáceas (melón y sandía *(Citrullus lunatus* (Tbunb.) Matsum. & Nakai» solanáceas (tomate, tabaco *(Nicotiana tabacum* L.», (Escoto, 2000; Campos-Ávila, 1991). En algunas regiones de México se ha observado como hospedante a la planta silvestre "huinari" *(Calopogonium* sp.), que siempre está cerca del cultivo y se considera su fuente de inóculo primario (Campos-Ávila, 1991).

Se realizó un estudio durante la época seca (enero-abril) en 48 localidades de Manabí, Ecuador, con el fin de identificar los cultivos de importancia económica y las malezas que presentaban una alta infestación por *B. tabaci.* La diversidad de condiciones de estas localidades durante el estudio incluyó altitudes de 0-70 msnm, precipitaciones de 345-877 mm, temperaturas medias de 24-25 °C, humedades relativas de 77-88%, y heliofanías de 1000-1500 horas sol al año. Los resultados indicaron que entre los cultivos anuales que presentaban mayor intensidad de ataque estaban el melón, sandía, soya, algodón, pepino *(Cucumis sativus* L.), maní, tomate, pimiento y el fríjol común. De los cultivos perennes evaluados, el guabo *(Inga edulis),* los cítricos y la badea *(Passiflora quadrangularis),* presentaron intensidad media a alta de infestación. Finalmente, las malezas hospederas con alta intensidad de ataque fueron zapanillo *(Evalvus* sp.), bejucos *(Ipomoea* spp.), escobas *(Sitia acuta* y *Sitia rhombifolia),* lechecilla *(Euphorbia hirta),* verdolaga *(Portulaca oleracea)* y dormidera *(Mimosa pudica),* que presentaban problemas en cultivos de importancia económica de la zona (Valarezo y Cañarte, 2000).

2.3.7 Biotipos

Anderson (2000), señala que el proyecto Global MIP (Manejo Integrado de Plagas) de la mosca blanca, realizó un sondeo para determinar los biotipos de *B. tabaci* en América Latina. Los resultados indican que aunque el biotipo B, *B. argentifolii,* se encuentra en casi todos los países, aún predomina el biotipo A, *B. tabaci.* El biotipo B predomina en El Caribe (Cuba y República Dominicana) y el norte de Sur América (Colombia, Panamá, Ecuador y Venezuela). Los resultados cuestionan el dogma que asevera que el biotipo B está desplazando a los biotipos locales. Adicionalmente, se encontraron mezclas de los dos biotipos en el mismo cultivo y lugar, lo que sugiere la necesidad de seguir realizando estudios sobre este vector.

2.3.8 Control de la mosca blanca

Anderson (2000), afirma que los entomólogos han contribuido en forma limitada a la elucidar y resolver del problema de mosca blanca como vector de begomovirus, para lograr el control de estos patógenos. Parcialmente, esto se atribuye a que no hay evidencias claras de la existencia de genes de resistencia al insecto vector, por lo que los entomólogos no han sido presionados ni estimulados para proteger al fríjol contra el mismo.

Los programas de mejoramiento de fríjol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y de otras universidades de América Latina y los Estados Unidos, junto con los programas nacionales de este grano básico, han contribuido con el desarrollo de variedades resistentes a los begomovirus que atacan al cultivo. Mediante estos esfuerzos complementarios, se ha logrado obtener materiales con resistencia al VMDAF (como las líneas DOR) y alta productividad. Sin embargo, se sabe que la resistencia de estos genotipos mejorados no es duradera bajo la alta presión de moscas blancas virulíferas, por lo que se hace necesario prolongar su vida reproductiva manejando las poblaciones de mosca blanca a través de estrategias complementarias, incluyendo el uso de pesticidas (Anderson, 2000).

Aunque el control químico se justifica por la naturaleza persistente de la transmisión del virus, tiempo en el cual el insecticida puede actuar impidiendo la infección, muchas veces esta medida no es efectiva (Anderson, 2000). En muchos casos, ello se debe a que la mayoría de los insecticidas usados ya no son efectivos debido al desarrollo de resistencia por el vector. Los productos nuevos aún efectivos son costosos y en general altamente tóxicos al ser humano y al ambiente.

Teóricamente; puede emplearse cualquier insecticida que afecte a la mosca blanca; sin embargo, los insecticidas de contacto no son tan efectivos como los sistémicos. Adicionalmente, estos últimos son efectivos sólo si se protege al cultivo desde la emergencia con aplicaciones al suelo o a la semilla al momento de la siembra (Morales, 2000). El principal problema del uso de insecticidas sistémicos es su alto costo y toxicidad al aplicador, medio ambiente y consumidor. Además, la mosca blanca ha desarrollado resistencia a los insecticidas sistémicos más tóxicos como el aldicarb. Para el reemplazo de éstos se han desarrollado productos sistémicos nuevos de toxicidad moderada, como acetamiprid, imidacloprid, nitenpyran y tiometoxan (Bethke y Redak, 1997).

También es posible el uso de químicos no sintéticos para el control de *B. tabaci,* como el producto botánico popularmente conocido como neem, extraído del árbol *Azadirachta indica* (familia Meliaceae). La *Melia azedarach,* de la misma familia, también tiene un efecto deletéreo sobre los estados inmaduro s de la mosca blanca (Nardo *et al.,* 1997). Uno de los productos botánicos más empleados han sido los residuos de las cosechas de tabaco, los que se preparan como infusión regularmente con cal. La tabaquina ha sido ampliamente utilizada en Cuba para este fin, con mucho éxito (Morales, 2000).

2.4 MARCADORES PARA EL FITOMEJORAMIENTO

En términos generales, un marcador indica la presencia de otro carácter y sirve para reconocerlo directa o indirectamente aplicado en la genética, esto significa que si un gen de una la planta influye en el marcador, también influye en el carácter de interés buscado ligado al marcador (Beebe, 1997).

Los marcadores son caracteres que se pueden detectar a diferentes niveles, como el morfológico (color de flor), bioquímico (proteínas e izoenzimas) y de ADN (molecular), para obtener información acerca de la genética de caracteres de interés del organismo en estudio (Ángel 1999). Sin embargo, a diferencia de los marcadores morfológicos y bioquímicos, los marcadores moleculares no son afectados por el ambiente ni varían con la edad de la planta, y pueden consistir en regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones) del genoma.

2.4.1 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta para el análisis genómico, con los cuales se busca identificar y medir la variabilidad genética de un organismo para establecer las relaciones genéticas existentes entre un marcador y una característica deseable, y permitir su rápida introgresión a genotipos que no la posean (Pedraza, 1997).

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que indican la presencia o ausencia de un gen, mediante su expresión en un gel de electroforesis. Se diferencian por su posición en el gel, porque los más pequeños migran más rápido bajo la influencia de un campo eléctrico. La diferencia entre dos plantas se puede visualizar por el tamaño de sus fragmentos de ADN, el que se pueden comparar con el de fragmentos de caracteres útiles. Estas regiones de ADN se miden por los pares de bases (Pb) que las componen, o sea el número de nucleótidos que conforman al fragmento (Beebe, 1997).

Para el uso de marcadores moleculares se debe considerar el número de genes con los que se puede trabajar. Esto es importante en cualquier sistema de mejoramiento donde se usen o no los marcadores, de manera que se puedan recombinar los genes en un genotipo ideal (Beebe y Pedraza, 1998). Existen genes para caracteres importantes en el mejoramiento de fríjol para Centroamérica, los cuales pueden ser identificados a través de marcadores moleculares (Cuadro 3). Entre estos se encuentra el gen *bgm-l* de resistencia al VMDAF, para el que existe un marcador molecular tipo SCAR.

Cuadro 3. Identificación de genes reportados para caracteres útiles del fríjol y marcadores asociados a ellos.

Caracteres útiles (resistencia)[z]	No. de genes identificados	Genes Marcados	Marcadores SCAR	No. mínimo de genes necesarios
VMCF	5	2	2	1
VMDAF	4	3	1	3
VMRF	2	-	-	-

Fuente: Beebe y Pedraza (1998).

z VMCF= Virus del Mosaico Común del Frijol; VMDAF= Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol; VMR.F= Virus del Mosaico Rugoso de~ Frijol.

2.4.2 Tipos de marcadores moleculares

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares que han evolucionado rápidamente, utilizando como herramienta las reacciones de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs por su nomenclatura en inglés) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), (Pedraza, 1997). Esta última ha permitido el desarrollo de las técnicas RAPDs (siglas en inglés de ADN Polimórfico Amplificado al Azar), de los que inicialmente se derivaron los SCARs; los AFLPs (de Polimorfismo de los Fragmentos Amplificados, que combinan aspectos de RAPDs y RFLPs); y últimamente de los microsatélites (SSR-Secuencias Sencillas Repetidas).

Los SCARs son marcadores que se derivan de los RAPD, RFLP o AFLP. Se basan en un cebador sintético que se acopla a un punto específico del genoma. Estos cebadores tienen de 15 a 23 pb, son de doble cadena con secuencia de ADN diferente y se acoplan sólo al lugar definido en la secuencia, es decir son específicos para un sitio del genoma, lo amplifican, y producen una banda que marca el carácter deseado en la planta (Beebe, 1997). Son muy útiles debido a que se pueden usar en la identificación de genes, incluyendo los recesivos que generalmente resultan difícil es de visualizar por cualquier otro método, con una precisión de media-alta. Aunque se necesita bastante trabajo e inversión para el desarrollo de los SCARs, cuando ya están fabricados resultan económicos de usar ya que se usan la PCR igual a los RAPDs, pero son más estables y confiables que estos (Beebe y Pedraza, 1998).

2.4.3 Marcadores moleculares utilizados para el mejoramiento genético del frijol

En cultivos como el fríjol común, el mejoramiento genético tradicional ha contribuido en el desarrollo de variedades con mayor resistencia a enfermedades y potencial de rendimiento, aunque los avances han sido limitados por la velocidad y tiempo necesarios para que los caracteres deseables sean identificados, seleccionados y usados (Kelly *el al.,* 1994). Se asegura que esta ciencia sería más eficiente si se usaran consistentemente los marcadores moleculares basados en ADN, como herramienta para la selección de genotipos superiores.

En las últimas dos décadas, el uso de marcadores moleculares de ADN ha sido una de las novedades en el mejoramiento de plantas, aunque sus ventajas y usos potenciales han sido citados más veces de lo que han sido comprobados y aplicados. Estos incluyen la selección por caracteres que presentan alta variabilidad y baja heredabilidad, sin exponer los materiales en el campo para lograr la expresión del fenotipo buscado, y reconocer genes de resistencia piramidados en combinaciones difíciles de reconocer (Beebe y Pedraza, 1998). Pese a estas ventajas, esta tecnología aún no es ampliamente utilizada por la mayoría de los programas de fitomejoramiento.

Aunque la biología molecular aun es una herramienta novedosa para el mejoramiento de plantas, en los últimos años ha sido de gran ayuda mediante la evolución de los marcadores. En el caso del fríjol existen varios marcadores de ADN para caracteres útiles; sin embargo, si se desea implementar esta tecnología de manera efectiva y eficiente, se

deben encontrar las fases dentro de los programas de mejoramiento donde su uso sea más productivo con relación al costo. En general, la biología molecular está avanzando rápidamente y en algunos años podrían cumplirse muchas expectativas, a medida que los programas de mejoramiento encuentren la manera de aplicarlos eficientemente aprovechando su potencial (Beebe y Pedraza, 1998).

Según Morales (2000), el proceso de combinar varias fuentes de resistencia a los geminivirus que atacan al frijol común, o sea la "piramidación" de genes, necesita de conocimientos genéticos. La identificación y el uso de marcadores moleculares del tipo RAPDs ligados a los genes de resistencia a geminivirus, ha reducido el tiempo requerido para detectar y seleccionar genotipos con esta característica. La aplicación de esta tecnología se puede refinar aún más mediante el uso de marcadores tipo SCAR como SR2, asociado al gen recesivo de resistencia al VMDAF *(bgm-l).* Este marcador está compuesto por dos cebadores de 20 pb cada uno, cuyas secuencias incluyendo las cuatro bases nitrogenadas son 1) DOR21A= 5'CACAGCTGCCCTAACAAAAT3' y 2) DOR21B= 5'CACAGCTGCCACAGGTGGGA3'[1]. Con este marcador se pueden seleccionar líneas por resistencia al VMDAF mediante pruebas de laboratorio, donde se efectúa la extracción, cuantificación, amplificación y separación del ADN. Con una foto del gel de electroforesis se pueden observar las bandas específicas para el gen *bgm-l,* Y verificar la reacción al virus. Ángel *et al.* (1998), afirman que este marcador amplifica un rango de 570-530 pb, donde la banda de 570 pb identifica al genotipo susceptible homocigota; la de 530 pb al resistente homocigota, y la presencia de ambas indica heterocigocidad.

Un ejemplo de la aplicación práctica de esta técnica en el mejoramiento del fríjol común es un estudio conducido por Ángel *et al.* (1998), para combinar el gen *bgm-l* con el gen recesivo *bc-3* de resistencia al Virus del Mosaico Común del Frijol (VMCF), eliminando el gen dominante *1* relacionado con la susceptibilidad al Virus del Mosaico Severo del Frijol (VMSF). Se utilizaron dos poblaciones derivadas de las cruzas de Tío Canela-75 / PR9457-107 *(bgm-l+I* Y *bgm-l+i,* respectivamente) y Don Silvio / PR9457-107 (¿? Y *bgm-I+i,* respectivamente), espetando segregación para los genes indicados. Se seleccionaron y sembraron en invernadero 39 líneas F5 y 38 líneas F7, de las que se extrajo y amplificó el ADN para detectar los genes *bgm-l el* (SCAR SW13). En total, 12 y 25 líneas de las generaciones F5 y F7, respectivamente, presentaron el marcador molecular para la presencia del gen recesivo *bgm-l* y la ausencia del gen dominante 1. Líneas con estas características pueden ser usadas en programas de mejoramiento para localidades donde se ha reportado la incidencia del VMCF, VMDAF y VMSF.

2.4.4 Uso de marcadores moleculares tipo SCAR

2.4.4.1 Extracción de ADN. En Biología molecular, la aplicación de diferentes técnicas para analizar un genoma depende de la habilidad para obtener ADN puro, con alto rendimiento y buena calidad. Para ello se utilizan diferentes métodos de extracción de ADN, de acuerdo al tipo de tejido (fresco o seco), (CIAT, 1999).

[1] BEA VER, J. 1999. SCARs. Puerto Rico, Universidad de Puerto Rico. (Comunicación personal).

En la extracción de ADN vegetal, el mayor problema es que la composición de la pared celular dificulta la liberación de los constituyentes de las células, por lo que es necesario romperla mediante acción mecánica. Es importante que el ADN no sea atrapado en desechos o restos celulares, ni asociado de proteínas y otros contaminantes que podrían interferir en los análisis (CIAT, 1999).

2.4.4.2 Amplificación de ADN. La PCR es una prueba *in vitro* utilizada para sintetizar enzimáticamente secuencias definidas de ADN. La reacción utiliza una plantilla de ADN, dos cebadores *(primers)* que hibridizan a la cadena complementaria y opuesta del ADN. La elongación de los cebadores está catalizada por la *Taq* DNA polimerasa *(Taq*polimerasa), que es una enzima termoestable aislada de la eubacteria termofilica *Thermus acuaticus.* La mezcla de cebadores, ADN con la secuencia de interés, dNTPs (nucleótidos libres) y Taq-polimerasa, es sometida a cambios sucesivos y repetitivo s de temperaturas que oscilan entre 70-96 °C, con el fin de separar las cadenas de ADN, permitir que los cebadores encuentren y se unan a las secuencias complementarias en ellas, y que la *Taq*polimerasa extienda los cebadores mediante la adición de los dNTPs para generar nuevas cadenas con las secuencias deseadas. De esta forma, por series de calentamiento y enfriamiento se logra la multiplicación exponencial del ADN. La eficacia de esta reacción se puede medir por su especificidad, eficiencia y fidelidad, en la que cada componente físico y químico se puede modificar para producir un incremento del producto (Gaitán, 1999).

2.4.4.3 Separación de ADN. La electroforesis es una técnica muy utilizada para la separación de ácidos nucleicos y de moléculas que poseen carga eléctrica, con base en su movimiento bajo la influencia de un campo eléctrico. Fue desarrollada por Ame Tiselius en 1930 para separar proteínas séricas (Bernal, 1999).

Bemal (1999), afirma que el tipo de electroforesis utilizada para separar ácidos nucleicos es la zonal, en la que se utilizan medios de soporte para crear zonas separadas donde casi todas las moléculas de una mezcla pueden identificarse independientemente. Los medios de soporte que más se usan son los geles, una red polimérica tridimensional a través de la cual migran las moléculas a separar. Los geles más utilizados para la separación de ácidos nucleicos son la agarosa y la poliacrilamida (Cuadro 4), (Bernal, 1999). Estos se sumergen en un amortiguador *(buffer),* que permite la conducción del campo eléctrico a lo largo del sistema.

Cuadro 4. Geles más utilizados para la separación de ácidos nucleicos:

Categorías	Tipo de gel	
	agarosa	Poliacrilamida
Rango de separación	0.2 – 50 kb	4 – 500 pb
Temperatura	Independiente	Dependiente
Resolución	Media	Alta
Manipulación	Sencilla	Compleja
Corrida	Horizontal	Vertical

Fuente. Bernal (1999).

Según Bernal (1999), la agarosa es un polímero de un alga marina que se compone de D-galactosa y 3,6 anhidro L-galactosa, los que se entrelazan formando una malla que permite separar moléculas de un rango de 0.2-50 Kb. Las moléculas de mayor tamaño (peso) migran más lento en la gel, debido a que físicamente les es más difícil deslizarse por sus poros.

Los factores que afectan la tasa de migración en el sistema electroforético son el gel, el amortiguador y el voltaje. A una mayor concentración de agarosa, el gel tiene poros pequeños a través de los cuales las moléculas se desplazan a una tasa menor. A un mayor pH del amortiguador, los nucleótidos migran más rápidamente debido a que su carga se hace menor. De acuerdo a la composición del amortiguador, sus cationes pueden unirse a las cargas negativas de los polinucleótidos neutralizándolas y retrasando la migración electroforética. Adicionalmente, cuando los amortiguadores tienen una alta fuerza iónica pueden ocurrir distorsiones en la corrida electroforética debido al aumento considerable de la temperatura. Los amortiguadores más utilizados en electroforesis de ácidos nucleicos son TAE (Tris-Acetato-EDTA), TBE (Tris-Borato-EDTA) y TPE (Tris-Fosfato-EDTA). El voltaje aplicado afecta de manera directamente proporcional a la movilidad electroforética.

2.5 PRINCIPIOS GENÉTICOS DE SEGREGACIÓN APLICADOS AL FITOMEJORAMIENTO

El proceso de mejoramiento genético de los cultivos requiere de la aplicación de principios y conceptos genéticos básicos que permiten guiar eficazmente las fases de selección y cruzamiento de padres superiores, y de manejo y selección de su progenie. El éxito en la transmisión de características deseables, así como la aplicación de la biología molecular en este proceso, depende en cierta medida de la naturaleza (complejidad y forma de los alelos) de los genes involucrados. En general, por su relativa sencillez las características Mendelianas han sido las más manejables y las que han permitido los mayores aportes de la SAM al fitomejoramiento.

2.5.1 Principios Mendelianos

En un experimento realizado por Gregor Mendel (Figura 2), los progenitores (P) de una cruza tenían alelos *DD* (alto) y *dd* (enano). Debido a la segregación, o sea la separación de los pares de alelos durante la formación de gameto s en el proceso de meiosis, los gameto s producidos tenían un sólo alelo de cada progenitor *(D* o *d).* En consecuencia, el cigoto resultante de la fusión de estos gameto s tenía los de cada tipo parental, formando una recombinación *Dd.* Debido a que el alelo *D* estuvo presente y era dominante, las plantas Fl (primera generación filial) resultaron altas (Gardner, 1988).

Al autofecundarse las plantas FI altas (Dd), la mitad de los gameto s tenían el alelo D y la otra el alelo d. Esta descendencia (segunda generación o F2) se clasificó y resultó en plantas altas y enanas. Esta clasificación de plantas demostró que al estudiar gran número de ellas, aproximadamente las tres cuartas partes de todas eran altas y una cuarta parte enanas. Con exactitud, unas plantas F2 de 1064 ejemplares comprendió a 787 plantas altas y 277 enanas; lo que resultó en una proporción 3: 1 casi perfecta (Gardner, 1988).

	ALTO		ENANO
Progenitores	. DD	x	dd
Gametos	D		d
	ALTO		
Fl	Aa		
	ALTO		ALTO
Fl XFl	Dd	x	Dd
Gametos	Dd		Dd
F2	D		d

D	DD ALTO	Dd ALTO
d	Dd ALTO	dd ENENO

		Frecuencia	
Fenotipos	Genotipos	Genotípica	Fenotípica
Alto	DD	1	3
	Dd	2	
Enano	dd	1	1

Figura 2. Cruza realizada por Mendel entre plantas de chícharos con tallos altos y enanos, y resumen de los resultados fenotípicos y genotípicos que se obtuvieron.

2.5.2 Cruzas monohíbridas

Gardner (1988), indica que los híbridos resultan de un cruce de dos individuos genéticamente diferentes (como, AA x aa o Aa). Un monohíbrido es heterocigoto para un par de alelos como Aa. La cruza de progenitores AA x aa diferentes en un par de alelos se denominan "cruzas monohíbridas". La segregación de genes que ocurre en combinaciones monohíbridas se resume en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Cruzas que implican un solo par de genes. Probables gameto s, frecuencia genotípica de la progenie y proporciones fenotípicas para la dominancia y la herencia intermedia, para las distintas combinaciones.

			Progenie		
Combinación de	Gametos Progenitor		Frecuencias	Proporción fenotípica con dominancia	
Apareamientos	Primero	Segundo	genotípica	Completa	Intermedia
AA x aa	A	A	Toda Aa	Toda dom.	Toda dom.
AA x Aa	Aa	Aa	¼AA, ½Aa ¼aa	3.1	1:2:1
Aa x AA	Aa	A	½ AA, ½Aa	Toda dom.	1:1
Aa x aa	Aa	A	½ Aa, ½aa	1:1	1:1

Fuente: Gardner (1999)

2.5.3 Alelos recesivos

Gardner (1988), afirma que los alelos recesivos tiene un patrón diferente de herencia porque su fenotipo sólo se expresa en individuos homocigotos (aa). Una población heterocigota (Aa) que se autofecundan incluye genotipos (AA, Aa y aa), contiene mayor número de portadores heterocigotos (Aa) que individuos homocigotos (aa) que lo manifiesten. Los portadores Aa no se pueden detectar fenotípicamente por el alelo dominante que tienen.

El gen asociado con el albinismo es un gen recesivo (cc). Los individuos con albinismo se caracterizan por ausencia completa de pigmentación en el pelo, la piel y el iris de los ojos. Los individuos homocigotos (cc) son albinos, mientras CC y Cc presentan pigmentación normal. Por ejemplo, en una familia "caucásica" de seis hijos dos fueron albinos. Los padres eran de pigmentación normal, y se cree que eran portadores Cc y que en sus dos hijos albinos ocurrió una combinación fortuita de genes recesivos cc (Figura 3).

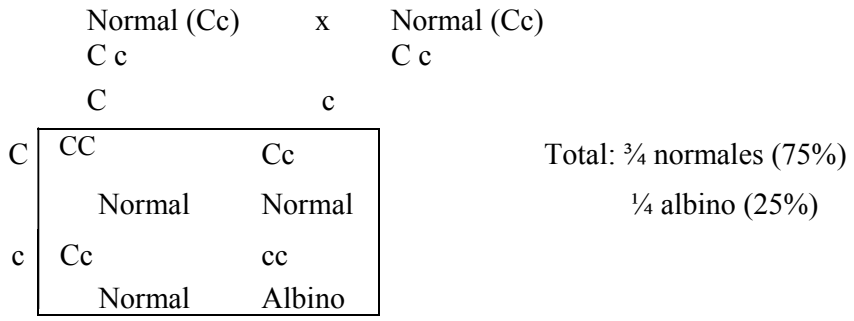


Figura 3. Cruza entre dos personas normalmente pigmentadas, ambas portadoras del gen (e) para el albinismo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS

La adaptación de protocolos provenientes de otros laboratorios al de Biología Molecular de Zamorano, se realizó en las fases de extracción, amplificación (PCR), y separación de ADN (electroforesis). Se evaluaron diversas variantes a estos procedimientos, con el fin de obtener mejores resultados para la visualización de las bandas de resistencia o susceptibilidad al VMDAF. En este proceso se utilizaron métodos de técnicas moleculares desarrolladas por la Universidad de Wisconsin-Madison (UW-Madison) y el CIAT.

3.1.1 Localización del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y en una casa de malla asignado al Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria (CCP A) de Zamorano, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras. En la casa de malla se sembraron diferenciales de ftijol (diferenciales), en que la presencia o ausencia en su genoma del gen *Ur-5* de resistencia a la roya era conocida *; y variedades de fiijol (variedades) conocidas por la presencia o ausencia en su genoma, del gen *bgm-l* de resistencia al VMDAF. En el laboratorio se hicieron las pruebas para la evaluación y adaptación de los protocolos de técnicas moleculares.

3.1.2 Características del gennoplasma

Para la adaptación de las fases de extracción y amplificación de ADN, las variedades utilizadas incluyeron las resistentes al VMDAF (portadoras del gen *bgm-l)* Tío Canela75, ICT A Ligero y Don Silvio; y las susceptibles Orgulloso, Desarrural-1R, Catrachita, Concha Rosada, Danlí 46, Madura Parejo, Vaina Blanca y Dorado. Aunque esta última es tolerante al virus, no posee en su genoma al gen *bgm-l.* Para la adaptación de la fase de separación de ADN, se utilizaron 18 diferenciales de roya (Anexo 16).

3.1.3 Variables evaluadas y su medición

La efectividad de las fases de extracción y amplificación de ADN evaluadas se midió a nivel de laboratorio, mediante la presencia en las variedades de las bandas indicadoras de resistencia (gen recesivo expresado a 530 pb) Y susceptibilidad (gen dominante o heterocigoto expresados a 570 pb ó 530/570 pb, respectivamente), colTespondientes al gen *bgm-l.* En la fase de separación, se midió en los diferenciales de roya la banda de resistencia (970 pb) y susceptibilidad (sin banda) a la roya (gen *Ur-5).*

La identificación de las bandas se realizó mediante su observación y detenninación del peso molecular en geles de agarosa sometidos a electroforesis, fotografiados con películas instantáneas Polaroid@ bajo la luz ultravioleta de un transiluminador.

3.1.4 Siembra

Con el fin de obtener tejido para las pruebas de ADN, los diferenciales de roya se sembraron en la casa de malla en octubre de 1999, colocando dos semillas por pote en potes estándar no. 4 (9.5 cm de ancho Y alto). Las variedades resistentes y susceptibles al VMDAF fueron sembradas dos veces (febrero y marzo del 2000), de la misma manera que los diferenciales pero usando cinco potes (repeticiones) por variedad.

3.1.5 Muestreo

Para la obtención de ADN proveniente de los diferenciales de roya, se realizó un muestreo de tejido a los 12 días después de la siembra (DDS); mientras que para las variedades se realizó tres muestreos a los 12 DDS en la primera siembra, y dos muestreos a los 14 DDS en la segunda. El tejido se obtuvo de las hojas más jóvenes (brotes terminales en crecimiento activo) de las plantas de cinco potes de cada variedad, colocándolo en tubos eppendorf de 1.5 mi.

3.1.6 Equipo y material de laboratorio

Para la extracción del ADN de los diferenciales y las variedades, se utilizó tubos eppendorfy barras *(pestle)* de pexiglass estériles, soluciones amortiguadoras *(buffers)* de extracción y lavado para purificar el ADN (Anexo 10), micropipetas (0.5-10 ul, 20-200 ul y 100-1000 ul), puntas y una microcentrífuga.

La cuantificación de ADN se realizó en un fluorómetro (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., D y NA Quant TM200), que expresa la cantidad en ng/ul, usando buffer de cuantificación TE para las muestras y ADN bovino estándar (100 ng/ul) para la calibración. La amplificación de ADN se realizó en un termociclador (PCR-100 , Programable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling); y la amplificación en un tanque de electroforesis (EC Maxicell EC 360M, 44 orificios) con una fuente de aplicación/regulación de voltaje

(Hoefer Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP). Para la observación de bandas se utilizó un transiluminador (Fotodyne, FotolUV(26), y una cámara Polaroid@ para fotografiar geles y registrar resultados.

3.1.7 Adaptación de la extracción de ADN

Esta fase fue la última en adaptarse, después de la adecuación de los procesos de amplificación y separación de ADN. En esta fase se evaluaron dos métodos de extracción, aplicados a las variedades cuya condición del gen *bgm-l* era conocida.

Extracción de ADN. Se utilizaron los protocolos de extracción de ADN total por los métodos de UW-Madison (generalmente aplicado en RAPDs) y CIAT (generalmente aplicados a SCARs). En la adaptación del método de la UW-Madison, se usó buffer de extracción PEX, diferentes buffer de lavado y reactivos, y una microcentrífuga para separar partículas contaminantes del ADN (Anexo 1). En el método del CIAT se utilizó 40 ul de NaOH 0.25 M (hidróxido de sodio), 40 ul de HCI 0.25 M (ácido clorhídrico), 20 ul de Tris HCI 0.5 M y agua destilada, microfiltrada y estéril (Anexo 2), (Quintero *et al.,* 1999).

Cuantificación de ADN. La calibración del fluorómetro y cuantificación de ADN se hizo siguiendo el manual del fluorómetro y un protocolo del laboratorio, respectivamente (Anexo 3). El ADN que se cuantificó fue de las muestras extraídas de las variedades (Anexo 12, 13,14 y 15).

Amplificación de ADN. Para la amplificación del ADN se usó el perfil térmico para termociclador aplicado por la Universidad de Puerto Rico (UPR), (Anexo 9). Los cebadores utilizados para detectar el gen *bgm-l* de resistencia al VMDAF (DOR 21A y DOR 21B), cuyas características están indicadas en el capítulo de Revisión de Literatura, fueron proporcionados por la Universidad de Cornell. Adicionalmente, con el fin de determinar cuál método de extracción mostraba mejor las bandas asociadas a la presencia del gen *bgm-l,* se utilizó perlas de PCR (beads, Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) para amplificar el ADN extraído con el protocolo del CIAT y UW-Madison. Según Guerra (2000), estas perlas contienen 1.5 unidades de *Taq-polimerasa,* 10 mM de Tris-HCI (pH 9.0), 50 mM de KC1, 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 uM de cada dNTPs y esterilizadores incluyendo ASB (albúmina de suero bovino). Estas se reconstituyeron con 19 ul de agua y 0.5 ul de cada cebador, para una mezcla de reacción de 20 ul/muestra a la que se agregó 5 ul de cada muestra de ADN.

Separación de ADN Y fotografía. La separación de las bandas de ADN amplificadas se realizó colocando las muestras en un gel de agarosa al 1 % en un buffer TBE a una concentración 0.5X, sometidas a una electroforesis de 150 voltios durante 1:30 hr. En la preparación del gel se agregó 2 ul de bromuro de etidio (10 mg/ml) por cada 40 mi de buffer (Anexo 10), con el fin de obtener la tinción de las bandas. Estas se visualizaron y fotografiaron como se indica en la sección 3.1.6.

3.1.8 Adaptación de la amplificación de ADN

Esta adaptación fue la segunda en adaptarse, después de la adecuación del proceso de electroforesis para la separación del ADN. Se evaluaron los perfiles térmicos para la de amplificación (PCR) en termociclador, de la UW -Madi son y de la UPR.

Extracción y cuantificación de ADN. El ADN utilizado en esta fase fue el mismo usado y cuantificado descrito en la sección 3.1.7.

Amplificación de ADN. En las reacciones para la amplificación de los fragmentos de ADN ligados a las secuencias del SCAR *bgm-l,* se usó como base la mezcla de reacción que se detalla en el Anexo 6. El ADN de las muestras fue sometido a los perfiles térmicos de amplificación para el gen *bgm-l,* utilizados por el CIAT (Anexo 8) y por la UPR (Anexo 9).

Separación de ADN y fotografía. La separación (electroforesis), visualización y registro de las bandas de ADN, se realizó como se indica en las secciones 3.1.6 y 3.1.7.

3.1.9 Adaptación de la separación del ADN

Esta fase fue la primera en adaptarse, pues es elemental para lograr la adaptación de las otras fases del proceso (extracción y amplificación). En ella se evaluaron diferentes factores que afectan la calidad de la separación y visualización de las bandas de ADN, como el porcentaje de agarosa, la concentración de buffer TBE, y la aplicación y duración del voltaje.

Extracción, cuantificación y amplificación de ADN. El ADN utilizado en esta fase fue el extraído del tejido de los diferenciales de roya. Las pruebas para la adecuación de los diferentes factores de electroforesis se realizaron utilizando marcadores del tipo RAPD, para los que los métodos de extracción, cuantificación, dilución, mezcla de reacción y perfil térmico para la amplificación, ya estaban definidos (anexos 1, 3, 4, 5 Y 7, respectivamente). El cebador usado fue el de OFI0, ligado al gen de resistencia *Ur-5* que amplifica en una banda de 970 pb.

Separación de ADN Y fotografía. La adaptación del protocolo para la separación de ADN de los diferenciales de roya mediante electroforesis, se hizo utilizando como base el método de UW-Madison (Anexo 10). Las pruebas de los factores modificados incluyeron variaciones en la concentración de agarosa del gel (1% y 1.5%); concentración del amortiguador TBE usado en la preparación del gel y en el tanque de electroforesis (IX y 0.5X); magnitud del voltaje (125V, 140V 150V Y 255V); Y duración del proceso (3:30 he, 2:05 he, 1 :30 he y 1 :20 *he).* Las pruebas de electroforesis para cada variante se aplicaron por separado, evaluándose los resultados mediante la observación y determinación del peso molecular de las bandas de ADN en un gel de agarosa, visualizadas y registradas como se indica en las secciones 3.1.6 y 3.1.7.

3.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE PLANTAS F2 Y FAMILIAS F5 DE FRIJOL

3.2.1 Localización del estudio

Este estudio se condujo a nivel de campo y de laboratorio. La parte de campo se realizó en la época de primera del 2000, en las instalaciones del Centro de Experimentación y Desarrollo Agrícola (CEDA) de la Dirección de Investigaciones, Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA) del Gobierno de Honduras, localizado en Comayagua, a 82 km de Tegucigalpa. Las características climatológicas anuales de esta localidad incluyen una temperatura de 29-30 °C y una precipitación de 700-900 mm. En estas facilidades se sembraron las parcelas con semilla F2 de la cruza Tío Canela-75 x G6727, y familias/líneas F5 de poblaciones PRF-98 y CIAT -98, con el fin de evaluar su reacción al VMDAF Y de obtener muestras de tejido para analizar la condición del gen *bgm-l* en su genoma, y correlacionar los resultados de ambos procedimientos de evaluación. El estudio se condujo en esta época debido a que generalmente se presenta la mayor incidencia del VMDAF, por las altas poblaciones de mosca blanca en la localidad.

El estudio a nivel de análisis de ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano, donde se hicieron las pruebas para determinar en las plantas F2 y las familias/líneas F5 la condición (dominante, recesiva o hetericigota) del gen *bgm-l* de resistencia al VMDAF.

3.2.2 Características del germoplasma

3.2.2.1 Plantas F2. Para la evaluación molecular de las plantas F2, se usó una población derivada de la cruza de la variedad Tío Canela-75 y el germoplasma G6727. Esta cruza proviene del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de Zamorano.

El progenitor Tío Canela-75 es portador del gen recesivo *bgm-l,* por lo que se esperaba una segregación para esta característica en la generación F2 por ser un gen mayor que puede fijarse en las primeras generaciones. Según Rosas y Varela (1996), la variedad mejorada Tío Canela-75 fue desarrollada por el PIF/Zamorano, mediante una cruza triple de la línea DOR 483 como progenitor femenino por la cruza simple Fl (DOR 391 x Pompadour 1), como progenitor masculino (Figura 4).

DOR 483 Y DOR 391 son líneas hermanas derivadas de la cruza triple DOR 367 x (DOR 364 x IN10l). Pompadour J es una accesión del germoplasma criollo recolectado en República Dominicana mediante la gestión del Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program. La genealogía del Tío Canela-75 incluye líneas resistentes al VMDAF.

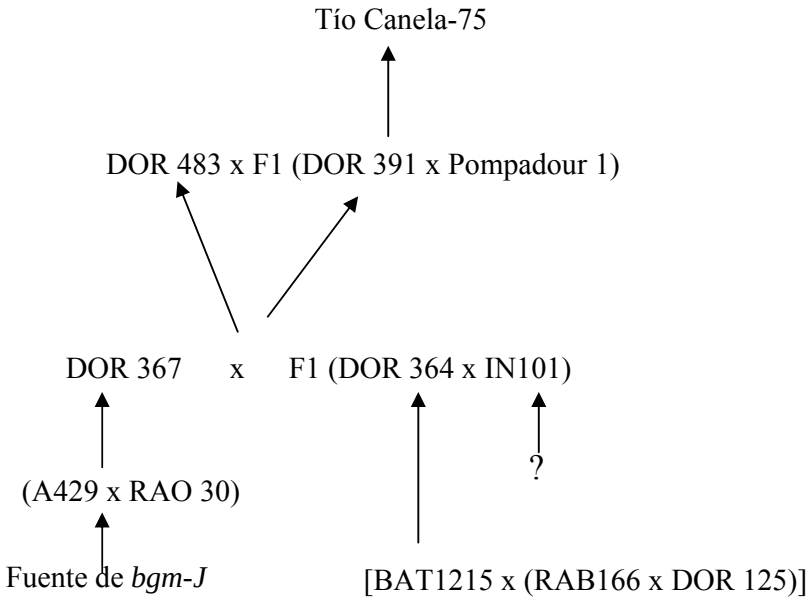


Figura 4. Genealogía de la variedad Tío Canela-75.

El otro progenitor de las plantas F2 en estudio es la accesión G6727, proveniente del germoplasma del frijol común del CIAT. Esta accesión perteneciente al acervo Andino con origen y procedencia colombiana, está identificada como Guarzo-Popayán, es de grano de color amarillo y rojo moteado, tiene grano grande (40 g/100 semillas) y presenta un hábito de crecimiento Tipo 1 (arbustivo determinado), (CIAT, 1992).

3.2.2.2 Familias F5. En la caracterización molecular de poblaciones F5, provenientes de cruzas donde al menos uno de los progenitores posee el gen *bgm-J,* se esperaba que este estuviera fijado en algunas de las" familias. Las plantas F5 utilizadas en este estudio incluyeron poblaciones PRF-98, provenientes del PIF/Zamorano; poblaciones MN y MR, procedentes del CIA T; y poblaciones del programa de mejoramiento de líneas negras-PROFRIJOL, procedentes de Guatemala.

3.2.3 Siembra

En las instalaciones del CEDA, se sembraron 200 semillas F2 distribuidas en una parcela con 20 surcos de dos metros de largo, a un distanciamiento de 70 cm entre surcos y 20 cm entre plantas con 10 plantas por surco. De las 200 semillas sembradas, 125 fueron usadas en el estudio (Anexo 17).

Las poblaciones F5 sembradas incluyeron 152 (72 rojas y 80 negras), de las cuales 54 familias fueron escogidas para el estudio (Anexo 18). La siembra se hizo en surcos de dos metros de largo, con un distanciamiento de 70 cm entre surcos y 10 cm entre plantas.

Junto con las parcelas de plantas F2 y poblaciones F5, se sembraron las variedades testigos Desarrural-1R (susceptible al VMDAF), Dorado (resistente sin el gen *bgm-J)* y Tío Canela-75 (resistente con el gen *bgm-J),* con el fin de incluir a los dos primeros en la evaluación de campo y al último en la de laboratorio.

3.2.4 Variables y su medición

3.2.4.1 Campo. Las variables a medir en el campo fueron la severidad (nivel de desarrollo de los síntomas) e incidencia (nivel de dispersión de la infección) del VMDAF, en las plantas F2 y poblaciones F5. La severidad se midió utilizando una escala cualitativa y de uso general (escala 1-9, donde 1= planta sin síntomas y 9= muerte de la planta) y la incidencia mediante la determinación del porcentaje de las plantas que presentaron sintomatología (Cuadro 6), (CIAT, 1987).

Cuadro 6. Escala general de evaluación para enfermedades.

Calificación	Síntomas		Incidencia (%)
	Severidad	Clasificación general	
1	Ausentes		0
2	Dudosos	Resistente	1 - 10
3	Débiles		11 - 25
4	Moderados		25 - 40
5	Intermedios	Intermedio	41 - 60
6	Generales		61 - 75
7	Intensos		76 - 90
8	Severos	Susceptible	91 - 99
9	Muerte		100

Fuente: CIAT (1987).

3.2.4.2 Laboratorio. La variable que se midió en el laboratorio fue la presencia de las bandas indicadoras de resistencia o susceptibilidad (recesivo y dominante o heterocigoto, respectivamente), correspondientes al gen *bgm-J.* Estas se identificaron mediante la observación y determinación de su peso molecular en un gel de agarosa (electroforesis), visualizadas y registradas como se indica en las secciones 3.1.6 Y 3.1.7.

3.2.5 Muestreo

3.2.5.1 Evaluación de campo. La evaluación visual (expresión fenotípica) de las reacciones de severidad e incidencia al VMDAF en las plantas F2 y poblaciones F5, se realizó ambas a los 42 DDS, respectivamente. Para facilitar el seguimiento y correlación de los resultados, las 200 plantas F2 fueron identificadas individualmente con una etiqueta de plástico enumerada al momento de la evaluación. En las 54 familias F5, se usó un número correlativo junto con la identificación asignada por el PIF durante su proceso de selección. Los resultados de ambas evaluaciones fueron registradas en los libros de campo correspondientes. Adicionalmente, se evaluó la reacción al VMDAF de las variedades de fríjol testigos Desarrural-lR y Dorado. Inmediatamente, se procedió a la obtención de las muestras de tejido para la evaluación molecular (análisis genotípico) de laboratorio, para la posterior correlación de ambos resultados.

3.2.5.2 Evaluación de laboratorio. En la obtención de tejido de las 200 plantas individuales F2, se tomaron muestras de las hojas más jóvenes para facilitar la extracción del ADN (paredes celulares menos lignificadas). Estas fueron recolectadas en tubos eppendorf rotulados con el número correspondiente a cada planta muestreada. Posteriormente se realizó un segundo muestreo con el fin de tener suficiente ADN para las pruebas de laboratorio.

Para la toma de muestras de las poblaciones F5, se seleccionaron 54 familias/líneas por su reacción contrastante (resistente o susceptible) al VMDAF. La muestra de cada familia estuvo constituida por un compuesto de cuatro plantas de cada surco, seleccionadas al azar. También se tomaron muestras de la variedad testigo Tío Canela-75.

En el procedimiento de laboratorio para la evaluación del ADN de las plantas F2 y familias/líneas F5, se utilizó los equipos y materiales descritos en la Sección 3.1.6.

3.2.5.2.1 Extracción de ADN. Para la extracción del ADN de las muestras se siguió el proceso adaptado al laboratorio, correspondiente al protocolo del CIAT descrito en la Sección 3.1. 7.

3.2.5.2.2 Cuantificación y dilución de ADN. La calibración del fluorómetro y la cuantificación del ADN, se hicieron como se indica en la Sección 3.1.7. El ADN que se cuantificó fue de las muestras extraídas de las plantas F2 y familias F5.

Según Beaver (1999)1, la cuantificación y la dilución de ADN no son necesarias para lograr una amplificación exitosa del mismo en la identificación de los marcadores ligados al gen *bgm-l.* Sin embargo, no se visualizaron bandas usando el método UW-Madison con altas concentraciones (>50 ng/ul) de ADN; mientras que fueron visualizadas aplicando el método del CIAT, usando concentraciones de 10-25 ng/ul. Utilizando esta información, se procedió a diluir el ADN con una concentración inicial ≥25 ng/ul, a 20 ng/ul (Anexos 17 y 18), usando el método UW-Madison (Anexo 4).

3.2.5.2.3 Amplificación de ADN. Para la amplificación del ADN (PCR) de las muestras se siguió los procesos adaptados al laboratorio, correspondientes a la mezcla y al perfil térmico de reacción de la UW -Madi son y de la UPR, respectivamente, descritos en la Sección 3.1.8.

3.2.5.2.4 Separación de ADN. Para la separación del ADN (electroforesis) de las muestras se siguió los procesos adaptados al laboratorio, descritos en la Sección 3.1.9.

Al primer orificio del gel se agregó una escalera de ADN de 100 pb, Y en los siguientes se colocó el control negativo (únicamente reactivos, para eliminar errores de interpretación por contaminación), el positivo (ADN conocido, consistente en una muestra Tío Canela75), y el producto de la amplificación (PCR) de las muestras de las plantas F2 y poblaciones F5

3.2.5.2.5 Visualización y registro de resultados. Para la observación y determinación del peso molecular de las bandas de ADN mediante su visualización y registro en los geles de agarosa, se siguió el procedimiento descrito en la Sección 3.1.9.

3.2.6 Análisis estadístico

Se correlacionó la reacción de las plantas F2 y familias F5 de frijol a la incidencia del VMDAF (expresión fenotípica) a nivel de campo, con los resultados obtenidos a nivel de laboratorio (carácter genotípico), utilizando la prueba de Chi-cuadrado *(X^2* para bondad de ajuste de las proporciones esperadas y observadas

BEAVER. J. 1999. SCARs. Puerto Rico, Universidad de Puerto Rico. (Comunicación personal)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS

La adaptación de protocolos al laboratorio de Biología Molecular de Zamorano es importante por razones académicas y de investigación. Esta última incluye la aplicación de técnicas moleculares para el desarrollo de variedades de frijol con resistencia al VMDAF, por ser esta enfermedad uno de los factores más limitantes para su cultivo en la región centroamericana. Las técnicas moleculares incluyen el uso de marcadores tipo SCAR y RAPD, para facilitar la selección por genes de resistencia a otras enfermedades para las que ya existen marcadores, como la roya y la antracnosis. Adicionalmente y en términos generales, la técnica de los RAPDs no sólo se utiliza para identificar marcadores ligados a un gen de interés, sino también para encontrar marcadores y hacer estudios de poblaciones y de biodiversidad En el fitomejoramiento, el uso exitoso de esta herramienta de laboratorio podría optimizar el tiempo necesario para seleccionar plantas o líneas durante su avance generacional, durante el desarrollo de nuevas variedades mejoradas.

4.1.1 Extracción de ADN

En la adaptación de los protocolos, la prueba de extracción de ADN fue la última en adaptarse debido a que inicialmente no se visualizaron bandas con el método de extracción de la UW -Madison. Para confirmar este resultado, se repitió este procedimiento de extracción usando perlas de PCR (beads) en la amplificación de ADN, en lugar de la mezcla tradicional. Con esta prueba se determinó que de los dos métodos de extracción evaluados, el que se adaptó a las condiciones de Zamorano fue el del CIAT.

Con el método de extracción de ADN del CIA T se logró visualizar en el gel de agarosa bandas de ADN claras, bien definidas y con una buena resolución en las variedades con respuesta al VMDAF conocida (Tío Canela-75 e ICTA Ligero como resistentes; y Orgulloso y Desarrural-lR como susceptibles), (Cuadro 7, Figura 5). Una visualización clara de las bandas es importante para detectar genes de interés y obtener datos confiables de muestras de ADN de plantas de frijol, sin necesidad de una evaluación visual a nivel de campo. Con el método de extracción UW-Madison, no visualizó las bandas (Figura 5).

Cuadro 7. Resultados de la PCR para el gen *bgm-l* (cebadores DOR 21A y DOR 21B) en variedades de frijol usando el método de extracción de ADN del CIA T. Zamorano, 2000.

Variedad	Tamaño (pb)[Z]	Condición del gen *bfm-1*	Reacción al VMDAF
Tío Canela-75	530	Recesivo (bb)	Resistente
ICTA Ligero	530	Recesivo (bb)	Resistente
Orgulloso	570	Dominante (BB)	Susceptible
Desarrural-lR	570	Dominante (BB)	Susceptible

[z] Pares de bases

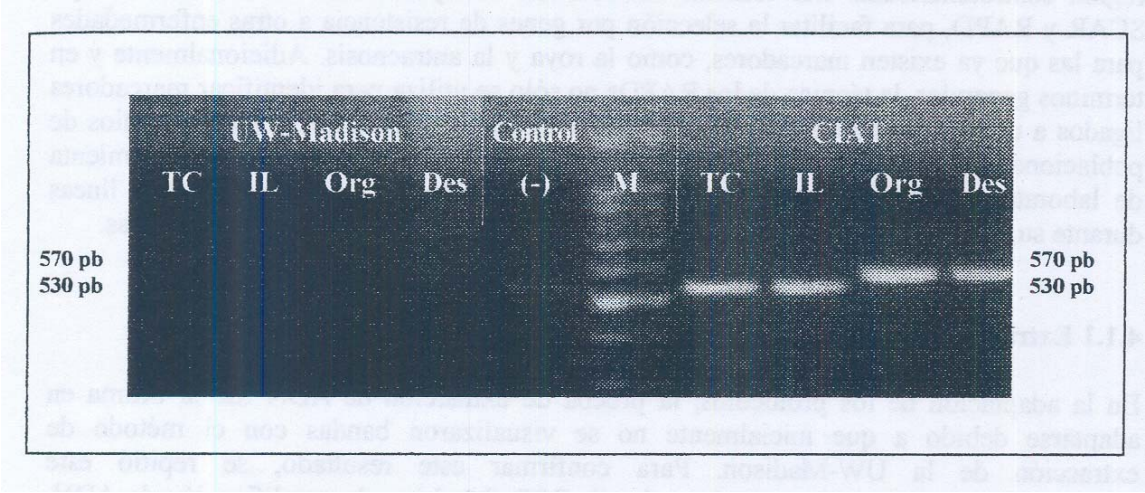


Figura 5. Visualización del análisis SCAR para el gen *bgm-l* en variedades de frijol usando dos métodos de extracción de ADN. Zamorano, 2000.

4.1.2 Amplificación de ADN (PCR)

De los dos perfiles térmicos evaluados, con el que se logró amplificar exitosamente el ADN complementario al marcador SCAR ligado al gen *bgm-l* de resistencia al VMDAF, fue el de la UPR (Anexo 9). Con este perfil se obtuvo suficiente ADN amplificado para lograr una visualización clara de las bandas asociadas a dicho gen, en las muestras de tejido de las variedades Tío Canela-75 y Dorado extraídas con el método del CIA T (Figura 6).

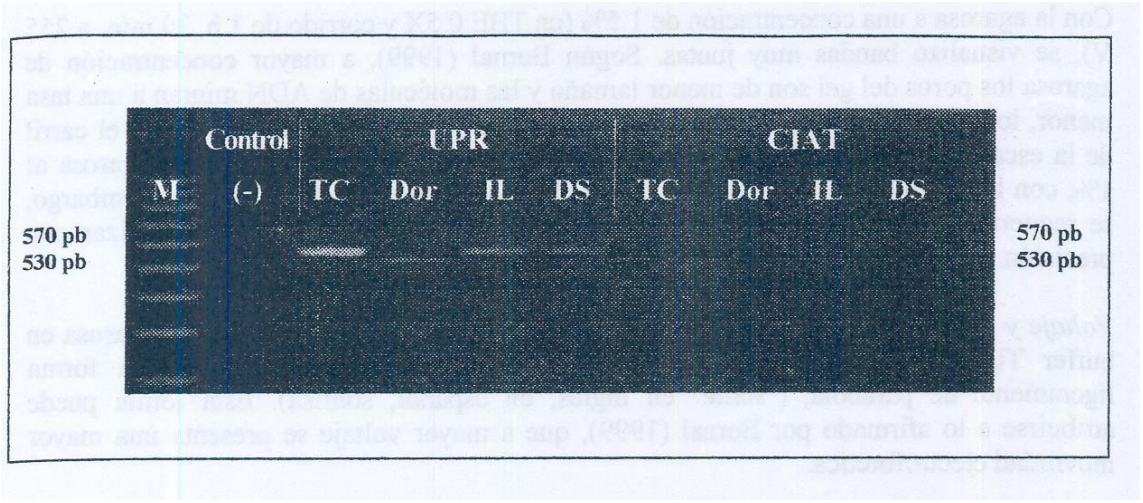


Figura 6. Visualización del análisis SCAR para el gen *bgm-l* en variedades de fríjol usando dos perfiles térmicos. Zamorano, 2000.

4.1.3 Separación de ADN (electroforesis)

Debido a las dificultades que se presentaron para una clara visualización de las bandas de ADN después de su amplificación, se evaluaron diversas combinaciones diversas de reactivos y procedimientos involucrados en la fase de separación electroforética hasta encontrar la composición adecuada para realizar esta prueba. A continuación se describen los resultados de las variaciones practicadas en esta fase.

Solución amortiguad ora. El buffer TBE a una concentración de IX y O.5X (empleando gel de agarosa al 1.5% y corrida por 1 h. 30 mino a 255 V), resultó en una pobre separación de bandas de ADN (muy juntas). No se redujo más la concentración del amortiguador, porque según el método de la UW-Madison éste debe estar a una concentración de O.5X para moléculas de ADN de plantas de fríjol. Por otro lado Bloom *el al.* (1996), indican que el gel preparado con agua o con una baja concentración del buffer TBE, resulta en la visualización distorsionada de las bandas de interés.

Agarosa. Bernal (1999), afirma que la agarosa es un soporte para crear zonas separadas en donde las moléculas de ADN pueden identificarse independientemente. Si no se corrieran las muestras en un gel de este material, el ADN no migraría recto sino que se dispersaría por diferentes partes del tanque de electroforesis, sin posibilitar la visualización de las bandas.

Con la agarosa a una concentración de 1.5% (en TBE 0.5X y corrido de 1 h. 30 mino a 255 V), se visualizó bandas muy juntas. Según Bernal (1999), a mayor concentración de agarosa los poros del gel son de menor tamaño y las moléculas de ADN migran a una tasa menor, lo que explica la pobre separación y resolución de las bandas incluso en el carril de la escalera (indicador del tamaño de bandas). Se bajó la concentración de agarosa al 1 %, con la que fue posible visualizar las bandas con una separación media; sin embargo, se requería una mayor separación para obtener una mejor resolución y visualizar con precisión las de interés.

Voltaje y tiempo de electroforesis. El voltaje a 255 V por 55 mino (gel 1% de agarosa en buffer TBE O.5X), dio como resultado bandas con separación media y en forma ligeramente de parábola, ("smile" en inglés; en español, sonrisa). Esta forma puede atribuirse a lo afirmado por Bernal (1999), que a mayor voltaje se presenta una mayor movilidad electroforética.

Bajando el voltaje a 150 V e incrementando la duración de la electroforesis a 1 h. 30 min., las bandas se visualizaron con mayor separación. Posteriormente, se experimentó un voltaje de 125 V por 3h. 30 min., que resultó en bandas con muy buena separación pero con la desventaja del tiempo excesivo para el corrido. Finalmente, se evaluó un voltaje de 140 V durante 2 h. 5 min., con el que se obtuvo bandas separadas pero sin diferir mucho de la prueba a 150 V Y 1 h. 30 min., por lo que se determinó que éste último era el voltaje y tiempo óptimos para la separación de las bandas en el gel de electroforesis.

Finalizadas las pruebas de modificaciones en los factores evaluados, se determinó que para detectar con claridad, nitidez y buena resolución la presencia o ausencia de un marcador RAPD ligado a un gen de resistencia en plantas de fríjol (mediante la visualización de las bandas de ADN separadas por electroforesis en un gel de agarosa), era necesario usar un gel con una concentración de agarosa al 1 %, amortiguador TBE a O.5X, y voltaje y tiempo de corrida de 150 V durante 1 h. 30 mino (Figura 7).

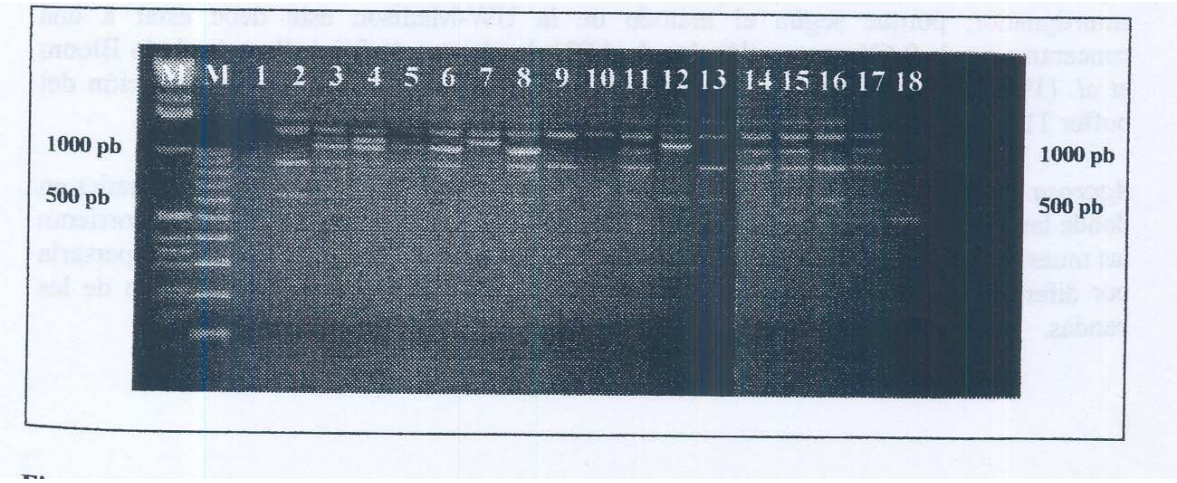


Figura 7. Visualización del análisis RAPD para el gen *Ur-5* en diferenciales de roya corrido en un gel de agarosa al 1 % y amortiguador TBE O.5X a 150 V por 1 hr. 30 mino Zamorano, 2000. .

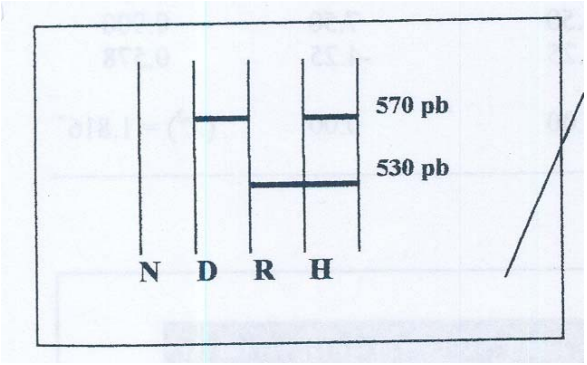
4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS F2 Y DE FAMILIAS F5 DE FRIJOL

4.2.1 Plantas F2

En cultivos autógamos, las plantas F2 presentan la mayor segregación genética. Debido a que en la generación F2 de una cruza monohíbrida se espera una segregación Mendeliana 1:2:1 para caracteres controlados por un solo gen (Gardner, 1988), es posible comenzar la selección de plantas por su resistencia al VMDAF mediante la identificación del gen recesivo *bgm-l* en su genoma, cuando uno de los progenitores actúa como donador de este gen.

Las plantas F2 fueron evaluadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano, para determinar mediante pruebas moleculares (extracción, cuantificación y dilución, amplificación de ADN; Y separación y visualización de sus fragmentos) con un marcador SCAR ligado al gen *bgm-J* de resistencia al VMDAF, la condición (homocigota recesiva o dominante, o heterocigota) en que se encontraba este gen en su genoma.

Este marcador SCAR, compuesto por cebadores DOR 21A y 21B, puede presentar las bandas indicadoras de la condición del gen *bgm-l* en cuatro formas: homocigota recesiva (530 pb), homocigota dominante (570 pb), heterocigota (530/570 pb) y sin el gen (sin banda) (Figura 8). De las 195 plantas incluidas en esta fase del estudio, se seleccionó las 125 que presentaban bandas en las pruebas de laboratorio, para la comparación de esta herramienta con los resultados de campo.



N= no tiene el gen (susceptible)
D= gen homocigoto dominante (susceptible)
R= gen homocigoto recesivo (resistente)
H= gen heterocigoto (susceptible)

Figura 8. Bandas en el gel de electroforesis asociadas al gen *bgm-J.*

En la evaluación de campo usando la escala 1-9 del CIA T (1987), se registró como resistentes a las plantas calificadas con 1 en severidad y O en incidencia; y como susceptibles a las que tenían de 2-9 en severidad y de 10-100 en incidencia. Debido a ataque de arañita roja *(Tetranychuy urticae),* se descartaron algunas plantas cuya evaluación era dudosa.

4.2.1.1 Evaluación genotípica y genotípica-molecular de la reacción de plantas F2 al VMDAF. La evaluación molecular de las 125 plantas F2 con los marcadores SCAR ligados al gen *bgm-l* de resistencia al VMDAF, permitió identificar 27 plantas resistentes y 98 susceptibles. En las susceptibles se identificaron 70 que continuarán segregando por el carácter heterocigota del gen; mientras que las 28 que lo tienen de forma homocigota dominante pueden ser eliminadas, pues no tienen posibilidad de poseer la característica deseable de resistencia (Cuadro 8), estos resultados se identificaron en geles (Figura 9).

La segregación genotípica de estas plantas provenientes de la cruza Tío Canela-75 x G6727, muestran un alto ajuste al modelo 1:2:1 ($P \leq 0.05$), (Cuadro 8). Este resultado concuerda con lo afirmado por Gardner (1988), con relación a que la proporción 1:2:1 corresponde a un tipo de cruza monohíbrida donde la población de organismos en la generación F2 incluye tres tipos de genotipos (AA Aa Y aa), con un mayor número de portadores heterocigotos. Estos portadores no pueden ser detectados fenotípicamente pues poseen un alelo dominante, por lo que generalmente en generaciones posteriores se observa la segregación para este gen.

Cuadro 8. Segregación genotípica de plantas F2 por resistencia al VMDAF según su evaluación con marcadores moleculares SCAR. Zamorano, Honduras, 2000.

Clase (genotipo)	Observado (SCAR)	Esperado (modelo 1:2:1)	Obs – Esp	$(O-E)^2/E$
BB (susceptible)	28	31.25	-3.25	0.338
Bb (susceptible)	70	62.50	7.50	0.900
bb (resistente)	27	31.25	-4.25	0.578
Total	125	125.00	0.00	$(x^2) = 1.816$*

* Nivel de significancia a= 0.05.

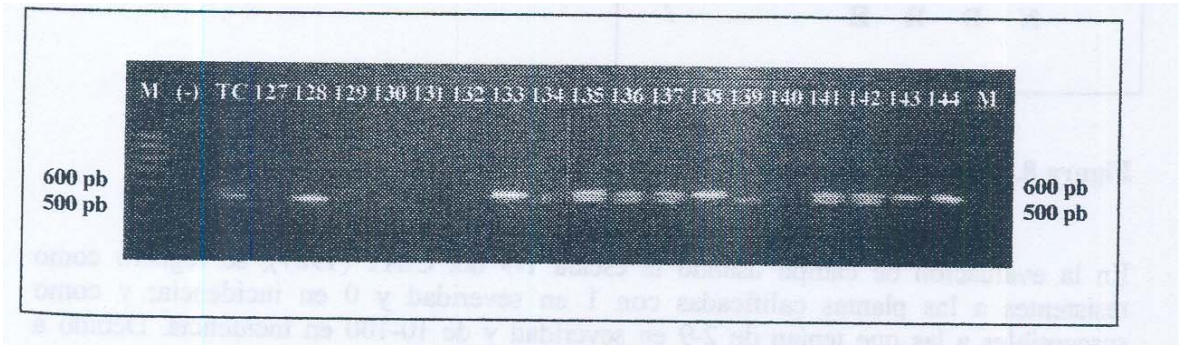


Figura 9. Visualización de la PCR para el gen *bgm-l* en plantas de fhjol F2. Zamorano, 2000.

Esta segregación fenotípica también muestra un alto ajuste al modelo Mendeliano 3:1 ($P \leq 0.05$) (Gardner, 1988), (Cuadro 9), que afirma esta posibilidad para un 25% de los alelos recesivos, estos resultados se identificaron en geles (Figura 10).

Cuadro 9. Segregación fenotípica de plantas F2 por resistencia al VMDAF según su evaluación con marcadores moleculares SCAR. Zamorano, Honduras, 2000.

Clase (fenotipo)	Observado (SCAR)	Esperado (modelo 3:1)	Obs - Esp	
BB/Bb (susceptibles)	98	93.75	-4.25	0.15
bb (resistente)	27	31.25	4.25	0.45
Total	125	125.00	0.00	$(X^2) = 0.60$*

* Nivel de significancia a= 0.05.

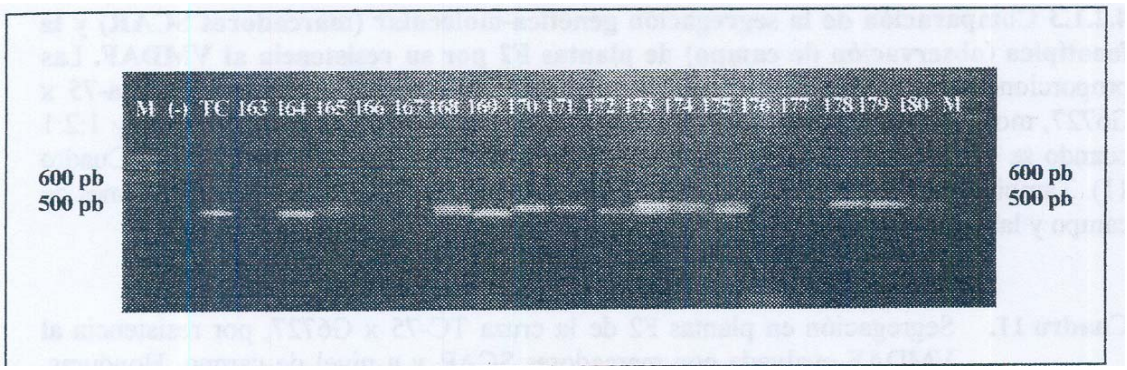


Figura 10. Visualización de la PCR para el gen *bgm-J* en plantas de frijol F2. Zamorano, 2000.

4.2.1.2 Evaluación fenotípica de campo de la reacción de plantas F2 al VMDAF. En la evaluación fenotípica de campo de las plantas F2, por la expresión de la severidad e incidencia del VMDAF, se identificó que de 125 plantas 30 mostraban resistencia y 95 susceptibilidad al virus (Cuadro 10).

Según esta evaluación, la segregación de las plantas F2 mostró un buen ajuste al modelo de Mendel 3:1 ($P \leq 0.05$), (Cuadro 10). Este nivel de ajuste sugiere que la evaluación de campo por severidad e incidencia del VMDAF en la localidad de Comayagua, donde se presenta una alta incidencia del VMDAF y su vector mosca blanca, es altamente efectiva para la identificación y selección fenotípica de plantas de frijol con resistencia al virus. Esta evaluación visual es importante, pues permite la obtención de resultados confiables

de una manera sencilla; sin embargo, también presenta limitantes debido a que no es completamente segura, .pues puede haber confusión entre los síntomas del VMDAF y los causados por otros virus, y por otros factores como deficiencias y/o toxicidades de nutrimentos y daños por otras plagas.

Cuadro 10. Segregación fenotípica de plantas F2 por resistencia al VMDAF según su evaluación a nivel de campo. Comayagua, Honduras, 2000.

Clase (fenotipo)	Observado (campo)	Esperado (modelo 3:1)	Obs − Esp	$((O-E)-0.5)^2/E$
Susceptible	95	93.75	1.25	0.006
Resistente	30	31.25	-1.25	0.018
Total	125	125.00	0.00	$(X^2) = 0.024$*

* Nivel de significancia a= 0.05.

4.2.1.3 Comparación de la segregación genética-molecular (marcadores SCAR) y la fenotípica (observación de campo) de plantas F2 por su resistencia al VMDAF. Las proporciones observadas en la población F2 derivada de la cruza de Tío Canela-75 x G6727, mostraron una buena bondad de ajuste a los modelos de segregación 3:1 y 1:2:1 cuando se evaluaron con marcadores moleculares y mediante observación visual Cuadro 11). También se encontró una alta correlación entre los resultados de las evaluaciones de campo y laboratorio.

Cuadro 11. Segregación en plantas F2 de la cruza TC-75 x G6727, por resistencia al VMDAF evaluada con marcadores SCAR y a nivel de campo. Honduras, 2000.

Comparación (X vs. Y)[Z]	n	Observado (X)	Modelo[Y] (Y)	X^2*	p
EG vs. SE	125	28:70:27	1:2:1	1.816	0.42
EG vs. SE	125	98:27	3:1	0.600	0.46
EF vs. SE	125	95:30	3:1	0.024	0.89
EF vs. EG	125	95:30	98:27	0.295	0.61

[Z]EG= evaluación genotípica usando un marcador molecular SCAR; EF= evaluación fenotípica (observación de campo); SE= segregación esperada

[y] Segregación Mendeliana

* Nivel de significancia a= 0.05.

4.2.1.4 Correlación entre la evaluación genética-molecular (marcadores SCAR) y la fenotípica (observación de campo). Los resultados obtenidos a nivel de laboratorio mostraron una buena concordancia con la evaluación de las plantas de frijol F2 a nivel de campo ($P \leq 0.05$), (Cuadro 12). Este nivel de probabilidad sugiere que las desviaciones obtenidas entre ambos métodos son debidas al azar, por lo que se puede utilizar el procedimiento de laboratorio para la selección de plantas F2 de frijol resistente al VMDAF cuando no sea posible hacer una evaluación confiable en el campo.

Cuadro 12. Comparación de la segregación fenotípica y genotípica de plantas F2 por resistencia al VMDAF evaluadas con marcadores SCAR y a nivel de campo. Honduras, 2000.

Clase (fenotipo)	Observado (campo)	Modelo (SCAR)	Obs - Mod	$((O-M)-0.5)^2/M$
Susceptible	95	98	-3.00	0.064
Resistente	30	27	3.00	0.231
Total	125	125	0.00	$(X^2) = 0.295$*

* Nivel de significancia a= 0.05.

4.2.2 Poblaciones F5 (PRF-98 Y CIAT)

Cincuenta y cuatro familias F5 de poblaciones identificadas como PRF-98 y CIAT-98, fueron evaluadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano y a nivel de campo en la estación experimental del CEDA en Comayagua, utilizando la misma metodología y criterios seguidos para el análisis genético (molecular) y fenotípico (reacción al VMDAF) de las plantas F2 (Sección 4.2.1), a fin de determinar la eficiencia de las dos metodologías de evaluación.

4.2.2.1 Evaluación genotípica molecular de la reacción de familias F5 al VMDAF. A nivel de laboratorio, de las 54 familias evaluadas siete resultaron resistentes al VMDAF (gen recesivo homocigota), y 47 susceptibles incluyendo cuatro que se esperan sigan segregando por la presencia heterocigoto del gen (Cuadro 13). En la evaluación de campo, 11 materiales mostraron resistencia al virus (severidad 1 e incidencia O) y 43 susceptibilidad (severidad 2-9 e incidencia 10-100%).

Cuadro 13. Reacción fenotípica al VMDAF de 11 familias F5 con el gen *bgm-J* recesivo o heterocigota según la evaluación de laboratorio. Zamorano, Honduras, 2000.

Identificación	Evaluación de laboratorio (condición del gen *bgm-J)* Heterocigoto (Bb)	Recesivo (bb)	Evaluación de campo Severidad (1-9)	Incidencia (0-100)
PRF 9805-31-A		X	1	O
PRF 9805-80		X	1	O
PRF 9806-18	X		7	40
MR 13057-18-B	X		7	70
MN 13070-481		X	1	O
MN 13070-489		X	1	O
MN 13070-492-B		X	1	O
MN 130-70-502		X	1	O
MN 13070-51O-B-2		X	1	O
MN 13070-515-A	X		7	40
MN 13070-515-B	X		2	10

z Severidad (1= resistente, 2-9susceptible) e incidencia (O = resistente. lO-l00 = susceptible)

De acuerdo a los resultados indicados 11 familias F5, siete resistentes (gen *bgm-J* homocigota) y cuatro con reacción no definida (gen heterocigota), pueden ser avanzadas para su evaluación en la generación siguiente; mientras que las 43 familias susceptibles deben ser eliminadas, pues el gen recesivo *bgm-l* ya no puede fijarse en su genoma por presentar el gen homocigoto dominante (Cuadro 14), estos resultados se identificaron en geles (Figura 11).

Cuadro 14. Genotipo y fenotipo esperado de poblaciones F5 de frijol evaluadas mediante marcadores SCAR. Zamorano, Honduras, 2000.

Genotipo	Fenotipo esperado (reacción a VMDAR)z	Tamaño (pb)y	Familias F5
Bgm-lBgm-l	S	570	35
Bgm-l bgm-l	S	530/570	4
bgm-l bgm-l	R	530	7
Gen ausente	S	-	8
Total			54

z S = susceptible; R = resistente;
y pb = pares de bases

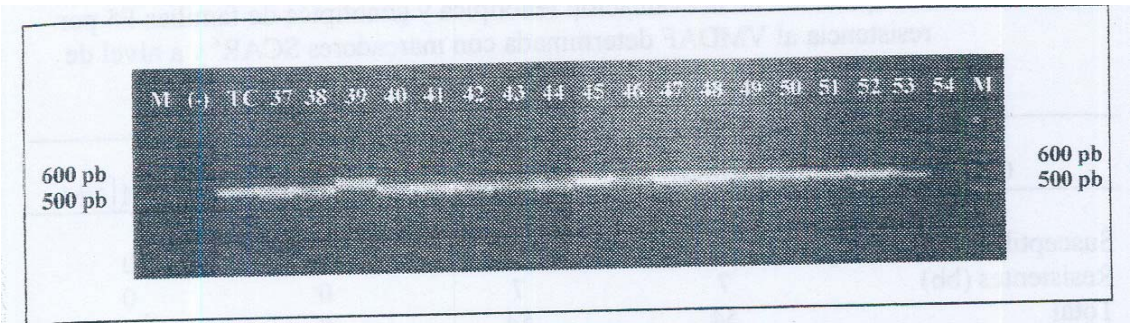


Figura 11. Visualización de la PCR para el gen *bgm-l* en familias de frijol F5. Zamorano, 2000.

4.2.2.2 Evaluación fenotípica de campo de la reacción de familias F5 al VMDAF. La evaluación de campo se realizó mediante observación visual del fenotipo (síntomas e incidencia de VMDAF) de las familias F5, determinándose que siete presentaban resistencia y 47 susceptibilidades al VMDAF (Cuadro 15). Este resultado puede atribuirse a que sólo uno de los progenitores incluidos en estas poblaciones, Tío Canela-75, tenía el gen *bgm-l* de resistencia al VMDAF. Aunque el pedigrí de todas las familias presentaba al menos una fuente de resistencia al VMDAF, estas no eran portadores del gen mayor *gbm-l,* por lo que su resistencia es vulnerable bajo situaciones extremas de incidencia del virus, como sucede en Comayagua.

Cuadro 15. Fenotipo de familias F5 determinado por su reacción al VMDAF según su evaluación a nivel de campo. Comayagua, Honduras, 2000.

Fenotipo (reacción al VMDAF)	Severidad (1-9)[z]	Incidencia (0-100)[y]	Familias F5 (unidades)
Resistente	1	0	7
Susceptible	2-8	10-100	47
Total			54

[z] Escala (1-9): 1= resistente y 2-9= susceptible
[y] (0-100): 0= resistente y 10-100= susceptible

4.2.2.3 Correlación entre la evaluación genética molecular (marcadores SCAR) y la fenotípica (observación de campo). La evaluación de campo por severidad e incidencia del VMDAF en familias F5, mostró un buen ajuste con las evaluaciones de laboratorio realizadas utilizando marcadores SCAR (Cuadro 16). Estos resultados indican que con una alta probabilidad ($P \leq 0.05$), las evaluaciones de laboratorio corresponden a la reacción fenotípica de las familias a la incidencia del virus.

Cuadro 16. Comparación de la evaluación fenotípica y genotípica de familias F5 por resistencia al VMDAF determinada con marcadores SCARz y a nivel de campo. Honduras, 2000.

Clase[Y]	Observado (campo)	Modelo (SCAR)	Obs - Mod	$(O-M)^2/M$
Susceptibles (BB/Bb)	47	47	O	O
Resistentes (bb)	7	7	O	O
Total	54	54	O	$(X^2) = O^X$

z Evaluadas en laboratorio por técnicas moleculares.
y BB=homocigoto dominante; Bb= heterocigoto; bb=homocigoto recesivo. x
Nivel de significancia a= 0.05.

Estos resultados confirman que el uso de marcadores SCAR es una alternativa para los programas de mejoramiento genético del cultivo de frijol. Las evaluaciones de laboratorio mediante técnicas moleculares pueden ser útiles y prácticas en el fitomejoramiento, porque en generaciones avanzadas de frijol como es el caso en las familias F5, se puede hacer depuraciones para eliminar material susceptible a factores bióticos adversos como el VMDAF. La selección puede realizarse de acuerdo a la expresión fenotípica de una familia/línea avanzada a la incidencia del VMDAF, Y a la identificación mediante técnicas moleculares de la presencia o ausencia del gen de interés ligado a esta reacción. Según los resultados de la evaluación molecular efectuada a las familias F5, mediante la detección de la condición del gen *bgm-l,* se puede eliminar plantas homocigotas dominantes (no tienen el gen recesivo) y dejar las homocigotas recesivas (dos alelos recesivos) y heterocigotas (un alelo recesivo, por lo que segregarán en la generación siguiente con algunas plantas homocigotas recesivas), en el proceso de avance hacia nuevas generaciones.

Entre las ventajas de usar marcadores moleculares se incluyen su facilidad de manejo y que funcionan en cualquier momento, sin que los factores ambientales afecten su evaluación. En las evaluaciones fenotípicas tradicionales a nivel de campo, existen factores ambientales que pueden influir sobre los resultados como la pérdida de plantas por exceso de lluvia, viento y otros factores fuera del alcance del fitomejorador. Adicionalmente, factores como enfermedades, toxicidades y deficiencias también pueden interferir en la evaluación de campo. Sin embargo, debe considerarse que las evaluaciones de campo utilizadas en el fitomejoramiento convencional han sido una herramienta muy valiosa para la selección de germoplasma de frijol, para el mejoramiento de características deseadas de resistencia a plagas (CIAT, 1987).

5. CONCLUSIONES

1. La metodología para el uso de marcadores moleculares tipo SCAR, como herramienta en el mejoramiento genético del fríjol común con énfasis en la evaluación por la reacción al VMDAF en ausencia del patógeno, ha sido desarrollada y adaptada al laboratorio de Biología Molecular de Zamorano.

2. En la adaptación de los dos protocolos evaluados, el método de extracción mejor adaptado fue el de ADN total del CIAT. Entre los perfiles térmicos usados para la amplificación del ADN, el que mejor funcionó fue el utilizado en la Universidad de Puerto Rico. Se determinó que la combinación final de variables para obtener bandas separadas y claras en la electroforesis, son agarosa al 1 %, buffer TBE a una concentración de 0.5X, y un voltaje de 150V durante 1 h 30 mino

3. Los resultados del análisis genético molecular a nivel de laboratorio, de la reacción al VMDAF de plantas de poblaciones segregantes de fríjol F2 y de familias de poblaciones avanzadas F5, concuerdan con los resultados de la evaluación fenotípica realizada a nivel de campo, indicando que la técnica y los SCAR recomendados pueden ser aplicadas en el mejoramiento genético de este cultivo tanto en generaciones tempranas como en intermedias-avanzadas.

6. RECOMENDACIONES

1. Al realizar las evaluaciones de muestras de ADN con marcadores moleculares, se debe manejar cuidadosamente los reactivos de la reacción de amplificación de ADN (PCR), ya que su inestabilidad en las condiciones del trópico podría causar problemas en la detección de bandas indicadoras de la presencia de genes.

2. En la fase de electroforesis, el buffer TBE debe estar ajustado al pH indicado en los protocolos y permanecer almacenado a temperatura ambiente para evitar que se precipite resultando en la distorsión de las bandas electroforéticas.

3. Debido a su mejor comportamiento, se debe evaluar la adaptación del uso de perlas (beads) de amplificación de ADN (PCR) en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano, incluyendo un estudio económico para determinar la rentabilidad de su uso en comparación al uso de reactivos tradicionales.

4. Evaluar la adaptación del procedimiento desarrollado para el uso del marcador molecular tipo SCAR ligado al gen *bgm-l* de resistencia al VMDAF en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano, usando otros marcadores SCAR y del tipo RAPD para otras características importantes.

5. Aplicar el uso del marcador molecular tipo SCAR ligado al gen *hgm-l* de resistencia al VMDAF, para la identificación de material genético resistente a esta enfermedad, incluyendo progenitores Fl a ser usado en cruzas múltiples, y familias y líneas de mejoramiento en poblaciones segregantes y avanzadas de fríjol común.

6. Efectuar un estudio económico para determinar los costos durante las diferentes fases del análisis de muestras de ADN de tejido vegetal, con el fin de incluirlos en los presupuestos de los programas institucionales interesados en su uso.

7. Capacitar al personal del laboratorio que trabaje con técnicas moleculares en la evaluación de plantas, ya que este trabajo requiere de conocimientos en el uso y preparación de reactivos y utilización de los equipos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, P. 2000. La mosca blanca vectora: *Bemisia tabaci* (Genn.). *In:* El mosaico dorado y otras enfermedades del fríjol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. Ed. por Francisco José Morales Garzón. Palmira, Colombia, CIAT. p. 107-127.

ANGEL, lC.; BEA VER, J.S.; KELL Y, lD. 1998. El uso de marcadores moleculares en la selección de líneas de frijol resistentes al mosaico dorado y mosaico común. s.l., s.n.t. 8 p.

ANGEL, F. 1999. Marcadores moleculares. *In:* Genética molecular para el mejoramiento y la caracterización de la biodiversidad. Cali, Colombia, CIAT. p. 13. (manuscrito).

BEEBE, S. 1994. La búsqueda de resistencia genética al virus del mosaico dorado del frijol común: historia y perspectivas. *In:* El mosaico dorado del frijol: Avances de Investigación. Trad. y Ed. por Francisco l Morales. Palmira, Colombia, CIAT. p. 148 149.

BEEBE, S. 1997. Marcadores moleculares para brutos (y para ftijoleros). 8.1., s.n.t. 11 p. (manuscrito).

BEEBE, S.; PEDRAZA, F. 1998. Perspectivas para el uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. *In:* Taller Internacional de Mejoramiento Genético de Frijol Negro Mesoamericano. Ed. por Rogelio Lépiz Idelfonso. Guatemala, PROFRIJOL. p. 129-139.

BERNAL, A. 1999. Electroforesis. *In:* Genética molecular para el mejoramiento y la caracterización de la biodiversidad. Cali, Colombia, CIAT. p. 21-24. (manuscrito).

BETHKE, lA.; REDAK, R.A. 1997. Effect of imidacloprid on the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae), and whitefly parasitismo Ano. Appl. BioI. 130:397-407.

BIRD, l; PÉREZ, lE.; ALCONERO, R.; V AKILI, N.G.; MELÉNDEZ, P.L. 1972. A whitefly-transmitted golden-yellow mosaic of *Phasolus lunatus* in Puerto Rico. l Agric. Univ., Puerto Rico 56:64-74.

BLAIR, M.W.; BEA VER, 1.8. 1993. Inheritance of bean golden mosaic resistance from bean genotype A429. Ann. Rept. Bean Improv. Coop. 36:143.

BLOOM, M.V.; FREYER, G.A; MICKLOS, D.A 1996. Laboratory DNA Science: An introducción to recombinant DNA techniques and Methods of genome analysis. United States of America, Benjamin Cummings. 434 p.

CABALLERO, R. 1994. Clave de campo para inmaduro s de moscas blancas de Centro América (Homoptera: Aleyrodidae). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 4 p.

CAMPOS-Á VILA, 1. 1991. Enfermedades del frijol. México, Trillas. 132 p.

CASTAÑO, J.; DEL RÍO, L. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. 3 ed. Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press ISBN 1885995-16-4. Publicación DPV-EAP no. 147. 290 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Trad. por EDITEC. Ed. por Francisco Mata. Aart van 8choonhoven y Marcial A Pastor-Corrales (comps.). Cali, Colombia, CIAT. 56 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Manual de recetas culinarias de frijol *(Phaseo/us vu/garis* L.). Ed. por Guillermo E. Gálvez. Lima, Perú, CIAT. 97 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1992. Catálogo de germoplasma de mjol común *Phaseolus vulgaris* L. Ed. por Rigoberto Hidalgo, Hember Rubiano y Orlando Toro. Cali, Colombia, CIAT. 450 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1994. El mosaico dorado del frijol: Avances de Investigación. Trad. y Ed. por Francisco 1. Morales. Palmira, Colombia, CIAT. 210 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1999. Extracción de ADN. *In:* Genética molecular para el mejoramiento y la caracterización de la biodiversidad. Cali, Colombia, CIAT. p. 18-20.

EAP (ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA). 1994. Enfermedades del frijol: el Virus del Mosaico Dorado. Zamorano, Honduras, Publicación del Departamento de Agronomía de la EAP (trifolio ilustrado).

EICHELKRAUT, K.; CARDONA, C. 1989. Biología, cría masal y aspectos ecológicos de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homóptera: Aleyrodidae), como plaga del frijol común. Turrialba (Costa Rica) 39:51-55.

ESCOTO, N.D. 2000. Historia y situación actual del cultivo de frijol en los países latinoamericanos afectados por geminivirus transmitidos por mosca blanca: América Central-Honduras. *In:* El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. Ed. por Francisco José Morales Garzón. Palmira, Colombia, CIAT. p.33-35.

GAITÁN, E. 1999. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR. Cali, Colombia, s.n.t. 20 p.

GÁMEz, R. 1970. Los virus del fríjol en Centroamérica. 1. Transmisión por moscas blancas *(Bemisia tabaci* Gen.) y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado. Turrialba 21:22.27.

GARDNER, E.1 1988. Principios de genética. 5 ed. México D.F., México, LIMUSA 716 p.

GUERRA, M.L. 2000. Caracterización agronómica y molecular de la reacción de tomate y frijol común a geminivirus. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 63 p.

KELLY, 1; AFANADOR, L.; HALEY, S.; MIKLAS, P. 1994. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento de frijol. Agronomía Avanzada (Costa Rica) 5:1-7.

LÓPEZ-SALINAS, E.; BECERRA, E.N. 1994. Situación actual del mosaico dorado del frijol en la América Latina: México-Sur. *In:* El mosaico dorado del frijol: Avances de Investigación. Trad. y Ed. por Francisco J. Morales. Palmira, Colombia, CIAT. p.28-33.

MORALES G., F.1 1996. Mejoramiento genético del frijol común por resistencia a las principales enfermedades virales.en la América Latina. *In:* Taller de mejoramiento de fríjol para el siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina. Ed. por Shree P. Singh y Oswaldo Voyses1. Cali, Colombia, CIAT. p.99-113.

MORALES, F.J. 1999. Situación actual de las enfermedades virales del frijol común en América Central, México y El Caribe. Hojas de PROFRUOL (Guatemala) no. 6:2-3.

MORALES, F.J. 2000. Introducción. *In:* El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. Ed. por Francisco José Morales Garzón. Palmira, Colombia, CIAT. p. 1-12.

NARDO, E.A; COSTA, AS.; LORENCAO, AL. 1997. *Melia azedarach* extract as an antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Entomologist 80:92-94.

PEDRAZA, F. 1997. Marcadores moleculares, nuevas herramientas para el fitomejorador. s.l. s.n.1. 1 p. (manuscrito).

PROPHETE, E. 1994. Situación actual del mosaico dorado del fríjol en la América Latina: Haití. *In:* El mosaico dorado del fríjol: Avances de Investigación. Trad. y Ed. por Francisco 1. Morales. Palmira, Colombia, CIAT. p.72-81.

QUINTERO, C.; TOHME, 1.; BEEBE, S.; TERÁN, H. 1999. Selección asistida por marcadores (MAS) en fríjol común. Cali, Colombia, CIAT. 5 p.

RODRÍGUEZ, R. 1996. Problemas, logros y posibilidades para el mejoramiento del fríjol negro. *In:* Taller de mejoramiento de fríjol para el siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina. Ed. por Shree P. Singh y Oswaldo V oysest. Cali, Colombia, CIAT. p. 294-306.

ROJAS, M.R. 2000. Los begomovirus. *In:* El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. Ed. por Francisco José Morales Garzón. Palmira, Colombia, CIAT. p. 87-98.

ROSAS, J.C. 1998. El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press. 52 p.

ROSAS, J.C.; V ARELA, 0.1. 1996. Propuesta de liberación de la nueva variedad de fríjol Tío Canela-75. Zamorano, Honduras, Depto. Agronomía. 46 p.

SAG (SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA). 1998. El cultivo del fríjol: Guía para uso de empresas privadas, consultores individuales y productores. Ed. por Federico Rodríguez y Andrés C. Gómez. Honduras, ZAS. 39 p.

SINGH, S.P. 1996. Progreso, problemas y el futuro del mejoramiento de fiijoles mesoamericanos y la mejora genética integrada. *In:* Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina. Ed. por Shree P. Singh y Oswaldo Voysest. Cali, Colombia, CIAT. p. 334-350.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. 1991. Races ofcommon bean *(Phaseolus vulgaris,* Fabaceae). Econ. Bot. 45:379-396.

SPONAGEL, K.; FÚNEZ, M. 1994. Estrategias probadas del manejo del complejo fitosanitario Mosca Blancal Virus Gemini en la producción de tomate. La Lima, Honduras, FRIA. 46 p.

V ALAREZO, O.; CAÑARTE, E. 1995. Cultivos y malezas hospederos de la mosca blanca en Manabí. INIAP (Ecuador) no. 5:5-7.

VIANA, A. 1999. Flujo de germoplasma e impacto del PROFRIJOL en Centro América. Hojas de PROFRIJOL (Guatemala) no. 6:2-3.

VOYSEST, O. 1983. Variedades de fríjol en América Latina y su origen. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 87 p.