

**Desarrollo de líneas de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) adaptadas a las condiciones ecológicas de Haití con resistencia a enfermedades e insectos**

Por

Gasner Démosthène

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Agronomía

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ  
2007

Aprobado por:

\_\_\_\_\_  
James S. Beaver, Ph.D.  
Presidente, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Feiko H. Ferwerda, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Carlos Rosario, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Miguel A. Muñoz, Ph.D.  
Director del Departamento

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Consuelo Estévez de Jensen, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

\_\_\_\_\_  
Fecha

## Resumen

La liberación de variedades de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) con resistencia a enfermedades y plagas podría reducir pérdidas en rendimiento en Haití. Se utilizó selección asistida por marcadores moleculares y métodos convencionales de fitomejoramiento para desarrollar líneas con resistencia al Mosaico Dorado Amarillo (BGYMV), Mosaico Común Necrótico (BCMNV), oídium causado por [*Erysiphe polygoni* (DC ex Merat)] y gorgojos [*Zabrotes subfasciatus* (Boheman)]. Se utilizó fuentes de resistencia de Haití, Puerto Rico, el Centro Internacional de Agricultura Tropical, Zamorano y la Universidad de Wisconsin como progenitores. Plantas F<sub>2</sub> de habichuela fueron evaluadas en el invernadero para resistencia a infección natural de oídium. Se evaluaron líneas F<sub>2:3</sub> y F<sub>3:4</sub> en el campo en Salagnac, Haití para adaptación y reacción a infección natural de las enfermedades. Se utilizó el marcador SCAR SR2 para detectar líneas F<sub>2:3</sub> y F<sub>3:4</sub> con el gen *bgm* para resistencia al BGYMV. Las mismas plantas fueron inoculadas con la cepa NL3 de BCMNV para identificar plantas con resistencia al virus. Se identificaron seis líneas de tipo “rojo moteado” que combinaron resistencia al BGYMV, BCMNV y oídium sin embargo apenas dos de estas líneas produjeron rendimientos en el campo similares al testigo ‘Salagnac 90A’. Se utilizó el marcador SCAR SR2 y SDS PAGE para identificar líneas de tipo “rojo moteado”, “blanco” y “rojo” con resistencia al BGYMV y gorgojos. Se identificaron 12 plantas F<sub>2</sub> que fueron homocigóticas para el gen *bgm* para resistencia al BGYMV y Arcelina 1 que confiere resistencia a los gorgojos. Líneas F<sub>2:3</sub> derivadas de plantas F<sub>2</sub> heterocigóticas para BGYMV o Arcelina serán avanzadas para evaluaciones adicionales. Las líneas con

resistencia múltiple serán utilizadas por los programas de mejoramiento de Haití y Puerto Rico como líneas mejoradas y progenitores.

## Abstract

The release of bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) with resistance to diseases and pests could reduce yield losses in Haiti. Marker-assisted selection and conventional methods of bean improvement were used to develop lines with resistance to Bean Golden Yellow Mosaic Virus (BGYMV), Bean Common Mosaic Necrotic Virus (BCMNV), powdery mildew caused by [*Erysiphe polygoni* (DC ex- Merat)] and the Mexican bean weevil [*Zabrotes subfasciatus* (Boheman)]. Sources of resistance from Haiti, Puerto Rico, the International Center of Tropical Agriculture, Zamorano and the University of Wisconsin were used as progenitors. F<sub>2</sub> bean plants were evaluated in the greenhouse for resistance to natural infection of powdery mildew. F<sub>2:3</sub> and F<sub>3:4</sub> lines were evaluated in the field in Salagnac, Haiti for adaptation and reaction to natural infection of diseases. We used the SCAR marker SR2 to detect F<sub>2:3</sub> and F<sub>3:4</sub> lines with the *bgm* gene for resistance to BGYMV. The same plants were inoculated with BCMNV NL3 strain to identify plants with resistance to the virus. We identified six red mottled lines with BGYMV, BCMNV and powdery mildew resistance. Only two of these lines, however, produced seed yields similar to 'Salagnac 90A'. The SCAR marker SR2 and SDS PAGE were used to identify red mottled, white and red lines with resistance to the BGYMV and the Mexican bean weevil. We identified 12 F<sub>2</sub> plants that were homozygous for the *bgm* gene for BGYMV resistance and Arcelin 1 that confers resistance to the weevils. F<sub>2:3</sub> lines derived from F<sub>2</sub> plants heterozygous for BGYMV or Arcelin will be advanced for additional evaluations. Lines with multiple resistance will be used by the bean improvement programs of Haiti and Puerto Rico as improved breeding and parental lines in crosses.

## **Dedicatoria**

- ❖ A mi preciosa esposa Françoise Antonie Moïse DÉMOSTHÈNE por siempre brindarme su amor y su confianza incondicional en mis decisiones aunque se encuentra lejos de mí.
- ❖ A mi maravillosa hija Ann Ganaëlle DÉMOSTHÈNE por ser el motivo de mi existencia.
- ❖ A mis padres Gaston DÉMOSTHÈNE y Facilia JEAN-BAPTISTE, quiero agradecerles con todo mi corazón por su apoyo de siempre y tanto sacrificio de su parte para lograr mis metas en la vida.
- ❖ A mis hermanos Alex, Kelly; mi hermana Huberta y mi cuñada Julène Moïse por estar siempre dispuestos a brindarme su colaboración cuando es necesaria.
- ❖ A mis compañeros y amigos haitianos: Ronald Dorcinvil y Raphaël W. Colbert por su amistad y su apoyo.
- ❖ Finalmente, dedico este trabajo a todos los agricultores e investigadores de mi país.

## **Agradecimientos**

- ❖ A Dios, en primer lugar, por conservarme la salud durante todos los días de mi vida y durante los años de mis estudios en Puerto Rico en particular.
- ❖ Al Dr. James S. Beaver por haberme dado la oportunidad de realizar estudios superiores sin olvidar sus consejos pertinentes en esta investigación.
- ❖ Al Ministerio de Agricultura, Recursos Naturales y Desarrollo Rural (MARNDR) de Haití en especial a Agr. Emmanuel Prophète por dirigirme a lograr mis sueños a través de sus gestiones y su apoyo.
- ❖ Al Dr. Carlos Rosario por haber aceptado ser parte de mi comité graduado y por dedicar tiempo en la revisión de este trabajo.
- ❖ Al Dr. Feiko H. Ferwerda por su orientación y su ayuda en los trabajos de laboratorio de marcadores moleculares.
- ❖ A la profesora Myrna Alameda por su colaboración y su ayuda en la realización de las inoculaciones en el invernadero.
- ❖ Al Dr. Melvin Pagan por permitirme usar los materiales de su laboratorio durante la última fase de esta investigación.
- ❖ A todos mis profesores del Recinto Universitario de Mayagüez por contribuir al enriquecimiento de mis conocimientos.
- ❖ Al Dr. Guillermo Ortiz Colón por su colaboración y su ayuda en los trabajos de laboratorio para la identificación de la proteína Arcelina.

- ❖ A mis compañeros de clase Axel Ramirez, Sonia Carlo y Ronald Dorcinvil por su ayuda en los trabajos de campo, en el invernadero y en el laboratorio.
- ❖ A todos los empleados de la Estación Experimental Agrícola de Isabela.
- ❖ Al personal del departamento de Agronomía y Suelos.

## Tabla de Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Tabla de Contenido</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Cuadros</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de Anexos</b> .....	<b>xii</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Revisión de Literatura</b> .....	<b>4</b>
Virus del Mosaico Dorado Amarillo.....	4
Virus del Mosaico Común .....	7
Oidium .....	10
Insectos de granos almacenados .....	14
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>17</b>
Análisis estadístico.....	21
<b>Resultados y Discusiones</b> .....	<b>22</b>
Evaluación de líneas de fríjol rojo moteado F <sub>2</sub> en invernadero para Oidium.....	22
Comportamiento de líneas de fríjol rojo moteado F <sub>3</sub> y F <sub>4</sub> sembradas en Salagnac, Haití en junio de 2006. ....	24
Inoculación con el NL3 del Mosaico Común .....	31
Presencia del marcador SR2 para la resistencia al Mosaico Dorado Amarillo.....	36
Evaluación de plantas F <sub>2</sub> para genes de resistencia al BGYMV y gorgojos .....	39

<b>Conclusión.....</b>	<b>45</b>
<b>Literatura Citada .....</b>	<b>47</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>55</b>

## Lista de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Evaluación de plantas F <sub>2</sub> de habichuela para reacción al oidium en el invernadero en Mayagüez, Puerto Rico. ....	22
<b>Cuadro 2.</b> Comparación de los patrones de segregación para reacción al oidium de dos cruces de habichuela evaluadas en el invernadero en Mayagüez, Puerto Rico. ....	23
<b>Cuadro 3.</b> Reacción de los padres al oidium evaluados en el invernadero en Mayagüez, Puerto Rico.....	24
<b>Cuadro 4.</b> Comportamiento de líneas de fríjol rojo moteado F <sub>2:3</sub> sembradas en Salagnac, Haití en junio de 2006.....	26
<b>Cuadro 5.</b> Comportamiento de líneas de fríjol rojo moteado F <sub>3:4</sub> sembradas en Salagnac, Haití en junio de 2006.....	28
<b>Cuadro 6.</b> Plantas con el gen <i>bc3</i> para resistencia al BCMV y BCMNV.....	31
<b>Cuadro 7.</b> Líneas que mostraron una reacción necrótica cuando fueron inoculadas con BCMNV.....	32
<b>Cuadro 8.</b> Líneas que variaron en su reacción al BCMNV entre la primera y la segunda evaluación.....	34
<b>Cuadro 9.</b> Líneas F <sub>4</sub> que combinan resistencia al BGYMV, BCMV y BCMNV.....	37
<b>Cuadro 10.</b> Líneas F <sub>4</sub> con resistencia al BCMNV y BCMV pero susceptibles al BGYMV.....	38
<b>Cuadro 11.</b> Líneas homocigotos para el marcador de <i>bgm</i> .....	40
<b>Cuadro 12.</b> Líneas homocigotos para la presencia de Arcelina 1.....	42
<b>Cuadro 13.</b> Líneas rojo F <sub>2:3</sub> y blanca F <sub>3:4</sub> homocigotos para la presencia de Arcelina 1 y el marcador SR2 de <i>bgm</i> .....	44

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Reacciones al BCMV y BCMNV .....	36
<b>Figura 2.</b> Presencia del marcador SR2 para la resistencia al Mosaico Dorado Amarillo	38
<b>Figura 3.</b> Plantas heterocigotos para el marcador SR2 .....	39
<b>Figura 4.</b> Plantas homocigotos susceptibles y resistentes para el marcador SR2 .....	41
<b>Figura 5.</b> Líneas homocigotos y heterocigotos para la presencia de Arcelina 1 .....	43

## Lista de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Evaluación de líneas de frijol rojo moteado F <sub>2</sub> en invernadero para Oidium ...	56
<b>Anexo 2.</b> Líneas heterocigotos para el marcador de <i>bgm</i> .....	61
<b>Anexo 3.</b> Líneas heterocigotos para la presencia de Arcelina 1 .....	62
<b>Anexo 4.</b> Líneas prometedoras para la presencia de Arcelina 1 y el marcador de <i>bgm</i> ...	63
<b>Anexo 5.</b> Protocolo de Extracción de ADN .....	64
<b>Anexo 6.</b> Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungos.....	66
<b>Anexo 7.</b> Escala general de evaluación para enfermedades virales.....	67

## Introducción

La habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los alimentos básicos de las Américas y África. Su consumo diario representa un aporte proteico (15-35%) y calorífico (3.40 calorías/g.) importante a la dieta del pueblo latinoamericano, especialmente a la gran mayoría de la población de menores recursos económicos (Morales, 2000). Una taza de habichuelas hervidas contribuye a las necesidades diarias de una persona adulta en las siguientes proporciones: 40% de vitamina C, 18% de vitamina A, 12% de vitaminas B1 y B2, 26% de ácido fólico, 12% de calcio, 9% de fósforo y 10% de hierro. Además, la fibra dietética contenida principalmente en sus vainas verdes facilita la digestión y evita los estreñimientos (Grusak, 1996).

En el año 2002 se sembraron más de 24 millones de hectáreas de habichuela a nivel mundial, las cuales produjeron un total de 17.9 millones de toneladas métricas de semilla con un rendimiento promedio de 724 kg/ha. (FAO-STAT, 2003 citado de Osorno, 2003). En la región del Caribe, la habichuela es producida en gran escala en Cuba (106,200 TM), Haití (58,420 TM), República Dominicana (24,270 TM) y Puerto Rico (570 TM), (FAO-STAT, 2005).

La habichuela es uno de los cultivos más importantes en Haití donde ocupa la cuarta posición en superficie sembrada después del maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.) y arroz (*Oryza sativa* L.). Sin embargo, la habichuela es la primera fuente de proteína vegetal de la población con un consumo per capita estimado en 17 kg/año (Morales, 2000).

El área cultivada de habichuela en Haití es alrededor de 90,000 hectáreas, distribuida en los nueve (9) departamentos geopolíticos del país. Las habichuelas se

siembran desde el nivel del mar hasta los 1,400 metros de altitud (Morales, 2000). Se siembran cuatro (4) colores principales de habichuela en el país:

- Habichuela roja moteada domina en el Norte, Oeste y Sureste con 16,128 y 28,460 ha, respectivamente
- Habichuela negra es más importante en el Sur y el Departamento de la Grande Anse con áreas de siembra de 23,536 ha
- Habichuela blanca es la favorita en el Noroeste con un área de 423 ha
- Habichuela amarilla es popular en el Valle del Artibonite y en el Centro con 21,554 ha

El área de habichuela sembrada en Haití se ha mantenido estable pero el rendimiento ha sufrido una reducción durante los últimos diez años de 1,013 kg/ha a menos de 600 kg/ha. Como consecuencia, era necesario importar habichuelas. (Morales, 1994). Pero en el año de 2003, el rendimiento promedio de grano seco en Haití fue de 696 kg/ha. (Beaver y Rosas, 2003). Los principales factores limitantes en Haití en la zona de producción de habichuela de baja altitud son la sequía seguida por el Virus del Mosaico Dorado Amarillo y el Virus del Mosaico Común Necrótico. En las montañas, se presentan otros problemas bióticos y abióticos. Humedades relativas altas en las montañas favorecen el desarrollo de enfermedades fungosas como antracnosis causada por [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) Scribner], roya causada por [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger] y oidium causado por [*Erysiphe polygoni* (DC ex Merat)].

Los sistemas de manejo de los cultivos son inadecuados. Frecuentemente, la semilla es de mala calidad y el control de malezas es inefectivo. Los bajos rendimientos

están también relacionados a la baja fertilidad de los suelos, especialmente debida a la erosión del suelo en las montañas, la acidez del suelo en ciertas zonas como Salagnac y el uso limitado de fertilizantes. Después de la cosecha, pérdidas son causadas por los gorgojos [*Zabrotes subfasciatus* (Boheman)] que atacan las semillas almacenadas y destruyen casi totalmente la habichuela conservada. Por lo tanto, los agricultores tienen que vender inmediatamente su cosecha cuando los precios son los más bajos.

Debida a esta situación catastrófica de la agricultura haitiana, nuestro trabajo tiene como objetivo principal la selección de líneas de habichuela adaptadas a las condiciones climáticas de Haití con mayores niveles de resistencia a enfermedades e insectos. Los objetivos específicos son:

1. Utilizar marcadores moleculares y métodos convencionales de fitomejoramiento para identificar líneas de habichuela que combinan resistencia al Virus del Mosaico Dorado Amarillo, al Virus del Mosaico Común Necrótico y al oidium.
2. Identificar líneas de habichuela que combinan resistencia al Virus del Mosaico Dorado Amarillo, al Virus del Mosaico Común y a los gorgojos.

## Revisión de Literatura

### Virus del Mosaico Dorado Amarillo

El Mosaico Dorado Amarillo de la habichuela (BGYMV) es una de las enfermedades más importantes del cultivo en las áreas tropicales de América Central y el Caribe. El BGYMV amenaza la producción de habichuela en la República Dominicana, Haití, Puerto Rico, Jamaica y Cuba. Lo transmite la mosca blanca [*Bemisia tabaci* (Gennadius)], (Morales, 1994). Este virus es clasificado como una especie del género *Begomovirus* (sigla por Bean golden mosaic virus). El genoma bipartita de los *begomovirus* está compuesta de dos componentes de DNA, denominados DNA-A y DNA-B, los cuales codifican por funciones virales esenciales y necesarias para establecer infección sistémica (Morales, 2000).

Vakili (1973) y Káiser y Meléndez (1973) fueron los primeros en asociar la presencia de moscas blancas con la enfermedad del BGYMV en el sur de Haití. Esta zona en Haití aún sufre de la mayor presión de BGYMV. Pierre, en 1975, observó que la enfermedad en Haití era más prevalente a bajas altitudes que en zonas de producción más altas. Igualmente, anotó que la incidencia del BGYMV era menor en los meses más frescos y secos del año (noviembre a marzo). En 1978, Balthazar identificó BGYMV como una de las enfermedades más importantes de la habichuela en el país. Turenne (1982) realizó un trabajo sobre el control químico de la mosca blanca en habichuela. Lecorps (1983) concluyó que la severidad del BGYMV en las llanuras secas con riego, es determinada por la dinámica de poblaciones de la mosca blanca a partir del inicio de la época seca y determinó que a partir del 15 de noviembre, las poblaciones de mosca blanca comienzan a crecer empezando de causar daño en las siembras de habichuela

realizadas después del 15 de diciembre. Las áreas más afectadas en su investigación fueron el Valle de Cul-de-Sac y la región fronteriza con la República Dominicana.

Actualmente, los departamentos de Artibonite, Noroeste y Grande Anse son los más afectados por el BGYMV. En Savane Zombi, se ha observado el BGYMV a 1400 metros. El BGYMV tiene en Haití el potencial de afectar unos 50,000 ha que corresponde a la superficie sembrada en llanuras, valles, mesas y colinas con una altura menos de 600 metros sobre el nivel del mar. Disminución en la área de siembra de tomate (*Lycopersicum esculentum*) en el Valle de Cul-de-Sac y reducciones en las poblaciones de la mosca blanca han disminuido la incidencia de BGYMV en este valle (Morales, 2000).

Hace 20 años, no había variedades de habichuela con resistencia a esta enfermedad. El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en colaboración con los investigadores del Instituto de Ciencias y Tecnología (ICTA) evaluaron en Guatemala más de 7,000 accesiones del banco de germoplasma para su reacción al BGYMV (Morales, 2000). “Garrapato”, una línea criolla de Méjico, fue una de las mejores fuentes de resistencia al mosaico dorado amarillo. Blair y Beaver (1993) y Velez et al. (1998) realizaron investigaciones en Puerto Rico y Florida que demostraron que la resistencia derivada de Garrapato es controlada por un gen recesivo, al cual se le identificó como *bgm*.

La colaboración entre investigadores de la Universidad de Puerto Rico y el Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-ARS) resultó en la identificación de un marcador molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ligado con *bgm* (Urrea et al., 1996).

Posteriormente, los investigadores en CIAT convirtieron este marcador RAPD en el marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) SR2570/530 que ha permitido la selección indirecta para este gen de resistencia (Beebe et al., 1999). Hoy en día, el gen *bgm* y su marcador molecular son utilizados ampliamente por programas públicos y privados de mejoramiento de habichuela.

La variedad ‘Porrillo Sintético’ tiene vigor considerable que permite a menudo a las plantas de escaparse a la infección particularmente en los casos donde el virus se inocula después de las primeras 2-3 semanas después de la germinación de las plantas (Morales y Niessen, 1988). Así, una segunda recombinación interracial favorable de genes Andinos y Mesoamericanos había ocurrido, para producir un genotipo rojo de la habichuela común poseyendo resistencia a BGYMV. El gen de resistencia a BGYMV en DOR 303 fue identificado más adelante como *bgm-2* (Velez et al., 1998).

Adames-Mora et al. (1996) desarrollaron una técnica usando moscas blancas para la selección en el invernadero de habichuelas resistentes a BGYMV. Ellos encontraron que algunas líneas, tales como DOR 364 con resistencia cuantitativa, retrasaron la expresión de síntomas hasta 5 días. Las hojas de las líneas homocigotas para los genes *bgm* o *bgm-2* de resistencia no expresan clorosis cuando fueron inoculadas con BGYMV (Velez et al. 1998) mientras que las líneas con el gene *Bgp-1* (Acevedo-Román et al., 2004) no desarrollan vainas deformadas en la presencia de BGYMV. Osorno et al. (2003) encontraron que dos genes del *Phaseolus coccineus* L. que confieren resistencia a BGYMV: un gene recesivo (*bgm-3*) proporciona resistencia a la clorosis en las hojas y un gene dominante (*Bgp-2*) confiere resistencia a la deformación de la vaina. La mayoría de las variedades de habichuela liberadas en Centroamérica en los últimos años tienen por lo

menos un gene de resistencia al BGYMV. Con la excepción de la liberación de ‘Morales’ en Puerto Rico (Beaver y Miklas, 1999), las variedades de habichuela cultivadas en el Caribe no tienen resistencia al BGYMV.

### **Virus del Mosaico Común**

El Virus del Mosaico Común de la habichuela (BCMV) es el patógeno viral más importante de este cultivo, debido principalmente a que puede ser transmitido en el campo por la semilla y por varias especies de áfidos como *Aphis gossypii* Glover y *Aphis medicaginis* Koch. Los síntomas causados en habichuela dependen de la variedad, de la cepa del virus y de las condiciones ambientales. Las hojas de las plantas infectadas generalmente se enrollan hacia el envés, lo cual les da una apariencia ahusada. Este síntoma se observa en las variedades susceptibles al BCMV (Cardona et al, 1982).

El síntoma conocido como “raíz negra” causado por el Virus del Mosaico Común Necrótico de la habichuela (BCMNV) que se presenta como una necrosis sistémica descendente desde los trifolios más jóvenes y se extiende al resto del sistema vascular de la planta, incluyendo las vainas, es el resultado de la reacción de hipersensibilidad de las plantas que poseen un gen dominante llamado gen de necrosis (*I*) al BCMNV conocidas como necróticas. Estas variedades son resistentes al mosaico común porque no presentan síntomas de esta enfermedad. Los síntomas inducidos por las cepas del BCMV aparecen como ampollas sobre la superficie de la hoja o son enmascarados, lo que hace imposible su reconocimiento (Cardona et al, 1982). El BCMV y BCMNV pueden causar pérdidas de hasta 60 por ciento en las cosechas de la habichuela verde y la habichuela seca (Suszkiw, 2003).

El BCMNV ha llegado recientemente al Caribe y empezó a causar pérdidas significativas en los campos de habichuela de la República Dominicana y Haití (Segura et al., 2002). Este virus es portado por la semilla que permite una rápida diseminación de la enfermedad. Colaboración con investigadores del USDA-ARS e Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), resultó en la identificación de la cepa específica del virus (NL-8). Esta información permitió a los fitomejoradores identificar la combinación de genes de resistencia más efectiva para controlar el virus. La mayoría de las variedades de habichuela sembradas en Centro América y el Caribe tienen solamente el gen '*I*' para resistencia al mosaico común (Beaver et al., 2003) y, como consecuencia, son susceptibles al BCMNV.

Sin la protección de otros genes de resistencia al mosaico común, las líneas de habichuela con el gen *I* producen una reacción de 'raíz negra' ante la presencia de BCMNV. El Dr. James Kelly, enfrentando un problema semejante en el estado de Michigan de los Estados Unidos, desarrolló la variedad 'Raven' que combina los genes de resistencia *I* y '*bc-3*' (Kelly et al., 1994). Esta combinación de genes provee resistencia a todas las cepas conocidas de BCMV y BCMNV. En Puerto Rico se cruzó la variedad Raven con fuentes de resistencia al BGYMV. Se seleccionaron líneas con el gen *bgm* para resistencia al Mosaico Dorado Amarillo y el gen *I* para resistencia al Mosaico Común Necrótico utilizando los SCAR SR2570/530 y SW13, respectivamente (Beebe et al., 1999; Melotto et al., 1996).

Sin embargo, la identificación de líneas con el gen recesivo *bc-3* requiere evaluaciones con una cepa de BCMNV tales como NL-3. Durante los últimos dos años, la Dra. Graciela Godoy- Lutz, fitopatóloga del IDIAF realizó evaluaciones en

laboratorios de la Universidad de Nebraska, de las líneas de las cruces con Raven utilizando los marcadores SCAR e inoculaciones con el BCMNV. Durante los últimos años, se evaluaron estas líneas en la República Dominicana, Honduras y Puerto Rico para su adaptación y reacción a otras enfermedades. Actualmente, hay líneas rojas, negras y blancas disponibles para validación en campos de los agricultores que combinan la resistencia al BCMNV y al BGYMV (Beaver y Rosas, 2005).

La selección asistida por marcadores (MAS por sus siglas en inglés) es una herramienta de fitomejoramiento que rápidamente identifica las plantas resistentes confirmando la presencia o ausencia de genes específicos de resistencia al BGYMV y BCMNV. De otro modo, los investigadores de habichuela tendrán que observar los síntomas de la enfermedad inducidos en invernadero (Suszkiw, 2003). El Laboratorio de Investigaciones de Vegetales mantenido por ARS en Beltsville, Maryland en colaboración con investigadores de las Universidad de Nebraska, Michigan State University y North Dakota State University han desarrollado líneas blancas y pintos con resistentes a todas razas conocidas del patógeno [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger], el cual causa la roya (Pastor-Corrales et al., 2001). Estas líneas tienen dos genes *I* y *bc-3* que las protejan contra el BCMV y el BCMNV (Eilstein, 2004). Estas enfermedades reducen el rendimiento y calidad de la cosecha y aumentan los costos de producción (Mc Ginnis, 2006).

Para desarrollar las líneas resistentes, los científicos han utilizado el método de la pirámide de genes, en que más de un gen deseable se añade a la planta. En este caso, cuatro genes que proveen resistencia a la roya y dos genes que proveen resistencia al BCMV y BCMNV fueron añadidos por el uso de fitomejoramiento convencional con la

selección asistida por marcadores moleculares. Hay muchas razas de los patógenos que causan la roya y las enfermedades virales. Estas razas podrían variar de un lugar y año a otro. La agregación de cuatro genes para resistencia a la roya y dos genes para resistencia a los BCMV y BCMNV a las líneas BelMiNeb y BelDakMi aumenta la probabilidad de que estas líneas de habichuela mantengan su resistencia a la roya y a las dos enfermedades virales (Eilstein, 2004).

### **Oidium**

La enfermedad causada por el hongo [*Erysiphe polygoni* (DC ex Merat)] se conoce en América Latina como oidium, oídio y cinza (Cardona, 1982). Tiene una distribución mundial. Los síntomas se inician en el haz de la hoja como manchas oscuras y moteadas que después se llenan de un micelio blanco dándole una apariencia polvorosa. De las hojas, el micelio se esparce a las vainas, donde causa una decoloración generalmente púrpura, casi redonda, con un centro grisáceo. La enfermedad puede deformar las vainas. Los síntomas en los tallos son, por lo general, decoloraciones rojizas o purpúreas (Beaver, 2006).

El micelio puede cubrir toda la planta. La infección en plantas jóvenes puede resultar en defoliación y en daños severos. Al hongo lo puede portar externamente la semilla y el viento disemina las esporas. Esta enfermedad prevalece en muchas condiciones ambientales pero generalmente es más grave en sequías y con temperaturas moderadas. Los métodos de control incluye el uso de variedades resistentes (Beaver, 2006). Sin embargo, la existencia de diferentes razas fisiológicas o patotipos, puede afectar la utilización de ciertas fuentes de resistencia (Cardona, 1982).

Los oídios son un grupo de hongos muy homogéneos. De hecho, todos pertenecen a una sola familia. Se incluyen en la clase Ascomycetes, orden Erysiphales, familia Erysiphaceae. Los caracteres utilizados en taxonomía son los correspondientes al teleomorfo, como el número de ascas y de ascosporas y la forma de los fulcros (Spencer, 1978).

El problema es que los cleistotecios no siempre son fáciles de encontrar, razón por la cual hasta hace pocos años cuando no se observaban cleistotecios, se describía el agente causal con el nombre de *Oidium* y el nombre del huésped, puesto que se pensaba que no era posible clasificar al *oidio* atendiendo a las características asexuales. Sin embargo se emplean las características del anamorfo como son: tipo de micelio (externo, interno o ambos), conidióforos, (formadores en cadena o únicos, contenidos en vacuolas), apresorios (tipo y disposición), (Spencer, 1978)

En Haití, el oidium causa daños muy significantes sobre todo en las siembras de octubre y febrero. Comenzando en 1976 investigadores de Guadalupe y Montpellier, Francia, en colaboración con el equipo agronómico del Centro Salagnac de Haití se interesó por la investigación sobre la resistencia varietal para mejorar el rendimiento de la habichuela. En este programa, la resistencia al oidio ocupó un papel importante pero no se descuidaron las otras enfermedades como la roya causada por [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger] y antracnosis causada por [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) Scribner] (Laraque, 1986).

Se intentó evaluar la resistencia al oidio en el invernadero y al campo de algunas variedades que formaron parte de esta colección. Se aislaron algunas líneas puras a partir de plantas situadas al campo para su buen comportamiento agronómico. Así, 350 líneas

fueron seleccionadas en las siembras de los campesinos de Salagnac y enviadas a Guadalupe para evaluarse en invernadero. Allí, la prueba fue estricta, el oidio siendo favorecido por la ausencia de lluvia y por el filtrado de los rayos ultravioletados por el vidrio del invernadero. Se seleccionó solamente nueve líneas resistentes (S92, S120, S123, S126, S128, S131, S81, S68 y S86) de las 350 líneas evaluadas en el invernadero (Laraque, 1986).

En 1979, se evaluaron en el campo en Haití cinco (S131, S86, S92, S120 y S81) de las nueve líneas resistentes. Los resultados obtenidos tanto al campo como en invernadero identificaron las líneas S120 y S131 con los más altos niveles de resistencia al oidio. S86 tuvo un alto nivel de resistencia a la fase plántula pero era susceptible durante la floración (Laraque, 1986). Se ha observado una interacción entre *Erysiphe polygoni* y el Southern Bean Mosaic Virus; se desarrollaron menos colonias de oidio en las plantas con virus que las sin virus. En las hojas infestadas por el virus se observó una reacción de hipersensibilidad que no se nota en las hojas libres del virus. (Maxfield, 1968).

Bett y Michaels (1995) realizaron una investigación de la herencia de resistencia al oidium en poblaciones F<sub>2</sub> de habichuela usando tres cruces: 'W-BB-II-56 / XR-235-1-1' (susceptible / resistente); 'W-BB-11 / OAC Gryphon' (susceptible / resistente) y 'W-BB-II-56 / OAC Gryphon' (susceptible / resistente). Estas líneas de germoplasma se seleccionaban antes para resistencia a la bacteriosis común, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, donde W-BB-II-56, W-BB-11 y XR-235-1-1 se originaron en Puerto Rico mientras que 'OAC Gryphon' vino de Ontario, Canada.

La infección polvorienta era natural y los resultados demostraron que la progenie de W-BB-II-56 / XR-235-1-1 segregó en un ratio de 6:12 de resistente:susceptible. La progenie de W-BB-11 / OAC Gryphon segregó en un ratio de 19:9 mientras que la progenie de W-BB-II-56 / OAC Gryphon segregó en un ratio de 4:14. Los investigadores deducieron que la resistencia era controlada por dos genes donde un gen de resistencia es dominante y el otro gen es recesivo, y que los dos genes deben estar presentes para la expresión de la resistencia (Bett y Michaels, 1995).

Rezende et al. (1999) estudiaron la herencia de la resistencia al oidium usando poblaciones de habichuela derivadas de las cruces 'Jalo x ESAL 686' y 'ESAL 550 x ESAL 686' donde ESAL 686 es un padre resistente y los padres susceptibles fueron Jalo y ESAL 550. Las plantas  $F_2$ , junto con los padres, fueron inoculadas y evaluadas por medio de una escala de 1 (planta sin síntomas) a 9 (planta totalmente infectada). Plantas  $F_2$  fueron cosechadas individualmente para producir 144 familias  $F_{2,3}$  de ESAL 550 x ESAL 686 y 121 familias  $F_{2,3}$  de Jalo x ESAL 686. Estas familias fueron también evaluadas con la misma escala de valores que la generación  $F_2$ . La segregación observada en las plantas  $F_2$  y las familias  $F_{2,3}$  indicó que dos genes confieren resistencia y que la planta será resistente solamente si posee los alelos dominantes de ambos genes implicados. Esta segregación contrasta con la divulgada por Dundas (1936) que encontró resistencia al oidium controlado por un gen, resistencia debida a un alelo dominante. Por otra parte, Bett y Michaels (1995) también reportaron la presencia de dos genes de resistencia al oidium. En un caso la resistencia era dominante y, en el otro, recesiva. La divergencia en estos resultados se puede atribuir a las diferencias en la constitución genética de los padres utilizados en los estudios genéticos o diferencias en los patrones de

virulencia de los aislamientos del patógeno. Además, la evaluación de la resistencia al patógeno a través de una escala de valores puede variar dependiendo de los evaluadores (Rezende et al, 1999).

### **Insectos de granos almacenados**

El gorgojo mexicano de la habichuela (*Zabrotes subfasciatus*) es la principal plaga de la habichuela almacenada en las regiones cálidas y tropicales de América Latina. Las hembras son pequeñas, de color café oscuro y se caracterizan por tener cuatro manchas de color crema en los élitros; el macho es más pequeño y su color tiene tonos de gris a café. Las hembras adhieren firmemente los huevos a la testa del grano; ésta es una diferencia muy importante con [*Acanthoscelides obtectus* (Say)], el cual nunca adhiere sus huevos a la semilla. Al eclosionar la larvita, ésta atraviesa el integumento y se desarrolla en el interior del grano. A diferencia del *Acanthoscelides*, el *Zabrotes* no ataca el cultivo en el campo (Cardona et al, 1982).

Estos insectos se les conocen también como brúquidos. Los adultos miden 0.25 cm de largo. Se caracterizan, además, porque los elitros no cubren totalmente el abdomen. Las hembras ponen sus huevos en las vainas ya maduras en el campo. Estas ovipositan encima de las grietas o heridas de las vainas, de manera que cuando el grano se almacena ya viene infestado. Las larvas penetran en la semilla, de la cual se alimentan hasta la etapa de pupa. El adulto corta y empuja el tejido al salir de la semilla. En el almacén se repite el ciclo de apareamiento y oviposición, con lo que se mantiene así una infestación constante (Beaver, 2006).

El descubrimiento de los genes de *Arcelina* despertaron interés científico cuando los investigadores teorizaron que esos genes pudieran jugar un papel en la resistencia de

algunas variedades de habichuela al *Zabrotes subfasciatus*. Las proteínas en este gen parecen haber desarrollado la capacidad de desalentar vertebrados e invertebrados de la alimentación en la semilla madura de la habichuela. En particular, ciertos alelos de arcelina son tóxicos a los gorgojos mexicanos de habichuela y reducirán o prevendrán la depredación por estos insectos de semilla (Myers et al, 2001). Se han identificado siete genes de Arcelina relacionados entre sí, todos en las variedades *Phaseolus vulgaris* de México (Acosta-Gallegos et al., 1998). El primero, llamado Arcelina1 (Arc 1), fue encontrado en la variedad criolla de habichuela que fue recogida en los años sesenta, cerca de la población de Arcelia (de ahí el nombre “Arcelina”), en el sudeste del estado de Guerrero, México. El Arcelina5 (Arc 5) proviene de otra habichuela mexicana recogida cerca de la población de Jomulco, Nayarit (Mc Gown, 2003).

En 1999, un equipo investigador belga insertó Arc 5 en la habichuela tépari [*Phaseolus acutifolius* (A.Gray)] y en *Arabidopsis*. Las plantas transgénicas produjeron altos niveles de proteína Arc 5, insinuando que el promotor continúa activo cuando se transfiere a otras especies (McGown, 2003). Arc 1 se ha demostrado para ser muy eficaz contra *Zabrotes subfasciatus* pero no *Acanthoscelides obtectus*. Las accesiones silvestres de habichuela con Arc 4 confieren resistencia a ambas especies del brúquido (Fory et al., 1996). Los investigadores en CIAT desarrollaron las líneas RAZ que poseen el alelo Arc 1 (Cardona et al., 1992). Misangu utilizó las líneas de RAZ para incorporar Arc 1 en varias de las líneas avanzadas del programa de mejoramiento de habichuela de la Universidad de Agricultura de Sokoine (Myers et al, 2001).

La actividad insecticida de la variante del Arc 5 que está presente en la accesión altamente resistente G 02771 de habichuela fue investigada. No se podía establecer

ninguna correlación entre la presencia del Arc 5 y los efectos insecticidas observados en semillas de G 02771. La presencia de las proteínas del Arc 5, aunque a niveles elevados, no era suficiente para alcanzar resistencia adecuada contra *Zabrotes subfasciatus*. Sin embargo, como la resistencia se liga claramente a la presencia del Arc 1 o Arc 5, estas proteínas siguen siendo marcadores útiles en programa de mejoramiento que tiene como objetivo la transferencia de altos niveles de resistencia a *Zabrotes subfasciatus* en variedades de habichuela (Goossens et al, 2000).

Osborn et al. (1986) detectaron la presencia del Arc 5 mediante SDS-PAGE de una dimensión usando el método de Laemmli (1970) y determinaron la relación genética entre Arc 5 y las otras proteínas arcelina demostrando que Arc 5 era alelico a Arc 1, Arc 2, Arc 3 y Arc 4. Kornegay et al. (1993) confirmaron que la expresión de arcelina es controlada por un solo gene y su presencia es dominante. Arc 5 tiene también el mismo modo de herencia que los otros arcelina. Así, Arc 5 y Arc 1 están ligados por alelos del mismo gene y son codominantes.

### **Electroforesis**

La Electroforesis del Gel de PoliAcrilamida del Sulfato Dodecyl de Sodio (SDS-PAGE) es usada para separar las proteínas según su tamaño. El SDS es un detergente aniónico que desnatura las proteínas y confiere una carga negativa al polipéptido en proporción con su longitud. En desnaturalizar separaciones de SDS-PAGE, la migración es determinada no por la carga eléctrica intrínseca del polipéptido sino por el peso molecular. En electroforesis, se utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas de la proteína a través de un gel de poliacrilamida que actúa como un acoplamiento. Las moléculas negativamente cargadas de la proteína son tiradas al extremo positivo por la

corriente, pero encuentran resistencia de este acoplamiento del poliacrilamida. Las moléculas más pequeñas pueden navegar el acoplamiento más rápidamente, así pues van más lejos en el gel que las moléculas más grandes (Deutscher, 1990).

Sin el SDS, diversas proteínas con pesos moleculares similares emigrarían de manera diferente, pues las diferencias en patrones que doblan harían que algunas proteínas se ajusten mejor a través de la matriz del gel que otras. La adición del SDS soluciona este problema linearizando las proteínas para poder separarlas terminantemente por la longitud. El SDS ata a la proteína en un coeficiente de aproximadamente 1.4 g SDS por proteína de 1g. Las proteínas desnaturalizadas se aplican posteriormente a un final de una capa del gel de poliacrilamida sumergida en un almacenador intermedio conveniente. El azul de Coomassie también atará con menos afinidad a las glicoproteínas y a las proteínas fibrosas, que interfiere con la cuantificación permitiendo la visualización de las proteínas separadas (Deutscher 1990).

## **Materiales y Métodos**

Se utilizó los siguientes padres para la investigación: ‘Salagnac 90’, una fuente de resistencia al oidium de color rojo moteado originaria de Haití. ‘Salagnac 90’ es también tolerante a la roya pero susceptible al BGYMV. ‘PR 0407-(1-7)-6-1’, ‘PR 0407-(1-7)-7-1’ y ‘PR 0407-(45-58)-18-1’, tres fuentes de resistencia al BGYMV, al BCMV de color rojo moteado originarias de Puerto Rico pero son susceptibles al oidium. ‘EAP 9503-32A’, de color rojo pequeño; ‘PR 0301-179’, ‘PR 0066-6’ y ‘X069-157-8-5-2-5’ de color blanco tienen el gen *bgm-1*; ‘RAZ 105’ y ‘RAZ 75’ tienen la proteína Arcelina 1 (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2002) y ‘SMARC PN1 #2’ que tiene también la

proteína Arcelina 1, (Osborn et al., 2003) representan fuentes de resistencia a *Zabrotes subfasciatus*.

Para desarrollar líneas rojo moteados resistentes al BGYMV, al BCMV y al oidium, se realizó las cruces 'Salagnac 90A / PR 04047-(1-7)-6-1' y 'Salagnac 90A / PR 0407-(45-58)-18-1'. Se sembraron semillas  $F_2$  el 28 de noviembre de 2005 en tiestos de 16 cm de diámetro y 17.5 cm de profundidad con 3 semillas por tiesto cuyas 363 plantas  $F_2$  proveniente de estos dos cruces fueron evaluadas para reacción al oidium en el invernadero ubicado en la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez usando una escala de 1 a 9 donde plantas de 1-3 se consideran resistentes y las de 7-9 son susceptibles [CIAT, 1987 (Anexo 6)]. Se cosechó semillas de 138 plantas individuales  $F_2$  que mostraron resistencia al oidium.

Se efectuó una siembra de estas líneas  $F_{2:3}$  el 8 de marzo de 2006 en la Estación Experimental de Isabela de la Universidad de Puerto Rico para producir semillas  $F_{3:4}$ . Se sembró un surco sencillo de 1 m por línea con una distancia entre surcos de 0.60m y una distancia de 0.1m entre las plantas dentro de los surcos. Se removieron las malezas mecánicamente y manualmente y se controlaron las plagas según las recomendaciones del Conjunto Tecnológico de Habichuela (Beaver, 2006). Se aplicó también riego suplementario semanalmente.

Se evaluaron líneas  $F_{2:3}$  y  $F_{3:4}$  en el campo en Salagnac, Haití para adaptación y reacción a las enfermedades como el BGYMV, el BCMNV y el oidium. Las condiciones climáticas, con una temperatura mensual promedio de 19°C a 23°C, en Salagnac favorecen el desarrollo de múltiples enfermedades de habichuela. La siembra se efectuó el 30 de junio de 2006. Se sembró un surco sencillo por línea con un largo de 1 metro que

constituyo la unidad experimental. La distancia entre los surcos fue de 0.40m con 10 semillas por surco. Al momento de la siembra se aplicó un abono completo 12-12-20 (N-P-K) a una dosis de 300 kg/ha. La lluvia fue la única fuente de agua para estos ensayos. No se realizó ningún control de plagas y enfermedades pero se removieron las malezas manualmente cuando era necesario.

Las líneas F<sub>2:3</sub> y F<sub>3:4</sub> con el mejor comportamiento en el campo en Haití se sembraron en el invernadero en la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez en tiestos con 3 semillas por tiesto a partir del 18 de agosto de 2006. Con el propósito de identificar plantas que combinan los genes *I* y *bc3*, dos (2) plantas en cada tiesto fueron identificadas para realizar extracciones de ADN (Anexo 5). Dos semanas después de la fecha de siembra, las plantas fueron inoculadas con la cepa NL3 de BCMNV.

El inoculo de BCMNV se preparó macerando 1 g de hojas jóvenes de plantas de la variedad susceptible ‘Rosada Mocana’ con síntomas bien definidos de BCMNV en 5 ml de fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) frío con una concentración de 0.01M a un pH 7 en un mortero frío. Utilizando una gasa, el macerado fue filtrado en un vaso plástico mantenido en hielo añadiendo una pizca de carborandum (M-600) (Mills y Silbernagel, 1992). Utilizando hisopos de algodón, el inoculo se aplicó temprano por la mañana frotándolo suavemente sobre las hojas primarias de las plantas de 7-8 días de sembradas. Según la temperatura, los síntomas se manifestaron en una semana aproximadamente luego de la inoculación. Las plantas con solamente el gen *I* producen una reacción de ‘raíz negra’ ante la presencia de BCMNV (Mills y Silbernagel, 1992). Las plantas que tienen el gen *bc-3* no desarrollaron síntomas. El ADN de todas las plantas fue evaluado durante los meses de septiembre y octubre de 2006 en el laboratorio de la Universidad de

Puerto Rico en Mayagüez utilizando el marcador molecular SCAR SR2 (Blair et al, 2006) para identificar la presencia del gen *bgm-1y* el QTL SW12 para resistencia al BGYMV.

Se realizó los cruces 'PR0407-(1-7) -7-1 / RAZ 105' y 'RAZ 75 / EAP 9503-32A' para desarrollar líneas con resistencia al BGYMV, al BCMV y a *Zabrotes*. Se efectuó la siembra el 3 de enero de 2007 en el invernadero en la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez. Se evaluaron 60 plantas de los dos cruces para la presencia del marcador molecular SR2 para el gen *bgm*. También, se realizaron inoculaciones con la cepa necrótica de BCMNV NL3 durante el mes de enero de 2007 para detectar las que tienen el gen *I*. Se cosechó solamente semillas de las plantas F<sub>2:3</sub> que tuvieron el gen *bgm*. Se evaluaron también durante los meses de abril y mayo de 2007 estas líneas F<sub>2:3</sub> con este marcador para la presencia de Arc 1 que confiere resistencia a los gorgojos.

Los extractos de proteína de semilla se analizaron mediante SDS-PAGE de una dimensión durante los meses de marzo a mayo de 2007 en el laboratorio de la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez. El cotiledón “harina” fue colectado raspando la parte posterior de las semillas usando papeles de lijadora y transferido en tubos de micro centrífuga. 10-20 mg de esta harina fueron pesados y suspendidos en 200 µl de 0.5M NaCl con un pH de 2.4. Las muestras se dejaron a temperatura de ambiente durante 30 minutos y fueron centrifugadas por 2 minutos a 10000 rpm. Cinco µl de las muestras fueron añadidas en 25 µl de un “Sample Loading Buffer” (Laemmli, 1970) y fueron desnaturalizadas a 94°C en baño caliente por 5 minutos.

Las muestras fueron inmediatamente cargadas y sometidas en electroforesis en un gel de poliacrilamida de 15% usando una solución Tris/Glycine/SDS de Laemmli por 6

horas a 100V constante. Los geles fueron manchados toda la noche en una solución de 10% metanol, 10% ácido acético, 0.1% azul de Coomassie y desmanchados el día siguiente por 2-3 horas en otra solución de 40% metanol y 10% ácido acético. Finalmente, los geles fueron visualizados en el Transiluminador bajo luz normal. Adicionalmente, se evaluaron 39 líneas F<sub>3:4</sub> provenientes de cruzamientos entre ‘PR 0301-179 / SMARC PN1 #2’, ‘PR 0066-6 / SMARC PN1 #2’ y ‘X069-157-8-5-2-5 / SMARC PN1 #2’ para identificar las que combinan resistencia al BGYMV y el alelo Arc 1 para resistencia a los gorgojos.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el estadístico de la prueba Chi Cuadrado realizada en InfoStat 2006 (Versión Estudiantil e.1) para estudiar la presencia o la ausencia de síntomas de las enfermedades, la presencia o la ausencia del marcador molecular y la proporción de plantas resistentes a *Zabrotes*. Usando una notación análoga a ANOVA, la cantidad de plántulas observada en cada celda se denota como  $n_{ij}$ . Las cantidades esperadas de plántulas en cada celda se calculan como:

$$E_{ij} = n_{i.}n_{.j} / n_{..} = (\text{total de fila } i) (\text{total de columna } j) / \text{total general}$$

La forma precisa de comparar cada valor observado con cada valor esperado es:

$$X^2 = \sum [(n_{ij} - E_{ij})^2 / E_{ij}]$$

Si lo que observamos es exactamente igual a lo que esperamos, entonces  $\chi^2 = 0$ . Si lo que observamos está muy lejos de lo que esperamos, entonces el valor de  $X^2$  será muy grande. Para la interpretación de los análisis, se utilizó una tabla de distribución Chi Cuadrado con un valor crítico de 5%.

## Resultados y Discusiones

### Evaluación de líneas de frijol rojo moteado F<sub>2</sub> en invernadero para Oidium

Esta evaluación permitió la identificación de plantas F<sub>2</sub> de dos cruzamientos con resistencia al oidium. La mayoría (70.83%) de las líneas del cruce ‘PR0407-(1-7)-6-1 / Salagnac 90A’ no presentaron síntomas y solamente (15.27%) tenían síntomas severos con una notación de 7 o mayor (Cuadro 1). En cuanto a las del cruce ‘PR0407-(45-58)-18-1 / Salagnac 90A, (58.33%) fueron totalmente resistentes mientras (16.67%) de las plantas mostraron síntomas severos pero ninguna de ellas tenía una notación mayor a 7 (Cuadro 1 y Anexo 1).

Cuadro 1. Evaluación de plantas F<sub>2</sub> de habichuela para reacción al oidium en el invernadero en Mayagüez, Puerto Rico.

	Pedigrí	
	PR0407-(1-7)-6-1 / Salagnac 90A	PR0407-(45-58)-18-1 / Salagnac 90A
Lectura de oidium <sup>1</sup>	Número de plantas F <sub>2</sub>	
1	102	42
2	0	0
3	16	17
4	4	1
5	0	0
6	0	0
7	20	12
8	2	0

<sup>1</sup> Evaluada en una escala de 1-9 donde 1=no síntomas, 9=síntomas muy severos

El análisis estadístico Chi Cuadrado (Cuadro 2) nos revela que todas las plantas F<sub>2</sub> de estos dos cruces mostraron el mismo patrón de segregación de susceptibilidad o de resistencia ante el oidium. El hecho que la gran mayoría de las plantas F<sub>2</sub> fueron

resistentes nos sugiere que un o más genes dominantes confieren resistencia a esta enfermedad. Estos resultados concuerdan con estudios previos (Bett y Michaels, 1995).

Cuadro 2. Comparación de los patrones de segregación para reacción al oidium de dos cruces de habichuela evaluadas en el invernadero en Mayagüez, Puerto Rico.

	Pedigrí			
	PR0407-(1-7)-6-1 / Salagnac 90A		PR0407-(45-58)-18-1 / Salagnac 90A	
Lectura de oidium <sup>1</sup>	Número de plantas F <sub>2</sub>			
	Observados	Esperados	Observados	Esperados
1	102	96.0	42	48.0
2				
3	16	22.0	17	11.0
4	4	3.3	1	1.7
5				
6				
7	20	21.3	12	10.7
8	2	1.3	0	0.7
Chi Cuadrado Pearson = 7.68				
$\chi^2_{cal} = 7.68 < \chi^2_{tab} = 9.487$ con $\alpha = 0.05$ y $gl = 4$				

<sup>1</sup> Evaluada en una escala de 1-9 donde 1=no síntomas, 9=síntomas muy severos

Encontramos una razón que aproxima 3 resistentes: 1 susceptible. Hay dos posibles razones porque no hubo un ajuste a 3:1. Algunas plantas se escaparon a la inoculación porque fue una infestación natural o estábamos en la presencia de diferentes razas de oidium porque no controláramos la raza en cuestión. Los padres utilizados para desarrollar las dos poblaciones variaron en resistencia al oidium o no hubo suficiente presión de la enfermedad (Cuadro 3). La mayoría de las plantas de los padres evaluados no tenían síntomas. Todas las plantas de Salagnac 90A tenían lecturas de oidium  $\leq 3$  mientras los otros padres tuvieron unas pocas plantas con reacción  $\geq 4$ . Estas líneas no

fueron seleccionadas previamente para reacción al oidium y podrían ser heterogéneas para los genes de resistencia a esta enfermedad.

Cuadro 3. Reacción de los padres al oidium evaluados en el invernadero en Mayagüez, Puerto Rico.

	PR0407-(1-7)-6-1	PR0407-(45-58)-18-1	Salagnac 90A
Lectura de oidium <sup>1</sup>	Número de plantas		
1	5	4	7
2	0	0	1
3	0	0	4
4	0	1	0
5	0	3	0
6	0	0	0
7	1	0	0
8	0	0	0

<sup>1</sup> Evaluada en una escala de 1-9 donde 1=no síntomas, 9=síntomas muy severos

**Comportamiento de líneas de frijol rojo moteado F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub> sembradas en Salagnac, Haití en junio de 2006.**

El comportamiento de las líneas F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub> sembradas en Haití, durante el verano de 2006 permitió una evaluación para reacción en el campo a las enfermedades como la roya, la antracnosis, el Mosaico Dorado Amarillo. Solamente dos líneas F<sub>4</sub> mostraron débiles síntomas del Mosaico Dorado Amarillo con una notación visual de 2 en la escala [CIAT, 1987 (Anexo 7)]. La mayoría de las plantas no mostraron síntomas a los demás enfermedades con una notación de 1 a 3. Los padres no mostraron síntomas del Mosaico Dorado Amarillo pero Salagnac 90A, PR0407-(1-7)-6-1 y PR0407-(45-58)-18-1 mostraron evaluaciones promedias de 3.6, 1.0 y 2.5 para la roya; 1.0, 1.0 y 2.0 para la antracnosis, respectivamente dentro del ensayo de las líneas F<sub>3</sub> y tuvieron evaluaciones

promedias de 4.1, 1.0 y 1.0 para la roya; 1.4, 1.0 y 1.0 para la antracnosis, respectivamente dentro del ensayo de las líneas F<sub>4</sub> (Cuadros 4 y 5). La mayoría de las líneas F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub> mostraron un mayor nivel de resistencia a la roya que Salagnac 90A (Cuadros 4 y 5).

No se observaron oidium en los ensayos. Por lo tanto, no retomaron lecturas de reacción a esta enfermedad. Debemos señalar, sin embargo, que las líneas F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub> fueron derivadas de plantas F<sub>2</sub> seleccionadas en Puerto Rico para resistencia al oidium. Los promedios de días a floración variaron de 29 a 33 días para las líneas F<sub>3</sub> y de 29 a 34 días para las de F<sub>4</sub> mientras los promedios de días a madurez de las líneas F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub> variaron de 57 a 68 y de 60 a 68 días, respectivamente. En cuanto a los padres, los promedios de días a floración eran de 31 días mientras los promedios de días a madurez variaron de 61 a 63 días (Cuadros 4 y 5).

El rendimiento promedio de Salagnac 90A fue mayor que los padres PR0407-(1-7)-6-1 y PR0407-(45-58)-18-1 en ambos ensayos aunque el rendimiento promedio de Salagnac 90A fue menor en el ensayo de las líneas F<sub>4</sub> (Cuadros 4 y 5). Los rendimientos promedios de las líneas F<sub>3</sub> variaron de 53 a 3220 kg/ha y los rendimientos de las líneas F<sub>4</sub> variaron de 75 hasta 2403 kg/ha (Cuadros 4 y 5). Solamente 6.59% de las líneas F<sub>3</sub> tuvieron un rendimiento promedio  $\geq$  que Salagnac 90A mientras 26.31% de las líneas F<sub>4</sub> tuvieron un rendimiento  $\geq$  que Salagnac 90A. Esta diferencia podría ser la consecuencia de la selección de las plantas F<sub>3</sub> en Isabela que resultó en mejor adaptación a las condiciones del campo en Salagnac.

Cuadro 4. Comportamiento de líneas de frijol rojo moteado F<sub>2,3</sub> sembradas en Salagnac, Haití en junio de 2006.

Identidad	Pedigrí	Días a floración	Roya <sup>1</sup>	Antracnosis <sup>1</sup>	Días a madurez	Rendimiento (kg/ha)
S1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	59	815
S1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	31	1	1	59	790
S2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	31	1	1	60	880
S3-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	31	1	1	60	1203
S4-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	31	1	1	60	778
S5-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	31	1	1	61	2705
S6-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	31	1	1	62	415
Salagnac90A		31	6	1	63	2455
PR0407-(1-7)-6-1		31	1	1	63	583
S6-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	61	1120
S8-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	64	438
S10-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	64	215
S10-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	64	53
S11-B	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	63	578
S12-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	63	623
S12-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	63	535
Salagnac90A		31	5	1	62	1765
PR0407-(1-7)-6-1		31	1	1	62	303
S15-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	68	1228
S17-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	68	490
S18-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	68	1020
S21-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	68	438
S21-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	67	1418
S27-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	67	1155
S28-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	67	365
S29-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	60	1240
Salagnac90A		31	1	1	60	2303
PR0407-(1-7)-6-1		31	1	1	60	630
S31-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	64	1288
S36-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	64	1955
S38-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	64	1845
S41-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	64	598
S42-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	61	550
S43-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	61	315
S44-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	61	338
Salagnac90A		31	6	1	60	1788
PR0407-(1-7)-6-1		31	1	1	60	765
S45-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	6	61	625
S46-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	65	738
S46-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	65	438
S47-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	65	208
S47-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	4	1	65	2250
S48-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	65	483

Identidad	Pedigrí	Días a floración	Roya <sup>1</sup>	Antracnosis <sup>1</sup>	Días a madurez	Rendimiento (kg/ha)
S49-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	65	1388
S49-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	5	1	63	930
Salagnac90A		31	5	1	59	1418
PR0407-(1-7)-6-1		31	1	1	59	613
S50-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	64	1095
S51-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	64	710
S51-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	30	1	1	64	458
S52-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	4	1	62	990
S53-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	62	1080
S53-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	62	528
S55-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	62	753
S56-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	33	1	1	62	440
Salagnac90A		31	7	1	60	1548
PR0407-(1-7)-6-1		31	1	1	60	423
S57-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	62	565
S57-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	62	768
S58-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	64	673
S58-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	4	1	64	688
S61-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	2	1	64	665
S62-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	3	1	63	595
S63-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	63	753
S68-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	32	1	1	63	398
Salagnac90A		31	1	1	59	2043
PR0407-(1-7)-6-1		31	1	1	59	75
S71-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	31	1	1	59	2048
S75-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	31	1	1	59	1275
Salagnac90A		31	6	1	65	953
PR0407-(45-58)-18-1		31	1	1	66	948
S82-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	31	7	1	63	685
S88-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	31	1	1	62	1163
S89-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	31	1	1	62	863
S90-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	31	1	1	62	1485
S91-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	31	1	1	62	173
S91-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	31	1	1	62	848
S93-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	30	4	1	60	998
Salagnac90A		31	1	1	60	1928
S95-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	30	1	1	60	900
S96-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	30	1	1	60	553
S102-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	30	1	1	60	1220
S106-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	29	1	1	58	123
S107-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	29	1	1	57	1128
S109-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	29	1	1	60	1450
S113-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	30	1	1	60	183
Salagnac90A		31	1	1	60	1668
S116-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	31	1	1	61	3220

Identidad	Pedigrí	Días a floración	Roya <sup>1</sup>	Antracnosis <sup>1</sup>	Días a madurez	Rendimiento (kg/ha)
S117-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	30	1	1	61	695
Salagnac90A		31	1	1	61	1128
PR0407-(45-58)-18-1		31	4	3	61	625
Promedio de Salagnac90A		31	3.64	1	60.82	1727
Promedio de PR0407-(1-7)-6-1		31	1	1	60.43	485
Promedio de PR0407-(45-58)-18-1		31	2.5	2	63.5	786.5

<sup>1</sup>Evaluada en una escala de 1 a 9 donde 1= ausencia de síntomas y 9=síntomas muy severas

Cuadro 5. Comportamiento de líneas de frijol rojo moteado F<sub>3,4</sub> sembradas en Salagnac, Haití en junio de 2006.

Fuente de semilla	Identidad	Pedigrí	Días a floración	BGYMV <sup>1</sup>	Roya <sup>1</sup>	Antracnosis <sup>1</sup>	Días a madurez	Rendimiento (kg/ha)
0669-1	S1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	32	1	1	1	60	1238
0669-2	S1-2	"	30	1	1	1	60	560
0669-4	S3-1	"	30	1	1	1	60	1078
0669-6	S4-2	"	30	1	1	1	60	243
0669-9	S6-1	"	30	1	1	1	60	260
0669-10	S6-2	"	30	1	1	1	60	575
0669-13	S10-1	"	33	1	1	1	65	260
0669-16	S12-1	"	33	1	1	1	63	448
Salagnac90A	Padre1		31	1	8	1	60	1038
PR0407-(1-7)-6-1	Padre2		31	1	1	1	60	413
0669-18	S13-1	"	30	2	1	1	60	568
0669-19	S14-1	"	30	1	1	1	60	963
0669-20	S14-2	"	30	1	1	1	60	693
0669-21	S15-1	"	30	1	1	1	60	343
0669-22	S15-2	"	34	1	1	1	65	668
0669-26	S17-2	"	34	1	1	1	65	725
0669-28	S18-2	"	30	1	1	1	60	325
Salagnac90A	Padre1		31	1	8	1	60	1168
PR0407-(1-7)-6-1	Padre2		31	1	1	1	60	690
0669-34	S21-1	"	32	1	1	1	61	213
0669-35	S21-2	"	32	1	1	1	61	745
0669-36	S22-1	"	32	1	1	1	61	325
0669-37	S23-1	"	29	1	1	1	60	1545
0669-38	S25-2	"	29	1	1	1	60	170
0669-40	S27-1	"	29	1	1	1	60	830
0669-42	S28-1	"	30	2	1	1	60	1263

Fuente de semilla	Identidad	Pedigrí	Días a floración	BGYMV <sup>1</sup>	Roya <sup>1</sup>	Antracnosis <sup>1</sup>	Días a madurez	Rendimiento (kg/ha)
0669-43	S28-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	30	1	1	1	60	465
Salagnac90A	Padre1		31	1	1	5	60	983
PR0407-(1-7)-6-1	Padre2		31	1	1	1	60	938
0669-47	S32-1	"	31	1	1	1	62	2175
0669-48	S34-1	"	31	1	1	1	61	353
0669-49	S34-2	"	31	1	1	1	61	610
0669-50	S36-1	"	31	1	1	1	60	1065
0669-52	S37-1	"	31	1	1	1	60	1693
0669-59	S41-1	"	30	1	1	1	60	75
Salagnac90A	Padre1		31	1	7	1	60	1185
0669-60	S42-2	"	31	1	1	1	60	880
0669-61	S43-1	"	33	1	1	1	67	448
0669-62	S43-2	"	33	1	3	1	67	110
0669-63	S44-2	"	30	1	1	1	61	498
0669-65	S45-2	"	30	1	1	1	61	180
0669-67	S46-2	"	30	1	1	1	61	508
0669-68	S47-1	"	30	1	1	1	61	1090
0669-69	S47-2	"	30	1	1	1	61	715
Salagnac90A	Padre1		31	1	6	1	61	1910
PR0407-(1-7)-6-1	Padre2		31	1	1	1	61	975
0669-70	S48-2	"	32	1	1	1	61	1835
0669-71	S49-1	"	34	1	1	1	68	730
0669-72	S49-2	"	29	1	1	1	60	1480
0669-73	S50-1	"	32	1	1	1	61	943
0669-78	S53-1	"	32	1	1	1	61	1170
0669-79	S53-2	"	32	1	1	1	61	493
0669-80	S55-1	"	32	1	1	1	61	1225
Salagnac90A	Padre1		31	1	4	1	61	2005
PR0407-(1-7)-6-1	Padre2		31	1	1	1	61	185
0669-83	S56-2	"	31	1	1	1	61	418
0669-84	S57-1	"	32	1	1	1	63	955
0669-85	S57-2	"	31	1	2	1	60	188
0669-86	S58-1	"	31	1	5	1	60	710
0669-87	S58-2	"	33	1	1	1	62	1813
0669-93	S61-1	"	30	1	2	1	60	175
0669-94	S61-2	"	30	1	1	1	60	455
0669-95	S62-A	"	30	1	5	1	60	1025
Salagnac90A	Padre1		31	1	7	1	60	885
PR0407-(1-7)-6-1	Padre2		31	1	1	1	60	193
0669-96	S62-2	"	31	1	1	1	60	375
0669-98	S63-2	"	31	1	1	1	60	788
0669-99	S68-1	"	31	1	1	1	60	1113
0669-101	S71-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	30	1	1	1	60	190
0669-102	S72-2	"	30	1	1	1	60	1005

Fuente de semilla	Identidad	Pedigrí	Días a floración	BGYMV <sup>1</sup>	Roya <sup>1</sup>	Antracnosis <sup>1</sup>	Días a madurez	Rendimiento (kg/ha)
0669-103	S75-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	30	1	1	1	60	408
0669-104	S75-2	"	30	1	1	1	60	1190
Salagnac90A	Padre1		31	1	1	1	60	398
0669-111	S91-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac 90A	32	1	1	1	65	2403
0669-112	S91-2	"	32	1	1	1	65	1183
0669-113	S93-1	"	32	1	1	1	65	563
0669-114	S95-2	"	32	1	1	1	65	640
0669-115	S96-1	"	32	1	1	1	65	1188
0669-119	S101-2	"	32	1	1	1	65	210
0669-120	S102-1	"	32	1	1	1	63	363
Salagnac90A	Padre1		31	1	1	1	60	348
PR0407-(45-58)-18-1	Padre3		31	1	1	1	60	138
0669-122	S103-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac 90A	31	1	1	1	60	1660
0669-123	S104-2	"	31	1	1	1	60	280
0669-124	S106-1	"	31	1	1	1	60	1453
0669-125	S107-2	"	33	1	1	1	60	153
0669-126	S108-1	"	30	1	1	1	61	1368
0669-129	S109-2	"	30	1	1	1	61	800
0669-131	S113-1	"	30	1	1	1	61	378
Salagnac90A	Padre1		31	1	1	1	62	375
PR0407-(45-58)-18-1	Padre3		31	1	1	1	62	898
0669-133	S116-1	"	31	1	1	1	62	713
0669-134	S116-2	"	31	1	1	1	62	683
0669-135	S117-1	"	29	1	1	1	60	983
Salagnac90A	Padre1		31	1	1	1	60	413
Promedio de Salagnac90A			31	1	4.09	1.36	60.36	973
Promedio de PR0407-(1-7)-6-1			31	1	1	1	60.33	566
Promedio de PR0407-(45-58)-18-1			31	1	1	1	61	518

<sup>1</sup>Evaluada en una escala de 1-9 donde 1 = ausencia de síntomas y 9 = síntomas muy severos.

### Inoculación con el NL3 del Mosaico Común

Un total de 193 plantas F<sub>4</sub> de los cruces PR0407-(1-7)-6-1 / Salagnac 90A y PR0407-(45-58)-18-1 / Salagnac 90A fueron inoculadas dos veces en el invernadero con la cepa necrótica NL3 de BCMNV. Se encontró 134 líneas con una reacción de raíz negra (Figura 1) que indica la presencia del gene *I* mientras 45 plantas tenían síntomas muy claros de mosaico común (Cuadros 7 y 8). Sin embargo, 12 plantas fueron completamente sanas y no presentaban ningún síntoma después de dos inoculaciones (Cuadro 6). Estas líneas deberían tener el gene *bc3* que les da una resistencia al Mosaico Común y Mosaico Común Necrótico. Todas las líneas resistentes al BCMNV fueron derivadas del cruce PR0407-(1-7)-6-1 / Salagnac 90A.

Cuadro 6. Plantas con el gen *bc3* para resistencia al BCMV y BCMNV

Identidad	Pedigrí	Primera evaluación de BCMNV	Segunda evaluación de BCMNV	Rendimiento en Salagnac, Haití (kg/ha)
S4-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	243
S4-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	243
S22-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	325
S44-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	498
S58-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	1813
S68-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	1113
S12-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	448
S12-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	448
S43-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	110
S57-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	955
S58-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	1813
S62-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	1025

Cuadro 7. Líneas que mostraron una reacción necrótica cuando fueron inoculadas con BCMNV

Identidad	Pedigrí	Primera evaluación de BCMNV
S1-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S1-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S3-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S3-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S6-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S6-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S6-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S6-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre1-1	Salagnac 90A	Necrótica
Padre1-2	Salagnac 90A	Necrótica
Padre2-1	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
Padre2-2	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
S14-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S14-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S14-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S14-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S15-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S15-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S18-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S18-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S18-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S18-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre2-1	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
Padre2-2	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
S21-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S21-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S21-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S21-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S22-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S23-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S27-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S27-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S28-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S28-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S28-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S28-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre2-1	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
Padre2-2	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
S32-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S34-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S34-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S36-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S36-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S36-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica

Identidad	Pedigrí	Primera evaluación de BCMNV
S36-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S37-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S38-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S38-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S41-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S41-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre2-1	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
Padre2-2	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
S43-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S43-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S45-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S47-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S47-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre2-1	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
Padre2-2	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
S49-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S49-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S49-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S50-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S50-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S53-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S53-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S53-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre1-1	Salagnac 90A	Necrótica
Padre1-2	Salagnac 90A	Necrótica
Padre2-1	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
Padre2-2	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
S56-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S56-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S57-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S58-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S61-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S61-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S62-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre1-1	Salagnac 90A	Necrótica
Padre1-2	Salagnac 90A	Necrótica
Padre2-1	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
Padre2-2	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
S62-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S63-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S63-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S75-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S75-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S75-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre2-1	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
Padre2-2	PR0407-(1-7)-6-1	Necrótica
S89-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica

Identidad	Pedigrí	Primera evaluación de BCMNV
S91-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S91-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S95-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S95-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S101-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S102-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S103-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S103-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S106-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S106-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S107-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S107-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S113-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S113-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
Padre1-1	Salagnac 90A	Necrótica
Padre1-2	Salagnac 90A	Necrótica
Padre3-1	PR0407-(45-58)-18-1	Necrótica
Padre3-2	PR0407-(45-58)-18-1	Necrótica
S116-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S116-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S116-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica
S116-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Necrótica

Cuadro 8. Líneas que variaron en su reacción al BCMNV entre la primera y la segunda evaluación

Identidad	Pedigrí	Primera evaluación de BCMNV	Segunda evaluación de BCMNV
S17-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S17-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S32-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S43-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S44-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S46-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S46-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S47-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S47-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
Padre 1-1	Salagnac 90A	Sin síntomas	Necrótica
S53-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S62-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S68-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S89-2-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
Padre3-1	PR0407-(45-58)-18-1	Sin síntomas	Necrótica
Padre3-2	PR0407-(45-58)-18-1	Sin síntomas	Necrótica
S108-1-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S109-2-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica

S109-2-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S117-1-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S117-1-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Necrótica
S1-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S1-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S10-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S10-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S13-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S13-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S15-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S15-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre 1-1	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre 1-2	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
S25-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S25-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S34-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S34-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S37-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre 1-1	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre 1-2	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
S45-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre 1-2	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
S48-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S48-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S49-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S55-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S55-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S56-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S56-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S58-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S70-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S70-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S71-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S71-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre1-1	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre1-2	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
S91-2-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S91-2-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S93-1-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S93-1-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S102-1-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre1-1	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
Padre1-2	Salagnac 90A	Sin síntomas	Mosaico
S102-2-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S102-2-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S104-2-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S104-2-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico
S108-1-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	Sin síntomas	Mosaico



Mosaico Común

Raíz Negra

Figura 1. Reacciones al BCMV y BCMNV

### **Presencia del marcador SR2 para la resistencia al Mosaico Dorado Amarillo**

Entre las 12 plantas F<sub>4</sub> que no desarrollaron síntomas de BCMNV, seis líneas tuvieron el marcador SR2 para el gen *bgm* para resistencia al BGYMV. Estas seis líneas deberían combinar los genes *bc3* y *bgm-1*. La línea S58-2-2 fue seleccionada como la más prometedora debida a su rendimiento de 1813 kg/ha en Salagnac, Haití (Cuadro 9). Durante el verano de 2007, esta línea se sembró en Kenscoff, Haití para incrementar semilla y confirmar su resistencia a las enfermedades. Se pretende evaluar S58-2-2 en fincas de los agricultores para obtener sus opiniones sobre las características agronómicas de la línea. Si el comportamiento de la línea continúa favorable, se podría considerar la

liberación en Haití de S58-2-2 como una variedad. También se pretende utilizar esta línea como parental en el programa de mejoramiento de habichuela de grano rojo moteado.

Seis de las líneas tienen el gene *bc3* para resistencia al BCMNV pero faltaron el SCAR SR2 para el gen *bgm* (Cuadro 10). Este SCAR es co-dominante o sea presenta dos bandas: una de 530 bp (par de bases) que se mueve más rápidamente y confiere la resistencia al mosaico dorado; otra de 570 bp se mueve más lenta pero es ligado con el alelo dominante *Bgm* que confiere susceptibilidad. Así, podemos distinguir claramente las bandas que nos interesan en la figura 2.

Cuadro 9. Líneas F<sub>4</sub> que combinan resistencia al BGYMV, BCMV y BCMNV.

Identidad	Pedigrí	Primera evaluación de BCMNV <sup>1</sup>	Segunda evaluación de BCMNV <sup>1</sup>	Presencia del marcador SR2 (530 bp) para el gen <i>bgm</i> para resistencia al BGYMV	Rendimiento en Salagnac, Haití (kg/ha)
S4-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	Sí	243
S4-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	Sí	243
S22-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	Sí	325
S44-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	Sí	498
S58-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	Sí	1813
S68-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	Sí	1113

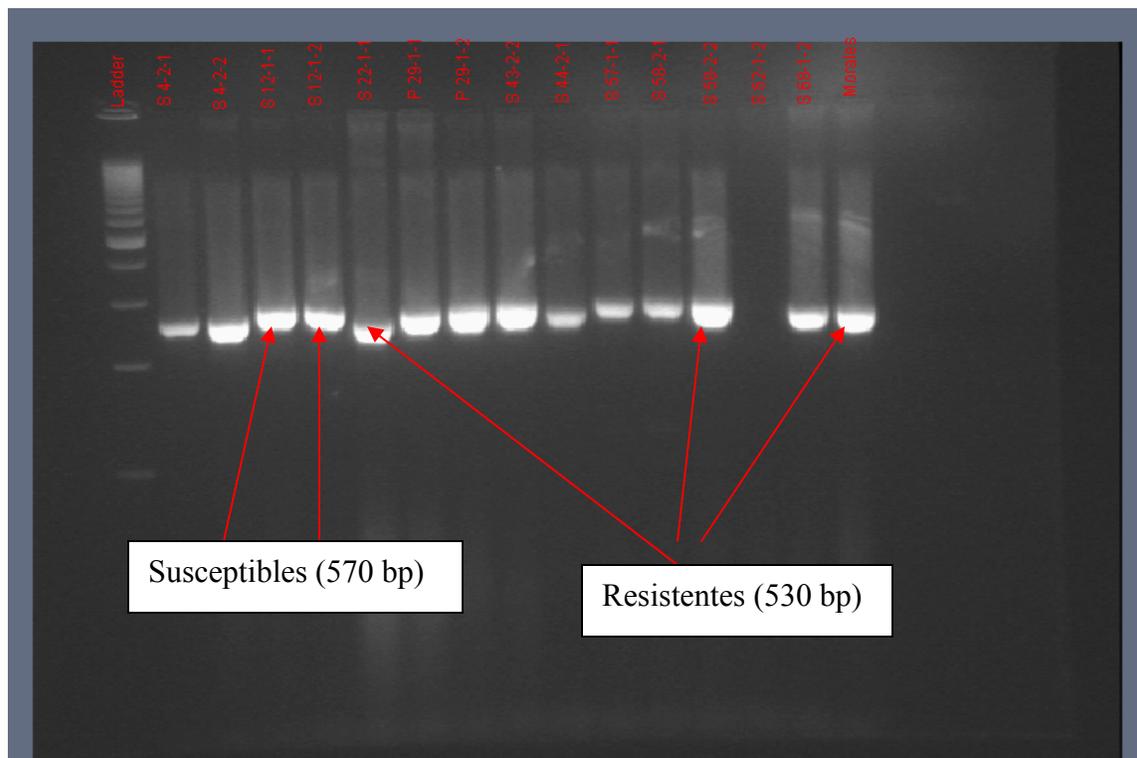
<sup>1</sup>Evaluadas en una escala de 1 a 9 donde 1 = ausencia de síntomas y 9 = síntomas muy severos.

Cuadro 10. Líneas F<sub>4</sub> con resistencia al BCMNV y BCMV pero susceptibles al BGYMV.

Identidad	Pedigrí	Primera evaluación de BCMNV <sup>1</sup>	Segunda evaluación de BCMNV <sup>1</sup>	Presencia del marcador SR2 (530 bp) para el gen <i>bgm</i> para resistencia al BGYMV	Rendimiento en Salagnac, Haití (kg/ha)
S12-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	No	448
S12-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	No	448
S43-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	No	110
S57-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	No	955
S58-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	No	1813
S62-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac 90A	1	1	No	1025

<sup>1</sup>Evaluadas en una escala de 1 a 9 donde 1 = ausencia de síntomas y 9 = síntomas muy severos.

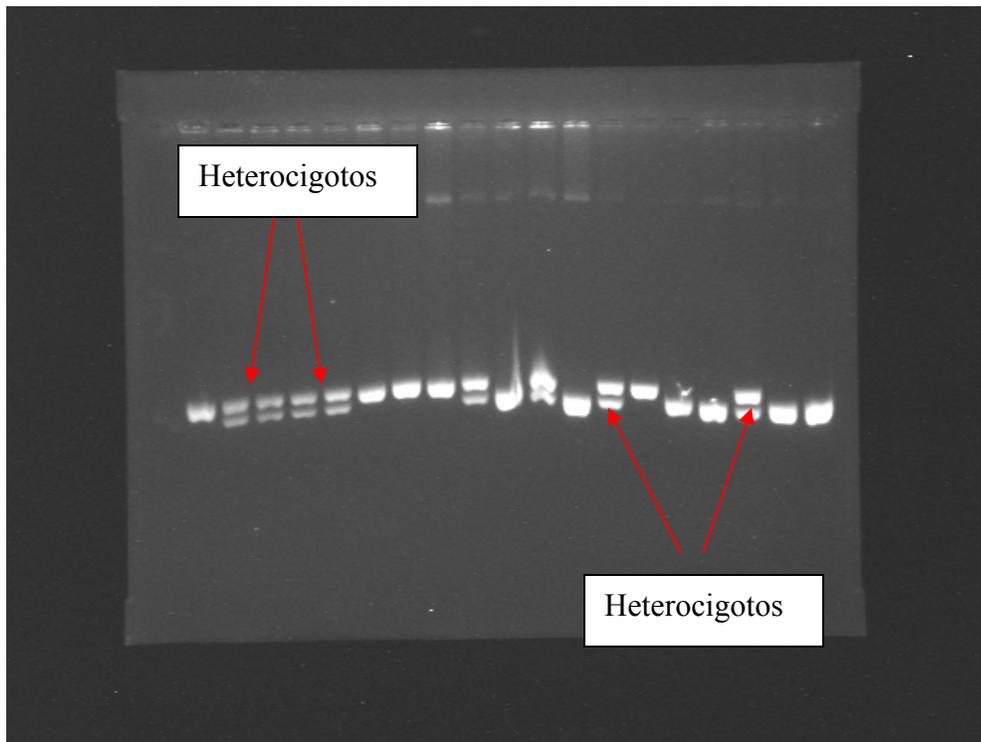
Figura 2. Presencia del marcador SR2 para la resistencia al Mosaico Dorado Amarillo



### Evaluación de plantas F<sub>2</sub> para genes de resistencia al BGYMV y gorgojos

La evaluación de las plantas F<sub>2</sub> de los cruces ‘RAZ 105 / PR 0407-(1-7) -7-1’ y ‘RAZ 75 / EAP 9503-32A’ para este marcador identificó 20 plantas heterocigotos entre las cuales 4 vienen del primer cruzamiento y 16 del segundo cruzamiento. Se podría seleccionar plantas resistentes al BGYMV en la próxima generación (Anexo 2 y Figura 3).

Figura 3. Plantas heterocigotos para el marcador SR2

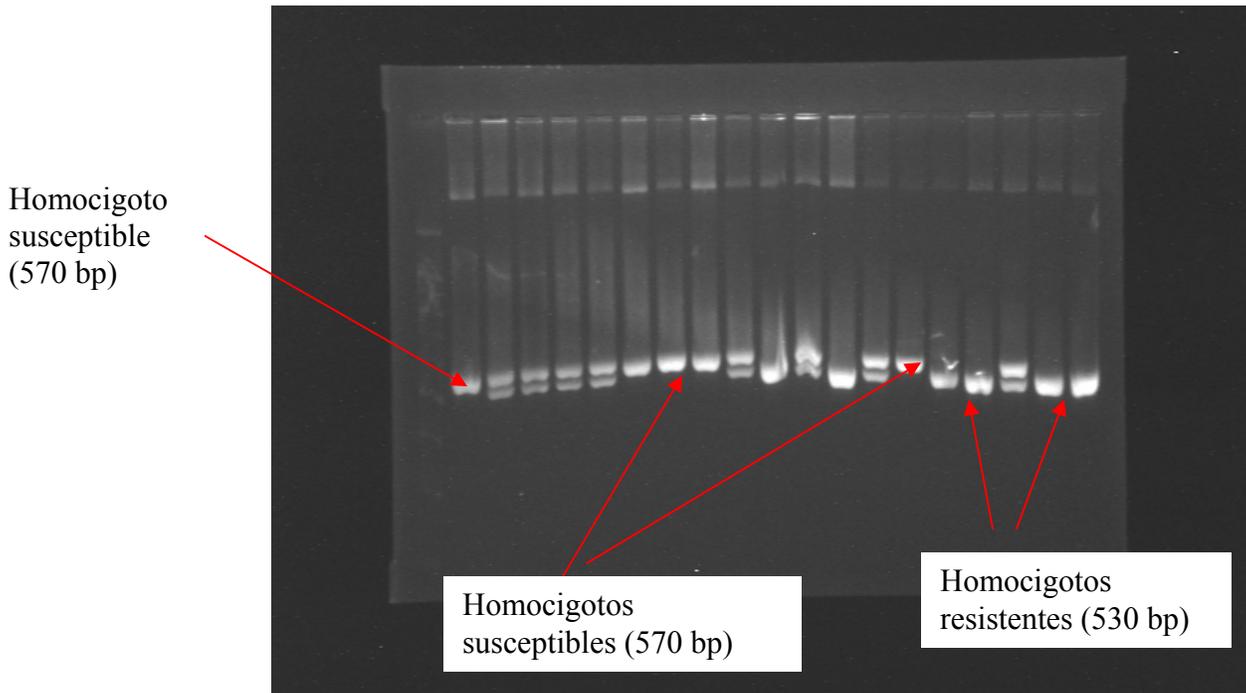


Se encontró también 27 plantas homocigotas resistentes o sea mostraron solamente la banda de 530 bp del marcador SR2. Diecisiete de las plantas fueron del cruce RAZ 105 / PR 0407-(1-7) -7-1 y 10 fueron del cruce RAZ 75 / EAP 9503-32A. Todas las plantas de este grupo son homocigóticas para *bgm-1* para la resistencia al BGYMV (Cuadro 11 y figura 4).

Cuadro 11. Líneas homocigotas para el marcador de *bgm*

Identidad	Pedigrí	Planta	SR2
CB-GH-1-1-2-1	RAZ 105 / PR0407-(1-7)-7-1 -F <sub>2</sub>	1	homocigoto
CB-GH-1-1-4-1	"	1	"
CB-GH-1-1-5-2	"	2	"
PR0407-(1-7)-7-1-7-1	"	1	"
CB-GH-1-1-9-1	"	1	"
CB-GH-1-1-9-2	"	2	"
CB-GH-1-1-10-1	"	1	"
CB-GH-1-2-11-2	"	2	"
CB-GH-1-2-12-1	"	1	"
CB-GH-1-2-15-2	"	2	"
CB-GH-1-2-18-1	"	1	"
CB-GH-1-3-21-1	"	1	"
CB-GH-1-3-22-1	"	1	"
PR0407-(1-7)-7-1-23-1	"	1	"
PR0407-(1-7)-7-1-23-2	"	2	"
CB-GH-1-3-25-2	"	2	"
CB-GH-1-3-27-1	"	1	"
CB-GH-2-1-1-2	RAZ 75 / EAP 9503-32A - F <sub>2</sub>	2	"
EAP 9503-32A-7-1	"	1	"
EAP 9503-32A-7-2	"	2	"
CB-GH-2-2-17-2	"	2	"
CB-GH-2-2-19-1	"	1	"
CB-GH-2-3-21-2	"	2	"
CB-GH-2-3-22-1	"	1	"
EAP 9503-32A-23-1	"	1	"
EAP 9503-32A-23-2	"	2	"
CB-GH-2-3-30-2	"	2	"

Figura 4. Plantas homocigotos susceptibles y resistentes para el marcador SR2



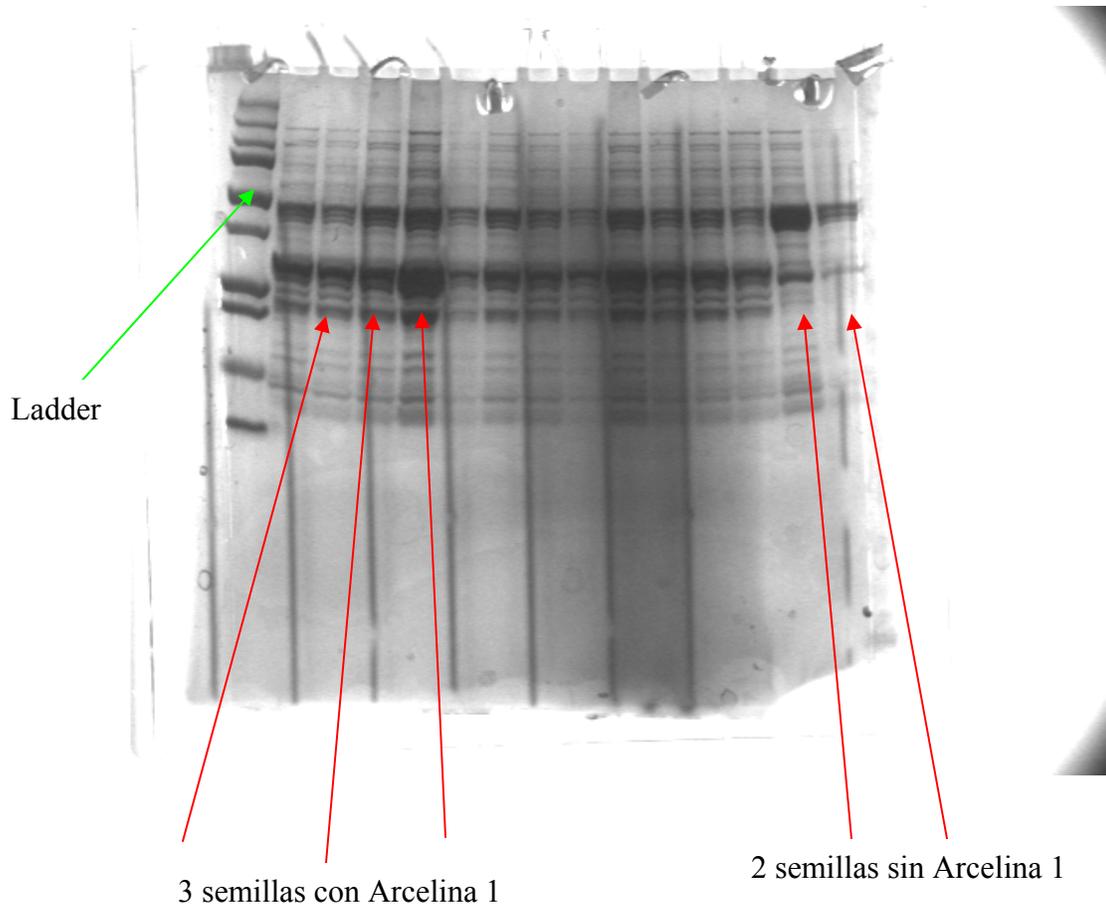
Por otra parte, se encontró 25 líneas homocigotos de color diferente y 42 otras líneas heterocigotos para la proteína Arcelina 1. Dentro de las líneas homocigotos, cinco tuvieron color rojo provinieron del cruce RAZ 105 / PR0407-(1-7)-7-1, siete tuvieron de color rojo del cruce RAZ 75 / EAP 9503-32A. Seis líneas de color blanca del cruce PR 0301-179 / SMARC PN1 #2, cuatro líneas de color blanca del cruce X069-157-8-5-2-5 / SMARC PN1 #2, dos líneas de color blanca del cruce PR 0066-6 / SMARC PN1 #2 y el testigo SMARC PN1 #2 fueron positivos para Arcelina 1 (Cuadro 12). La mayoría de las líneas heterocigotos fueron del cruce PR 0301-179 / SMARC PN1 #2 (14) y del cruce RAZ 75 / EAP 9503-32A (12) (Anexo 3).

Cuadro 12. Líneas homocigotos para la presencia de Arcelina 1.

Identidad	Pedigrí	Arcelina 1
CB-GH-1-1-2-1	RAZ 105 / PR0407-(1-7)-7-1 -F <sub>2</sub>	homocigoto
CB-GH-1-1-5-2	"	"
CB-GH-1-1-8-2	"	"
CB-GH-1-2-12-1	"	"
CB-GH-1-2-14-1	"	"
CB-GH-2-2-14-2	RAZ 75 / EAP 9503-32A - F <sub>2</sub>	"
CB-GH-2-2-17-1	"	"
CB-GH-2-2-17-2	"	"
CB-GH-2-2-18-2	"	"
CB-GH-2-3-21-2	"	"
CB-GH-2-3-22-1	"	"
CB-GH-2-3-30-2	"	"
0702-1-1	PR 0301-179 / SMARC PN1 #2 - F <sub>3;4</sub>	"
0702-2-1	"	"
0702-3-3	"	"
0702-5-1	"	"
0702-5-3	"	"
0702-6-3	"	"
0702-9-1	X069-157-8-5-2-5 / SMARC PN1 #2 - F <sub>3;4</sub>	"
0702-9-2	"	"
0702-9-4	"	"
0702-9-6	"	"
0703-20-1	PR 0066-6 / SMARC PN1 #2 - F <sub>3;4</sub>	"
0703-22-2	"	"
0401-307	SMARC PN1 #2	"

Las líneas rojas fueron de la F<sub>2</sub> mientras que las blancas fueron más avanzadas (F<sub>3;4</sub>). Estas líneas fueron consideradas homocigotos cuando presentaron por lo menos 3 semillas con la proteína y fueron heterocigotos cuando solamente una o dos semillas indicaron la presencia de Arcelina 1. Los extractos de las 3 semillas de una misma línea fueron cargados uno al lado del otro para una mejor apreciación del análisis en los geles. Así, se puede detectar claramente las bandas que mostraron la presencia de la proteína. Según la literatura (Osborn et al.1986), la Arcelina tiene un peso molecular entre 31 kd (lectina) y 45 kd (faseolina) (Figura 5).

Figura 5. Líneas homocigotos y heterocigotos para la presencia de Arcelina 1



Se logró obtener por lo menos 12 plantas que combinaron resistencia al BGYMV y a los gorgojos cuyas tres provinieron del cruce RAZ 105 / PR 0407-(1-7)-7-1 y cuatro del cruce RAZ 75 / EAP 9503-32A para las plantas de color rojo, tres provinieron del cruce PR 0301-179 / SMARC PN1 #2 y dos del cruce X069-157-8-5-2-5 / SMARC PN1 #2 para las líneas blancas (Cuadro 13). Todas fueron homocigotos para la presencia de Arcelina 1 y el marcador de *bgm*. Se pretende seguir trabajando en el futuro con estas líneas en Haití en el programa de mejoramiento de habichuela.

Cuadro 13. Líneas rojo F<sub>2:3</sub> y blanca F<sub>3:4</sub> homocigotos para la presencia de Arcelina 1 y el marcador SR2 de *bgm*

Identidad	Pedigrí	SR2	Arcelina 1
CB-GH-1-1-2-1	RAZ 105 / PR0407-(1-7)-7-1 -F <sub>2</sub>	homocigoto	homocigoto
CB-GH-1-1-5-2	"	"	"
CB-GH-1-2-12-1	"	"	"
CB-GH-2-2-17-2	RAZ 75 / EAP 9503-32A - F <sub>2</sub>	"	"
CB-GH-2-3-21-2	"	"	"
CB-GH-2-3-22-1	"	"	"
CB-GH-2-3-30-2	"	"	"
0702-2-1	PR 0301-179 / SMARC PN1 #2	"	"
0702-3-3	"	"	"
0702-5-1	"	"	"
0702-9-4	X069-157-8-5-2-5 / SMARC PN1 #2	"	"
0702-9-6	"	"	"

Además, se encontró 28 otras plantas prometedoras entre las cuales 8 fueron heterocigotos para la presencia de Arcelina 1 y el marcador SR2, ocho (8) heterocigotos también para Arcelina 1 pero homocigotos para SR2 y doce (12) homocigotos para Arcelina 1 y heterocigotos para SR2 (Anexo 4). De hecho, estas líneas también podrán ser muy útiles y se podrá desarrollar plantas resistentes al BGYMV y a los insectos en la próxima generación.

## Conclusión

En esta investigación se desarrollaron líneas de habichuela con resistencia a enfermedades e insectos mediante el uso de marcadores moleculares y métodos convencionales de fitomejoramiento. Se usaron los cruces 'Salagnac 90A / PR 04047-(1-7)-6-1' y 'Salagnac 90A / PR 0407-(45-58)-18-1' para desarrollar plantas resistentes al oidium que tienen los genes *bgm*, *I* y *bc3*. Todas las plantas F<sub>2</sub> de estos dos cruces mostraron el mismo patrón de segregación de susceptibilidad o de resistencia ante el oidium y la gran mayoría de estas plantas fueron resistentes. Por lo tanto, se infiere que un o más genes dominantes confieren resistencia a esta enfermedad. Se encontró 134 líneas con la presencia del gene *I* para resistencia al BCMV. Todas las líneas resistentes al BCMNV fueron derivadas del cruce 'PR0407-(1-7)-6-1 / Salagnac 90A'. Seis líneas combinaron la presencia de los genes *bc3* y *bgm-1* y la línea S58-2-2 fue seleccionada como la más prometedora. Fue resistente al oidium, al mosaico dorado y al mosaico común además de producir un rendimiento promedio de 1813 kg/ha en Salagnac, Haití; mayor que el rendimiento promedio de Salagnac 90A. Se pretende usar estas líneas como progenitores en el programa de mejoramiento de habichuela de Haití.

Se evaluaron también plantas de los cruces 'RAZ 105 / PR 0407-(1-7) -7-1', 'RAZ 75 / EAP 9503-32A', 'PR 0301-179 / SMARC PN1 #2', 'PR 0066-6 / SMARC PN1 #2' y 'X069-157-8-5-2-5 / SMARC PN1 #2' para detectar las con el gen *bgm* y la presencia de la proteína Arcelina. Se encontró 12 plantas que combinan resistencia al mosaico dorado amarillo y a los gorgojos. Todas fueron homocigotas para la presencia de Arcelina 1 y el marcador SR2 para *bgm*. Se pretende incrementar semillas de estas líneas importantes en la Estación Experimental de Isabela de la Universidad de Puerto Rico.

Así, tendremos semillas muy valiosas de diferente color y tamaño para reforzar nuestro programa de mejoramiento en Haití.

## Literatura Citada

- Acevedo, R.M., Molina, C.A., Ángel Sánchez, J.C., Muñoz, C.G. and Beaver, J.S. 2004. Inheritance of normal pod development in bean golden yellow mosaic resistant common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129 (4): 549-552.
- Acosta-Gallegos JA, Quintero C, Vargas J, Toro O, Tohme J, Cardona C. 1998. A new variant of arcelin in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from southern Mexico *Genetic Resources and Crop Evolution* 45(3):235-242.
- Adames-Mora, C., Beaver, J. S., Diaz, O. 1996. Una metodología de evaluación del virus del mosaico dorado de habichuela en el invernadero. *Journal of Agricultura of the University of Puerto Rico* 80: 65-72.
- Balthazar, S. 1978. Les viroses du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*,L.) en Haiti. *FAMV. Damien. Haiti.* 25p.
- Beaver, J. S., Rosas, J. C. 2003. Investigación colaborativa de fríjol en Centro América y el Caribe, p19-24. *Actas del III Seminario de Judía de la Península Ibérica de la Asociación Española de Leguminosas realizada en Lourená, Lugo, España el 3 y 4 de Octubre.*
- Beaver, J.S., Rosas, J. C. 2005. Investigación colaborativa de fríjol en Centroamérica y el Caribe. <http://phaselieu.cesga.es/Beaver.pdf> (Verificado 16 de septiembre de 2007).
- Beaver, J.S., Rosas, J.C. Myers, J., Acosta, J., Kelly, J. D., Nchimbi-Msolla, S., Misangu, R., Bokosi, J., Temple, S., Arnaud-Santana, E. and Coyne, D. P. 2003. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. *Field Crops Research* 82 (2-3): 87-102.

Beaver, J.S. 2006. Conjunto tecnológico de Habichuela.

<http://academic.uprm.edu/jbeaver/> (Verificado 22 de noviembre de 2006).

Beaver, J. S. and Miklas, P. N. 1999. Notice of naming and release of Morales, a bean golden mosaic resistant small white bean cultivar for Puerto Rico. Ann. Rep. of the Bean Improv. Coop. 42:237.

Beebe, S., Quintero, C. M., Tohme, J. and Teran, H. 1999. Selection of an important gene for BGMV resistance using MAS. Annual report, Project IP1: Bean improvement for sustainable productivity input use efficiency, and poverty alleviation. CIAT. p. 37-39.

Bett, K. E. and Michaels, T. E. 1995. A two-gene model for powdery mildew resistance in common bean. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 38: 145-146.

Blair, M. W. and Beaver, J. S. 1993. Inheritance of bean golden mosaic virus resistance from genotype A 429. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 36: 143.

Blair, M. W., Rodriguez, L. M., Pedraza, F., Morales, F. and Beebe, S. 2006. Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*,L.)

Cardona, C., Flor, C. A. Morales, F. J. and Pastor Corrales, M. A.1982. Problemas de campo en los cultivos de frijol en América Latina. 2a. ed. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 184p.

Cardona, C., Dick, K., Posso, C. E., Ampofo, K. and Nadhy, S. M. 1992. Resistance of a common bean (*Phaseolus vulgaris*,L.) cultivar to post-harvest infestation by *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) 2. Storage test. Trop. Pest Manage. 38: 173-175.

- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 2002. CIAT Annual Report – Project IP-1 Bean improvement for the tropics. CIAT, Cali, Colombia.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1987. CIAT. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Aart van Schoonhoven y Marcial A. Pastor-Corrales (comps.). Cali, Colombia. 56p.
- Deutscher, P. M. (ed.) 1990. Guía a la purificación de la proteína. Métodos Enzymol. Vol. 182. Prensa Académica Inc. San Diego, CA.
- Dundas, B. 1936. Inheritance of resistance to powdery mildew in beans. *Hilgardia* 10: 241-253.
- Eilstein, D. 2004. Líneas nuevas de habichuelas con resistencia a la roya y el virus del mosaico común. <http://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2004/041223.es.htm> (Verificada 22 de noviembre de 2006).
- Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2005. FAOSTAT Agriculture Data. <http://www.fao.org>. Statistics (FAOSTAT).
- Fory, L. F., Fuibardu-Filho, F., Quintero, C. M., Osborn, T. C., Cardona, C., Chrispeels, M. J. and Mayer, J. E. 1996. Alpha-amylase inhibitors in resistance of common beans to Mexican bean weevil and the bean weevil (Coleoptera: Bruchidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 204-210.
- Goossens, A., Quintero, C., Dillen, W., De Rycke, R., Valor, J. F., De Clercq, J., Montagu, M. V., Cardona, C. and Angenon, G. 2000. Analysis of bruchid resistance in the wild common bean accession G02771: no evidence for insecticidal activity of arcelin 5. *Journal of Experimental Botany*, 51(348):1229-1236.

- Grusak, M. A., Quintana, J. M., Harrison, H. C., Nienhuis, J. and Palta, J. P. 1996. Variation in calcium concentration among sixty S1 families and four cultivars of snap beans (*Phaseolus vulgaris*,L.). Journal of the American Horticultural Society. 121(5): 789-793.
- InfoStat 2006. Primer software estadístico desarrollado en la Argentina. Versión Estudiantil e.1. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Estadística y Diseño F.C.A. [www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
- Kaiser, J. J. et Melendez, P. L. 1973. Maladies des haricots (*Phaseolus vulgaris*,L.) dans les régions hautes de Fonds-Verrettes et de Jacmel. IICA, Port-au-Prince. Haïti. 21p.
- Kelly, J. D., Hosfield, G. L., Varner, G. V., Ubersax, M. A., Haley, S. D. and Taylor, J. 1994. Registration of Raven black bean. Crop Science 34: 1406-1407.
- Kornegay, J., Cardona, C., Posso, C. E. 1993. Inheritance of resistance to Mexican Bean Weevil in common bean, determined by Bioassay and Biochemical Tests. Crop Science 33: 589-594.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature Vol. 227: 680-685.
- Laraque, J. A. 1986. Contribution à l'étude de la résistance du haricot à l'oidium américain (*Erysiphe polygoni*,D.C.). Mémoire de fin d'études D.A.A. de productions végétales et d'amélioration des plantes. 50pp.
- Lecorps, G. 1983. La mosaïque dorée du haricot. Nature et importance des dégâts. FAMV. Mémoire de sortie, Damien, Haïti. 14p.

- Maxfield, J. E. 1968. Investigations under controlled environment conditions on interactions between *Erysiphe polygoni* D.C. and Southern Bean Mosaic Virus in Bean (*Phaseolus vulgaris*,L.) var. Bountiful and Pinto In Diss. Abstr., 28(7) B: 2686 Cornell Univ.
- Mc Ginnis, L.. 2006. Nuevas judías pintas resisten enfermedades.  
<http://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2006/060612.es.htm> (Verificado 22 de noviembre de 2006).
- Mc Gown, J. 2003. El caso de la reivindicación del gen de frijol Mexicano. Teatro Misterios de Biodiversidad. <http://www.edmonds-institute.org> (Verificado 22 de noviembre de 2006).
- Melotto, M., Afanador, L. and Kelly, J. D. 1996. Development of a SCAR marker linked to the gene *I* in common bean. Genome 39: 1216-1219.
- Mills, L.J. and M.J. Silbernagel. 1992. A rapid screening technique to combine resistance to halo blight and bean common mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* L. Euphytica 58: 201-208.
- Morales, 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, 169p.
- Morales, F. J. 1994. Mosaico dorado del frijol. Avances de Investigación. PROFRIJOL-COSUDE, 193p.

- 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.
- Myers, J. R., Davis, J., Kean, D., Nchimbi-Msolla and Misangu, R. 2001. Backcross breeding to introduce Arcelin alleles into improved African Bean cultivars. Bean Seed Workshop. Arusha, Tanzania. January 12-14.
- Osborn, T.C., L.M. Hartweck, R.H. Harmsen, R.D. Vogelzang, K.A. Kmiecik, and F.A. Bliss. 2003. Registration of *Phaseolus vulgaris* genetic stocks with altered seed protein compositions. Crop Sci. 43: 1570-1571
- Osborn, T.C., Blake, T., Gepts, P. and Bliss, F.A. 1986. Bean arcelin. 2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris*, L.Theor. Appl. Genet. 71: 847-855.
- Osorno, J.M., Beaver, J. S., Ferwerda, F. and Miklas, P.N. 2003. Two genes from *Phaseolus coccineus*, L. confer resistance to bean golden yellow mosaic virus. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 46: 147-148.
- Osorno, J.M. 2003. Herencia de una nueva fuente de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo de la habichuela (*Phaseolus vulgaris*,L.). Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez. 68p.
- Pastor-Corrales, M.A., J.R. Stavely, J.D. Kelly, K.F. Grafton, J.R. Steadman, D.P. Coyne, D.T. Lindgren and B.T. Scully. 2001. Rust and mosaic resistant bean germplasm releases 1997-1999. ANN. Rep. of the Bean Improv. Coop. 44:101-102.

- Pierre, R.E. 1975. Observations on the golden mosaic of bean (*Phaseolus vulgaris*,L.) in Jamaica. p. 50-55. En: Tropical diseases of legumes. J. Bird y Maramorosch (Eds) Academic Press, N. Y.
- Rezende, V. F., Ramalho, M. A. P. and Corte, H. R. 1999. Genetic control of common bean (*Phaseolus vulgaris*,L.) resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*). Genetics and Molecular Biology, 22(2): 233-236.
- Segura, Y., Arias, J., Godoy-Lutz, G. y Miklas, P. 2002. Presencia y caracterización de virus del mosaico necrótico común del fríjol en parcelas de productores y lotes de semilla básica y artesanal en el suroeste de la Republica Dominicana. Resúmenes de XLVIII Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales. 14-20 abril 2002. Boca Chica, Republica Dominicana.
- Singh, S. P., Morales, F. J., Miklas, P. N. and Terán, H. 2000. Selection for bean golden mosaic resistance in intra and interracial bean populations. Crop Science 40, 1565-1572.
- Spencer, D. M. 1978 . The powdery mildews Academic Press. 565 pp.
- Suszkwi, J. 2003. Método nuevo ayudará a cultivar nuevas variedades de habichuelas resistentes a enfermedades. <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/may03/dna0503.htm> (Verificado 3 de noviembre de 2006).
- Turenne, H. 1982. Essai de lutte chimique contre la mouche blanche (*Bemisia tabaci*: Homoptera, Aleyrodidae) dans la culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*,L.) Bull. Agri. No. 35 Damien, Haïti, p 21-22.

Urrea, C. A., Miklas, P., Beaver, J. and Riley, R. 1996. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121(6): 1035-1039.

Vakili, N. 1973. Bean (*Phaseolus vulgaris*,L.) diseases encountered in Haitian lowlands. IICA. Port-au-Prince. Haiti. 9p.

Velez, J., Bassett, M. J., Beaver, J. S. and Molina, A. 1998. Inheritance of resistance to bean golden mosaic virus in common bean. *Journal of American Society Hort. Sci.* 123(4): 628-631.

## **Anexos**

## Anexo 1

Anexo 1. Evaluación de líneas de frijol rojo moteado F<sub>2</sub> en invernadero para Oidium

	Identidad	Fuente	Oidium <sup>1</sup>
Pot-1	S-1-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-1-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-2	S-2-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-2-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-3	S-3-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-3-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-4	S-4-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
	S-4-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-5	S-5-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	4
	S-5-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-6	S-6-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	4
	S-6-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-7	S-7-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-7-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-8	S-8-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
	S-8-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-9	S-9-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-9-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-10	S-10-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	4
	S-10-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-11	S-11-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
	S-11-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-12	S-12-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-12-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-13	S-13-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-13-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-14	S-14-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-14-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-15	S-15-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-15-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-16	S-16-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-16-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-17	S-17-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-17-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-18	S-18-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-18-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-19	S-19-1	Salagnac 90A	2
	S-19-2	Salagnac 90A	3
Pot-20	S-20-1	PR 0407-(1-7)-6-1 (bgm-1, I, bc3)	1
	S-20-2	PR 0407-(1-7)-6-1 (bgm-1, I, bc3)	1
Pot-21	S-21-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-21-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1

	Identidad	Fuente	Oidium <sup>1</sup>
Pot-22	S-22-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-22-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-23	S-23-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	4
	S-23-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-24	S-24-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-24-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-25	S-25-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-25-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-26	S-26-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
	S-26-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-27	S-27-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-27-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-28	S-28-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-28-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-29	S-29-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
	S-29-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-30	S-30-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-30-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-31	S-31-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-31-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-32	S-32-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-32-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-33	S-33-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-33-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-34	S-34-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-34-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-35	S-35-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-35-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-36	S-36-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-36-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-37	S-37-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
	S-37-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-38	S-38-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-38-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-39	S-39-1	Salagnac 90A	1
	S-39-2	Salagnac 90A	3
Pot-40	S-40-1	PR 0407-(1-7)-6-1 (bgm-1, I, bc3)	1
	S-40-2	PR 0407-(1-7)-6-1 (bgm-1, I, bc3)	7
Pot-41	S-41-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-41-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-42	S-42-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-42-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-43	S-43-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-43-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-44	S-44-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	8
	S-44-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-45	S-45-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1

	Identidad	Fuente	Oidium <sup>1</sup>
	S-45-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-46	S-46-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-46-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-47	S-47-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-47-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-48	S-48-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	8
	S-48-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-49	S-49-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
	S-49-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-50	S-50-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-50-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-51	S-51-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-51-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-52	S-52-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-52-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-53	S-53-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
	S-53-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-54	S-54-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
	S-54-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-55	S-55-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
	S-55-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-56	S-56-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-56-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-57	S-57-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
	S-57-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-58	S-58-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-58-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-59	S-59-1	Salagnac 90A	3
	S-59-2	Salagnac 90A	3
Pot-60	S-60-1	PR 0407-(1-7)-6-1 (bgm-1, I, bc3)	1
	S-60-2	PR 0407-(1-7)-6-1 (bgm-1, I, bc3)	1
Pot-61	S-61-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-61-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	3
Pot-62	S-62-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-62-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-63	S-63-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-63-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-64	S-64-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-64-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-65	S-65-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-65-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-66	S-66-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-66-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-67	S-67-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-67-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-68	S-68-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-68-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7

	Identidad	Fuente	Oidium <sup>1</sup>
Pot-69	S-69-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-69-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-70	S-70-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-70-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-71	S-71-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-71-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-72	S-72-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
	S-72-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-73	S-73-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-73-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-74	S-74-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-74-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-75	S-75-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-75-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-76	S-76-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-76-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	7
Pot-77	S-77-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-77-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-78	S-78-1	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
	S-78-2	PR0407-(1-7)-6-1/Salagnac90A	1
Pot-79	S-79-1	Salagnac 90A	1
	S-79-2	Salagnac 90A	1
Pot-80	S-80-1	PR 0407-(45-58)-18-1 (bgm-1, I, bc3)	5
	S-80-2	PR 0407-(45-58)-18-1 (bgm-1, I, bc3)	4
Pot-81	S-81-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-81-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-82	S-82-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-82-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-83	S-83-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-83-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-84	S-84-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-84-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-85	S-85-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
	S-85-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-86	S-86-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-86-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-87	S-87-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-87-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-88	S-88-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-88-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-89	S-89-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	4
	S-89-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-90	S-90-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-90-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
Pot-91	S-91-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
	S-91-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-92	S-92-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1

	Identidad	Fuente	Oidium <sup>1</sup>
	S-92-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-93	S-93-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
	S-93-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
Pot-94	S-94-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
	S-94-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-95	S-95-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-95-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-96	S-96-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-96-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
Pot-97	S-97-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-97-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
Pot-98	S-98-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-98-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-99	S-99-1	Salagnac 90A	1
	S-99-2	Salagnac 90A	1
Pot-100	S-100-1	PR 0407-(45-58)-18-1 (bgm-1, I, bc3)	1
	S-100-2	PR 0407-(45-58)-18-1 (bgm-1, I, bc3)	1
Pot-101	S-101-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
	S-101-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-102	S-102-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
	S-102-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-103	S-103-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-103-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-104	S-104-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
	S-104-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-105	S-105-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-105-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-106	S-106-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
	S-106-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-107	S-107-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-107-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-108	S-108-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-108-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-109	S-109-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-109-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-110	S-110-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
	S-110-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-111	S-111-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-111-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
Pot-112	S-112-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
	S-112-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
Pot-113	S-113-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-113-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-114	S-114-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-114-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-115	S-115-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
	S-115-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7

	Identidad	Fuente	Oidium <sup>1</sup>
Pot-116	S-116-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
	S-116-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-117	S-117-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-117-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	3
Pot-118	S-118-1	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	1
	S-118-2	PR0407-(45-58)-18-1/Salagnac90A	7
Pot-119	S-119-1	Salagnac 90A	1
	S-119-2	Salagnac 90A	1
Pot-120	S-120-1	PR 0407-(45-58)-18-1 (bgm-1, I, bc3)	5
	S-120-2	PR 0407-(45-58)-18-1 (bgm-1, I, bc3)	5
Pot-121	S-121-1	PR 0407-(45-58)-18-1 (bgm-1, I, bc3)	1
	S-121-2	PR 0407-(45-58)-18-1 (bgm-1, I, bc3)	1

## Anexo 2

Anexo 2. Líneas heterocigotos para el marcador de *bgm*

Identidad	Pedigrí	Planta	SR2
CB-GH-1-1-5-1	RAZ 105 / PR0407-(1-7)-7-1- F <sub>2</sub>	1	heterocigoto
CB-GH-1-1-8-2	"	2	heterocigoto
CB-GH-1-2-14-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-1-2-15-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-2-1-2-1	RAZ 75 / EAP 9503-32A - F <sub>2</sub>	1	heterocigoto
CB-GH-2-1-4-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-2-1-4-2	"	2	heterocigoto
CB-GH-2-1-5-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-2-1-5-2	"	2	heterocigoto
CB-GH-2-1-8-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-2-2-13-2	"	2	heterocigoto
CB-GH-2-2-14-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-2-2-14-2	"	2	heterocigoto
CB-GH-2-2-15-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-2-2-17-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-2-2-18-2	"	2	heterocigoto
CB-GH-2-3-20-2	"	2	heterocigoto
CB-GH-2-3-22-2	"	2	heterocigoto
CB-GH-2-3-28-1	"	1	heterocigoto
CB-GH-2-3-29-1	"	1	heterocigoto

## Anexo 3

Anexo 3. Líneas heterocigotos para la presencia de Arcelina 1

Identidad	Pedigrí	Arcelina 1
CB-GH-1-1-4-1	RAZ 105 / PR0407-(1-7)-7-1- F <sub>2</sub>	heterocigoto
CB-GH-1-1-5-1	"	heterocigoto
CB-GH-1-1-9-1	"	heterocigoto
CB-GH-1-1-10-1	"	heterocigoto
CB-GH-1-2-15-2	"	heterocigoto
CB-GH-1-2-18-1	"	heterocigoto
CB-GH-1-3-22-1	"	heterocigoto
CB-GH-1-3-27-1	"	heterocigoto
CB-GH-2-1-1-2	RAZ 75 / EAP 9503-32A - F <sub>2</sub>	heterocigoto
CB-GH-2-1-2-1	"	heterocigoto
CB-GH-2-1-4-1	"	heterocigoto
CB-GH-2-1-4-2	"	heterocigoto
CB-GH-2-1-5-2	"	heterocigoto
CB-GH-2-2-13-2	"	heterocigoto
CB-GH-2-2-14-1	"	heterocigoto
CB-GH-2-2-15-1	"	heterocigoto
CB-GH-2-3-20-2	"	heterocigoto
CB-GH-2-3-22-2	"	heterocigoto
CB-GH-2-3-28-1	"	heterocigoto
CB-GH-2-3-29-1	"	heterocigoto
0702-1-2	PR 0301-179 / SMARC PN1 #2	heterocigoto
0702-1-3	"	heterocigoto
0702-1-4	"	heterocigoto
0702-1-5	"	heterocigoto
0702-2-2	"	heterocigoto
0702-2-3	"	heterocigoto
0702-2-4	"	heterocigoto
0702-3-1	"	heterocigoto
0702-3-2	"	heterocigoto
0702-4-1	"	heterocigoto
0702-4-2	"	heterocigoto
0702-4-3	"	heterocigoto
0702-5-2	"	heterocigoto
0702-6-4	"	heterocigoto
0702-9-3	X069-157-8-5-2-5 / SMARC PN1 #2	heterocigoto
0702-9-5	"	heterocigoto
0702-10-1	"	heterocigoto
0702-10-2	"	heterocigoto
0703-20-2	PR 0066-6 / SMARC PN1 #2	heterocigoto
0703-20-3	"	heterocigoto
0703-20-4	"	heterocigoto
0703-22-1	"	heterocigoto

## Anexo 4

Anexo 4. Líneas prometedoras para la presencia de Arcelina 1 y el marcador de *bgm*

Identidad	Pedigrí	SR2	Arcelina 1
CB-GH-1-1-4-1	RAZ 105 / PR0407-(1-7)-7-1 -F <sub>2</sub>	homocigoto	heterocigoto
CB-GH-1-1-5-1	"	heterocigoto	heterocigoto
CB-GH-1-1-8-2	"	heterocigoto	homocigoto
CB-GH-1-1-9-1	"	homocigoto	heterocigoto
CB-GH-1-1-10-1	"	homocigoto	heterocigoto
CB-GH-1-2-14-1	"	heterocigoto	homocigoto
CB-GH-1-2-15-2	"	homocigoto	heterocigoto
CB-GH-1-2-18-1	"	homocigoto	heterocigoto
CB-GH-1-3-22-1	"	homocigoto	heterocigoto
CB-GH-1-3-27-1	"	homocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-1-1-2	RAZ 75 / EAP 9503-32A - F <sub>2</sub>	homocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-1-2-1	"	heterocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-1-4-1	"	heterocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-1-4-2	"	heterocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-1-5-2	"	heterocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-2-13-2	RAZ 75 / EAP 9503-32A - F <sub>2</sub>	heterocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-2-14-1	"	heterocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-2-14-2	"	heterocigoto	homocigoto
CB-GH-2-2-15-1	"	heterocigoto	heterocigoto
CB-GH-2-2-17-1	"	heterocigoto	homocigoto
CB-GH-2-2-18-2	"	heterocigoto	homocigoto
0702-1-1	PR 0301-179 / SMARC PN1 #2	heterocigoto	homocigoto
0702-5-3	"	heterocigoto	homocigoto
0702-6-3	"	heterocigoto	homocigoto
0702-9-1	X069-157-8-5-2-5 / SMARC PN1 #2	heterocigoto	homocigoto
0702-9-2	"	heterocigoto	homocigoto
0703-20-1	PR 0066-6 / SMARC PN1 #2	heterocigoto	homocigoto
0703-22-2	"	heterocigoto	homocigoto

## Anexo 5

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE HABICHUELA

**\*SIEMBRA:** Escarificar 5 semillas de cada muestra a evaluar y colocarlas en papel toalla con algodón húmedo. Germinar en oscuridad (7-8 días después de siembra).

**COSECHA:** Cosechar primordios foliares y colocar en tubo Eppendorf y almacenar a -80°C.

\* Puede sustituirse por cosecha de 0.1g de tejido vegetal joven (12 días después de siembra).

1. Calentar baño Maria a 65°C.
2. Preparar Buffer de extracción (hasta 72 muestras):
  - 7.5 ml de Tris- HCL pH 8.0 (1M) de concentración 150 mM
  - 1.5 ml de EDTA pH 8.0 (0.5M) de concentración 15 mM
  - 10 ml de NaCl (5M) de concentración 1M
  - 0.5g de CTAB de concentración 1%
  - 30.25 ml de Agua Destilada
3. Mezclar bien Buffer de extracción en un frasco (vaso) pequeño con tapa y colocar en baño caliente a 65°C por 10 minutos.
4. Manejar las muestras de habichuela en hielo en tubos Eppendorf de 1.5 ml.
5. Añadir 200µl de Buffer a 65°C a cada tubo antes de macerar.
6. Añadir 400 µl de Buffer a 65°C después de estar todas las muestras maceradas.
7. Calentar en baño caliente por 15 minutos a 65°C, agitar y colocar por 15 minutos adicionales → FLOTADOR!
8. Añadir 600 µl de Cloroformo-Isoamil 24:1 a cada muestra.

9. Mezclar por 15 minutos mediante inmersión.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
11. Extraer 450  $\mu$ l de sobrenadante y pasarlo en tubos nuevos Eppendorf de 1.5 ml identificados previamente y botar los tubos viejos.
12. Añadir 400  $\mu$ l de Isopropanol muy frío (-20°C).
13. Mezclar por inmersión agitando suavemente durante 5 minutos.
14. Guardar las muestras a -20°C durante toda la noche o por lo menos durante dos (2) horas.
15. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
16. Descartar (botar) todo el sobrenadante sin perder el pellet que se encuentra en el fondo de cada tubo.
17. Dejar secar los pellets por 15 minutos boca abajo sobre toalla de papel.
18. Lavar los pellets en 500  $\mu$ l de Etanol frío (70%) en cada tubo.
19. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
20. Descartar el Etanol y secar otra vez los tubos boca abajo por 15 minutos sobre otra toalla de papel.
21. Resuspender los pellets en 100  $\mu$ l de solución de Agua Sigma.
22. Colocar de nuevo las muestras en baño caliente a 65°C durante 15 minutos.
23. Preparar tubos nuevos más pequeños y poner 2  $\mu$ l de ADN de cada muestra en 98  $\mu$ l de Agua Sigma.
24. Guardar el resto (98  $\mu$ l de ADN de cada muestra) en la nevera a 4°C hasta el próximo uso.
25. Leer las concentraciones de ADN de cada muestra.

## Anexo 6

Anexo 6. Escala general para evaluar la reacción del germoplasma de frijol a patógenos bacterianos y fungos

Calificación	Categoría	Descripción	Comentarios
1	Resistente	Síntomas no visibles o muy leves	Germoplasma útil como progenitor o variedad comercial
2			
3			
4	Intermedio	Síntomas visibles y conspicuos que solo ocasionan un daño económico limitado	Germoplasma utilizable como variedad comercial o como fuente de resistencia a ciertas enfermedades
5			
6			
7	Susceptible	Síntomas severos a muy severos que causan pérdidas considerables en rendimiento o la muerte de la planta	En la mayoría de los casos, germoplasma no útil, ni aun como variedad comercial
8			
9			

## Anexo 7

Anexo 7. Escala general de evaluación para enfermedades virales

Calificación	Síntomas	Incidencia (%)	Rendimiento
1	Ausentes	0	Excelente
2	Dudosos	1-10	
3	Debiles	11-25	Bueno
4	Moderados	26-40	
5	Intermedios	41-60	Intermedio
6	Generales	61-75	
7	Intensos	76-90	Escaso
8	Severos	91-99	
9	Muerte	100	Muy escaso