

Evaluación de la resistencia de genotipos de frijol al virus del mosaico dorado amarillo y al gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleóptera: Chrysomelidae)

José Orlando Suazo Mejía

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación de la resistencia de genotipos de frijol al virus del mosaico dorado amarillo y al gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleóptera: Chrysomelidae)

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

Presentado por

José Orlando Suazo Mejía

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

Evaluación de la resistencia de genotipos de frijol al virus del mosaico dorado amarillo y al gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleóptera: Chrysomelidae)

José Orlando Suazo Mejía

Resumen. La adopción de variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se basa en altos rendimientos, calidad comercial del grano y resistencia a factores limitantes (bióticos y abióticos). El gorgojo de almacén *Zabrotes subfasciatus* y el virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF) son factores bióticos que afectan directamente la calidad del grano y el rendimiento. El objetivo del estudio fue evaluar la resistencia al gorgojo *Z. subfasciatus* y al VMDAF en 21 líneas de frijol de la Universidad de Puerto Rico y tres variedades testigos (Amadeus 77, Surú y Seda). La resistencia a *Z. subfasciatus* debido a la presencia del locus APA (arcelina-fitoheماغلوتينina-inhibidor de α -amilasa) en las líneas PR, se evaluó utilizando frascos de vidrio conteniendo 10 semillas y 5 parejas del gorgojo, en un diseño completamente al azar con 12 repeticiones. La resistencia al VMDAF se evaluó en condiciones de campo utilizando un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, y la presencia del marcador molecular SR2 del gen *bgm-1* en el laboratorio. Las líneas PR 1729-44 y PR 1729-45 fueron altamente resistentes al gorgojo presentando menor índice de susceptibilidad, porcentaje de emergencia de adultos y daños a las semillas, y mayor tiempo promedio de desarrollo del insecto. Ambas líneas resultaron ser resistentes al VMDAF y presentaron buen rendimiento en el campo, y presentaron el marcador SR2 del gen *bgm-1*. Estas líneas serán evaluadas en condiciones de producción y almacenamiento en fincas de agricultores.

Palabras clave: Gen *bgm1*, locus *APA*, *Phaseolus vulgaris* L.

Abstract. The adoption of improved bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) is based on high yields, commercial grain quality and resistance to biotic and abiotic limiting factors. The warehouse weevil *Zabrotes subfasciatus* and the bean golden yellow mosaic virus (BGYMV) are biotic factors that directly affect grain quality and yield. The objective of the study was to evaluate resistance to weevil *Z. subfasciatus* and BGYMV in 21 bean lines of the University of Puerto Rico and three control varieties (Amadeus 77, Surú and Seda). Resistance to *Z. subfasciatus* due to the presence of the APA locus (arcelina-phytohemagglutinin- α -amylase inhibitor) in the PR lines was evaluated using glass bottles containing 10 seeds and 5 weevil couples, in a completely randomized design with 12 repetitions. Resistance to BGYMV was evaluated under field conditions using a randomized complete block design with four replications, and the presence of the SR2 molecular marker of the *bgm-1* gene in the laboratory. The PR 1729-44 and PR 1729-45 lines were highly resistant to the weevil presenting a lower susceptibility index, adult emergence rate and damage to the seeds, and a longer average insect development time. Both lines turned out to be resistant to BGYMV and presented good performance in the field, and presented the SR2 marker of the *bgm-1* gene. These lines will be evaluated in conditions of production and storage in producers' farms.

Key words: *APA* locus, *bgm1* gene, *Phaseolus vulgaris* L.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	20
5. RECOMENDACIONES.....	21
6. LITERATURA CITADA.....	22
7. ANEXOS	25

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Relación de los 24 genotipos y testigos de frijol evaluados por resistencia al gorgojo mexicano <i>Zabrotes subfasciatus</i> . Zamorano, Honduras 2019.	4
2. Marcador molecular SCAR SR2 para identificar el gen de resistencia <i>bgm-1</i> de resistencia al virus de mosaico dorado amarillo del frijol.	8
3. Reactivos para mezcla maestra de PCR con el marcador SCAR SR2.	9
4. Perfil térmico para PCR con marcador molecular SCAR SR2.	9
5. Número de huevos ovopositados total y por hembra en las líneas de frijol común infestadas con <i>Zabrotes subfasciatus</i> . Zamorano, Honduras, 2019.	11
6. Emergencia de adultos machos, hembras, proporción de hembras y total en las líneas de frijol común infestadas con <i>Zabrotes subfasciatus</i>	12
7. Porcentaje de emergencia de adultos, tiempo promedio de desarrollo e índice de susceptibilidad en las líneas de frijol común infestadas con <i>Zabrotes subfasciatus</i>	14
8. Porcentaje de semilla dañada, porcentaje de pérdida de peso y número de perforaciones en las líneas de frijol común infestadas con <i>Zabrotes subfasciatus</i>	16
9. Rendimientos, incidencia y severidad del virus del mosaico dorado amarillo y marcador molecular SR2 presente (+) o ausente (-) en líneas de frijol común....	18
10. Líneas resistentes al ataque de <i>Zabrotes subfasciatus</i> y virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF).....	19
Anexos	
1. Coeficiente de correlación de Pearson para cada variable evaluada para resistencia a gorgojo <i>Zabrotes subfasciatus</i>	25
2. Resultados de electroforesis para determinar presencia o ausencia del gen <i>bgm-1</i> con el marcador molecular SCAR SR2.....	26

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los granos básicos más cultivados en la región de Centroamérica. Es un alimento básico y fuente importante de proteínas, calorías, minerales y vitaminas (Rosas 2003). El éxito en la producción de frijol influye directamente en la seguridad alimentaria y nutricional de las familias rurales y de los consumidores urbanos. Factores limitantes incluyendo plagas y enfermedades, estrés de sequía e incrementos de temperatura causados por efectos del cambio climático y deficiencias de suelo, afectan al cultivo de frijol y la productividad del grano.

El gorgojo del frijol *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera; Bruchidae) es una de las plagas de almacén de mayor impacto en la región centroamericana. Las hembras adhieren firmemente los huevos a la testa (concha) de frijol. Al eclosionar el huevo, la larva penetra la testa y se desarrolla en el interior del grano. Antes de empupar, la larva prepara una ventana justo debajo de la testa por la cual emerge el adulto (Lardizábal *et al.* 2010). Existen muchas medidas de control de esta plaga incluyendo la cosecha temprana del cultivo, aplicación de productos químicos, no mezclar el frijol infestado con el limpio y limpieza al almacenarlo. Es importante considerar los impactos que producen estas plagas en cuánto a las pérdidas totales del grano almacenado.

En Centro América y El Caribe, el virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF) es una de las enfermedades más importantes en el cultivo del frijol. Este virus es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). La infección se puede percibir induciendo síntomas de amarillamiento y clorosis en las hojas y retraso en el crecimiento (Morales y Anderson 2001). El desarrollo de las hojas posterior a la infección es deforme y su tejido muere eventualmente. La infección del virus afecta el desarrollo de las vainas, reduce el peso, causa deformaciones y reduce el rendimiento de grano. El VMDAF es la enfermedad viral más importante en América Central y puede causar pérdidas de 30 a 100% dependiendo de la variedad, edad de la planta y la población del vector mosca blanca (Araya 2008).

La adopción de variedades mejoradas por los agricultores se basa en la resistencia a factores bióticos (enfermedades y plagas), y abióticos (sequía, baja fertilidad y calor), y alto rendimiento y calidad comercial del grano, que deben ser superiores a las variedades tradicionales y mejoradas utilizadas en las parcelas de producción para autoconsumo y comercialización. Actualmente, no hay disponibles variedades de frijol resistentes a

gorgojos de grano que posean resistencia al VMDAF y otras características agronómicas y comerciales deseables para la producción en Centro América. La evaluación de genotipos de frijol que poseen resistencia al virus del mosaico común (VMCF), VMDAF y a gorgojos de almacén, y con buena adaptación agronómica y calidad comercial, es indispensable para que puedan ser aceptadas posteriormente como variedades mejoradas.

Según Cardona *et al.* (1990), la expresión de resistencia a gorgojos está ligada con la presencia de cinco variantes de la proteína arcelina presentes en la semilla (Arc+1, +2, +3, +4 y +5). Harmsen *et al.* (1988) reportó que cuatro tipos de arcelina están asociados a diferentes niveles de resistencia. Posteriormente se reportó que la resistencia provenía de la presencia de tres genes ligados a la arcelina, fitohemaglutinina y alfa-amilasa (locus APA). Estas proteínas ejercen un efecto antibiosis, afectando el aparato digestivo del insecto, por tal razón se reduce el desarrollo de las larvas y la fertilidad de los adultos (Osborni *et al.*, 1988; Hartweck *et al.*, 1997)

Al evaluar la resistencia de genotipos de frijol siempre se debe iniciar con evaluaciones fenotípicas de las características de interés. En el caso del VMDAF, las evaluaciones fenotípicas consisten en siembras de parcelas con los genotipos en condiciones donde se tiene certeza que hay presencia del virus y el vector. Datos como la incidencia y severidad, así como los efectos en el rendimiento indican la reacción de un genotipo en relación al virus.

De manera similar, las evaluaciones fenotípicas de la resistencia a *Z. subfasciatus* se realizan mediante la evaluación de los daños causados por el ataque del gorgojo en grano almacenado. Los diferentes genotipos de frijol son expuestos al ataque del gorgojo bajo condiciones controladas para tomar datos de los daños causados en los granos y los efectos en la reproducción de la plaga como resultado de la resistencia del genotipo.

Las evaluaciones fenotípicas de la resistencia al VMDAF son complementadas con evaluaciones genotípicas realizadas en laboratorio, utilizando métodos de selección asistida con marcadores moleculares (SAM) para determinar las características de un genotipo con base en la presencia o ausencia de los marcadores ligados a los genes de resistencia. Mediante el uso del marcador molecular SCAR (regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas) SR2 se puede identificar la presencia del gen recesivo *bgm-1* que confiere resistencia al VMDAF.

El objetivo de este estudio fue evaluar la resistencia de genotipos de frijol al ataque del VMDAF y el gorgojo *Z. subfasciatus*, y características agronómicas y de calidad de grano, para seleccionar los genotipos que deben pasar a la fase de validación en finca y su posterior liberación como variedades mejoradas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la resistencia a *Zabrotes subfasciatus*.

El estudio se llevó a cabo en el Banco de Germoplasma del Programa de Investigaciones del Frijol (PIF), en la Escuela Agrícola Panamericana-Zamorano, localizadas en el departamento de Francisco Morazán, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras. La localidad presenta una temperatura promedio anual de 24 °C y una precipitación 1100 mm por año y se encuentra a una altura de 800 msnm.

Material experimental. Se utilizaron frascos de vidrio de 120 mL conteniendo 10 semillas por cada tratamiento (genotipo) a evaluar. Los frascos tienen las tapas perforadas con un agujero de aproximadamente 2.5 cm de diámetro y una malla de 40 mesh para prevenir el escape de los gorgojos. Seguidamente, se colocaron cinco parejas de gorgojos por cada frasco. Estos frascos se ubicaron en cámaras de cría y se mantuvieron en condiciones ambientales de 28 ± 1 °C y humedad relativa de $65 \pm 5\%$. Las condiciones ambientales se tomaron con un registrador de temperatura y humedad iButton® (DS1923). A los 17 días después de la infestación (DDI) se procedió a retirar los adultos colocados en los frascos para iniciar las evaluaciones de las variables.

Tratamientos. Se evaluaron 24 tratamientos, incluyendo 21 líneas de frijol resistentes a gorgojos provenientes de la Universidad de Puerto Rico y tres variedades testigos, dos mejoradas (Amadeus 77 y Surú) y una criolla testigo (Seda) del PIF (Cuadro 1).

Diseño experimental y análisis estadístico. Las unidades experimentales fueron frascos de vidrio de 120 mL conteniendo 10 semillas del tratamiento (genotipo), infestadas con cinco parejas de adultos de *Z. subfasciatus*. Se utilizó un diseño completamente al azar con 12 repeticiones. Los datos fueron analizados con el programa estadístico “InfoStat” versión 2018 a través de un análisis de varianza y una separación de medias DMS Fisher ($P \leq 0.05$). Se realizó una transformación de datos por raíz cuadrada para todas las variables excepto tiempo promedio de desarrollo. Para comparar relaciones entre las variables se utilizó un coeficiente de correlación de Pearson.

Infestación. Se clasificaron los gorgojos por sexo para posteriormente introducir las cinco parejas en cada tratamiento. Para poder manejar con facilidad a los gorgojos, estos se expusieron durante 2 minutos a temperaturas de 8 °C, de esta manera su movilidad se ve reducida temporalmente.

Cuadro 1. Relación de los 24 genotipos y testigos de frijol evaluados por resistencia al gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus*. Zamorano, Honduras 2019.

N°	Genotipo	N°	Genotipo	N°	Genotipo
1	PR 1729-44	9	PR 1429-3	17	PR 1813-11
2	PR 1729-45	10	PR 1429-4	18	PR 1812-1
3	PR 1729-46	11	PR 1464-14	19	PR 1824-51
4	PR 1729-66	12	PR 1803-19	20	PR 1845-45
5	PR 1729-67	13	PR 1813-6	21	PR 1691
6	PR 1729-68	14	PR 1803-21	22	Surú
7	PR 1729-69	15	PR 1803-54	23	Amadeus 77
8	PR 1729-25	16	PR 1813-7	24	Seda

Testigos: Amadeus 77 y Surú (mejorados) y Seda (criollo).

Variables medidas. Las variables medidas fueron el número de huevos ovopositados, ovoposición por hembra, número y porcentaje de emergencia de adultos, porcentaje de hembras emergidas, duración del ciclo de vida, porcentaje de pérdida de peso de semilla, porcentaje de semilla dañada y número de perforaciones.

Ovoposición. Se contó el número de huevos presentes en la testa de las semillas de frijol a los 17 DDI.

Ovoposición por hembra. Se dividió el número de huevos ovopositados entre la cantidad total de hembras colocadas por frasco.

Número de adultos emergidos. Es el total de adultos emergidos en el primer ciclo, mediante observaciones cada tres días a partir de 23 DDI.

Porcentaje de adultos emergidos (PAE). Es la relación entre el total de adultos emergidos (TAE) con respecto al total de huevos ovopositados (THO) mostrado en la ecuación 1.

$$PEA (\%) = \frac{TAE}{THO} \times 100 \quad [1]$$

Proporción de hembras emergidas (PHE) de *Z. subfasciatus*. Una vez finalizada la emergencia, se contaron y sexaron los gorgojos. La proporción de hembras se obtuvo a partir del número total de hembras emergidas (THE) entre el total de adultos emergidos (TAE) (ecuación 2).

$$PHE = \frac{THE}{TAE} \quad [2]$$

Tiempo promedio de desarrollo (TPD). Es la sumatoria del producto de adultos emergidos por día (AED) por los días de emergencia de adultos (DEA), dividido entre el total de adultos emergidos (TAE) (ecuación 3).

$$TPD = \frac{\Sigma(AED \times DEA)}{TAE} \quad [3]$$

Índice de susceptibilidad de genotipos de frijol a *Z. subfasciatus*. (Dobie y Kilminster 1978). Se dividió el logaritmo del total de adultos emergidos [Log (TAE)] entre el tiempo promedio de desarrollo (TPD) de los gorgojos (ecuación 4).

$$IS = \frac{\text{Log}(TAE)}{TPD} \times 100 \quad [4]$$

Porcentaje de semilla dañada (PSD). Posterior a la emergencia de adultos, se calculó el número total de semillas dañadas (TSD) entre el total de semillas utilizadas (TSU) multiplicado por 100. (ecuación 5).

$$PSD (\%) = \frac{TSD}{TSU} \times 100 \quad [5]$$

Porcentaje de pérdida de peso de semillas (PPS). Antes de colocar las semillas en cada frasco, se midió el peso inicial (Pi). Una vez concluida la emergencia de adultos, se registró el peso final (Pf) de las 10 semillas. La diferencia en los pesos representó el peso perdido de las semillas debido al consumo por gorgojo (ecuación 6).

$$PP (\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad [6]$$

Número total de perforaciones. Se cuantificó el total de perforaciones en la semilla de frijol de cada unidad experimental.

Evaluación de la resistencia a VMDAF.

Las evaluaciones fenotípicas de la reacción al VMDAF se realizaron en parcelas sembradas en el lote 27, Zona II de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, localizadas en el departamento de Francisco Morazán, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras. Las evaluaciones genotípicas se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF.

Tratamientos. Los tratamientos fueron 24 genotipos de frijol incluyendo 21 líneas resistentes a gorgojos de grano provenientes de la Universidad de Puerto Rico, dos variedades mejoradas testigos (Amadeus 77 y Surú) y una variedad criolla testigo (Seda) (Cuadro 1).

Diseño experimental y análisis estadístico. Las unidades experimentales fueron surcos individuales de 2 m de largo distanciados a 0.6 m entre surcos y 0.1 m entre plantas. Estas fueron distribuidas en un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones. Los datos fueron analizados con el programa estadístico “InfoStat” versión 2018 a través de un análisis de varianza y una separación de medias DMS Fisher ($P \leq 0.05$).

Manejo experimental. Se realizaron evaluaciones fenotípicas en el campo para determinar la resistencia al VMDAF, y los efectos en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los genotipos. Adicionalmente, se utilizó el marcador molecular SR2 para identificar la presencia del gen *bgm1* de resistencia al VMDAF para identificar los genotipos resistentes mediante la selección asistida con marcadores moleculares.

Evaluaciones fenotípicas en campo.

Para el establecimiento de la parcela de evaluación de la resistencia al VMDAF, se sembraron surcos esparcidores conteniendo plantas de líneas de frijol común y frijol pallar (*Phaseolus lunatus*) susceptibles al VMDAF, con el propósito que el virus y el vector mosca blanca, se reproduzcan cerca de las parcelas experimentales y las infectaran cuando estas se establecieran dos semanas después.

Las parcelas se manejaron según las recomendaciones para estos estudios. En el lote experimental se evitó el control de insectos ya que esto puede reducir o eliminar la presencia del vector del VMDAF, la mosca blanca. Durante el cultivo se protegió contra la bacteriosis común causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, utilizando los productos Agri-mycin 16.5 WP con ingredientes activo estreptomicina y oxitetraciclina y dosis de 250 g/ha y EK- Micina 20 SC con ingredientes activo estreptomicina kasugamicina. No se realizó ningún control para insectos. Las malezas se controlaron con aplicaciones de Fusilade 12.5 EC con ingrediente activo fluazifop-p-butyl, dosis de 1.4 L/ha y Flex 25 SL con ingrediente activo fomesafen, dosis de 1 L/ha. El control de malezas se realizó en prefloración.

VARIABLES MEDIDAS. Se midieron las variables de incidencia y severidad de daños, así como los efectos en el rendimiento causados por el VMDF.

Incidencia. Se expresa en porcentaje de plantas que presentan síntomas típicos causados por el VMDF.

Severidad. Se utilizó el sistema de evaluación de 1 a 9 para la severidad de los daños causados por el VMDF, en donde 1 = plantas libres de virus y 9 = plantas severamente dañadas o muertas. Los síntomas causados por VMDF se presentan después de la infección y su desarrollo en las plantas; incluyen clorosis, amarillamiento, deformación de las hojas, enanismo, deformación de vainas y reducción del rendimiento (Rosas 2003).

Rendimiento. La evaluación se hizo en la madurez de cosecha. Al momento de la cosecha, se contó el número de plantas cosechadas, con este valor se realizó un ajuste para rendimientos en kg/ha. El ajuste se realizó considerando una densidad de 166,666 plantas por hectárea obtenida a partir de los distanciamientos utilizados. Se utilizó un porcentaje de humedad del 14%.

Evaluaciones genotípicas en laboratorio.

Se evaluaron los genotipos con el marcador molecular SR2 para determinar la presencia del gen *bgm-1* que confiere resistencia al VMDF.

Germinación de semillas. Se pusieron a germinar 10 semillas de cada genotipo de frijol, colocándolas en papel de germinación humedecido. Los papeles se enrollaron y se aseguraron con alambres y se colocaron en un recipiente con agua para que se mantengan húmedos.

Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó utilizando las semillas germinadas. Se colocó el primer par de hojas de estas semillas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le agregó 50 mL de buffer PEX (etil xantogenato de potasio). Con una barra de plexiglass se maceró el tejido y posteriormente se adicionaron 450 µL de buffer PEX. Las muestras se colocaron en baño maría a 65 °C durante 60 minutos. Luego se centrifugó la muestra a 14,000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó una mezcla de etanol y acetato de amonio (6:1), a 7.5 M durante 30 minutos a temperatura ambiente; esto permite que se dé la precipitación de los ácidos nucleicos en la muestra. Los ácidos nucleicos se pelletizaron mediante una centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos.

Se eliminó el sobrenadante para luego añadir 300 µL de RNAsa (100 µg/mL) + buffer TE (Tris-ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) 0.1X. Las muestras fueron agitadas y se colocaron en baño maría a 37 °C por 1 hora, con el objetivo de eliminar el ARN de la misma. Se centrifugó la muestra nuevamente a 14,000 rpm durante 3 minutos, de esta forma se precipitó el ADN limpio. Se llenaron tubos Eppendorf nuevos con una mezcla de etanol:

acetato de sodio (10:1) al 3 M. Posteriormente, se mezclaron invirtiendo los tubos para que se precipite a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se centrifugó la muestra a 3,000 rpm durante 5 minutos para peletizar y precipitar el ADN. Posteriormente, se lavaron los pellets de ADN con etanol al 70% para luego centrifugar a 14,000 rpm durante 15 segundos. Se dejó secar a muestra durante 3 horas a temperatura ambiente para finalmente hidratar el pellet con 100 µL de buffer TE 0.1X y almacenarlo a -20 °C.

Cuantificación del ADN. Para cuantificar el ADN se mezclaron las muestras del mismo (1 µL) con el buffer TE 1X (99 µL) en tubos termosensibles con una capacidad de 0.5 mL. Posteriormente, se utilizó un Fluorómetro Quantus®; calibrado con dos muestras previas (blanco y ADN estándar). Para la preparación del blanco se mezcló en un tubo de 0.5 mL buffer TE 1X (100 µL) con la solución de trabajo (100 µL). Para la solución estándar se utilizó 2 µL de (ADN lambda) y se mezcló con 98 µL de buffer TE 1X y 100 µL de solución de trabajo. Finalmente, se dejó reposar durante 5 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente.

Dilución del ADN. Se realizó una dilución del ADN en buffer TE 0.1X hasta obtener un volumen final de 100 µL y con una concentración de 30 ng/µL, con el propósito de uniformizar las muestras y obtener la misma concentración en todas. De esta forma, todas tienen la misma probabilidad de ser amplificadas. Para determinar el volumen de ADN a utilizar se usó la siguiente fórmula: $V_i = (C_f \times V_f) / C_i$. En este caso, C_f corresponde a concentración final (30 ng/µL), V_f es el volumen final (100 µL) y C_i es la concentración inicial de la muestra.

Amplificación del ADN. Se utilizó un termociclador Techne Unit® TC-512 para amplificar el marcador del *bgm-1*, SCAR SR2 (Cuadro 2). Se elaboró una mezcla maestra (Cuadro 3) para cada una de las muestras que se evaluaron, los controles positivos y negativos y aquellas correspondientes al error de pipeteo (una muestra adicional por cada 10 muestras analizadas). Se utilizó el protocolo de perfil térmico correspondiente para la amplificación del gen *bgm-1* (Cuadro 4).

Cuadro 2. Marcador molecular SCAR SR2 para identificar el gen de resistencia *bgm-1* de resistencia al virus de mosaico dorado amarillo del frijol.

SCAR	Tamaño (bp)	Secuencia del SCAR	Gen
SR2	530/570	SR2-R (5'CAC AGC TGC CCT AAC AAA AT 3') SR2-F (5'CAC AGC TGC CAC AGG TGG GA 3')	<i>bgm-1</i>

Fuente: Urrea *et al.* 1996.

El marcador SCAR SR2 indica la presencia del gen *bgm-1* resistente al VMDAF. Posee un tamaño de 530/570 pares de bases (pb), es co-dominante y expresa resistencia en 530 pb (homocigota recesivo *bgm-1/bgm-1*), susceptibilidad en 570 pb (homocigota dominante *Bgm-1/Bgm-1*) y en las dos bandas (heterocigota *Bgm-1/bgm-1*) (Urrea *et al.* 1996).

Cuadro 3. Reactivos para mezcla maestra de PCR con el marcador SCAR SR2.

Reactivos	Cantidad (µL)
dd H ₂ O	9.4
PCR Buffer	2.0
dNTP's + MgCl ₂	0.7
Primer SR2 (F)	0.3
Primer SR2 (R)	0.3
Taq (Enzima)	0.3
ADN Template	2.0
Total	15

Fuente: Alvarado García 2009.

Cuadro 4. Perfil térmico para PCR con marcador molecular SCAR SR2.

Perfil térmico	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	30 s	
Desnaturalización	94	1 min	35
Acoplamiento	60	1 min	35
Extensión	72	3 min	35
Extensión Final	72	5 min	1
Mantenimiento	15		

Fuente: Alvarado García 2009.

Electroforesis y visualización del ADN. El ADN amplificado se observó dentro de un tanque de electroforesis, con gel de agarosa al 1.1% en solución buffer TBE 1X. Se añadió 3µL de buffer de cargas a cada muestra y se utilizó una escalera molecular de 100 pb para medir los resultados. Para realizar la electroforesis se utilizó un Transphor/ Electrophoresis[®] de 2.5 amperios a 110 voltios durante 1 hora y 15 min. Posteriormente se sumergieron los geles de agarosa en solución TBE 0.5X mezclada con tinte para ácidos nucleicos Diamond[®] a una concentración de 0.01% con el propósito de teñir las bandas de ADN. Para la observación de las bandas de ADN se utilizó un trans-iluminador Benchtop[®], UVP, modelo M-26VX (95-0413-01) con longitud de onda de 302 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la resistencia a *Z. subfasciatus*.

Es importante destacar las líneas PR 1803-19 y PR 1729-69 que consistentemente presentaron menor susceptibilidad para cada una de las variables evaluadas. Esto indica un alto nivel de resistencia presentado por estas líneas. Líneas como PR 1729-67 y PR 1845-45 presentaron medias favorables para la mayoría de variables, sin embargo, no obtuvieron las mejores medias para tiempo promedio de desarrollo. Las líneas PR 1429-3 y PR 1429-4 han sido reportadas por Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) y Pizarro Dorado (2015) como resistentes, sin embargo, solamente la línea PR 1429-3 ha presentado buenos resultados. La variedad Surú fue reportada por Pizarro Dorado (2015) como resistente al ataque de *Z. subfasciatus*, sin embargo, Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) y Escobar Vados (2016) también han evaluado esta variedad sin resultados positivos. En este experimento la variedad Surú tampoco demostró resistencia.

Ovoposición. Los conteos de ovoposición total indicaron que los mayores números de huevos se encontraron en las líneas PR 1729-68, Seda y PR 1813-7 con promedios de 48.17, 48.08 y 46.42 respectivamente (Cuadro 5). Por el contrario, las líneas PR 1813-11, PR 1729-44 y Amadeus 77 presentaron el menor número de huevos totales con promedios de 23.00, 24.50 y 24.83 huevos respectivamente. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en relación a esta variable ($P \leq 0.05$). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Soto Pleités (2014) en donde se evaluaron ocho líneas del Programa de Investigación del Frijol (PIF). Miranda *et al.* (2002) y Pizarro Dorado (2015) tampoco obtuvieron diferencias significativas para esta variable.

Mazzoneto y Boica (1999) señalan que el hecho de no tener diferencia significativa en ovoposición total indica uniformidad en el ataque del gorgojo a las diferentes unidades experimentales. Esto se debe a que el factor de antibiosis de las proteínas arcelinas no afecta a los huevos ni a la ovoposición, sino a los instares larvales del gorgojo. Según Cardona (1989), son específicamente el primer y segundo instar larval que se ven retrasados o frenados en su desarrollo producto de las arcelinas.

Ovoposición por hembra. Se obtuvo un promedio de ovoposición por hembra de 7.3 huevos/hembra. Las medias obtenidas oscilan desde 4.6 para la línea PR 1813-11 hasta 9.63 huevos/hembra para la línea PR 1729-68 (Cuadro 5). Por otra parte, Pizarro Dorado (2015) obtuvo un promedio de 20.2 huevos/hembra, Escobar Vados (2016) obtuvo 14.34 huevos/hembra y Howe y Currie (1964) reportaron ovoposiciones promedio de hasta 35 huevos/hembra. Estas variaciones pueden ser provocadas por los días de edad que posee el gorgojo inoculado en los frascos. Experimentos como el de Howe y Currie (1964) se realizaron con adultos recién emergidos de la semilla, es decir, todos tenían un día de

emergencia. El gorgojo hembra comienza a poner sus huevos poco después de emerger y depositarse alrededor del 30-40 por ciento de la producción total de huevos en el primer día después de la emergencia (Utida 1967). Por el contrario, los gorgojos inoculados en este experimento no necesariamente eran recién emergidos por lo que se explica la variación de este valor en las diferentes investigaciones.

Cuadro 5. Número de huevos ovopositados total y por hembra en las líneas de frijol común infestadas con *Zabrotes subfasciatus*. Zamorano, Honduras, 2019.

Genotipos	Número de huevos ovopositados	
	Total	Huevos/Hembra
PR 1813-11	23 ± 16 ns	4.6 ± 3.2 ns
PR 1729-44	24 ± 21	4.9 ± 4.1
Amadeus 77	24 ± 22	4.9 ± 4.4
PR 1803-21	30 ± 13	6.1 ± 2.6
PR 1729-46	34 ± 24	6.9 ± 4.8
PR 1845-45	34 ± 21	6.9 ± 4.2
PR 1803-54	35 ± 15	7.1 ± 2.9
PR 1729-69	35 ± 16	7.1 ± 3.1
Surú	36 ± 24	7.2 ± 4.8
PR 1729-25	36 ± 15	7.3 ± 2.9
PR 1729-67	36 ± 21	7.3 ± 4.2
PR 1813-6	36 ± 20	7.3 ± 4.0
PR 1729-45	39 ± 16	7.9 ± 3.2
PR 1824-51	39 ± 22	7.9 ± 4.4
PR 1691	40 ± 21	8.0 ± 4.3
PR 1464-14	40 ± 29	8.1 ± 5.8
PR 1729-66	41 ± 20	8.3 ± 4.1
PR 1803-19	42 ± 23	8.4 ± 4.7
PR 1812-1	42 ± 27	8.5 ± 5.4
PR 1429-4	43 ± 28	8.7 ± 5.6
PR 1429-3	45 ± 29	9.1 ± 5.8
PR 1813-7	46 ± 26	9.2 ± 5.2
Seda	48 ± 24	9.6 ± 4.8
PR 1729-68	48 ± 27	9.6 ± 5.5
CV (%)	34.6	34.8
DMS (P ≤ 0.05)	17.8	3.6
Significancia	0.26	0.26

ns = no hay diferencias (P ≤ 0.05)

CV = Coeficiente de variación.

DMS = Diferencia mínima significativa.

Total de adultos emergidos. Para los datos correspondientes al total de adultos emergidos para machos y hembras se obtuvo diferencias significativas (P ≤ 0.05) (Cuadro 6). Las

líneas PR 1803-19, PR 1729-67, PR 1845-45 y PR 1729-69 presentaron las medias más bajas del total de adultos emergidos con promedios de 0.83, 1.17, 1.33 y 2.75 respectivamente. Las variedades Surú y Seda presentaron alta emergencia de adultos con medias de 29.42 y 43.92 respectivamente; la línea PR 1813-7 también presentó valores elevados con un promedio de 33.67 adultos emergidos. Considerando que las variedades Seda y Surú son los controles del experimento, se puede decir debido al elevado número de adultos emergidos que había presión ejercida por los gorgojos a las diferentes líneas evaluadas.

Cuadro 6. Emergencia de adultos machos, hembras, proporción de hembras y total en las líneas de frijol común infestadas con *Zabrotes subfasciatus*.

Genotipos	Emergencia de adultos			Total
	Hembras	Machos	Proporción de hembras	
PR 1803-19	0.3 ± 0.6	0.5 ± 0.9	0.17 ± 0.39	0.8 ± 0.4
PR 1729-67	0.5 ± 0.8	0.6 ± 0.7	0.24 ± 0.33	1.2 ± 0.3
PR 1845-45	0.6 ± 0.7	0.7 ± 0.8	0.33 ± 0.39	1.3 ± 0.4
PR 1729-69	0.8 ± 1.3	1.9 ± 1.6	0.23 ± 0.33	2.8 ± 0.3
PR 1729-44	1.4 ± 0.9	1.6 ± 2.5	0.60 ± 0.33	3.1 ± 0.3
PR 1729-68	1.8 ± 1.6	1.4 ± 1.6	0.58 ± 0.4	3.3 ± 0.4
PR 1464-14	2.7 ± 2.3	1.8 ± 1.5	0.56 ± 0.29	4.5 ± 0.3
PR 1729-45	2.3 ± 2.1	2.5 ± 1.9	0.49 ± 0.32	4.8 ± 0.3
PR 1824-51	2.2 ± 1.8	2.6 ± 2.9	0.42 ± 0.30	4.8 ± 0.3
PR 1429-3	2.2 ± 2.4	3.1 ± 1.9	0.37 ± 0.21	5.3 ± 0.2
PR 1729-46	2.8 ± 2.8	3.5 ± 3.9	0.44 ± 0.33	6.3 ± 0.3
PR 1803-54	0.6 ± 2.7	3.5 ± 2.9	0.45 ± 0.33	6.8 ± 0.3
PR 1729-66	2.7 ± 1.8	4.5 ± 4.0	0.42 ± 0.29	7.2 ± 0.3
PR 1729-25	3.5 ± 3.2	3.9 ± 2.9	0.46 ± 0.32	7.4 ± 0.3
PR 1691	3.0 ± 2.7	4.7 ± 3.7	0.40 ± 0.29	7.7 ± 0.3
PR 1812-1	4.2 ± 4.0	4.2 ± 3.4	0.41 ± 0.31	8.4 ± 0.3
PR 1813-11	7.7 ± 5.1	3.3 ± 2.4	0.71 ± 0.16	11.0 ± 0.2
Amadeus 77	7.7 ± 5.5	7.8 ± 6.3	0.44 ± 0.22	15.5 ± 0.2
PR 1429-4	7.7 ± 5.1	8.3 ± 7.2	0.55 ± 0.19	16.0 ± 0.2
PR 1803-21	10.8 ± 5.1	9.6 ± 5.8	0.55 ± 0.20	20.4 ± 0.2
PR 1813-6	12.0 ± 7.3	8.8 ± 7.7	0.55 ± 0.21	20.8 ± 0.2
Surú	18.0 ± 12.7	11.4 ± 7.9	0.61 ± 0.11	29.4 ± 0.1
PR 1813-7	17.9 ± 13.7	15.8 ± 12.9	0.55 ± 0.09	33.7 ± 0.1
Seda	24.1 ± 14.1	19.8 ± 12.3	0.56 ± 0.11	43.9 ± 0.1
CV (%)	52.7	57.7	49.0	46.9
DMS (P ≤ 0.05)	4.6**	4.3**	0.2**	8.2**

CV = Coeficiente de variación.

DMS = Diferencia mínima significativa.

Valores con ** son altamente significativos (P < 0.0001).

Proporción de hembras. Se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las medias de proporción de hembras (Cuadro 6). Las líneas con menor proporción de hembras fueron PR 1803-19 (0.17), PR 1729-69 (0.23) y PR 1729-67 (0.24). Las líneas que presentaron una mayor proporción de hembras fueron PR 1729-44 (0.60), Surú (0.61) y PR 1813-11 (0.71). Es más deseable para una línea que esta posea menor proporción de hembras. Aumentar el número de hembras en relación al total de la población implica que aumentaría el número de ovoposiciones y por lo tanto el daño se vería incrementado (Decheco *et al.* 1987). Considerando que hay diferencias significativas, se puede inferir que los factores de resistencia tienen un efecto sobre la proporción de hembras. Sin embargo, no se encuentra correlación directa entre esta variable con alguna otra lo que dificulta determinar exactamente si la presencia de una arcelina en particular provoca este efecto.

Porcentaje de emergencia de adultos. Se obtuvo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en relación al porcentaje de emergencia de adultos (Cuadro 7). Las líneas que presentaron menores porcentajes de emergencia fueron PR 1803-19: (2.68%), PR 1729-67 (3.42%) y PR 1845-45 (5.92%). Por otra parte, las líneas que presentaron el mayor porcentaje de emergencia fueron los tres controles Amadeus 77 (73.32%), Surú (84.25%) y Seda (92.55%). Con respecto a la línea PR 1429-3, se presentó una emergencia del 13.8%. Esto confirma los resultados obtenidos por Pizarro Dorado (2015), Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) y Escobar Vados (2016), quienes reportan que esta línea posee bajos porcentajes de emergencia de adultos. Por otra parte, la línea PR 1429-4 presentó una emergencia del 44.53% que contrasta con lo encontrado por los autores mencionados anteriormente; estos reportan valores similares a la línea PR 1429-3.

De acuerdo a lo señalado por Harmsen *et al.* (1988), la presencia de diferentes arcelinas confiere diferentes niveles de resistencia. Considerando que la línea PR 1803-19 posee bajos porcentajes de emergencia, así como tiempo promedio de desarrollo largo (se discutirá posteriormente), se puede inferir que esta posee Arc+1.

Tiempo promedio de desarrollo. En cuanto a tiempo promedio de desarrollo se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las diferentes líneas evaluadas (Cuadro 7). En el caso de esta variable entre más días tome el tiempo de desarrollo, menos severo será el ataque del gorgojo a la semilla. Las líneas PR 1803-19, PR 1429-3 y PR 1729-69 presentaron medias de 58.2, 56.9 y 56.3 respectivamente, siendo estos los más altos. Estas presentaron porcentajes de emergencia bajos por lo que se puede suponer que estos poseen Arc+1. Líneas como la PR 1812-1 y PR 1691 presentaron tiempos promedios más largos, pero presentaron porcentajes de emergencia menos favorables por lo que se puede inferir que poseen Arc+2. La línea PR 1429-3 posee resultados similares a los reportados por Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) de 59.9 días; sin embargo, estos difieren a los reportados por Pizarro Dorado (2015) de 31.9 días. Las líneas PR 1803-21 y PR 1813-6 presentaron medias de 37.48 y 37.35 respectivamente y la variedad Surú presentó una media de 36.47, siendo estas las líneas con menor tiempo promedio de desarrollo. La línea PR 1429-4 presentó una media de 41.8 días, estos son superiores a los reportados por Pizarro Dorado (2015) 36.47 e inferiores a los reportados por Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016).

Los tiempos promedios de desarrollo encontrados son superiores a los reportados por Howe y Currie (1964) de 25-26 días con temperaturas promedio de 30 °C. Sin embargo, Wanderley (1992) obtuvo promedios de 32-34 días. Estas diferencias están relacionadas con las condiciones de temperatura y humedad relativa bajo las cuales se realizó la investigación (Wanderley 1992). Esto se puede confirmar al observar los tiempos promedios obtenidos por Altamirano Pólit (1992) quien realizó un estudio similar con temperaturas promedio de 27 °C y obtuvo 32 días en la línea Arc- y 31 días en Danlí-46 (testigos susceptibles).

Cuadro 7. Porcentaje de emergencia de adultos, tiempo promedio de desarrollo e índice de susceptibilidad en las líneas de frijol común infestadas con *Zabrotes subfasciatus*.

Genotipos	Tiempo promedio		
	Emergencia (%)	de desarrollo (días)	Índice de susceptibilidad
PR 1803-19	2.7 ± 3.6	58.2 ± 4.6	0.2 ± 0.4
PR 1729-67	3.4 ± 2.9	50.1 ± 14.2	0.5 ± 0.5
PR 1845-45	5.9 ± 6.6	50.2 ± 8.5	0.5 ± 0.7
PR 1729-68	7.6 ± 6.3	53.7 ± 11.6	0.8 ± 0.7
PR 1729-69	7.7 ± 4.9	56.3 ± 4.8	0.8 ± 0.5
PR 1729-45	10.5 ± 8.1	56.0 ± 6.8	0.9 ± 0.7
PR 1824-51	11.8 ± 10.1	56.2 ± 3.2	1.3 ± 0.5
PR 1729-44	13.8 ± 11.4	54.7 ± 7.0	0.6 ± 0.7
PR 1429-3	13.8 ± 9.1	57.0 ± 3.7	1.1 ± 0.6
PR 1729-46	14.3 ± 11.5	55.4 ± 2.5	1.3 ± 0.7
PR 1464-14	16.7 ± 19.8	46.4 ± 11.7	1.4 ± 0.6
PR 1812-1	17.9 ± 10.4	55.8 ± 3.5	1.5 ± 0.7
PR 1729-66	18.6 ± 8.4	51.8 ± 7.4	1.6 ± 0.6
PR 1691	20.9 ± 12.1	54.9 ± 4.8	1.4 ± 0.7
PR 1729-25	22.2 ± 14.8	53.3 ± 5.0	1.4 ± 0.7
PR 1803-54	25.9 ± 34.6	54.3 ± 3.4	1.4 ± 0.6
PR 1429-4	44.5 ± 20.7	41.8 ± 7.2	2.5 ± 1.2
PR 1813-11	52.6 ± 18.7	37.9 ± 4.2	2.6 ± 0.9
PR 1813-6	57.4 ± 32.3	37.4 ± 2.8	3.4 ± 0.9
PR 1813-7	65.5 ± 25.9	37.8 ± 3.0	3.6 ± 1.3
PR 1803-21	70.8 ± 18.6	37.5 ± 2.3	3.4 ± 0.4
Amadeus 77	73.3 ± 45.9	39.2 ± 2.3	2.9 ± 1.4
Surú	84.3 ± 24.5	36.5 ± 2.4	3.8 ± 0.8
Seda	92.6 ± 18.3	38.8 ± 3.8	4.1 ± 0.8
CV (%)	38.1	12.9	40.9
DMS (P ≤ 0.05)	15.3**	5.3**	0.7**

CV = Coeficiente de variación.

DMS = Diferencia mínima significativa.

Valores con ** son altamente significativos (P < 0.0001).

Índice de susceptibilidad. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) respecto al índice de susceptibilidad entre las diferentes líneas (Cuadro 7). Las líneas PR 1803-19, PR 1845-45 y PR 1729-67 presentaron los índices de susceptibilidad más favorables con valores de 0.2, 0.5 y 0.5 respectivamente. Por el contrario, se puede observar que Seda, Surú y la línea PR 1813-7 obtuvieron las medias menos favorables en cuanto al índice con valores de 3.56, 3.79 y 4.12 respectivamente. La mayoría de los testigos presentaron medias similares a investigaciones realizadas por Pizarro Dorado (2015) y Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) a excepción del testigo Amadeus 77. La media para la línea PR 1429-4 fue consistente con las investigaciones de los autores mencionados anteriormente. La línea PR 1429-3 presentó una media similar a la reportada por Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) sin embargo, difirió con los resultados de Pizarro Dorado (2015) quien presentó índice mucho mayor.

Este índice se utilizó para hacer comparaciones entre tratamientos y para clasificar las variedades como resistente, intermedias o susceptibles al ataque de los insectos (Altamirano Pólit 1992). Entre mayor sea el índice de susceptibilidad, más susceptible será el genotipo que se está analizando. El índice de susceptibilidad da una indicación de la tasa potencial de acumulación de la población de plagas en los diferentes cultivares (Dobie y Kilminster 1978).

Porcentaje de semilla dañada. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) al comparar las medias del porcentaje de semilla dañada (Cuadro 8). Las líneas que presentaron el menor porcentaje de semilla dañada son PR 1803-19 con 2.5%, PR 1729-67 con 5.8% y PR 1845-45 con 7.5%. Por otra parte, las líneas con peor desempeño en esta variable fueron Seda con 96.7%, PR 1803-21 con 90.8% y Surú con 89.2%. Los testigos Seda y Surú presentaron resultados similares a investigaciones previas realizadas en Zamorano. el caso de Amadeus 77 se obtuvo una media de 62.5%, Soto Pleités (2014) y Escobar Vados (2016) obtuvieron porcentajes de semilla dañada bastante inferiores a los obtenidos en este experimento. Por otra parte, Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) y Pizarro Dorado (2015) obtuvieron resultados comparables a los de este experimento. Pizarro (2015) reportó las líneas PR 1429-3 y PR 1429-4 con bajos porcentajes de semilla dañada, sin embargo, solo los resultados obtenidos para la línea PR 1429-3 son comparables. La línea PR 1429-4 presentó un 54% de semilla dañada.

Porcentaje de pérdida de peso de la semilla. En relación al porcentaje de pérdida de peso en semilla, se obtuvo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las diferentes medias (Cuadro 8). Las líneas que presentaron la menor pérdida de peso fueron PR 1845-45 con 0.74%, PR 1803-19 con 1.36% y PR 1729-44 con 1.48%. Por el contrario, el testigo Seda, PR 1813-7 y PR 1803-21 obtuvieron las mayores pérdidas de peso (20.78, 20.49 y 18.01%) respectivamente. Las medias obtenidas para los testigos Seda y Surú reflejan una pérdida importante de peso en la semilla, sin embargo, el testigo Amadeus 77 presentó pérdidas de peso bastante inferiores a las reportadas por Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) y Pizarro Dorado (2015).

Según Montoya (2001) las pérdidas de peso promedio en frijol durante almacenamiento son de un 5.6% en silo y 4.7% en sacos. Las líneas con mejores medias en esta variable han

obtenido porcentajes de pérdida inferiores a los mencionados anteriormente lo que indica características deseadas para el desarrollo de una variedad.

Cuadro 8. Porcentaje de semilla dañada, porcentaje de pérdida de peso y número de perforaciones en las líneas de frijol común infestadas con *Zabrotes subfasciatus*.

Genotipos	Semilla dañada (%)	Pérdida de peso (%)	Número de Perforaciones
PR 1803-19	2.5 ± 4.5	1.4 ± 2.3	0.3 ± 0.5
PR 1729-67	5.8 ± 7.9	2.5 ± 3.1	0.6 ± 0.8
PR 1845-45	7.5 ± 19.3	0.7 ± 3.0	1.4 ± 3.8
PR 1729-44	13.3 ± 11.6	1.5 ± 3.2	1.6 ± 1.4
PR 1729-69	16.7 ± 17.8	2.8 ± 3.2	2.2 ± 2.3
PR 1464-14	17.5 ± 14.9	5.9 ± 5.8	3.2 ± 3.0
PR 1729-68	17.5 ± 17.1	5.8 ± 5.3	2.5 ± 2.2
PR 1429-3	25.8 ± 18.8	4.8 ± 5.7	3.9 ± 3.4
PR 1824-51	27.5 ± 17.7	2.5 ± 2.9	3.7 ± 3.0
PR 1729-45	30.8 ± 19.3	4.3 ± 1.3	4.8 ± 3.8
PR 1803-54	30.8 ± 15.6	5.0 ± 3.3	5.3 ± 3.7
PR 1691	39.2 ± 22.3	5.2 ± 5.7	7.4 ± 6.5
PR 1729-46	39.2 ± 31.2	4.3 ± 4.6	6.2 ± 6.0
PR 1729-25	43.3 ± 26.1	3.3 ± 3.4	7.3 ± 5.7
PR 1729-66	44.2 ± 21.5	5.5 ± 4.4	8.1 ± 5.0
PR 1812-1	44.2 ± 36.8	6.1 ± 6.6	8.3 ± 7.6
PR 1429-4	54.2 ± 29.7	10.7 ± 9.0	15.1 ± 12.8
Amadeus 77	62.5 ± 32.8	7.4 ± 7.0	18.3 ± 13.9
PR 1813-11	63.3 ± 29.3	7.1 ± 8.2	15.6 ± 13.4
PR 1813-6	80.0 ± 31.6	13.4 ± 9.8	29.3 ± 19.1
PR 1813-7	82.5 ± 24.5	20.5 ± 15.5	37.5 ± 26.9
Surú	89.2 ± 18.3	15.6 ± 9.7	39.0 ± 24.6
PR 1803-21	90.8 ± 14.4	18.0 ± 7.8	30.5 ± 11.9
Seda	96.7 ± 7.8	20.8 ± 10.4	42.7 ± 21.1
CV (%)	40.9	63.8	51.8
DMS (P ≤ 0.05)	17.8**	5.4**	9.1**

CV = Coeficiente de variación.

DMS = Diferencia mínima significativa.

Valores con ** son altamente significativos (P < 0.0001).

Número total de perforaciones. Se encontró diferencia significativa (P ≤ 0.05) en relación a las medias del número total de perforaciones (Cuadro 8). Las líneas que presentaron menor número de perforaciones fueron PR 1803-19, PR 1729-67 y PR 1845-45 con medias de 0.3, 0.6 y 1.4 respectivamente. Las líneas con mayor número de perforaciones fueron Seda (42.7), Surú (39.0) y PR 1813-7 (37.5). Los resultados obtenidos en los testigos son comparables a los reportados por Arteaga Montano y Avaroma Gutiérrez (2016) y Escobar

Vados (2016). Algo interesante es que las variables número de perforaciones y total de adultos emergidos son las que presentaron la mayor correlación entre sí en todo el estudio (0.92). Es decir, los resultados obtenidos en una de estas variables reflejarían con mucha semejanza estos resultados para la otra variable.

Evaluación de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol.

Las líneas PR 1729-45, PR 1729-44, PR 1729-46, PR 1813-11 y PR 1812-1 presentaron los mejores resultados en relación a rendimientos, incidencia y severidad del virus (Cuadro 9). Estas líneas obtuvieron resultados superiores a los presentados por el testigo resistente Amadeus 77. De igual manera, el testigo susceptible presentó grandes pérdidas de rendimiento y reportó una alta incidencia y severidad lo que indica que el sitio del experimento se encontraba bajo presión del virus. Es importante mencionar la fuerte incidencia de bacteriosis común (*Xanthomonas axonopodi pv. phaseoli*), enfermedad de difícil control que pudo afectar las lecturas de incidencia y severidad del VMDF.

La bacteriosis común produce síntomas de amarillamiento y deformación de hojas que impidió una evaluación precisa de los síntomas causados por el VMDF. Los resultados presentados en el cuadro 9 deben ser considerados con cautela y es necesario hacer una nueva evaluación de la resistencia al VMDF de las líneas incluidas en el estudio para confirmar los resultados. Sería anticipado decir que líneas como PR 1691 no poseen resistencia al virus; y es que a pesar de obtener rendimientos inferiores a los del testigo positivo, este obtuvo medias muy buenas respecto a incidencia y severidad. Esto quiere decir que la reducción en rendimientos pudo haber sido provocada también por la bacteriosis común.

Las líneas con mejor desempeño fenotípico en relación al virus obtuvieron resultados positivos para el gen de resistencia *bgm-1*, sin embargo, las líneas con rendimientos inferiores al control susceptible también presentaron resultados positivos para el gen *bgm-1*. Esto se podría explicar mediante el uso del marcador molecular SW12 para el *QTL* mayor. Este marcador aumenta la eficiencia del gen *bgm-1* y es usado como complemento del marcador SR2 ya que por sí solo no proveerá la protección adecuada contra el VMDF (Singh *et al.* 2000). Es probable que las líneas que obtuvieron resultados positivos para el gen *bgm-1* y bajos rendimientos en campo carezcan del *QTL* mayor.

Rendimiento. Se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en relación a las medias de los rendimientos (Cuadro 9). Las líneas PR 1729-45 y PR 1729-44 se destacaron con rendimientos de 1417 y 1397 kg/ha respectivamente. Por otra parte, también se obtuvo rendimientos bajos de hasta 93 kg/ha por la línea PR 1729-25. El control susceptible Seda obtuvo rendimientos bajos de 499 kg/ha, es decir, alta presión del virus

De acuerdo con Lardizábal *et al.* (2010), mediante el uso de prácticas básicas de producción los rendimientos van desde 57 quintales a 75 qq/ha (2,590 kg/ha - 3,409 kg/ha). Schwartz y Pastor-Corrales (1987) reportaron pérdidas de entre 52 - 100% en los rendimientos causados por el ataque de VMDF. Esto quiere decir que cualquier línea que supere rendimientos de 1,300 kg/ha sobrepasa los rendimientos esperados para un cultivo sin ningún tipo de control para el ataque del VMDF. Es importante mencionar que el testigo resistente (Amadeus 77) obtuvo rendimientos de 1,133 kg/ha; aquellas líneas que superaron

en rendimiento al testigo resistente se pueden reportar como resistentes al virus. Cabe destacar que los rendimientos en Amadeus 77 pudieron haber sido superiores a los obtenidos en este estudio sin considerar los posibles efectos que tuvo la bacteriosis común sobre este.

Cuadro 9. Rendimientos, incidencia y severidad del virus del mosaico dorado amarillo y marcador molecular SR2 presente (+) o ausente (-) en líneas de frijol común.

Genotipos	Evaluación fenotípica			Evaluación genotípica
	Rendimiento (kg/ha)	Incidencia (%)	Severidad (1-9)	SR2 (<i>bgm-1</i>)
PR 1729-45	1417 a	37.5 ab	3.0 a	+
PR 1729-44	1397 ab	35.0 a	3.0 a	+
PR 1729-46	1183 ab	50.0 abcde	4.5 abcd	+
PR 1813-11	1170 ab	55.0 bcdef	3.8 abc	+
PR 1812-1	1160 ab	40.0 ab	3.5 ab	-
Amadeus 77	1133 ab	60.0 cdefg	5.5 cde	+
PR 1803-21	1118 ab	72.5 fg	5.3 bcde	+
PR 1691	1064 ab	45.0 abcd	3.5 ab	+
Surú	1017 abc	77.5 g	8.0 g	-
PR 1429-4	919 abcd	62.5 defg	5.5 cde	+
PR 1813-6	891 abcd	35.0 a	4.0 abc	+
PR 1813-7	878 abcd	42.5 abc	4.0 abc	+
PR 1803-54	852 bcd	72.5 fg	6.0 def	+
Seda	499 cde	100 h	8.0 g	-
PR 1464-14	480 cde	67.5 efg	5.5 cde	+
PR 1729-66	476 cde	62.5 defg	5.5 cde	+
PR 1429-3	467 de	70.0 fg	6.0 def	+
PR 1729-69	364 de	70.0 fg	7.0 efg	+
PR 1803-19	329 de	75.0 g	6.0 def	+
PR 1845-45	245 e	72.5 fg	6.5 efg	+
PR 1729-67	224 e	67.5 efg	6.5 efg	+
PR 1824-51	215 e	65.0 efg	7.5 fg	+
PR 1729-68	213 e	65.0 efg	6.5 efg	+
PR 1729-25	93 e	60.0 cdefg	6.5 efg	+
CV (%)	50.82	20.40	23.32	
DMS ($P \leq 0.05$)	562.8**	17.5**	1.8**	

Valores con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

CV = Coeficiente de variación.

Valores con ** son altamente significativos ($P < 0.0001$).

Incidencia. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las medias obtenidas para la incidencia del VMDF (Cuadro 9). Las líneas que presentaron las incidencias más

bajas fueron PR 1729-44 (35.0%), PR 1813-6 (35.0%) y 1729-45 (37.5%). El testigo resistente Amadeus 77 obtuvo una incidencia del 60%. Las líneas que presentaron las incidencias más altas fueron Seda (100%), Surú (77.5%) y 1803-19 (75.0%).

Severidad. Las líneas presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre sí en relación a la severidad (Cuadro 9). Las líneas PR 1729-45, PR 1729-44, PR 1691 y PR 1812-1 presentaron las menores medias para severidad, (3, 3, 3.5 y 3.5) respectivamente. Surú, Seda y 1824-51 presentaron las medias para la severidad del virus con valores 8, 8 y 7.5 respectivamente. El testigo Amadeus 77 presentó una severidad de 5.5, probablemente afectada también por el brote de bacteriosis común que pudo haber facilitado el ataque del virus.

Resistencia al virus del mosaico dorado amarillo y a *Zabrotes subfasciatus*.

Resistencia a *Z. subfasciatus*. Hubo varias líneas que consistentemente presentaron un alto grado de resistencia a cada una de las variables relacionadas al ataque del gorgojo. Cabe destacar la línea PR 1803-19 que no solo fue consistentemente resistente en todas las variables, sino que también fue la más resistente de todas para el ataque del gorgojo. Líneas como PR 1729-44, PR 1729-69 y PR 1729-68 presentaron consistentemente buenas medias en todas las variables evaluadas. Adicionalmente, hay otras líneas que presentaron niveles de resistencia considerables.

Resistencia a VMDAF. Se obtuvo cinco líneas que lograron superar en todas las variables al testigo resistente por lo que se puede asegurar que estas son resistentes al virus (PR 1729-45, PR 1729-44, PR 1729-46, PR 1813-11 y PR 1812-1). Se encontraron otras líneas que presentaron medias favorables para algunas variables más no para todas, por lo que no se puede asegurar que estas sean resistentes.

Resistencia combinada a *Z. subfasciatus* y VMDAF. Finalmente, se encontraron ciertas líneas que presentaron considerable resistencia en ambos estudios. Estas líneas presentaron desempeños destacados en condiciones de estrés por VMDAF y gorgojo mexicano (PR 1729-44 y PR 1729-45).

Cuadro 10. Líneas resistentes al ataque de *Zabrotes subfasciatus* y virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF).

Resistencia <i>Z. subfasciatus</i>	Resistencia VMDAF	Resistencia para ambos
PR 1803-19	PR 1729-44	PR 1729-44
PR 1729-44	PR 1729-45	PR 1729-45
PR 1729-69	PR 1729-46	
PR 1729-68	PR 1813-11	
PR 1729-67		
PR 1845-45		
PR 1429-3		
PR 1729-45		

4. CONCLUSIONES

- Las líneas PR 1803-19, PR 1729-44, PR 1729-69 y PR 1729-68 presentaron la mayor resistencia al ataque del gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus*.
- Las líneas PR 1729-44, PR 1729-45, PR 1729-46 y PR 1813-11 presentaron la mayor resistencia al ataque del VMDAF.
- Las líneas PR 1729-44 y PR 1729-45 presentaron niveles altos de resistencia a ambos *Zabrotes subfasciatus* y VMDAF.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar las líneas resistentes como progenitores para transferir las características deseables de resistencia a gorgojo *Z. subfasciatus*.
- Validar agronómica y comercialmente las líneas PR 1729-44 y PR 1729-45 en condiciones de finca bajo el manejo del cultivo y en almacén en zonas frijoleras de Honduras.
- Evaluar la resistencia de estas líneas al ataque del gorgojo del frijol *Acanthoscelides obtectus*.
- Eliminar la variable “número de perforaciones” ya que posee una correlación de 0.92 con la variable “total de adultos emergidos”.

6. LITERATURA CITADA

- Altamirano Pólit RC. 1992. Efecto de arcelina en la tasa de crecimiento y reproducción de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 96 p.
- Alvarado García PG. 2009. Optimización del protocolo para el marcador molecular SR21 del gen *bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol. [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 23 p.
- Araya CM. 2008. Guía de identificación y manejo integrado de enfermedades del frijol en América Central [internet]. Managua: IICA; [consultado el 02 de jun. de 2019]. <http://repiica.iica.int/docs/B0891E/B0891E.pdf>
- Arteaga Montano FG, Avaroma Gutiérrez FC. 2016. Evaluación de la resistencia del frijol tepari *Phaseolus acutifolius* al ataque del gorgojo de almacén *Zabrotes subfasciatus*. [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 24 p.
- Cardona C, Posso CE, Kornegay J, Valor J, Serrano M. 1989. Antibiosis effects of wild dry bean accessions on the mexican bean weevil and the bean weevil (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Economic Entomology*. 82(1):310–315. doi:10.1093/jee/82.1.310.
- Cardona C, Kornegay J, Posso CE, Morales F, Ramirez H. 1990. Comparative value of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 56(2):197–206. doi:10.1111/j.1570-7458.1990.tb01397.x.
- Decheco A, Moncada B, Ortiz M. 1987. Influencia de la temperatura sobre el “gorgojo del frijol” *Zabrotes subfasciatus* [internet] Lima: Revista Peruana de Entomología; [consultado el 27 de ago. de 2019]. <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v29/pdf/a16v29.pdf>
- Dobie P, Kilminster AM. 1978. The susceptibility of triticale to post-harvest infestation by *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus granarius* (L.). *Journal of Stored Products Research*. 14(2-3):87–93. doi:10.1016/0022-474x(78)90003-6.

- Escobar Vados DT. 2016. Evaluación de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) almacenado al ataque del gorgojo *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 27 p.
- Harmsen R, Bliss FA, Cardona C, Posso C, Osborn TC. 1988. Transferring genes for arcelin protein from wild to cultivated beans: Implications for bruchid resistance. *Arbic* 31: 54-55.
- Hartweck LM, Cardona C, Osborn TC. 1997. Bruchid resistance of common bean lines having an altered seed protein composition. *Theor Appl Genet.* 95(5-6):1018–1123. doi:10.1007/s001220050656
- Howe RW, Currie JE. 1964. Some laboratory observations on the rates of development, mortality and oviposition of several species of Bruchidae breeding in stored pulses. *Bull. Entomol. Res.* 55(3):437–477. doi:10.1017/S0007485300049580
- Lardizabal RD, Arias S, Segura R. 2010. Manual de producción de frijol [internet]. La Lima: USAID; [consultado el 13 de mar. de 2019]. http://www.agronegocioshonduras.org/wp-content/uploads/2014/06/manual_de_produccion_de_frijol.pdf
- Mazzonetto F, Boiça Jr AL. 1999. Determinação dos tipos de resistência de genótipos de feijoeiro ao ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). *An. Soc. Entomol. Bras.* 28(2):307–311. doi:10.1590/S0301-80591999000200014
- Miranda JE, Toscano LC, Fernandes MG. 2002. Evaluación de resistencia de diferentes genotipos de *Phaseolus vulgaris* a *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleoptera:Bruchidae) [internet]. Campina Grande; [consultado el 29 de ago. de 2019]. <https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP28-04-571-576.pdf>
- Montoya Aburto GG. 2001. Evaluación de pérdidas físicas y monetarias en dos sistemas de almacenamiento de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en El Paraíso, Honduras. [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 52 p.
- Morales FJ, Anderson PK. 2001. The emergence and dissemination of whitefly transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol.* 146(3):415–441. eng. doi:10.1007/s007050170153.
- Osborn TC, Alexander DC, Sun SS, Cardona C, Bliss FA. 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science.* 240(4849):207–210. eng. doi:10.1126/science.240.4849.207.
- Pizarro Dorado I. 2015. Evaluación de la resistencia de genotipo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al ataque del gorgojo del frijol *Zabrotes subfasciatus*. Proyecto Especial de Graduación, Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 17 p.

- Rosas JC. 2003. Recomendaciones para el manejo agronómico del cultivo de frijol. Programa de Investigaciones en Frijol [internet]. Tegucigalpa: Editorial Litocom; [consultado el 10 de jun. de 2019]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2424/1/prueba%2009.pdf>.
- Schwartz HF, Pastor-Corrales MA. 1989. Problemas de producción de frijol en el trópico. 2a ed. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 805 p. ISBN: 958 9183-04-2.
- Singh SP, Morales FJ, Miklas PN, Terán H. 2000. Selection for bean golden mosaic resistance in intra and interracial bean populations. *Crop Science*. 40(6):1565. doi:10.2135/cropsci2000.4061565x.
- Soto Pleités OJ. 2014. Evaluación de la resistencia de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) al ataque del gorgojo del frijol *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 24 p.
- Urrea CA, Miklas PN, Beaver JS, Riley RH. 1996. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 121(6):1035–1039. doi:10.21273/JASHS.121.6.1035.
- Utida S. 1967. Collective oviposition and larval aggregation in *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera, Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*. 2(4):315-322. doi:10.1016/0022-474x(67)90077-x
- Wanderley V. 1992. Influencia do número de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. E. *Vigna unguiculata* (L.) walp. na biologia de *Zabrotes subfasciatus* (BOH., 1833) (Coleoptera.Bruchidae) [internet]. Recife: UFRP; [consultado el 28 de ago. de 2019]. <http://www.repository.ufrpe.br/handle/123456789/565?mode=full>.

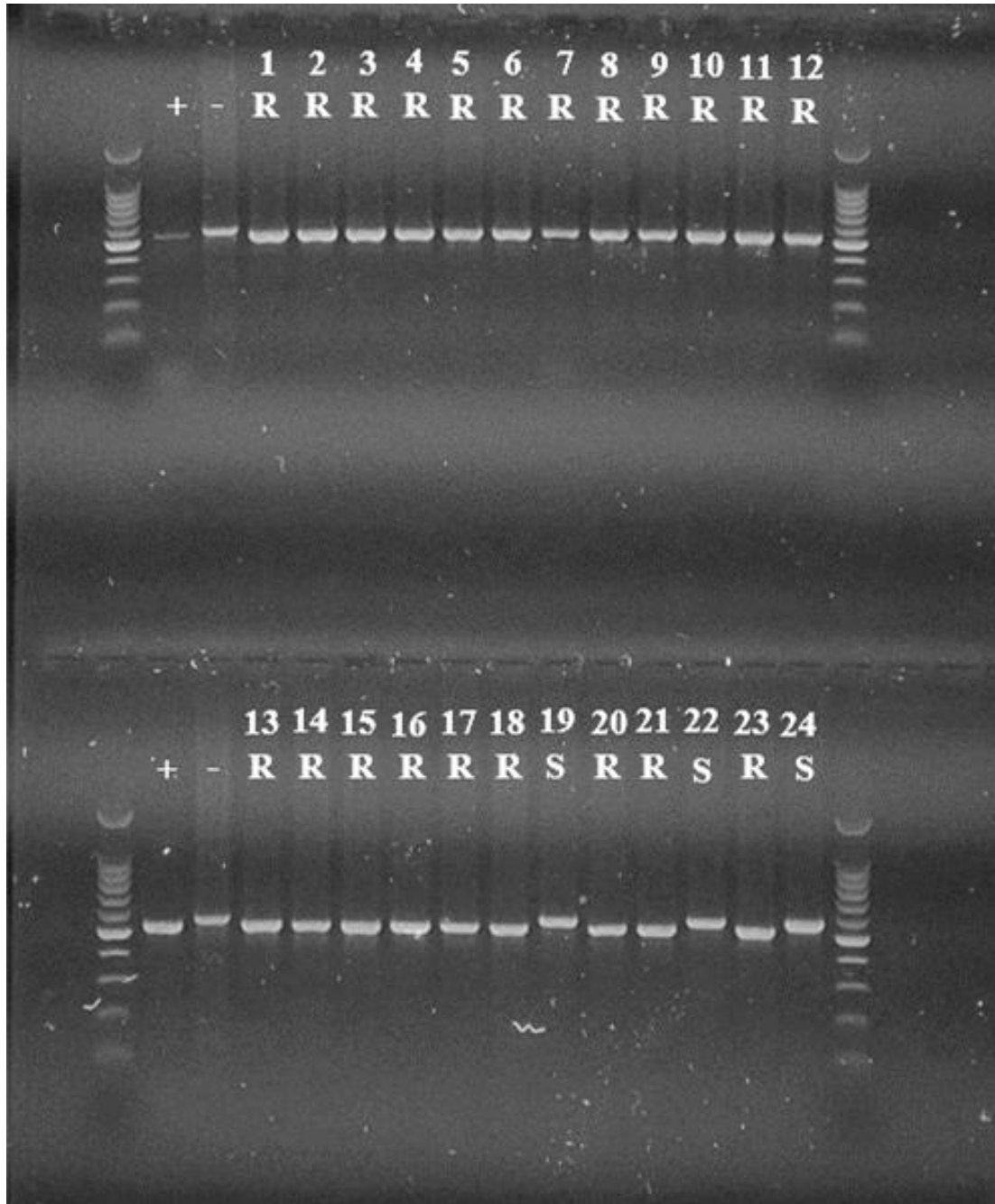
7. ANEXOS

Anexo 1. Coeficiente de correlación de Pearson para cada variable evaluada para resistencia a gorgojo *Zabrotes subfasciatus*.

	Ov	Ov/H	TAE	PEA	PH	TPD	IS	PSD	PP	NP
Ov	1									
Ov/H	1	1								
TAE	0.4	0.4	1							
PEA	-0.11	-0.11	0.69	1						
	-	-								
PH	1.30E-03	1.30E-03	0.16	0.25	1					
			-							
TPD	0.07	0.07	0.47	-0.59	-0.17	1				
IS	0.26	0.26	0.86	0.76	0.09	-0.67	1			
PSD	0.28	0.28	0.75	0.73	0.23	-0.51	0.87	1		
PP	0.51	0.51	0.86	0.56	0.14	-0.42	0.8	0.77	1	
NP	0.34	0.34	0.92	0.7	0.17	-0.53	0.86	0.82	0.9	1

Ov (ovoposición), Ov/H (ovoposición por hembra), TAE (total de adultos emergidos), PEA (porcentaje de emergencia de adultos), PH (proporción de hembras), TPD (tiempo promedio de desarrollo), IS (índice de susceptibilidad), PSD (porcentaje de semilla dañada), PP (porcentaje de pérdida de peso), NP (número de perforaciones).

Anexo 2. Resultados de electroforesis para determinar presencia o ausencia del gen *bgm-1* con el marcador molecular SCAR SR2.



+ (testigo positivo), - (testigo negativo), R (resistente), S (susceptible).
Números de tratamientos coinciden con los del cuadro 1.