

**Uso de técnicas convencionales y
moleculares para el mejoramiento de la
resistencia a la Bacteriosis Común y al
Virus del Mosaico Dorado Amarillo del
Frijol Común**

Carlos Andrés Barrera Ochoa

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Diciembre, 2001

30141

1390

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Uso de técnicas convencionales y moleculares
para el mejoramiento de la resistencia a la
Bacteriosis Común y al Virus del Mosaico
Dorado Amarillo del Frijol Común**

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

Presentado por

Carlos Andrés Barrera Ochoa

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2001

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



Carlos Andrés Barrera Ochoa

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2001

DEDICATORIA

La compañía de Dios en cada momento de alegría y su apoyo incondicional cuando sentía desfallecer.

A mis papas, Jaime de Jesús y María Amanda, por todas sus enseñanzas, sus incontables muestras de amor y por enseñarme que los imposibles también son posibles.

A todos los que me acompañaron en mi vida y con voz de aliento constante me hablan hoy desde el cielo y en múltiples sueños.

A mi tío Diego quien solo con su mirada me dice que me quiere y me apoya, pues yo le digo en palabras que lo quiero mucho, detrás de un gran hombre siempre existe una gran mujer, Ofelia, y una linda familia.

A mi tía Dora, solo decirle que ya sabe que me complace decir que es mi mamá.

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos, Julián, Gabriel Jaime, Nacho, Juan Camilo, porque de cada uno he aprendido cosas muy especiales y solo decirles que sigamos unidos, un los quiero mucho y estoy llorando cuando escribo estas palabras.

A mi tío Guillermo, su esposa e hijos, por su apoyo y confianza.

A mis tíos(as) Fernando, Mario, Noemí, Blanca, Helena, Gustavo, Eugenia, Tristán, Matilde, Margarita, Martha, Eduardo (q.e.p.d.), por su preocupación de ver en su sobrino un profesional.

A mis primos, amigos y en especial a gente que me vio crecer y sentir (Felicidad, Edilma, Olga, Ruby y Amanda -q.e.p.d-).

Al Dr. Juan Carlos Rosas por sus enseñanzas, por su profesionalismo y preocupación sincera en este proyecto.

A la Ing. Aracely por ser el bastón donde sin merecer me apoye, bueno solo una sonrisa por haber compartido con una persona tan especial y una lágrima por la partida.

A Ing. Luwbia por su apoyo incondicional, en fin por confiar en que todo proyecto es realizable aunque parezca imposible.

A mi prima María Elsy, por su apoyo y porque lo que yo logro este día es gracias a su tenacidad.

A todo el personal del PIF, que soportaron mis charlas y me ayudaron en mi trabajo, tienen mis respetos

A la familia Restrepo, sin palabras de nuevo, solo lágrimas.

A la familia Rojas, Agudelo y Velez por el apoyo durante 4 largos años, sin ustedes no sería posible el hoy.

A mis amigos Andrés (Felipe y Muñoz), Damián, Miguel, Johanm, Cristina, Indira, Francisco y los que no menciono, pero que llevo en el corazón.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

Agradezco a mi tío Diego por su inmenso apoyo y a todos los que con un grano de arena infinito colaboraron en este esfuerzo.

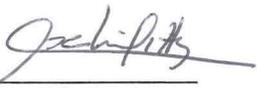
Agradezco al Programa Bean/Cowpea CRSP (Donación USAID No. DAN-1310-G-SS-6008-00) por el financiamiento para la realización del estudio a través del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) Zamorano.

RESUMEN

Barrera Ochoa, Carlos A. 2001. Uso de técnicas convencionales y moleculares para el mejoramiento de la resistencia a la Bacteriosis Común y al Virus del Mosaico Dorado Amarillo del frijol común. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 45 p.

El grano de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un componente esencial en la dieta de la mayoría de la población en América Latina. En los países de esta región, el cultivo se produce bajo condiciones marginales que incluyen la incidencia de enfermedades como la bacteriosis común causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp), que reduce su rendimiento en un 40-80%; y el Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF) que puede causar su pérdida total. En el proceso de mejoramiento genético, es posible utilizar de manera complementaria la evaluación tradicional por reacción fenotípica a la enfermedad y la confirmación de la presencia de genes de resistencia mediante marcadores moleculares. El objetivo de este trabajo fue desarrollar germoplasma de frijol resistente a Xcp y al VMDAF, empleando métodos convencionales y técnicas moleculares (selección asistida por marcadores). Los materiales utilizados para la selección fenotípica fueron plantas de familias F3, F4 y F5, provenientes de la cruce de Tío Canela-75 (resistente al VMDAF) por VAX 6 (resistente a Xcp), evaluadas por su reacción a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de Xcp. La evaluación molecular incluyó el análisis de ADN del grupo de plantas F4 seleccionado por su reacción fenotípica a Xcp, para la identificación de genotipos portadores de un QTL de resistencia a esta enfermedad y del gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF. Para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR SAP6 de un QTL de resistencia a Xcp, se determinaron las concentraciones y volúmenes totales en la mezcla de reacción. Se seleccionaron 25 de las 305 plantas F3 evaluadas por su reacción fenotípica a Xcp. De las 150 plantas F_{3:4} (seis repeticiones de las 25 familias F3) evaluadas por su reacción fenotípica, se seleccionaron 54 resistentes y 13 susceptibles. De estas, se identificaron 64 plantas con la presencia del QTL de resistencia a Xcp y tres sin él; las 12 plantas de ambos padres presentaron el QTL. Para el gen *bgm-1* se identificaron 26 plantas homocigotas resistentes, 29 homocigotas susceptibles y 12 heterocigotas susceptibles; sólo las plantas de Tío Canela-75 presentaron el gen *bgm-1*. Mediante una prueba Chi-cuadrado (X^2) se determinó que el marcador SAP6 no es efectivo para la identificación de plantas resistentes al aislamiento EAP 9506. De las 342 plantas F_{3:5} (seis repeticiones de 57 plantas F5) evaluadas, se seleccionaron 23 resistentes a Xcp, 14 por presentar el gen homocigoto recesivo (resistente) y 9 por el heterocigoto (susceptibles) en la F4. Los resultados indican que la población F_{3:6} contiene 23 familias con resistencia a ambas enfermedades, las cuales se continuarán evaluando en el programa de mejoramiento de Zamorano.

Palabras claves: Gen *bgm-1*, métodos convencionales, QTL, técnicas moleculares, VMDAF, Xcp.


Dr. Abelino Pitty

NOTA DE PRENSA

SELECCIONAN PLANTAS RESISTENTES A LA BACTERIOSIS COMUN Y AL VIRUS DEL MOSAICO DORADO AMARILLO DEL FRIJOL

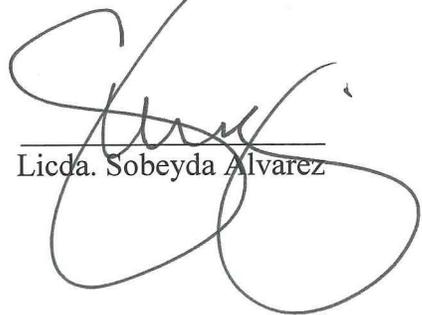
Entre las enfermedades predominantes en zonas bajas e intermedias del trópico latinoamericano, se encuentran la bacteriosis común que puede reducir el rendimiento del frijol desde un 40% hasta un 80%; y la enfermedad causada por el Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF), que puede causar su pérdida total.

Para la obtención de variedades de frijol resistentes a ambas enfermedades se realizaron cruza entre líneas resistentes a cada una (Tío Canela-75 y VAX6). La descendencia se seleccionó según la reacción fenotípica de las plantas a la inoculación con la bacteria y la resistencia genética a la bacteriosis común y al VMDAF del Frijol. Para la bacteriosis común se identificó un QTL (bloque de alelos resistentes) y para el VMDAF se identificó el gen recesivo *bgm-1*.

En los ensayos en Zamorano se evaluó la cruza Tío Canela-75 y VAX6 realizada en la Universidad de Puerto Rico, mediante el análisis genético en laboratorio y el fenotípico en invernaderos, se obtuvieron familias con resistencia a ambas enfermedades

La selección fenotípica para la bacteriosis común se realizó en las poblaciones avanzadas F3, F4 y F5 y la selección con marcadores moleculares para la bacteriosis común y el VMDAF se realizó en la población avanzada F4. Las evaluaciones en el invernadero mediante observación visual y en el laboratorio mediante marcadores moleculares SCAR (Región Amplificada de Secuencia Caracterizada), resultaron en la selección de 23 plantas F5 resistentes a la bacteriosis común, de las cuales 14 plantas presentan resistencia y las 9 restantes están segregando por esta resistencia al VMDAF.

Los estudios permitieron desarrollar 23 familias F6 con resistencia a ambas enfermedades, las cuales se continuarán seleccionando en el Zamorano, buscando líneas con características agronómicas deseables.



Licda. Sobeyda Alvarez

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.....	xii
	Índice de Anexos.....	xiii
1.	INTRODUCCION.....	1
1.1	OBJETIVOS.....	1
1.1.1	Objetivo general.....	1
1.1.2	Objetivo específicos.....	1
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	GENERALIDADES DEL CULTIVO DEL FRIJOL.....	3
2.2	LA BACTERIOSIS COMUN.....	3
2.2.1	Clasificación y descripción del patógeno.....	3
2.2.2	Sintomatología.....	3
2.2.3	Epidemiología.....	4
2.2.4	Pérdidas.....	4
2.2.5	MÉTODOS DE CONTROL.....	5
2.2.5.1	Control químico.....	5
2.2.5.2	Resistencia varietal.....	5
2.2.5.3	Control cultural.....	5
2.2.6	MÉTODOS DE INOCULACIÓN.....	5
2.2.7	RESISTENCIA.....	6
2.2.7.1	Fuentes de resistencia.....	6
2.2.7.2	Herencia.....	6
2.2.7.3	Mecanismos de resistencia.....	7
2.2.7.4	Mejoramiento.....	7
2.3	VIRUS DEL MOSAICO DORADO AMARILLO DEL FRIJOL..	7
2.3.1	Clasificación y descripción del patógeno.....	7

2.3.2	Sintomatología.....	8
2.3.3	Epidemiología.....	8
2.3.4	Pérdidas.....	8
2.3.5	MÉTODOS DE CONTROL.....	9
2.3.5.1	Control químico.....	9
2.3.5.2	Resistencia varietal.....	9
2.3.5.3	Control cultural.....	10
2.3.6	RESISTENCIA.....	10
2.3.6.1	Fuentes de resistencia.....	10
2.3.6.2	Herencia	10
2.3.6.3	Mecanismos de resistencia.....	10
2.3.6.4	Mejoramiento.....	11
2.4	MARCADORES MOLECULARES.....	11
2.4.1	Marcador molecular para la resistencia a la bacteriosis común.....	11
2.4.2	Marcador molecular para la resistencia al VMDAF.....	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1	UBICACIÓN DEL ESTUDIO	12
3.1.1	Evaluación fenotípica de plantas F3.....	12
3.1.1.1	Siembra.....	13
3.1.1.2	Inoculación	13
3.1.1.3	Variable evaluada.....	13
3.1.2	Evaluación fenotípica de plantas F4 de frijol.....	13
3.1.2.1	Siembra.....	13
3.1.2.2	Inoculación	13
3.1.2.3	Variable evaluada.....	13
3.1.3	Adaptación del protocolo para el marcador SCAR SAP6 (<i>Xcp</i>).....	14
3.1.3.1	Variable evaluada.....	14
3.1.4	Protocolos para el marcador SCAR SR2 (VMDAF).....	14
3.1.5	Evaluación con marcadores moleculares de la resistencia a <i>Xcp</i> y al	
3.1.6	VMDAF en plantas F4.....	14
3.1.5.1	Equipo y materiales de laboratorio.....	14
3.1.5.2	Variable evaluada.....	15
3.1.6	Evaluación fenotípica y molecular de la resistencia a la <i>Xcp</i> en	
	plantas F4	15
3.1.7	Evaluación fenotípica de plantas F5.....	15
3.1.7.1	Siembra.....	16
3.1.7.2	Inoculación.....	16
3.1.7.3	Variable evaluada.....	16
3.1.8	Población F6 de frijol.....	16
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1	Evaluación fenotípica de plantas F3.....	17
4.2	Evaluación fenotípica de plantas F4.....	18

4.3	Adaptación del Protocolo para el marcador SCAR SAP6.....	18
4.3.1	Amplificación de ADN para el marcador SAP6.....	18
4.4	Evaluación con marcadores moleculares en plantas F4.....	20
4.5	Evaluación fenotípica y molecular en plantas F4.....	21
4.6	Evaluación molecular de la resistencia de plantas F4 al VMDAF.....	21
4.7	Evaluación fenotípica de plantas F5 de.....	21
4.8	Familia F6 de frijol.....	22
5.	CONCLUSIONES	25
6.	RECOMENDACIONES	26
7.	BIBLIOGRAFIA	27
8.	ANEXOS	31

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Reacción de las plantas seleccionadas de familias F3 y sus progenitores, a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de <i>Xcp</i> . Zamorano, Honduras, 2001.....	17
2.	Reacción de las plantas seleccionadas de las familias F4 y sus progenitores Tio Canela-75 y VAX 6 a la inoculación con el aislamiento de <i>Xcp</i> EAP 9506 Zamorano, Honduras, 2001.....	19
3.	Concentraciones de los componentes de la mezcla maestra para la amplificación del marcador SCAR SAP6 para el QTL de resistencia a <i>Xcp</i> del genotipo GN #1 Sel 27. Zamorano, Honduras, 2001.....	19
4.	Presencia del QTL (P) asociado a la resistencia a <i>Xcp</i> usando el SCAR SAP6. Zamorano, Honduras, 2001.	20
5.	Comparación de la reacción fenotípica a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de <i>Xcp</i> y presencia del marcador SAP6 en plantas F4. Zamorano, Honduras, 2001.....	21
6.	Presencia del gen recesivo <i>bgm-1</i> asociado a la resistencia al VMDAF. Zamorano, Honduras, 2001.....	22
7.	Reacción de plantas F5 a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de <i>Xcp</i> . Zamorano, Honduras, 2001.	23
8.	Reacción de plantas F5 a la inoculación con el aislamiento de <i>Xcp</i> EAP 9506 y presencia del gen <i>bgm-1</i> (SCAR SR2) asociado a la resistencia al VMDAF. Zamorano, Honduras, 2001.....	24

INDICE DE ANEXOS

1.	Extracción de ADN para el análisis de marcadores SCAR (Método Alcalino)...	32
2.	Procedimiento para la cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant TM 200).....	33
3.	Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR SR2 para el gen <i>bgm-1</i> (Universidad de Puerto Rico).....	34
4.	Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR SAP 6 para un QTL de resistencia a <i>Xcp</i> (Miklas, 2000).....	35
5.	Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores tipo SCAR.....	36
6.	Electroforesis para la amplificación de ADN.....	37
7.	Reacción de plantas de familias F3, sus progenitores y los tres testigos (XAN176, DOR 364 y Don Silvio) a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de <i>Xcp</i> . Zamorano, 2001.....	38
8.	Reacción de plantas de familias F4 y sus progenitores a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de <i>Xcp</i> y presencia del marcador SAP6 del QTL asociado a la resistencia a <i>Xcp</i> . Zamorano, 2001.....	41
9.	Reacción de plantas de familias F4 y sus progenitores a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de <i>Xcp</i> y la presencia del marcador SR 2 (gen recesivo <i>bgm-1</i>) asociado a la resistencia al VMDAF Zamorano, 2001.	42
10.	Reacción de plantas de familias F5 y sus progenitores a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de <i>Xcp</i> y la presencia del marcador SR2 (gen recesivo <i>bgm-1</i>) asociado a la resistencia al VMDAF en familias F4. Zamorano, 2001.....	43

1. INTRODUCCIÓN

El grano de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un componente esencial en la dieta de la mayoría de la población rural y urbana de América Latina. En Centroamérica, este grano representa la fuente principal de proteínas y es considerado un alimento básico de la dieta diaria familiar, alcanzándose un consumo *per cápita* regional de 9.8 kg (Rosas, 1998). La producción de frijol en América tropical es afectada por diversos factores bióticos y abióticos (clima y suelo), siendo una de sus principales limitantes la alta incidencia y diversidad de enfermedades que afectan al cultivo (Schoonhoven y Voysest, 1994). Aunque existen variedades resistentes a algunas enfermedades y con adaptación a los trópicos (Castaño y del Río, 1994), se requiere de un esfuerzo más intenso para desarrollar variedades superiores a las existentes en términos de adaptación, tolerancia a factores bióticos y abióticos, comercialización y calidad culinaria y nutricional.

La estrategia más empleada por los investigadores para incrementar los rendimientos del cultivo y ampliar su área de producción, es reducir su susceptibilidad a enfermedades mediante la obtención de variedades con resistencia múltiple, disminuyendo el riesgo de la producción en el campo y permitiendo a los agricultores aplicar mejores prácticas de manejo (Schoonhoven y Voysest, 1994). Entre las enfermedades predominantes en las zonas bajas e intermedias del trópico latinoamericano, se encuentran la bacteriosis común causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcp*), que puede reducir el rendimiento del frijol desde un 40% hasta un 80%; y la enfermedad causada por el Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF), que puede causar su pérdida total. La prevención y control de ambas enfermedades es importante con el fin de obtener un cultivo más rentable y atractivo para el productor, por lo que es necesario desarrollar variedades resistentes a las mismas. En el proceso de mejoramiento por resistencia a enfermedades, más específicamente en las fases de selección, es posible utilizar de manera complementaria la evaluación tradicional mediante la reacción fenotípica a la enfermedad y la confirmación de la presencia de genes de resistencia mediante marcadores moleculares asociados a los mismos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Desarrollar germoplasma mejorado de frijol resistente a la bacteriosis común y al virus del mosaico dorado amarillo, empleando métodos convencionales y técnicas moleculares para la selección asistida por marcadores (SAM).

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Seleccionar mediante evaluación convencional (fenotípica) plantas de frijol resistentes a la bacteriosis común, utilizando el método de inoculación con agujas múltiples y un aislamiento virulento de Honduras.

2. Implementar protocolos para la aplicación de Selección Asistida por Marcadores en la resistencia a *Xcp*.
3. Seleccionar simultáneamente plantas de frijol resistentes a la bacteriosis común y al virus del mosaico dorado amarillo del frijol, aplicando técnicas convencionales y moleculares.
4. Desarrollar familias avanzadas compuestas por plantas resistentes a la bacteriosis común y al virus del mosaico dorado amarillo del frijol.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cultivo del frijol

El frijol común es una importante fuente de proteína para los países en desarrollo de América Latina, donde es mayormente cultivado en condiciones de bajos insumos, en áreas marginales y/o en épocas con limitaciones de abastecimiento de agua. Las regiones con temperaturas comprendidas entre 18-24 °C y precipitaciones de 300 a 350 mm por ciclo de cultivo, se consideran las más adecuadas para su cultivo (Rosas *et al.*, 2000).

Los principales factores que limitan la producción de esta leguminosa de grano en los trópicos son la presencia de enfermedades causadas por hongos, virus y bacterias. Entre estas enfermedades, dos de las siete más importantes para las zonas frijoleras de Centroamérica y El Caribe son la bacteriosis común causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, (*Xcp*); y el Virus del Moisaico Amarillo del Frijol (VMDAF) transmitido en por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (López *et al.*, 1985).

2.2 La Bacteriosis Común

La bacteriosis común es una enfermedad bacteriana de climas cálidos, que afecta severamente al cultivo del frijol. Generalmente es favorecida por temperatura y humedad altas, por lo que su incidencia puede causar pérdidas en la mayoría de las zonas frijoleras de América Latina (López *et al.*, 1985; Rosas, 1998).

2.2.1 Clasificación y descripción del patógeno

El patógeno es una bacteria del orden eubacteriales, grupo de las varillas y cocos, de la familia Rhizobiaceae (Castaño y del Río, 1994). Fue descrita en 1897 por E.F. Smith e identificada en 1939 como *Xanthomonas phaseolis*; en 1980 el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática cambió su denominación a *Xcp* (Vidaver, 1996).

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* y su variante *fuscans* poseen forma de varillas rectas, son bacterias gram negativas, aeróbicas y móviles con un flagelo polar (Muñoz y Singh, 1996). Miden de 0.4-0.9 micras de diámetro por 0.6-2.6 micras de largo (IICA, 2000). Según Vidaver (1996) el pigmento Xanthomonadin diferencia a *Xcp* de otros géneros gram negativos y aeróbicos.

2.2.2 Sintomatología

Entre los hospedantes principales de *Xcp* se encuentran las especies del género *Phaseolus*, *Glycine max* y otras leguminosas forrajeras (Castaño y del Río, 1994). En el frijol común, los síntomas foliares comienzan con manchas húmedas en el envés de la hoja. Estas lesiones aumentan de tamaño con el tiempo y generalmente se unen; la zona infectada se torna flácida con bordes amarillos, aunque algunas veces el halo puede ser color limón en sus bordes o en medio de la misma (Castaño y del Río, 1994; Muñoz y Singh, 1996).

Frecuentemente se observa un exudado bacteriano en el envés de la hoja. Los ataques severos o tempranos de *Xcp* pueden ocasionar la defoliación prematura de la planta (López *et al.*, 1985).

En las vainas, la enfermedad se presenta como manchas húmedas y pequeñas color café que luego se tornan oscuras y se unen cubriendo regiones extensas de tejido, siendo generalmente acompañadas de un exudado bacterial (López *et al.*, 1985). La infección en la vaina puede deformar y decolorar la semilla, y convertirla en transmisora de la bacteria. Los ataques severos a las vainas pueden causar su pérdida total por pudrición (López *et al.*, 1985; Rosas, 1998).

Generalmente, en plantas que provienen de semilla infectada el nudo cotiledonario presenta infecciones bacterianas que afectan el tallo, provocando que la planta se doble y seque (IICA, 2000).

2.2.3 Epidemiología

Los daños más drásticos causados por *Xcp* ocurren con temperaturas de 28 °C y alta humedad; esta última favorece la penetración de la bacteria en la planta a través de los hidatodos o heridas (IICA, 2000). Las semillas infectadas son el medio más eficaz para la propagación de la enfermedad. Los residuos de cosecha son también un medio de diseminación eficiente, ya que en estos se encuentran las condiciones ideales para la propagación y multiplicación de la bacteria por varios meses. Entre las fuentes adicionales de diseminación de *Xcp* se encuentran los insectos, el viento, la lluvia y el agua de riego (Rosas, 1998).

La contaminación de la semilla puede ser interna o externa (Rosas, 1998). La bacteria puede permanecer latente en la semilla durante varios años (Castaño y del Río, 1994), reportándose su sobrevivencia virulenta hasta por 15 años (IICA, 2000).

Los insectos actúan como transportadores de la bacteria, provocando heridas que pueden facilitar su entrada (Castaño y del Río, 1994). Entre los principales insectos vectores de la enfermedad se encuentran los "chapulines" (*Melanoplus* sp.), conchuela (*Epilachna varivestis*), chicharrita (*Empoasca* sp.), chinche verde (*Nezara viridula*), *Diaprepes abbreviata* y *Cerotoma ruficornis* (IICA, 2000).

La bacteria *Xcp* crece bien *in vitro* con temperaturas entre 28-30 °C, reduciéndose su desarrollo a temperaturas más bajas. Muchas bacterias son tolerantes a la desecación (Schwartz y Gálvez, 1980), pues producen un polisacárido extracelular que las protege de condiciones extremas de sequía (IICA, 2000).

2.2.4 Pérdidas

La bacteriosis común es importante pues en muchas zonas productoras con condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, la presencia de algunas semillas infectadas puede causar pérdidas considerables en el rendimiento del cultivo (Pejúan, 1999).

La incidencia de la bacteriosis común en Honduras se reporta en la mayoría de las zonas productoras en las dos épocas de siembra, la primera (junio a agosto) y la postrera (septiembre a diciembre), causando una reducción significativa del rendimiento. En el continente americano, las pérdidas de rendimiento reportadas oscilan del 10% hasta el 45% en México, Colombia, Canadá y Estados Unidos (Serracín *et al.*, 1991; IICA, 2000).

2.2.5 MÉTODOS DE CONTROL

2.2.5.1 Control químico

El empleo de fungicidas a base de hidróxido de cobre es recomendado, pues son los más efectivos (Castaño y del Río, 1994; IICA, 2000). En el follaje se han utilizado compuestos a base de cobre como el sulfato de cobre y el oxiclورو de cobre; para la semilla y el follaje también se emplean antibióticos como la estreptomina (López *et al.*, 1985), pero su uso en follaje no se recomienda pues puede promover el desarrollo de patógenos mutantes resistentes (Castaño y del Río, 1994).

En ciertos casos el control químico ha tenido buenos resultados para el control de enfermedades, aunque estos no necesariamente incrementan los rendimientos (López *et al.*, 1985).

2.2.5.2 Resistencia varietal

Al igual que para otras enfermedades, la resistencia varietal constituye el método más efectivo y económico para enfrentar la bacteriosis común (López *et al.*, 1985).

El centro de origen del frijol se encuentra en América con una distribución no céntrica, sugiriéndose su domesticación en una área extensa (Rosas y Young, 1992). El aislamiento geográfico probablemente causó divergencia genética entre la domesticación en la región mesoamericana y la región sur de los Andes, para caracteres como resistencia a enfermedades (Rosas, 1998), lo que sugiere una amplia variabilidad del patógeno y de los genes de resistencia correspondientes.

Un alto porcentaje de las variedades comerciales disponibles en América Latina son susceptibles a *Xcp*, por lo que no se recomienda su uso en zonas tropicales donde la temperatura y alta humedad favorecen la presencia y desarrollo de la bacteria (Rosas, 1998). En algunos países de Centroamérica se encuentran disponibles líneas con resistencia intermedia a alta a la bacteriosis; en Honduras, variedades como "Dorado" y "Tío canela-75" presentan resistencia moderada (Rosas, 1998), pero algunos aislamientos altamente virulentos las afectan seriamente (Pejúan, 1999).

2.2.5.3 Control cultural

La incorporación los residuos de cosecha en barbechos profundos (más de 30 cm) puede disminuir el inóculo en el campo. Romper el ciclo de vida de la enfermedad mediante rotaciones con cultivos no susceptibles puede disminuir la cantidad de infección en el terreno. El uso de semilla limpia libre de la enfermedad y el mantenimiento del cultivo libre de malezas es eficaz, pues reduce las fuentes alternas de inóculo (IICA, 2000).

2.2.6 MÉTODOS DE INOCULACION

Generalmente, todos los métodos utilizados para la inoculación con *Xcp* buscan la exposición del tejido de la planta a la bacteria para lograr una buena infección (Pejúan, 1999). En ensayos para evaluar la resistencia del frijol al patógeno, se utilizan algunos

métodos de inoculación que incluyen el corte en los cotiledones con escalpelo, el raspado del segundo trifolio, el remojo a alta presión, la infiltración al vacío, la punción con agujas múltiples y el corte con tijeras (Schwartz y Gálvez, 1980; López *et al.*, 1985).

La concentración del inóculo puede influir sobre la reacción de la planta, considerándose óptima cuando oscila entre 10^7 y 10^8 células/ml (Schawartz y Gálvez, 1980). En el trópico, la inoculación a la 3^{ra} a 4^{ta} semana después de la siembra resulta muy eficiente (López *et al.*, 1985).

2.2.7 RESISTENCIA

2.2.7.1 Fuentes de resistencia

Para lograr un programa exitoso de mejoramiento para resistencia a *Xcp*, es indispensable contar con genes provenientes de los dos acervos genéticos del frijol (Muñoz y Singh, 1996). En las regiones tropicales existen variedades comerciales con resistencia a la bacteriosis común (Castaño y del Río, 1994), con *P. acutifolius* (frijol tepari) como principal fuente de resistencia (Beebe y Pastor-Corrales, 1991). También se ha buscado fuentes de resistencia en *P. coccineus* y *P. lunatus* (López *et al.*, 1985). En evaluaciones conducidas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), pocos materiales de *P. vulgaris* han presentado resistencia a la enfermedad o esta ha sido muy baja; mientras que con *P. coccineus* y *P. lunatus* se han realizado ensayos con resultados promisorios, aunque sin una evaluación sistemática (Muñoz y Singh, 1996).

Algunas líneas originadas de cruzamientos interespecíficos entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius* han presentado reacción intermedia a la bacteriosis (Muñoz y Singh, 1996). En el CIAT se han utilizado aproximadamente media docena de accesiones de germoplasma de *P. acutifolius* para su cruce con *P. vulgaris*, buscando un nivel de resistencia más alto a la enfermedad (Singh *et al.*, 1996).

El primer híbrido reportado como resistente a la bacteriosis común fue el de Honma (1956), generado mediante una cruce interespecífica entre *P. acutifolius* y *P. vulgaris*, del cual se derivan las líneas Great Northern (GN) Nebraska #1, XAN y VAX, las que poseen una mayor adaptación a los trópicos (Muñoz y Singh, 1996).

2.2.7.2 Herencia

La herencia a *Xcp* es de tipo cuantitativo y se presume que un pequeño grupo de diferentes genes mayores controla la reacción a la enfermedad con efectos aditivos más relevantes que los dominantes y epistáticos (Muñoz y Singh, 1996). Se ha observado que la resistencia de la planta disminuye con la edad (Arnaud-Santana *et al.*, 1994).

Por su naturaleza cuantitativa, la resistencia del cultivo a la bacteriosis ha sido sustentada en datos sobre QTL's ('Quantitative Trait Loci'), (Kelly y Miklas, 1996). Por ejemplo, Bai *et al.* (1996) identificaron en una población proveniente de una cruce interespecífica, dos QTL que explicaban el 81% de la resistencia a *Xcp* y tres que explicaban el 77%, al inocular en invernaderos el primer trifolio de la progenie de la cruce DOR 364 x XAN 179. En consecuencia, la selección indirecta usando marcadores del tipo QTL puede ser eficaz para la selección de plantas con resistencia (Kelly y Miklas, 1996).

2.2.7.3 Mecanismos de resistencia

La resistencia o tolerancia al establecimiento de un patógeno en los tejidos, o la interferencia en su crecimiento y desarrollo cuando ha alcanzado la planta, son mecanismos eficientes para reducir o anular su impacto (Rosas y Young, 1992). La presencia de lecitinas y la reacción de hipersensibilidad como mecanismos de resistencia al establecimiento de *Xcp*, son de suma importancia para reducir su impacto en el cultivo del frijol (Coyne y Schuster, 1980).

2.2.7.4 Mejoramiento

El desarrollo y adopción de variedades resistentes a enfermedades en las regiones tropicales, constituye el control más efectivo, seguro y económico para los agricultores. Los programas responsables del desarrollo de variedades resistentes deben contar con materiales provenientes de los acervos genéticos adecuados, métodos de inoculación y procedimientos de evaluación eficientes, y programas de mejoramiento sistemáticos y consistentes (Muñoz y Singh, 1996). Es importante utilizar métodos de selección que permitan la discriminación entre individuos resistentes de familias segregantes (Webster *et al.*, 1980).

La mayoría de las variedades resistentes a *Xcp* se han obtenido mediante cruza interespecíficas del género *Phaseolus* (Pejúan, 1999). El CIAT ha desarrollado variedades resistentes que se basan en la piramidación o acumulación de genes, considerado por muchos autores el método de mejoramiento más eficiente. Mediante su aplicación se obtuvo en el CIAT las líneas VAX, provenientes de la piramidación de genes de *P. vulgaris* y cruza interespecíficas de este con *P. acutifolius* (Muñoz y Singh, 1996).

2.3 VIRUS DEL MOSAICO DORADO AMARILLO DEL FRIJOL

La incidencia del VMDAF es uno de los principales problemas para la producción de frijol en Argentina, Brasil, República Dominicana, México y Centro América (Morales y Singh, 1991; Morales, 2000). La enfermedad es favorecida por temperaturas cálidas debido al incremento del vector de este geminivirus, la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y de sus múltiples hospederos alternos (Rosas *et al.*, 2000).

2.3.1 Clasificación y descripción del patógeno

La identificación fenotípica del virus ha sido diversa según la región donde se presente, y ha sido sólo mediante el uso del microscopio electrónico, de la purificación por centrifugación y/o de la serología, que se ha determinado de forma más confiable el tipo de virus presente (Castaño y del Río, 1994; Schwartz y Gálvez, 1980). Estudios realizados demuestran que el virus que induce amarillamiento en el Norte (México), Centro (Guatemala y El Salvador), Sur América (Colombia y Brasil), América Insular (Cuba, Puerto Rico y República Dominicana) y África (Nigeria), son causados por el mismo geminivirus (Schwartz y Gálvez, 1980).

El VMDAF es un geminivirus. Se clasifica así por sus partículas cristalinas y de forma icosaédrica, que miden ~10 nanómetros (nm) de largo por ~32 nm de ancho; suelen encontrarse en pares y en el punto de unión son aplanadas (Castaño y del Río, 1994).

2.3.2 Sintomatología

Los síntomas de infección pueden visualizarse 14 días después de la siembra si existen altas poblaciones de mosca blanca (Schwartz y Gálvez, 1980). Las plantas atacadas en las primeras etapas pueden presentar enanismo y no producir vainas (Rosas, 1998). En variedades de frijol susceptibles se presenta una coloración amarilla brillante, comenzando en la nervadura de las hojas (Rosas, 1998) y las hojas jóvenes se enrollan hacia abajo (Castaño y del Río, 1994) debido al desarrollo desigual de las áreas sanas y enfermas (López *et al.*, 1985).

Las plantas que se infectan antes de la floración presentan un aborto prematuro de flores (López *et al.*, 1985). El VMDF produce distorsión de vainas (Morales, 1996) y ataques drásticos en estas pueden afectar la calidad de la semilla decolorándola (Schwartz y Gálvez, 1980).

Las infecciones por el VMDF disminuyen el rendimiento del cultivo del frijol, reduciendo el número de vainas, el número de semillas por vaina y el peso promedio de las semillas (Castaño y del Río, 1994). En algunos casos, las pérdidas pueden alcanzar el 100% de la producción (López *et al.*, 1985).

2.3.3 Epidemiología

Las regiones tropicales con elevaciones menores a los 1200 msnm, temperatura alta y fuentes del inoculo y del vector más numerosas, presentan mayor incidencia del VMDF (Rosas, 1998). La incidencia del virus es favorecida por temperaturas de 30 °C, considerándose menos probable la presencia del virus a temperaturas menores a los 21 °C (Schwartz y Gálvez, 1980).

El VMDF puede ser transmitido naturalmente por su vector mosca blanca y artificialmente por inoculación mecánica (Schwartz y Gálvez, 1980), pero es la primera la que causa el mayor daño en campos de producción de frijol. Se calcula que una sola mosca puede transmitir el virus a más de 100 plantas en un día (Castaño y del Río, 1994). Este insecto chupador tiene una alta gama de cultivos hospederos que incluyen más de 16 especies de cultivos comerciales como la soya, los frijoles lima (*P. lunatus*) y tepari, tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y algodón (*Gossypium hirsutum*), (Rosas, 1998); y malezas como *Macroptilium* sp. y *Euphorbia* sp. (Schwartz y Gálvez, 1980; Castaño y del Río, 1994).

No se ha comprobado que la semilla sea transmisora del virus (Castaño y del Río, 1994).

2.3.4 Pérdidas

La disminución en el rendimiento causada por el VMDF depende de la edad de la planta al momento de la infección, la variedad utilizada en la región y las condiciones ambientales para el desarrollo y la reproducción del vector (Schwartz y Gálvez, 1980).

La presencia del VMDF se ha incrementado durante los últimos años, presentándose actualmente como un problema para la producción en diversas regiones de Centroamérica y El Caribe (Rosas, 1998). En las tierras bajas y en la costa oriental de México, el VMDF es la enfermedad viral que causa mayores pérdidas, mientras en Guatemala se

han reportado zonas con reducción en los rendimientos cercana al 90% (López *et al.*, 1985). Informes de Jamaica reportan reducciones promedio en el rendimiento de 57%, en Brasil de 48 a 85% y en El Salvador de 52 a 100% (Schwartz y Gálvez, 1980)

2.3.5 MÉTODOS DE CONTROL

2.3.5.1 Control químico

La utilización de insecticidas para disminuir las poblaciones de mosca blanca ha sido uno de los métodos de control más eficientes (López *et al.*, 1985), principalmente la aplicación de sistémicos que en condiciones de campo evidencian un mejor control. Aspersiones de plaguicidas como acefato, endosulfan, metil-oxidemeton o metamidofos, insecticidas sistémicos aplicados al suelo como carbofuran y carbosulfan, y monocrotofos y oxidemetonmetil aplicados al follaje previo a la floración (Rosas, 1998), reducen significativamente las poblaciones de mosca blanca en los campos de frijol. Es recomendable que las aplicaciones se realicen durante los primeros 30 días del cultivo (Castaño y del Río, 1994), cuando aún no se ha establecido bien la enfermedad.

2.3.5.2 Resistencia varietal

El uso de plantas resistentes puede proveer un método económico para enfrentar la enfermedad causada por el VMDF (Schwartz y Gálvez, 1980). La mayoría de los cultivares comerciales presentan susceptibilidad al VMDF, aunque existen variedades mejoradas de frijol mesoamericano con grano rojo y negro con buen nivel de resistencia, recomendadas para zonas con presencia del VMDF (Rosas, 1998).

Inicialmente, niveles moderados de resistencia o tolerancia al VMDF fueron observados en algunos cultivares tropicales de frijol, como "Porrillo Sintético" y "Turrialba 1", y otros genotipos de grano negro cultivados en Centroamérica (Morales y Singh, 1993). Las variedades de grano negro Porrillo Sintético y Turrialba 1 fueron utilizados en Brasil, Guatemala, México y otros países, para el desarrollo de variedades resistentes (Morales y Singh, 1991). Posteriormente, nuevas fuentes y mecanismos de resistencia fueron encontrados en algunas variedades de otros tipos de grano (Morales y Niessen, 1988).

En la variedad mesoamericana de grano rojo pequeño "Dorado" (línea DOR 364) se encontró resistencia al VMDF, expresada como una reducción en los síntomas característicos de amarillamiento en las hojas y mayor rendimiento. Esta línea fue liberada en Guatemala, El Salvador y Honduras (Kelly y Miklas, 1996). En la variedad "Tío Canela-75", desarrollada en 1996 en la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano mediante la cruce triple de DOR 483 x F1 (DOR 391 x Pompadour J), también se encontró resistencia a esta enfermedad (Rosas y Varela, 1996), que sumada a su resistencia a enfermedades y tolerancia al calor en zonas bajas, ha promovido su amplia difusión en América Central (Voyses, 2000).

Actualmente, se están desarrollando líneas de mejoramiento que combinan los mecanismos de resistencia de Dorado y de Tío Canela-75, con el recientemente encontrado efecto de no-enrollamiento de la vaina.

2.3.5.3 Control cultural

La mayoría de las prácticas culturales para disminuir la incidencia del VMDAF están orientadas hacia su vector y no a la enfermedad *per se*. Debido a que la mosca blanca puede hospedarse en una amplia gama de malezas y cultivos, se recomiendan prácticas como la siembra en zonas donde estas no existan o no se cultiven, respectivamente, en épocas con temperaturas bajas y precipitación moderada (López *et al.*, 1985); o hacer coincidir la etapa de plántula con condiciones favorables para el desarrollo del cultivo, como clima moderado y humedad baja en los trópicos (Castaño y del Río, 1994). Las siembras en la época de postrera en Centroamérica, puede hacer coincidir el clima favorable para el desarrollo del vector y la enfermedad con la etapa de plántula del frijol (Rosas, 1998).

Plantas utilizadas como mantillo para el control de malezas y la retención de humedad crean microambientes, donde se presume que la mosca blanca no puede reproducirse (Schwartz y Gálvez, 1980).

2.3.6 RESISTENCIA

2.3.6.1 Fuentes de resistencia

El control genético es actualmente el objetivo más perseguido para enfrentar el VMDAF (Morales, 1996). Una fuente parcial de resistencia está condicionada por el gen *bgm-1*, derivado de la línea "Garrapato"; esta resistencia se considera parcial por la presencia de deformación de vainas y la disminución en rendimiento (Blair y Beaver, 1993; Urrea *et al.*, 1996). Este gen ha sido incorporado extensivamente en variedades de grano rojo pequeño como Tío Canela-75 y DOR 482 (CIAT, 1999). La variedad Dorado posee resistencia cuantitativa al VMDAF expresada con disminución en los síntomas de la enfermedad y un rendimiento superior (Kelly y Miklas, 1996).

Anteriormente, la variedad más empleada en América Latina para el mejoramiento de la resistencia al VMDAF fue Porrillo Sintético, el cual tiene tendencia al escape cuando la inoculación se retrasa (Morales, 1996). Actualmente, Tío Canela-75 está siendo usada como fuente principal por los programas de mejoramiento de la región centroamericana y de El Caribe.

2.3.6.2 Herencia

La interacción epistática entre las diferentes fuentes de resistencia hace que el mejoramiento y selección de líneas comerciales se dificulte (Beebe, 1994). Sin embargo, utilizando marcadores moleculares SCAR como el SR2 asociado al gen recesivo resistente al VMDAF (*bgm-1*), se pueden obtener líneas comerciales con niveles de resistencia aceptables, aunque el mejoramiento se dificulta al existir diferentes especies del patógeno (Morales, 2000).

2.3.6.3 Mecanismos de resistencia

Morales (1996) concluyó que existen diversos mecanismos para la resistencia al VMDAF. En unos, en los que la planta responde al virus en los tejidos tolerando ó resistiendo su ataque. En otros casos, las plantas responden con otros mecanismos como la no

preferencia por la planta en los que donde *B. tabaci* no encuentra apetecible el hospedero; o la antibiosis donde los insectos son afectados por la presencia de tejidos o sustancias de la planta que afectan y/o inhiben su desarrollo (Rosas y Young, 1992).

2.3.6.4 Mejoramiento

El mejoramiento genético para enfrentar eficazmente al VMDF se basa en el uso de variedades tolerantes o resistentes, que en presencia de la enfermedad puedan producir normalmente (Aranda, 2000). Actualmente, el uso de técnicas moleculares juega un papel importante en el desarrollo de líneas resistentes; sin embargo, el tipo de herencia de la resistencia al VMDF demanda un esfuerzo más intenso para obtener líneas con capacidad de producción bajo una alta incidencia de la enfermedad (Morales, 2000).

2.4 Marcadores moleculares

Durante la última década, los marcadores moleculares han contribuido sustancialmente al mejoramiento genético de algunos cultivos, pues ayudan a detectar la presencia de genes para características específicas otorgando mayor confiabilidad durante la selección. Entre las ventajas de la selección asistida por marcadores (SAM) se encuentran el evitar llevar los materiales al campo para la expresión de la característica deseada (Beebe y Pedraza, 1998). Los marcadores más usados para la selección indirecta de genotipos de frijol por su tolerancia a enfermedades, se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por 'Polimerase Chain Reaction'), técnica que permite la identificación, manipulación y reproducción del ADN de manera más efectiva (Rabinow, 1996).

2.4.1 Marcador molecular para la resistencia a la bacteriosis común

La resistencia que es factible identificar con el uso del marcador molecular SCAR SAP6, se encuentra asociada con la presencia de un QTL ligado con la resistencia a *Xcp*. Este marcador está compuesto de dos cebadores, cuyas secuencias son SAP6A= 5'GTC ACG TCT CCT TAA TAG TA3' y SAP6B= 5'GTC ACG TCT CAA TAG GCA AA3. La línea de frijol de donde se deriva este marcador es la GN#1 Sel 27; este QTL está conformado por 820 pares de bases (Miklas *et al.*, 2000).

2.4.2 Marcador molecular para la resistencia al VMDF

La resistencia que es factible identificar con el uso del marcador molecular SCAR SR2, se encuentra asociada al gen recesivo de resistencia al VMDF (*bgm-1*). Este marcador está compuesto de dos cebadores de 20 pb cada uno, cuyas secuencias son SR2A= 5'CAC AGC TGC CCT AAC AAA AT3' y SR2B= 5'CAC AGC TGC CAC AGG TGG GA3'. La línea de frijol de donde se deriva este marcador es DOR 21 (Morales, 2000; Urrea *et al.*, 1996). Angel *et al.* (1998) menciona que este marcador amplifica un rango de 530-570 pb, donde la banda de 570 pb indica su condición homocigota dominante (susceptibilidad), la de 530 pb su homocigocidad recesiva (resistencia), y la presencia de ambas bandas indica la heterocigocidad del gen (susceptibilidad) en la planta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en los invernaderos del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria de Zamorano, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras. El estudio pretende mejorar la resistencia a la bacteriosis común de la variedad comercial Tío Canela-75, mediante la cruce Tío Canela-75 x VAX 6, realizada en la Universidad de Puerto Rico. La genealogía de la variedad mejorada Tío Canela-75 se observa en la Figura 1. La línea VAX 6 fue utilizada en esta cruce por su alta resistencia a la bacteriosis común, la cual se deriva de una cruce interespecífica entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*, en donde la resistencia proviene de este último.

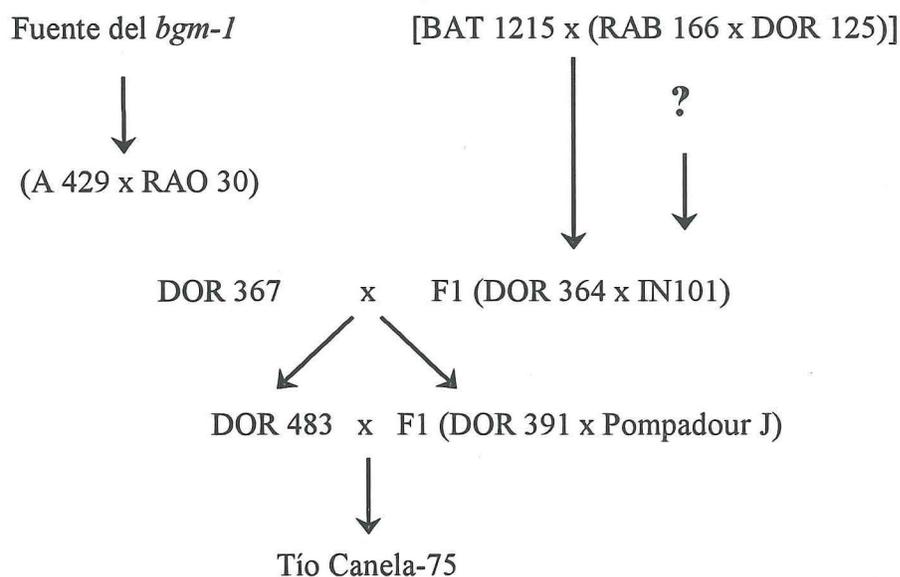


Figura 1. Genealogía de la variedad Tío Canela-75.

3.1.1 Evaluación fenotípica de plantas F3

La evaluación de la reacción a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp*, se realizó utilizando la escala de severidad del daño de 1-9 donde 1= máxima resistencia (no síntomas) y 9= máxima susceptibilidad (muerte de la planta), propuesta por el CIAT (1987).

3.1.1.1 Siembra

En los invernaderos del PIF, se sembró un grupo de 61 familias F3 de la población Tío Canela-75 x VAX 6, incluyendo los padres y tres testigos con variaciones en la resistencia a la enfermedad (XAN 176, DOR 364 y Don Silvio). De cada genotipo se sembraron 5 maceteros (repeticiones) estándar de 8" con dos posturas, las que fueron raleadas para dejar una planta por macetero.

3.1.1.2 Inoculación

La inoculación se realizó usando el aislamiento EAP 9506 de Namasigüe, Choluteca. Para ello, se usó el método de punción múltiple propuesta por el CIAT (1981), que consistió en presionar el folíolo central de la segunda hoja trifoliada más joven con un inoculador de agujas múltiples, sobre una esponja inmersa en un plato petri conteniendo la suspensión bacteriana, con el fin de exponer el tejido foliar herido a la bacteria. La inoculación se realizó 25 días después de la siembra (DDS) y la lectura 14 días después de la inoculación (DDI).

3.1.1.3 Variable evaluada

Se evaluó la respuesta fenotípica (reacción) a la inoculación con bacteriosis común, usando la escala de severidad indicada. Las plantas de las familias F3 que presentaron una calificación menor o igual a tres (resistencia), pasaron a conformar la población F4.

3.1.2 Evaluación fenotípica de plantas F4 de frijol

La selección fenotípica de las familias F4 se realizó siguiendo los procedimientos mencionados en el apartado 3.1.1.

3.1.2.1 Siembra

Un grupo de 25 familias F4 seleccionados en la evaluación de la población F3 y los dos padres (Tío Canela-75 y VAX 6), fueron sembrados en los invernaderos del PIF incluyendo 6 repeticiones (maceteros estándar) por genotipo y dos plantas por macetero.

3.1.2.2 Inoculación

Se inocularon los trifolios utilizando el aislamiento de *Xcp* y el método de agujas múltiples mencionados, con el fin de seleccionar plantas resistentes y susceptibles al patógeno. Se realizaron dos inoculaciones, a los 23 y 39 DDS, y dos lecturas efectuadas a los 14 días después de cada inoculación.

3.1.2.3 Variable evaluada

Se evaluó la respuesta fenotípica de las plantas F4 a la inoculación con *Xcp*, usando la escala cualitativa indicada. De acuerdo con la severidad de la enfermedad observada en los padres (testigos resistente y susceptible), se seleccionaron las plantas que presentaron una calificación menor a 4.8 (resistencia alta-intermedia) y mayor a 7 (susceptibilidad) y los padres Tío Canela-75 y VAX 6, para la identificación molecular de laboratorio empleando el marcador SCAR SAP6, del fragmento de ADN (banda) asociada con la resistencia a *Xcp* (Anexos 8 y 7). Las plantas de las familias F4 que presentaron la reacción de resistencia, pasaron a conformar la población F5.

3.1.3 Adaptación del protocolo para el marcador SCAR SAP6 (*Xcp*)

La adaptación a las condiciones del laboratorio de Biología Molecular de Zamorano del protocolo sugerido para el uso del marcador SCAR SAP6, se realizó exclusivamente para la fase de amplificación. Se evaluaron diferentes concentraciones de los componentes (agua, buffer, dNTP's, cebadores SAP 6 A y B, *Taq*-polimerasa y ADN) y volúmenes finales (15 y 25 μ l) de la mezcla maestra de reacción; y el perfil térmico sugerido por Miklas (2000), (Anexo 4). En esta adaptación se utilizó como control positivo el progenitor VAX 6, línea que posee el gen de resistencia derivado del germoplasma GEN#1 Sel 27 (Muñoz y Singh 1999), correspondiente al marcador SAP 6. En un estudio con esta línea Membreño *et al.* (2000), determinaron con el uso de este marcador para la amplificación del ADN genómico, un nivel de resistencia alta a intermedia a *Xcp*. Una vez que se adaptó la amplificación y se logró una buena visualización de las bandas correspondiente al SCAR SAP6, se procedió a la identificación de su presencia en el grupo de plantas F4 provenientes de la selección fenotípica por la reacción con *Xcp*, y en los dos padres.

3.1.3.2. Variable evaluada

La efectividad en la adaptación de la fase de amplificación para el marcador SCAR SAP6, se evaluó mediante la expresión de las bandas indicadoras de su presencia (820 pb) en el genotipo VAX 6.

3.1.4 Protocolos para el marcador SCAR SR2 (VMDAF)

La extracción, cuantificación, separación y visualización-registro de bandas de ADN para la selección genotípica usando el marcador SCAR SR2 ligado al gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF, se realizaron como se indicó en la sección 3.1.3. Para la amplificación del ADN se empleó el perfil térmico sugerido por la Universidad de Puerto Rico (Anexo 3), usando como base la mezcla maestra de reacción que se detalla en el Anexo 5.

3.1.5 Evaluación con marcadores moleculares de la resistencia a *Xcp* y al VMDAF en plantas F4

Usando los marcadores SCAR SAP6 y SR2, se evaluó en las plantas F4 seleccionadas fenotípicamente la expresión de las bandas indicadoras de la presencia del QTL ligado a la resistencia a *Xcp* de la línea GEN#1 Sel 27 y del gen recesivo *bgm-1* asociado con la resistencia al VMDAF, respectivamente.

3.1.5.1 Equipo y materiales de laboratorio

Extracción de ADN. El protocolo seguido para la extracción de ADN fue el de la técnica alcalina desarrollada en 1993 por Klimyuk *et al.* (Valadez-Moctezuma y Kahl, 2000), aplicado para análisis con marcadores SCAR (Anexo 1). Para la extracción de ADN se emplearon las 67 plantas F4 seleccionadas por su reacción de resistencia (54) y susceptibilidad (13) a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp* y 6 plantas de cada progenitor (12 plantas). Se utilizaron tubos eppendorf, barras ("*pestle*") de plexiglass estériles, soluciones amortiguadoras (*buffers*) de lavado y extracción de ADN, micropipetas y puntas, y una microcentrifuga.

Cuantificación de ADN. En esta etapa se utilizó un fluorómetro (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant™200), que expresa la cantidad de ADN en nanogramos por microlitro (ng/μl). Para la calibración del aparato y la cuantificación del ADN se siguió el protocolo del laboratorio de Biología Molecular de Zamorano (Anexo 2), empleando el ADN bovino estándar (100 ng/μl) y una solución amortiguadora de cuantificación (TE) para las muestras de tejido.

Amplificación de ADN. La amplificación de ADN se realizó en un termociclador (PCR-100™, Programmable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycling). Se utilizó la concentración y volumen de mezcla de reacción definidos en la adaptación del protocolo para el marcador SCAR SAP6 (apartado 3.1.3); y los utilizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano para el SCAR SR2 (Anexo 5).

Separación de ADN. La separación de las moléculas de ADN con base en su tamaño y carga eléctrica, se realizó en un tanque de electroforesis (EC Maxicell EC 360M, 44 orificios) con la aplicación mediante una fuente de poder (Hoefer Scientific Instruments, Ps 250/2.5 AMP) de 140 voltios durante 45 min. Se siguieron los protocolos utilizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano para la preparación de geles de agarosa y la electroforesis de las muestras de ADN (Anexo 6).

Visualización de ADN y registro de bandas. La expresión de bandas de ADN fue identificada y registrada en fotografías instantáneas Polaroid®, tomadas de geles de agarosa y visualizadas bajo la luz ultravioleta de un transiluminador (Fotodyne, Foto/UV®26).

3.1.5.2 Variables evaluadas

Se buscó la presencia de la banda indicadora de resistencia (820 pb) correspondiente al SCAR SAP6 del QTL asociado a la resistencia a la bacteriosis común. Para el SCAR SR2 ligado al gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF, se evaluó la presencia de las bandas indicadoras de resistencia (530 pb), susceptibilidad (570 pb) o heterocigocidad (530/570 pb), (Aranda, 2000).

3.1.6 Evaluación fenotípica y molecular de la resistencia a *Xcp* en plantas F4

Por medio de una prueba estadística Chi-cuadrado (χ^2), se evaluó la relación de las reacciones fenotípicas a la inoculación observadas en plantas en invernadero con su análisis genético obtenido con el marcador molecular SCAR SAP6.

3.1.8 Evaluación fenotípica de plantas F5

La población F5 se conformó usando como criterios de reacción en la población F4, la reacción fenotípica de resistencia a la inoculación con *Xcp* y la presencia del gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF.

3.1.8.1 Siembra

Un grupo de 57 familias F5 resultantes de la selección indicada y los dos padres (Tío Canela-75 y VAX 6), fueron sembrados en los invernaderos del PIF en maceteros estándar de 8", con 6 repeticiones (maceteros) por familia y dos plantas por macetero.

3.1.8.2 Inoculación

Las familias F5 fueron inoculadas con el método de agujas múltiples a los 27 y 37 DDS, efectuándose las lecturas respectivas a los 13 y 10 DDI.

3.1.8.3 Variable evaluada

La selección de plantas en la población F5 se realizó según la reacción fenotípica a la inoculación con *Xcp*. De acuerdo con la severidad de la enfermedad observada en los padres (testigos resistente y susceptible), se consideraron plantas resistentes aquellas con una calificación menor o igual a 4.8.

3.1.9 Población F6 de frijol

La selección de las plantas que conformarán la población F6, se realizó considerando la reacción fenotípica a la inoculación con *Xcp* en plantas de la población F5 y la expresión homocigota recesiva (resistente) o heterocigota (segregante) para el gen *bgm-1* de resistencia al VMADF en plantas de las familias F4. Solamente plantas expresando ambos criterios (resistencia a las dos enfermedades) serán sembradas para su evaluación en la generación F6.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación fenotípica de plantas F3

Cinco plantas de cada una de las 61 familias F3 fueron evaluadas por su reacción fenotípica a la inoculación con *Xcp*, usando la escala 1-9 de severidad del daño (CIAT, 1987). La calificación ≤ 3 se empleó como criterio de evaluación de resistencia a esta enfermedad, avanzando las plantas seleccionadas para continuar su evaluación en la generación F4.

De las 61 familias F3 evaluadas, se seleccionaron 31 plantas resistentes de 22 familias (grado ≤ 3), (Cuadro 1, Anexo 7), pero sólo se obtuvo semilla de 25 plantas (seis no produjeron semilla), las que junto con los padres pasaron a conformar la población F4.

Cuadro 1. Reacción de las plantas seleccionadas de familias F3 y sus progenitores, a la inoculación con el aislamiento de *Xcp* EAP 9506. Zamorano, Honduras, 2001.

Familia	Reacción a <i>Xcp</i> (plantas F3)					Nº plantas resistentes por familia
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
X069-152-3	2					1
X069-152-7		3*				1
X069-152-12				3		1
X069-152-15					3	1
X069-153-9				3	NL	1
X069-153-20		1				1
X069-156-16		2				1
X069-156-39	2*				NL	1
X069-156-51	3*	3				2
X069-157-2	3		3			2
X069-157-3				3		1
X069-157-4				3		1
X069-157-7				2*		1
X069-157-8		3	3*	3	2	4
X069-157-10	3		2	2	NL	3
X069-157-12		2			3	2
X069-157-13			2			1
X069-157-14				3		1
X069-157-15	3			3		2
X069-157-16					3*	1
X069-157-28		3			NL	1
X069-157-36		3				1
Tío Canela - 75 (susceptible)	8	9	8	7	8	5
VAX 6 (resistente)	2	6	3	2	2	5

*: plantas sin producción de semilla; NL: sin lectura

Plantas sin calificación (espacios en blanco) presentaron lecturas mayores a tres (Anexo 7).

4.2 Evaluación fenotípica de plantas F4

El objetivo de evaluar la reacción de la población F4 (proveniente de la evaluación de las familias F3) a la inoculación con el aislamiento altamente virulento de *Xcp* EAP 9506, obtenido en Namasigüe, Honduras y usado por el PIF para la selección por resistencia a esta enfermedad, fue seleccionar plantas F4 resistentes y no resistentes a *Xcp*, para relacionar su reacción fenotípica con la efectividad del marcador molecular SAP6 utilizado para la identificación de un QTL asociado a la resistencia a *Xcp*. Según Muñoz y Singh (1996), esto brinda la posibilidad de diferenciar la reacción de las plantas de un material a un determinado aislamiento de *Xcp*.

Las 25 familias F4 fueron sembradas con 6 repeticiones (6 plantas/familia) para un total de 150 plantas en evaluación, de las que se seleccionaron 67 plantas de 23 familias (Cuadro 2, anexos 8 y 9). De estas plantas F4 seleccionadas, 54 presentaron una calificación menor o igual a 4.8 y fueron consideradas resistentes; y 13 plantas seleccionadas presentaron una calificación mayor a 7.3 y se consideraron susceptibles. Los dos padres de la población fueron incluidos para la caracterización molecular como testigos del estudio, evaluándose en total 79 plantas.

Las plantas del progenitor VAX 6 presentaron calificaciones menores o iguales a 3, confirmando la resistencia sugerida para este cruce interespecífico y otorgada por *P. acutifolius*. Pejúan (1999) en estudios con familias derivadas de la línea VAX 2, demostró por medio de inoculaciones que la resistencia intermedia determinada por *P. acutifolius* en un cruce interespecífico, es una opción para la búsqueda de resistencia a *Xcp* en *P. vulgaris*. Las plantas del progenitor Tío Canela-75 presentaron alta susceptibilidad a la inoculación con *Xcp*, con calificaciones superiores a 7.5.

4.3 Adaptación del protocolo para el marcador SCAR SAP6

Se logró amplificar exitosamente el ADN complementario al marcador SCAR SAP6, asociado a un QTL de resistencia a *Xcp* (derivado de la fuente GN#1 sel 27 conformado por 820 pares de bases). Con el empleo del perfil sugerido por Miklas (2000) y de las concentraciones de los componentes de la mezcla maestra y de su volumen optimizados, se logró una visualización adecuada de las bandas correspondientes al QTL en las muestras de ADN de la línea VAX 6.

4.3.1 Amplificación de ADN para el marcador SAP6

Para lograr una adecuada visualización de la banda del SCAR SAP6 ligada a la resistencia a *Xcp*, se realizaron pruebas de amplificación empleando dos volúmenes de mezcla maestra (15 μ l y 25 μ l) y diferentes concentraciones de sus componentes incluyendo agua, cebadores SAP6 A y SAP6 B y *Taq*-polimerasa para cada volumen. Para el volumen de 25 μ l, la concentración de *Taq*-polimerasa se mantuvo constante (Cuadro 3).

Cuadro 2. Reacción de las plantas seleccionadas de las familias F4 y sus progenitores Tío Canela-75 y VAX 6 a la inoculación con el aislamiento de *Xcp* EAP 9506. Zamorano, Honduras, 2001.

Familia	Reacción a <i>Xcp</i> y presencia del QTL						N° plantas seleccionadas
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
X069 152-3-1		8.5	4.0			3.5	3
X069 152-12-4	3.5	4.5				2.0*	3
X069 152-15-5						7.3*	1
X069 153-9-4		3.5	3.8	3.5	4.3	3.3*	5
X069 153-20-2	3.5		3.5	4.0	3.3	4.8*	5
X069 156-16-2			4.5				1
X069 153-51-2				7.5	7.8		2
X069 157-2-1	2.3	4.3	3.5	3.3	3.3	3.8*	6
X069 157-2-3			3.3	4.0	3.3	3.3	4
X069 157-3-4	8.3	9.0	7.3			4.3	4
X069 157-4-4	2.5	7.5*		3.3*		4.0*	4
X069 157-8-4				2.0			1
X069 157-8-5	4.8	3.3	7.8			3.3	4
X069 157-10-1			3.0				1
X069 157-10-3		3.5	4.5	3.3	4.0		4
X069 157-10-4		4.5					1
X069 157-12-2	7.5						1
X069 157-12-5	7.3		4.0				2
X069 157-13-3	3.5		4.0	4.0	4.8		4
X069 157-14-4	3.8	8.5	3.3	4.3*	3.8	3.8	6
X069 157-15-1			4.5	4.5			2
X069 157-15-4				4.8*		4.8	2
X069 157-28-2	7.3						1
Tío Canela-75	8.8	9.0	9.0	8.8	7.5	8.3	6
VAX 6	2.3	1.8	2.0	3.0	1.8	2.3	6

*: plantas sin producción de semilla.

Plantas sin calificación (espacios en blanco) no fueron seleccionadas; las calificaciones se detallan en los anexos 8 y 9.

Cuadro 3. Concentraciones de los componentes de la mezcla maestra para la amplificación del marcador SCAR SAP6 para el QTL de resistencia a *Xcp* del genotipo GN #1 Sel 27.

Componente	Volumen total (1 reacción (µl))					
	15 µl				25 µl	
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Agua	8.3	7.3	8.1	7.1	14.8	13.8
Buffer (5 X)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.5
dNTPs	0.7	0.7	0.7	0.7	1.2	1.2
Cebador SAP6 A	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
Cebador SAP6 B	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
Taq-polimerasa	0.5	0.5	0.7	0.7	0.5	0.5
ADN (20 ng/ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	5.0	5.0

M: mezclas maestras con diferentes concentraciones de los componentes

Con un volumen final de 15 µl de la mezcla maestra y el uso de la mezcla cuatro (M4) para la reacción de amplificación (Cuadro 3), se logró la visualización de las bandas más adecuada para la identificación del QTL asociado a la resistencia a *Xcp*.

4.4 Evaluación con marcadores moleculares en plantas F4

Simultáneamente a la evaluación fenotípica por su reacción a la inoculación, las plantas F4 se evaluaron empleando el marcador molecular SCAR SAP6 para determinar la presencia del QTL asociado con la resistencia a *Xcp* (Anexo 8).

Las 67 plantas F4 resistentes y susceptibles seleccionadas para este estudio y las 12 plantas de los padres, fueron evaluadas con el marcador molecular SCAR SAP6, identificándose que únicamente tres plantas no lo contenían (Cuadro 4). Esto sugiere que las plantas resistentes y algunas susceptibles al aislamiento EAP 9506 de *Xcp* poseen el QTL derivado de GN#1 sel 27, pero que su presencia no es suficiente para conferir resistencia a este aislamiento por lo que las plantas resistentes, incluyendo las de VAX 6, deberán poseer adicionalmente otro(s) gen(es) de resistencia.

Cuadro 4. Presencia del QTL (P) asociado a la resistencia a *Xcp* usando el SCAR SAP6. Zamorano, Honduras, 2001.

Familia	Presencia del QTL (plantas F4)						N° plantas resistentes y/o susceptibles
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
X069 1152-3-1		P	P			P	3
X069 152-12-4	P	P				P*	3
X069 152-15-5						P*	1
X069 153-9-4		P	P	P	P	P*	5
X069 153-20-2	P		P	P	A	P*	5
X069 156-16-2			P				1
X069 153-51-2				P	P		2
X069 157-2-1	P	P	P	P	P	P*	6
X069 157-2-3			P	P	P	P	4
X069 157-3-4	P	P	A			A	4
X069 157-4-4	P	A*		P*		P*	4
X069 157-8-4				P			1
X069 157-8-5	P	P	P			P	4
X069 157-10-1			P				1
X069 157-10-3		P	P	P	P		4
X069 157-10-4		P					1
X069 157-12-2	P						1
X069 157-12-5	P		P				2
X069 157-13-3	P		P	P	P		4
X069 157-14-4	P	P	P	P*	P	P	6
X069 157-15-1			P	P			2
X069 157-15-4				P*		P	2
X069 157-28-2	P						1
Tío Canela-75	P	P	P	P	P	P	6
VAX 6	P	P	P	P	P	P	6

P: plantas con marcador presente ; A: Plantas con marcador ausente ; *: plantas sin producción de semilla
Las plantas sin calificación no fueron identificadas con el SCAR SAP6.

4.5 Evaluación fenotípica y molecular en plantas F4

La prueba de Chi-cuadrado determinó que para el aislamiento EAP 9506 de *Xcp* obtenido en Namasigüe, Choluteca, el marcador molecular SAP6 no es efectivo en la identificación de plantas resistentes a la enfermedad (Cuadro 5). Probablemente las plantas que no presentaron el marcador pero que muestran resistencia a este aislamiento, poseen otros genes mayores cuya presencia no es detectable por el marcador SAP6, por lo que sería conveniente evaluarlas con otros marcadores SCAR disponibles como el SU91.

4.6 Evaluación molecular de la resistencia de plantas F4 al VMDAF

En la evaluación para determinar la presencia del marcador SCAR SR2 asociado con la resistencia al VMDAF conferida por el gen *bgm-1*, se emplearon 67 plantas F4 y 12 plantas de los padres Tío Canela-75 y VAX 6. Se identificaron 26 plantas resistentes (banda presente en 530 pb) y 41 susceptibles (bandas presentes en 570 y 570/530 pb), (Cuadro 6, Anexo 9). Doce de las 41 plantas susceptibles son heterocigotas (530/570 pb), lo que indica que continuarán segregando para el gen recesivo *bgm-1*, aumentando la probabilidad de encontrar plantas con resistencia al VMDAF en la siguiente generación. Las 6 plantas de Tío Canela-75 presentaron el gen recesivo *bgm-1*, lo que concuerda con el estudio de Angel *et al.* (1998), donde se determinó que esta línea presenta la resistencia al VMDAF conferida por este gen. Aranda (2000) confirmó que el progenitor Tío Canela-75 es portador del gen recesivo *bgm-1*. Las plantas de VAX 6 no presentaron las bandas asociadas con el marcador molecular SR2, por lo que son susceptibles al VMDAF.

4.7 Evaluación fenotípica de plantas F5

De las 67 plantas seleccionadas de las familias F4, sólo 57 pasaron a conformar la población F5 pues de 10 plantas no se obtuvo producción de semilla. Adicionalmente, se evaluaron los dos progenitores para un total de 59 genotipos (Anexo 10).

Se seleccionaron 31 plantas resistentes de 22 familias (calificación ≤ 4.8) por su reacción fenotípica de resistencia a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp* (Cuadro 7).

Cuadro 5. Comparación de la reacción fenotípica a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp* y presencia del marcador SAP6 en plantas F4. Zamorano, Honduras, 2001.

Clase (fenotipo)	Observado (campo)	Esperado (laboratorio)	Obs- Esp	$[(O-E) - 0.5]^2/E$
Susceptible	19	3	16	80.08
Resistentes	48	64	-16	3.75
Total	67	67	0.00	83.83*

* Nivel de significancia $\alpha=0.05$

Cuadro 6. Presencia del gen recesivo *bgm-1* asociado a la resistencia al VMDAF. Zamorano, Honduras, 2001.

Familia	Presencia del gen <i>bgm-1</i> (plantas F4)						N° plantas resistentes y/o susceptibles
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
X069 152-3-1		S	S			S	3
X069 152-12-4	S	S				S*	3
X069 152-15-5						S*	1
X069 153-9-4		H	P	H	H	S*	5
X069 153-20-2	P		H	H	P	P*	5
X069 156-16-2			S				1
X069 153-51-2				P	P		2
X069 157-2-1	S	S	S	S	P	S*	6
X069 157-2-3			S	S	S	S	4
X069 157-3-4	H	P	P			S	4
X069 157-4-4	H	H*		P*		S*	4
X069 157-8-4				P			1
X069 157-8-5	P	P	P			P	4
X069 157-10-1			S				1
X069 157-10-3		S	S	S	S		4
X069 157-10-4		S					1
X069 157-12-2	H						1
X069 157-12-5	P		P				2
X069 157-13-3	S		H	H	P		4
X069 157-14-4	P	P	P	P*	P	P	6
X069 157-15-1			P	P			2
X069 157-15-4				S*		S	2
X069 157-28-2	H						1
Tío Canela-75	P	P	P	P	P	P	6
VAX 6	S	S	S	S	S	S	6

R: Homocigota resistente (530 pb); H: Heterocigota susceptible (530/570); S= Homocigota susceptible (570 pb)

*: plantas sin producción de semilla

Plantas sin calificación (espacio en blanco) no fueron identificadas con el SCAR SR2.

4.8 Familia F6 de frijol

De las 31 plantas resistentes de 22 familias F5 seleccionadas según su reacción fenotípica a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp*, y usando como criterio que provinieran de familias F4 con el gen *bgm-1* (según presencia del marcador SR2), se seleccionaron 23 plantas resistentes al VMDAF para que conformaran la población F6. De estas, 14 plantas provienen de familias resistentes y 9 de familias susceptibles heterocigotas al VMDAF (Cuadro 8). Estas familias F6 serán evaluadas por los marcadores SCAR SAP6 y SU91 (QTL's de resistencia a *Xcp*) y SR2 (gen *bgm-1* de resistencia al VMDAF), simultáneamente.

Las líneas puras de plantas F6 seleccionadas serán llevadas a pruebas de campo bajo inoculación con los aislamientos EAP 9503 y 9606 de *Xcp*, y en Comayagua bajo incidencia del VMDAF. Se espera seleccionar plantas con resistencia a ambas enfermedades, la bacteriosis común y el VMDAF.

Cuadro 7. Reacción de plantas F5 a la inoculación con el aislamiento de *Xcp* EAP 9506. Zamorano, Honduras, 2001.

Familia	Reacción a <i>Xcp</i> (plantas F5)						N° plantas seleccionadas
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
X069 152-3-1-6		3.8			4.0	NL	2
X069 153-9-4-2		3.0	3.3			NL	2
X069 153-9-4-3		4.0			3.5	NL	2
X069 153-9-4-4	3.0				NL	NL	1
X069 153-9-4-5	4.3				4.0	NL	2
X069 153-20-2-1					3.0	NL	1
X069 153-20-2-3	3.8				3.8		2
X069 153-20-2-4				4.5		NL	1
X069 153-20-2-5	2.0						1
X069 157-2-1-1					4.3		1
X069 157-2-1-2					3.5	4.3	2
X069 157-2-3-4					2.3	4.0	2
X069 157-4-4-1					4.0	NL	1
X069 157-8-5-1					4.0	4.5	2
X069 157-8-5-2						4.5	1
X069 157-8-5-6					3.8		1
X069 157-14-4-1			3.8		NL	NL	1
X069 157-14-4-3	3.5					4.3	2
X069 157-14-4-5	3.5					4.3	2
X069 157-14-4-6	4.5					4.5	2
X069 157-15-1-4		4.8				NL	1
X069 157-15-4-6			4.8		NL	NL	1
Tío Canela-75	8.5	9.0	7.8	5.8	7.3	NL	6
VAX 6	5.8	4.3	4.5	4.5	NL	NL	6

NL: sin lectura

Plantas sin calificación (espacio en blanco) no fueron seleccionadas, las calificaciones se detallan en el Anexo 10.

Cuadro 8. Reacción de plantas F5 a la inoculación con el aislamiento de *Xcp* EAP 9506 y presencia del gen *bgm-1* (SCAR SR2) asociado a la resistencia al VMDAF. Zamorano, Honduras, 2001.

Familia	Reacción a <i>Xcp</i> (plantas F5)						<i>bgm-1</i>	N° plantas
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)		
X069 152-3-1-6		3.8*			4.0*	NL	S	2
X069 153-9-4-2		3.0	3.3			NL	H	2
X069 153-9-4-3		4.0			3.5	NL	P	2
X069 153-9-4-4	3.0				NL	NL	H	1
X069 153-9-4-5	4.3				4.0	NL	H	2
X069 153-20-2-1					3.0	NL	P	1
X069 153-20-2-3	3.8				3.8		H	2
X069 153-20-2-4				4.5		NL	H	1
X069 153-20-2-5	2.0						P	1
X069 157-2-1-1					4.3*		S	1
X069 157-2-1-2					3.5*	4.3*	S	2
X069 157-2-3-4					2.3*	4*	S	2
X069 157-4-4-1					4.0	NL	H	1
X069 157-8-5-1					4.0	4.5	P	2
X069 157-8-5-2						4.5	P	1
X069 157-8-5-6					3.8		P	1
X069 157-14-4-1			3.8		NL	NL	P	1
X069 157-14-4-3	3.5					4.3	P	2
X069 157-14-4-5	3.5					4.3	P	2
X069 157-14-4-6	4.5					4.5	P	2
X069 157-15-1-4		4.8				NL	P	1
X069 157-15-4-6			4.8*		NL	NL	S	1
Tío Canela-75	8.5	9.0	7.8	5.8	7.3	NL	P	6
VAX 6	5.8	4.3	4.5	4.5	NL	NL	S	6

bgm-1: presencia del SCAR SR2
 NL: Sin lectura

H: Heterocigota susceptibles (530/570 pb)
 R: Homocigota resistente (530 pb)
 S: Homocigota susceptible (570 pb)

*: Plantas no seleccionadas por ser susceptibles al VMDAF

Plantas sin calificación (espacio en blanco) no fueron seleccionadas; las calificaciones se detallan en el Anexo 10

5. CONCLUSIONES

1. Se logró adaptar los procedimientos del protocolo para la amplificación del SCAR SAP6, a las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano.
2. Se seleccionaron plantas con resistencia a la bacteriosis común (aislamiento virulento EAP 9506 de *Xcp* de Honduras), empleando el método de agujas múltiples.
3. Se identificaron plantas con resistencia a la bacteriosis común empleando técnicas moleculares (SCAR SAP6).
4. Se identificaron familias con resistencia al VMDAF empleando técnicas moleculares (SCAR SR2).
5. Se seleccionaron simultáneamente plantas de frijol común resistentes a la bacteriosis común y al VMDAF, aplicando técnicas convencionales y caracterización molecular.

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar las inoculaciones con diferentes aislamientos hondureños de *Xcp*, con el fin de identificar si el marcador SAP6 es efectivo en la selección de líneas resistentes para otros aislamientos adicionales al EAP 9506.
2. En la población F6, es recomendable seleccionar las familias por su evaluación fenotípica a la *Xcp* y al VMDAF. Adicionalmente, estas deberían ser sometidas a análisis de laboratorio para la identificación de las bandas asociadas a los QTL's y los genes de resistencia a la bacteriosis común y al VMDAF, respectivamente.
3. Utilizar en el Laboratorio de Biología Molecular de Zamorano, los ajustes sugeridos en este estudio para la amplificación del marcador SAP6.
4. Evaluar el comportamiento agronómico (rendimiento, reacción a otras enfermedades y valor comercial) de las familias seleccionadas avanzadas hasta la generación F6, para identificar líneas que posean resistencia simultánea a ambas enfermedades y condiciones agronómicas favorables por su uso como progenitores en programas de mejoramiento o como nuevas variedades.

BIBLIOGRAFIA

ANGEL, J.C.; BEAVER, J.S.; KELLY, J.D. 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.

ARANDA, L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo en frijol común. Tesis Ing. Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 78 p.

ARNAUD-SANTANA, E.; COINE, D.P.; ESKRIDGE, K.M.; VIDAVER, A.K. 1994. Inheritance, low correlations of leaf, pod, and seed reactions to common blight disease in common beans, and implications for selection. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119:116-121.

BAI, Y.; MICHAELS, T.E.; PAULS, K.P. 1996. Identification of RAPD markers linked to bacterial blight resistance genes in *Phaseolus vulgaris* L. Annu Rep. Bean Improv. Coop. 39:164-165.

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 J. Morales. Palmira, Colombia, CIAT. p. 148-149.

BEEBE, S.; PASTOR-CORRALES, M.A. 1991. Breeding for disease resistance. *In: Common beans: research for crop improvement.* Ed. por A. Van Schoonhoven y O. Voysest. CAB Internacional, Wallingford, U.K. p. 561-610.

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

BLAIR, M.W.; BEAVER, J.S. 1993. Inheritance of BGMV from bean genotype A429. Ann. Rept. Bean Improv. Coop. 36:143.

CASTAÑO, J.; DEL RÍO, L. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press. 290 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1981. Enfermedades bacterianas del frijol: identificación y control (Guía de estudio). Cali, Colombia, serie 045B-06.05. p. 14-21.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de Frijol. Cali, Colombia. 56 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1999. Técnicas modernas en el mejoramiento y estudios de patología de frijol: Curso internacional para mejoradores y patólogos de la región andina. Cali, Colombia, CIAT. 21 p.

COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. 1980. Bacterial diseases of legumes: breeding and resistance. *In*: Summerfield, R. And Bunting, A. H., eds. *Advances in Legume Science*. London, HMSO, p. 225-233.

IICA (INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN EN LA GRICULTURA). 2000. Tizón común o bacteriosis común. Consultado el 20 de agosto del 2001. Documento disponible en: <http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/frejol/tizcom.html>

KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N. 1996. The role of molecular markers in breeding for qualitative and quantitative traits of common bean. *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. 262-278.

LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHOONHOVEN, A.V. 1985. Frijol: Investigación y Produccion, CIAT. Cali, Colombia. 417 p.

MIKLAS, P.; SMITH, J.; RILEY, R.; GRAFTON, K.; SINGH, S.; JUNG, G.; COYNE, P. 2000. Marker-assisted breeding for pyramided resistance to common bacterial blight in common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 43:39-40.

MORALES G., F.J. 1996. Mejoramiento genético del frijol común por resistencia a las principales enfermedades vírales en la América Latina. *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. 99-113.

MORALES G., F.J. 2000. El Mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. CIAT, Cali, Colombia. 169 p.

MORALES, F.J.; NIESSEN. A.I. 1988. Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germplasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. *Plant Disease* 72: 1020-1023.

MORALES, F.J.; SINGH, S.P. 1991. Genetics of resistance to bean golden mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. Euphytica* 25: 113-117.

MORALES, F.J.; SINGH, S.P. 1993. Breeding for resistance to bean golden mosaic virus in an interracial population of *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. Euphytica* 25: 113-117.

MUÑOZ, C.G.; SINGH, S.P. 1996. Estudio comparativo de fuentes de resistencia para bacteriosis común disponibles en diferentes especies de *Phaseolus* y progreso genético a

través de cruzamientos interespecíficos y piramidación de genes. *In: Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina.* Ed. por Shree P. Singh y Oswaldo Voystest. Cali, Colombia. CIAT. p. 118-129.

SINGH, S.P.; MUÑOZ, C.G. 1999. Resistance to Common Bacterial Blight among *Phaseolus* Species and Common Bean Improvement. *Crop Science*. 39(1): 80-89.

PEDRAZA, F.; GALLEGO, G.; BEEBE, S.; TOHME J. 1996. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis común (CBB). *In: Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina.* Ed. por Shree P. Singh y Oswaldo Voystest. Cali, Colombia. CIAT. p 130-134.

PEJUÁN, W.B. 2000. Identificación de fuentes de resistencia utilizando aislamientos hondureños de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y su importancia en el manejo de la bacteriosis común del frijol. Tesis Ing. Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 78 p.

RABINOW, P. 1996. Making PCR: a Story of Biotechnology. University of Chicago Press. 235 p.

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

ROSAS, J.C.; VARELA, O.I. 1996. Propuesta de liberación de la nueva variedad de frijol Tío Canela-75. Zamorano, Honduras, Departamento de Agronomía. 46 p.

ROSAS, J.C.; YOUNG, R. 1992. Principios y prácticas de mejoramiento de plantas. Zamorano, Honduras. Publicación del Departamento de Agronomía de la EAP. 119 p.

ROSAS, J.C.; CASTRO, A.; BEAVER, J.S.; PÉREZ, C. A.; MORALES, A.; LÉPIZ, R. 2000. Mejoramiento Genético para tolerancia a altas temperaturas y resistencia al mosaico dorado en frijol común. *Agronomía Mesoamericana* 11(1):1-10.

SCHOONHOVEN, A.V.; VOYSEST, O. 1994. El frijol común en América Latina y sus limitaciones. *In: Problemas de producción de frijol en los trópicos.* Ed. Pastor-Corrales, M.; Schwartz, H. 2 ed. Cali, Colombia. P 49-61.

SERRACIN, J.; YOUNG, R.A.; ROSAS, J.C.; CACERES, J. 1991. Daños causados por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y su efecto en el rendimiento del frijol común (habichuela: *Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agriculture*. The University of Puerto Rico. 75 (4): 353-361.

SINGH, S.P.; ROCA, W.M.; DEBOUCK, D.G. 1996. Ampliación de la base genética de los cultivares de frijol: Hibridación interespecífica en *Phaseolus* Especies. *In: Taller de Mejoramiento de Frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina.* Ed. por Shree P. Singh y Oswaldo Voystest. Cali, Colombia. CIAT. p. 9-18

MEMBREÑO, J.B.; ZAPATA, M.; BEAVER, J.B.; SMITH, R. 2000. Identificación de genotipos de *Phaseolus vulgaris* L. con resistencia a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, con el uso de marcadores moleculares. Consultado el 28 de Noviembre del 2001. Documento disponible en: <http://www.apsnet.org/meetings/div/cr00abs.asp>

SCHWARTZ, H.F.; GALVEZ, G.E. 1980. Bean Production Problems: Disease, Insect, Soil and Climatic Constraints of *Phaseolus vulgaris*. CIAT, Cali, Colombia.. 424 p.

URREA, C.A.; MIKLAS, P.N.; BEAVER, J.S.; RILEY, R.H. 1996. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of BGMV resistance in common bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:1035-1039.

VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; KAHL, G. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas: teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa, México. 147 p.

VIDAVER, A. K. 1996. Clasificación, nomenclatura e identificación del patógeno de la bacteriosis común dentro del grupo *Xanthomonas campestris*. In: Primer Taller Internacional sobre Bacteriosis Común del Frijol. Universidad de Puerto Rico. Documento 96/2. Puerto Rico. p. 6-20.

VOYSEST, O. 2000. Mejoramiento Genético del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de Variedades de América Latina 1930-1999. CIAT, Cali, Colombia. p. 92.

WEBSTER, D.M.; TEMPLE, S.R.; SCHWARTZ, H.F. 1980. Selection for resistance to *Xanthomonas campestris* in dry beans. Crop Science. 20:519-522.

8. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN para el análisis de marcadores SCAR (Método Alcalino)

1. Cosechar tejido fresco de plantas (hojas jóvenes) para la extracción del ADN.
2. Agregar 40 μ l de hidróxido de sodio (NaOH 0.25 M) en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Calentar las muestras en baño maría a 100 °C por 30 segundos.
3. Macerar el tejido suavemente usando una barra (*pestle*) de plexiglass de laboratorio.
4. Agregar 40 μ l de ácido clorhídrico (HCl 0.25 M) y 20 μ l Tris ácido clorhídrico (Tris HCl 0.5 M).
5. Colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 100 °C por 2 min.
6. Diluir las muestras extraídas en agua destilada estéril, usando una relación de 1:1.
7. Medir la concentración (ng/ml) de ADN de las muestras; si es necesario, diluir previo a su amplificación.
8. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C.

Anexo 2. Procedimiento para la cuantificación de ADN (instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant™200)

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

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

* Buffer de cuantificación:

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

Anexo 3. Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR SR2 para el gen *bgm-1* (Universidad de Puerto Rico)

Perfil térmico para la amplificación con el SCAR SR2 (gen *bgm-1*)

Nº	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización (denaturation)	94	30 seg	1
2	Desnaturalización (denaturation)	94	1 min	35
	Acoplamiento (annealing)	60	1 min	35
	Elongación (polimerization)	72	3 min	35
3	Elongación final	72	5 min	1

Perfil de programación del termociclador para la amplificación con el SCAR SR2 (gen *bgm-1*)

Nº	Paso (step)	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)/ciclo
1	1	94	00:00:30
2	2	94	00:01:00
3	3	60	00:01:00
4	4	72	00:03:00
5	5		34 veces al Paso 1
6	6	72	00:05:00
7	7	4	00:00:00
8	8	Final	

Anexo 4. Protocolo para la amplificación de ADN usando el marcador SCAR SAP 6 para un QTL de resistencia a *Xcp* (Miklas, 2000)

Perfil térmico para la amplificación con el SCAR SAP 6 (QTL de resistencia a *Xcp*)

N°	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización (denaturation)	94	10 seg	34
	Acoplamiento (annealing)	60	40 seg	34
	Elongación (polimerization)	72	2 min	34
2	Elongación final	72	5 min	1

Perfil de programación del termociclador para la amplificación con el SCAR SAP 6 (QTL de resistencia a *Xcp*)

N°	Paso (step)	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)/ciclo
1	1	94	00:00:10
2	2	60	00:01:40
3	3	72	00:02:00
4	4		33 veces al Paso 1
5	5	72	00:05:00
6	6	4	00:00:00
7	7	Final	

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

1. Descongelar el ADN a temperatura ambiente del plato con las muestras diluidas de ADN guardados en el refrigerador.
2. Realizar los cálculos pertinentes para preparar la mezcla de reacción para el SCAR SR2, según el cuadro, y para el SCAR SAP6 la mezcla adaptada como se indica en resultados y discusión.
3. Preparar la mezcla de reacción sin incluir las muestras de ADN.
4. Colocar 13 μl de la mezcla de reacción a cada celda del plato, luego agregar 2 μl de muestra de ADN.
5. Tapar con papel plástico (Microseal TM "A") la caja de reacción (platos de 96 celdas).
6. Colocar el plato en el termociclador y amplificar con el perfil térmico para SCAR (Universidad de Puerto Rico) para el SCAR SR2 y el perfil térmico sugerido por Miklas (2000) para el SCAR SAP6.
7. Una vez finalizada la amplificación, guardar los platos con las muestras en el refrigerador hasta proceder a la electroforesis

Cuadro. Mezcla de reacción para la amplificación del marcador SCAR para gen *bgm-1*.

Componente	1 reacción (μl)
Agua	9.0
Buffer (5 X)	2.0
dNTPs (4 mM c/u) + Mg Cl ₂	0.7
Cebador DOR 21 A (10 μM)	0.3
Cebador DOR 21 B (10 μM)	0.3
<i>Taq</i> -polimerasa (5 U/ μl)	0.7
ADN (20 ng/ml)	2.0
Volumen final	15.0

Anexo 6. Electroforesis para la amplificación de ADN

Preparación de geles (gelatinas) al 1% de agarosa

1. Agregar 170 ml de buffer TBE 0.5X + 1.7 g de agarosa en un erlenmeyer, para bandejas de 22 orificios; ó 320 ml de buffer TBE 0.5X 3.2 g de agarosa, para bandejas de 44 orificios.
2. Colocar el erlenmeyer (con uno más pequeño invertido en su boca) en un horno microondas por 3 min. Retirar el erlenmeyer, agitarlo levemente y colocarlo de nuevo en el horno microondas dos veces por 1 min. (USAR GUANTES RESISTENTES AL CALOR).
3. Retirar el erlenmeyer del microondas y colocarlo en una bandeja con agua para enfriar la mezcla de agarosa/TBE buffer. Verificar la temperatura introduciendo un termómetro en el erlenmeyer.
4. Cuando la temperatura baje a 60 °C, agregar 9 ó 20 µL de bromuro de etidio (180 ml para 22 orificios ó 400 ml para 44 orificios), y vaciar la solución de agarosa y buffer TBE en una bandeja de electroforesis para correr muestras. Colocar los peines de inmediato y dejar solidificar por 20-30 min.

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

* Buffer TBE (Trisborate), ver guía de preparación de reactivos y enzimas (Anexo 11).

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

Electroforesis

1. Colocar 15 ó 25 µl de cada muestra de ADN amplificado en cada orificio del gel.
2. Dejar correr la electroforesis por una hora a ~140 V
3. Transferir las gelatinas al transiluminador, usando guantes de látex desechables.
4. Revisar el nivel de tinción de las bandas en el transiluminador de luz UV.
5. Fotografíar las gelatinas.

* El bromuro de etidio es altamente cancerígeno.

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

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

Anexo 7. Reacción de plantas de familias F3, sus progenitores y los tres testigos (XAN176, DOR 364 y Don Silvio) a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp*. Zamorano, 2001.

Título: F2:3 Tío Canela - 75 x VAX 6							
Fecha siembra: 16-11-2000							
Ubicación: Invernadero # 2							
Descripción: Evaluación por bacteriosis, cinco repeticiones (plantas).							
Parcela	Fuente	Pedigrí	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1	X069-152-3	Tío Canela - 75 (I gene) / VAX 6	2	7	8	6	8
2	6		6	4	5	8	7
3	7		8	3	9	8	7
4	8		7	7	8	4	7
5	10		5	6	7	7	NL
6	12		5	6	7	3	5
7	15		6	7	5	6	3
8	16		7	4	6	9	7
9	27		6	8	7	7	8
10	29		8	8	8	9	9
11	32		7	9	9	8	7
12	33		9	7	7	7	NL
13	35		8	9	4	7	NL
14	41		9	9	8	7	9
15	42		8	7	9	5	NL
16	43		6	4	5	4	7
17	153-1	Tío Canela - 75 (I gene) / VAX 6	6	4	8	7	8
18	9		9	7	6	3	NL
19	15		8	8	6	5	8
20	16		7	6	6	9	9
21	20		6	1	7	6	8
22	21		7	6	6	6	NL
23	22		9	7	8	8	9

24	25		9	6	5	5	7
25	29		5	4	5	5	NL
26	30		8	7	6	6	8
27	156-1	Tío Canela - 75 (i gene) / VAX 6	9	6	6	4	9
28	2		9	6	5	4	4
29	12		8	8	8	4	8
30	15		8	8	9	7	7
31	16		9	2	6	6	8
32	18		7	8	6	7	9
33	19		9	7	9	8	9
34	22		7	8	7	7	8
35	34		8	8	9	8	NL
36	38		6	9	9	9	8
37	39		2	5	4	4	NL
38	51		3	3	6	5	8
39	52		4	7	5	8	NL
40	157-2	Tío Canela - 75 (i gene) / VAX 6	3	4	3	4	5
41	3		4	6	7	3	9
42	4		7	5	7	3	5
43	5		4	6	4	6	5
44	7		6	5	6	2	8
45	8		7	3	3	3	2
46	9		8	7	8	9	NL
47	10		3	9	2	2	NL
48	11		7	8	8	7	8
49	12		7	2	8	4	3
50	13		6	6	2	4	5
51	14		5	6	6	3	7
52	15		3	5	4	3	6
53	16		6	9	5	7	3
54	20		5	6	6	4	7
55	157-21	Tío Canela - 75 (i gene) / VAX 6	6	4	5	4	7

56	24		8	8	8	8	NL
57	28		4	3	7	4	NL
58	30		7	7	4	5	6
59	32		5	6	8	NL	NL
60	36		7	3	6	5	7
61	42		8	7	7	8	8
62	X003- (422,423)	Tío Canela - 75 (I gene)	8	9	8	7	8
63	(91,92)	VAX 6	2	6	3	2	2
64	(135-136)	XAN 176	9	8	8	9	9
65	(95,96)	DOR 364	9	8	8	9	9
66	(89,90)	Don Silvio	9	9	9	9	9

NL: Plantas sin lectura

Anexo 8. Reacción de plantas de familias F4 y sus progenitores a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp* y presencia del marcador SAP6 del QTL asociado a la resistencia a *Xcp*. Zamorano, 2001.

Ensayo: Evaluación de familias F4 de la cruza TC-75 x VAX6													
Fecha siembra:		26/02/01											
Ubicación:		Invernadero #2											
Descripción:		Evaluación BC y VMDF, 6 reps.											
Plot	fuelle	SEV	SAP	SEV	SAP	SEV	SAP	SEV	SAP	SEV	SAP	SEV	SAP
1	X069 1152-3-1	5.8		8.5	R	4.0	R	6.5		6.0		3.5	R
2	X069 152-12-4	3.5	R	4.5	R	6.0		6.0		6.0		2.0	R
3	X069 152-15-5	5.8		6.0		5.0		6.5		5.5		7.3	R
4	X069 153-9-4	5.3		3.5	R	3.8	R	3.5	R	4.3	R	3.3	R
5	X069 153-20-2	3.5	R	5.0		3.5	R	4.0	R	3.3	S	4.8	R
6	X069 156-16-2	6.0		6.3		4.5	R	6.5					
7	X069 153-51-2	5.5		8.0		8.3		7.5	R	7.8	R	5.8	
8	X069 157-2-1	2.3	R	4.3	R	3.5	R	3.3	R	3.3	R	3.8	R
9	X069 157-2-3	6.3		7.3		3.3	R	4.0	R	3.3	R	3.3	R
10	X069 157-3-4	8.3	R	9.0	R	7.3	S	6.0		5.8		4.3	S
11	X069 157-4-4	2.5	R	7.5	R	5.0		3.3	R	5.0		4.0	R
12	X069 157-8-2	5.5		6.5		5.3							
13	X069 157-8-4	7.3		5.8		5.0		2.0	R	5.3		5.5	
14	X069 157-8-5	4.8	R	3.3	R	7.8	R	5.0		6.8		3.3	R
15	X069 157-10-1	6.0		5.8		3.0	R	5.3		5.0		5.5	
16	X069 157-10-3	5.3		3.5	R	4.5	R	3.3	R	4.0	R	5.0	
17	X069 157-10-4	5.3		4.5	R								
18	X069 157-12-2	7.5	R	5.8		5.5		6.5		6.3		4.8	
19	X069 157-12-5	7.3	R	5.8		4.0	R	5.5		5.0		6.0	
20	X069 157-13-3	3.5	R	5.3		4.0	R	4.0	R	4.8	R	5.0	
21	X069 157-14-4	3.8	R	8.5	R	3.3	R	4.3	R	3.8	R	3.8	R
22	X069 157-15-1	5.5		5.5		4.5	R	4.5	R	5.5		6.3	
23	X069 157-15-4	5.3		7.0		5.3		4.8	R	5.3		4.8	R
24	X069 157-28-2	7.3	R	5.8		6.0		6.0		6.3		6.0	
25	X069 157-36-2	5.5		5.8		5.0		5.0		5.8		6.0	
26	Tío Canela-75	8.8	R	9.0	R	9.0	R	8.8	R	7.5	R	8.3	R
27	VAX 6	2.3	R	1.8	R	2.0	R	3.0	R	1.8	R	2.3	R

R: Resistente

S: Susceptible

SEV: Severidad de aislamiento EAP 9506 de *Xcp*.

SAP: Presencia del marcador SAP6

Anexo 9. Reacción de plantas de familias F4 y sus progenitores a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp* y la presencia del marcador SR 2 (gen recesivo *bgm-1*) asociado a la resistencia al VMDF. Zamorano, 2001.

Ensayo: Evaluación de familias F4 de la cruce TC-75 x VAX6													
Fecha siembra:		26/02/01											
Ubicación:		Invernadero #2											
Descripción:		Evaluación BC y VMDF, 6 reps.											
Plot	fuelle	SEV	SR2	SEV	SR2	SEV	SR2	SEV	SR2	SEV	SR2	SEV	SR2
1	X069 1152-3-1	5.8		8.5	S	4.0	S	6.5		6.0		3.5	S
2	X069 152-12-4	3.5	S	4.5	S	6.0		6.0		6.0		2.0	S
3	X069 152-15-5	5.8		6.0		5.0		6.5		5.5		7.3	S
4	X069 153-9-4	5.3		3.5	H	3.8	R	3.5	H	4.3	H	3.3	S
5	X069 153-20-2	3.5	R	5.0		3.5	H	4.0	H	3.3	R	4.8	R
6	X069 156-16-2	6.0		6.3		4.5	S	6.5					
7	X069 153-51-2	5.5		8.0		8.3		7.5	R	7.8	R	5.8	
8	X069 157-2-1	2.3	S	4.3	S	3.5	S	3.3	S	3.3	R	3.8	S
9	X069 157-2-3	6.3		7.3		3.3	S	4.0	S	3.3	S	3.3	S
10	X069 157-3-4	8.3	H	9.0	R	7.3	R	6.0		5.8		4.3	S
11	X069 157-4-4	2.5	H	7.5	H	5.0		3.3	R	5.0		4.0	S
12	X069 157-8-2	5.5		6.5		5.3							
13	X069 157-8-4	7.3		5.8		5.0		2.0	R	5.3		5.5	
14	X069 157-8-5	4.8	R	3.3	R	7.8	R	5.0		6.8		3.3	R
15	X069 157-10-1	6.0		5.8		3.0	S	5.3		5.0		5.5	
16	X069 157-10-3	5.3		3.5	S	4.5	S	3.3	S	4.0	S	5.0	
17	X069 157-10-4	5.3		4.5	S								
18	X069 157-12-2	7.5	H	5.8		5.5		6.5		6.3		4.8	
19	X069 157-12-5	7.3	R	5.8		4.0	R	5.5		5.0		6.0	
20	X069 157-13-3	3.5	S	5.3		4.0	H	4.0	H	4.8	R	5.0	
21	X069 157-14-4	3.8	R	8.5	R	3.3	R	4.3	R	3.8	R	3.8	R
22	X069 157-15-1	5.5		5.5		4.5	R	4.5	R	5.5		6.3	
23	X069 157-15-4	5.3		7.0		5.3		4.8	S	5.3		4.8	S
24	X069 157-28-2	7.3	H	5.8		6.0		6.0		6.3		6.0	
25	X069 157-36-2	5.5		5.8		5.0		5.0		5.8		6.0	
26	Tío Canela-75	8.8	R	9.0	R	9.0	R	8.8	R	7.5	R	8.3	R
27	VAX 6	2.3	S	1.8	S	2.0	S	3.0	S	1.8	S	2.3	S

R: Resistencia.

S: Susceptibilidad

H: Heterogeneidad

SEV: severidad del aislamiento EAP 9506 de *Xcp*

SR2: Presencia del gen *bgm-1* (Laboratorio)

Anexo 10. Reacción de plantas de familias F5 y sus progenitores a la inoculación con el aislamiento EAP 9506 de *Xcp* y la presencia del marcador SR2 (gen recesivo *bgm-1*) asociado a la resistencia al VMDF en familias F4. Zamorano, 2001.

Ensayo: Evaluación familias F5 de la cruz TC-75 x VAX6									
Fecha siembra:		23/06/2001							
Inoculación:		Aislamiento EAP 9506 de Namasigüe, Choluteca							
Ubicación:		Invernadero # 2							
Descripción:		Evaluación BC y VMDF, 6 reps.							
plot	Familia	Pedigrí	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	<i>Bgm-1</i>
1	X069 152-3-1-2	(Tío Canela - 75 (I gene)/VAX6	8.3	8.8	7.8	9.0	NL	NL	S
2	X069 152-3-1-3		7.3	4.5	6.3	6.5	NL	NL	S
3	X069 152-3-1-6		5.3	3.8	5.3	5.5	4.0	NL	S
4	X069 152-12-4-1		5.3	5.0	6.0	8.0	7.0	NL	S
5	X069 152-12-4-2		5.5	5.5	NL	NL	NL	NL	S
6	X069 153-9-4-2		4.0	3.0	3.3	4.0	4.8	NL	H
7	X069 153-9-4-3		5.0	4.0	4.0	6.8	3.5	NL	R
8	X069 153-9-4-4		3.0	4.0	5.8	6.0	NL	NL	H
9	X069 153-9-4-5	(Tío Canela - 75 (I gene)/VAX6	4.3	6.5	6.5	5.5	4.0	NL	H
10	X069 153-20-2-1		5.3	5.3	6.5	5.0	3.0	NL	R
11	X069 153-20-2-3		3.8	5.5	6.0	6.0	3.8	6.0	H
12	X069 153-20-2-4		5.8	6.0	5.8	4.5	6.3	NL	H
13	X069 153-20-2-5		2.0	4.5	4.3	5.8	4.8	5.5	R
14	X069 156-16-2-3	(Tío Canela - 75 (i gene)/VAX6	7.0	7.8	8.3	7.3	NL	NL	S
15	X069 153-51-2-4		9.0	6.0	6.0	8.5	9.0	NL	R
16	X069 153-51-2-5		5.8	6.8	7.0	6.5	6.8	NL	R
17	X069 157-2-1-1		5.3	5.0	7.8	7.0	4.3	6.0	S
18	X069 157-2-1-2	(Tío Canela - 75 (i gene)/VAX6	4.8	4.5	5.5	3.0	3.5	4.3	S
19	X069 157-2-1-3		6.0	5.5	7.3	5.8	7.3	6.8	S
20	X069 157-2-1-4		6.5	6.5	7.3	7.8	6.5	6.8	S
21	X069 157-2-1-5		5.3	5.8	6.8	7.3	8.0	7.0	R
22	X069 157-2-3-3		5.8	6.0	7.8	7.5	6.5	7.0	S
23	X069 157-2-3-4		4.3	8.0	5.3	5.0	2.3	4.0	S
24	X069 157-2-3-5		6.0	5.3	3.0	6.3	9.0	6.8	S
25	X069 157-2-3-6		6.3	5.8	5.5	5.3	6.0	7.5	S
26	X069 157-3-4-1		8.0	8.3	5.8	6.0	5.0	8.8	H
27	X069 157-3-4-2		6.8	NL	8.3	9.0	8.3	8.8	R
28	X069 157-3-4-3		8.3	9.0	8.3	7.8	9.0	9.0	R
29	X069 157-3-4-6		7.8	7.3	NL	NL	NL	NL	S
30	X069 157-4-4-1		6.3	6.3	4.8	5.5	4.0	NL	H

31	X069 157-8-4-4	(Tío Canela - 75 (i gene)/VAX6	5.0	4.8	6.0	NL	NL	NL	R
32	X069 157-8-5-1	(Tío Canela - 75 (i gene)/VAX6	7.3	5.5	8.8	5.0	4.0	4.5	R
33	X069 157-8-5-2		5.3	5.8	8.0	4.5	4.0	4.5	R
34	X069 157-8-5-3		7.8	7.8	8.8	8.0	9.0	7.5	R
35	X069 157-8-5-6		3.5	5.3	7.5	5.0	3.8	8.3	R
36	X069 157-10-1-3		5.8	7.3	7.8	8.5	8.5	8.5	S
37	X069 157-10-3-2		6.8	8.0	6.0	5.0	NL	NL	S
38	X069 157-10-3-3		5.8	4.5	6.0	6.5	5.5	4.0	S
39	X069 157-10-3-4		6.5	4.8	6.0	6.0	7.3	4.5	S
40	X069 157-10-3-5		6.8	8.0	7.8	4.8	7.3	6.0	S
41	X069 157-10-4-2		5.5	6.3	5.0	6.5	6.5	5.8	S
42	X069 157-12-2-1		6.8	7.3	6.8	6.8	6.0	7.0	H
43	X069 157-12-5-1		5.8	7.3	5.0	5.5	3.5	4.0	R
44	X069 157-12-5-3		7.0	8.5	8.0	7.8	7.5	7.0	R
45	X069 157-13-3-1		6.3	6.5	6.5	4.0	5.0	6.0	S
46	X069 157-13-3-3		5.3	4.8	6.8	4.8	5.3	NL	H
47	X069 157-13-3-4		6.5	5.8	5.8	4.8	7.0	7.0	H
48	X069 157-13-3-5		6.3	6.5	4.5	5.8	NL	NL	R
49	X069 157-14-4-1		7.0	7.0	3.8	6.0	NL	NL	R
50	X069 157-14-4-2		8.8	8.3	8.5	8.0	6.8	6.5	R
51	X069 157-14-4-3		3.5	5.8	6.5	6.5	4.8	4.3	R
52	X069 157-14-4-5		5.8	5.8	5.0	4.5	3.8	4.0	R
53	X069 157-14-4-6		4.5	4.5	5.0	6.3	4.5	4.5	R
54	X069 157-15-1-3		5.5	5.8	5.3	5.8	5.0	5.8	R
55	X069 157-15-1-4		6.8	4.8	4.8	5.5	6.0	NL	R
56	X069 157-15-4-6		6.5	7.5	4.8	3.8	NL	NL	S
57	X069 157-28-2-1	(Tío Canela - 75 (i gene)/VAX6	5.3	7.0	7.3	6.0	5.3	5.5	H
58	Tío Canela-75		8.5	9.0	7.8	5.8	7.3	NL	R
59	VAX 6		5.8	4.3	4.5	4.5	NL	NL	S

H: Heterogocigotica

R: Resistente

S: Susceptible

NL: Sin lectura

bgm-1: Evaluación de familias F4 con el SCAR

SR2