

**Estudio de la herencia de los altos niveles de resistencia al tizón bacteriano,
causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, en el frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

Por

Marcelino Santiago Guachambala Cando

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
2013

Aprobada por:

Mildred Zapata, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Timothy Porch, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

James Beaver, Ph. D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Skip Van Bloem, Ph. D.
Director del Departamento

Fecha

Rene Vieta, Ph. D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

ABSTRACT

Common bacterial blight caused by the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) is an important biotic factor limiting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production. A few bean breeding lines such as VAX 6 exhibit a high level of resistance to a wide range of *Xap* strains representing different pathogenic races. In this study, the inheritance of high levels of resistance to common bacterial blight with the pathogenic strain *Xap* UPR 3353 was evaluated in a population derived from a cross between breeding lines PR0313-58, which has moderate levels of resistance and VAX6, which has high levels of resistance to common bacterial blight. The genetics of resistance to *Xap* 3353 was studied using generation means analysis and Chi-square tests in the F₂ and F₃ generations. SCAR markers SAP6, SU91 and SU91-CG11 were evaluated, to detect possible cosegregation with high levels of resistance. Common bacterial blight evaluations were conducted in the field and in a greenhouse on F₂ plants and F_{2,3} lines. The results suggest that in this population two putative dominant genes confer high levels of resistance to bacterial blight caused by strain *Xap* UPR 3353. White and black bean lines that combine high levels of common bacterial blight resistance, heat tolerance and resistance to BGYMV and BCMV virus were identified in this study. The DNA was extracted from F₂, F₃ and F₄ plants and subsequently diagnosed for the presence or absence of SU91 and SU91-CG11 SCAR markers. There was no consistent cosegregation with plants that showed high levels of resistance. Therefore, there is a need to identify molecular markers that can facilitate the selection of these dominant genes that confer high levels of bacterial blight resistance.

RESUMEN

El tizón bacteriano común causado por el patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), es un factor biótico importante que limita la producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Pocas líneas mejoradas de frijol, tales como VAX 6, muestran un alto grado de resistencia a una amplia gama de cepas de *Xap*. En el presente estudio, la herencia a altos niveles de resistencia al tizón bacteriano, con la cepa patógena *Xap* UPR 3353, fue evaluada en una población derivada de un cruce entre las líneas mejoradas PR0313-58, que muestra niveles moderados de resistencia y VAX6, con altos niveles de resistencia al tizón bacteriano. Este estudio genético de la resistencia a la cepa *Xap* UPR 3353 se realizó por medio de un análisis de medias generacionales y pruebas de Chi-cuadrado para determinar los patrones de herencia en las generaciones F₂ y F₃. Los marcadores moleculares SAP6, SU91 y SU91-CG11 fueron diagnosticados para tratar de detectar una cosegregación con los altos niveles de resistencia. Se llevaron a cabo evaluaciones en el campo y el invernadero de la reacción al tizón bacteriano de plantas F₂ y líneas F₃ derivadas del cruzamiento entre PR0313-58 y VAX 6. Los resultados sugieren que en esta población dos genes dominantes confieren los altos niveles de resistencia al tizón bacteriano causada por la cepa de *Xap* UPR 3353. En el presente estudio se identificaron líneas blancas y negras de frijol que combinan: altos niveles de resistencia al tizón bacteriano, la tolerancia al calor, la resistencia a los virus *BGYMV* y *BCMV*. El ADN de las plantas de las generaciones F₂, F₃ y F₄ fue extraído y posteriormente diagnosticado para la presencia o ausencia de los marcadores *SCAR* SU91 y SU91-CG11. No se observó una cosegregación consistente entre los marcadores y las plantas que mostraron los altos niveles de resistencia. Por lo tanto, hay una necesidad de identificar marcadores moleculares que pueden facilitar la selección de estos genes dominantes que confieren altos niveles de resistencia al tizón bacteriano.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, Señor y Dador de vida.

A mis Padres: Gloria Inés y Luis Nelson.

A mi Hermana Mirta Armenia y a toda mi Familia.

A mis Profesores, Mentores y a mis Amigos.

AGRADECIMIENTOS

Durante mi estadía en Puerto Rico y durante mis estudios graduados en la Universidad de Puerto Rico-Mayagüez, muchas personas e instituciones han colaborado en mi formación profesional y humana. Quiero agradecerles su apoyo, confianza y cariño ya que sin ello no hubiese podido alcanzar mis objetivos.

En primer lugar agradezco sincero y humildemente a mis asesores: Dr. James Beaver, Dr. Timothy Porch y a la Dra. Mildred Zapata, por su guía, tutoría, consejos, apoyo y confianza en Mí, para continuar con mis estudios. He aprendido mucho en lo académico, profesional, intelectual y humano, siempre les estaré muy agradecido.

Un especial agradecimiento a mis colegas y amigos: Ana Negrete, Pablo Vargas, Laura Lara, Abel Almeida, Yolima Arenas, Olga Gonzales y Jorge Caicedo, por su apoyo, ánimo y por su ayuda en las inoculaciones en campo y en invernadero. Sea grato el agradecimiento también a Abraham Montes y Abiezer Gonzales, por su ayuda en el manejo de los ensayos en campo.

A todo el personal de la Estación de Investigación de Agricultura Tropical *USDA-ARS-TRAS*, por su apoyo, facilidades y cálida acogida para con mi persona y mis proyectos.

Al proyecto: *Dry Grain Pulse Collaborative Research Support Program (CRSP)* por el financiamiento para el presente estudio.

LISTA DE CONTENIDO

ABSTRACT.....	i
RESUMEN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE APENDICES	ix
I-INTRODUCCION.....	1
II-OBJETIVOS.....	2
III- REVISION DE LITERATURA.....	3
IV- MATERIALES Y METODOS.....	14
V- RESULTADOS Y DISCUCION.....	23
REFERENCIAS.....	42
APENDICES.....	50

LISTA DE TABLAS

Tablas		Páginas
Tabla 1.	Cultivares y germoplasma mejorados, identificados como fuentes de resistencia al tizón bacteriano.	11
Tabla 2.	Correlaciones fenotípicas entre los promedios de las tres lecturas (14, 21 y 28 días después de la inoculación) en la generación F ₂ sembrada en los invernaderos de la Finca Alzamora.	23
Tabla 3.	Promedios de las lecturas de reacción al tizón bacteriano a los 21 días después la inoculación de las seis generaciones (P ₁ , P ₂ , F ₁ , F ₂ , BC ₁ y BC ₂) sembradas en los invernaderos de la Finca Alzamora.	24
Tabla 4:	Frecuencias y medias (en paréntesis) de las seis generaciones evaluadas bajo condiciones de invernadero en la Finca Alzamora, Mayagüez, PR, a los 21 DDI.	26
Tabla 5.	Análisis de χ^2 para la el patrón de dos genes dominantes basado en la reacción al tizón bacteriano causada por la cepa de <i>Xap</i> UPR 3353 en la población F ₂ .	27
Tabla 6.	Segregación en la generación F ₃ dentro de las familias resistentes y susceptibles bajo las condiciones de invernadero en el <i>USDA-ARS-TARS</i> .	29
Tabla 7.	Listado de las de las familias of F _{2:3} seleccionadas para la prueba de progenie.	30
Tabla 8.	Segregación de las familias F _{2:3} resistentes y susceptibles bajo condiciones de campo en la subestación de Isabela.	32
Tabla 9.	Patrón de segregación en las familias de la generación F ₃ en el invernadero de <i>TARS</i> en Mayagüez, PR y en el campo en Isabela, PR.	34
Tabla 10.	Pruebas de Chi-cuadrado para el patrón de segregación esperado en las familias F _{2:3} con genotipo R1/R1 R2/r2 o R1/r1 R2/R2 de la prueba de progenie, sembradas en el invernadero de <i>TARS</i> .	34
Tabla 11.	Valores de los coeficientes <i>a</i> , <i>d</i> y de las varianzas genéticas de las medias fenotípicas para las seis generaciones (modificado de Kearsey y Pooni, 1996) evaluadas en los invernaderos de la Finca Alzamora.	35
Tabla 12.	Matriz codificada de coeficientes para la estimación de las varianzas δ^2_A (<i>parm</i> 1), δ^2_D (<i>parm</i> 2) y δ^2_{AD} (<i>parm</i> 3) modificada de Piepho y Mohring (2010).	36
Tabla 13.	Separación de medias de las generaciones sembradas en la Finca Alzamora con base en el análisis de medias generacionales (<i>GMA</i>).	37
Tabla 14.	Prueba F para el modelo aditivo-dominante tipo <i>Wald</i> , que incluye la prueba de ajuste (prueba escalonada conjunta <i>joint scaling test</i>) del <i>GMA</i> de las seis generaciones evaluadas en los invernaderos de la Finca Alzamora.	38

Tabla 15.	Líneas seleccionadas que combinan la alta resistencia al tizón bacteriano, al virus del mosaico dorado amarillo <i>BGYMV</i> , al virus del mosaico común <i>BCMV</i> y la tolerancia a altas temperaturas.	41
-----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Páginas
Figura 1.	Diseño experimental: Diseño de bloques completos al azar. Genotipos distribuidos en dos invernaderos, en tres bloques con seis parcelas cada uno, las parcelas representan las seis generaciones compuestas de: siete plantas de PR0313-58, siete plantas de VAX 6, cuatro plantas de la generación F ₁ , 45 plantas de la F ₂ , cuatro plantas de la BC ₁ dos plantas de la BC ₂ .	16
Figura 2.	Metodología de inoculación de <i>Xap</i> de acuerdo a Zapata (2006). A) Inoculación utilizando puntas de micropipeta impregnadas con el cultivo puro bacteriano. B) Trifolio central dividido a la mitad, donde, el lado izquierdo es la zona de control y el lado derecho corresponde a la zona inoculada con el cultivo bacteriano de <i>Xap</i> UPR 3353. C) Tres primeras hojas trifoliadas consecutivas fueron elegidas en cada planta.	17
Figura 3.	A) Diagrama de avance sistémico de la infección en el trifolio central. B) Escala de evaluación a la respuesta de la hoja trifoliada de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. a la inoculación con <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> cepa UPR 3353 bajo condiciones de invernadero (con base en Zapata <i>et al.</i> , 2011).	18-19
Figura 4.	Rango de las reacciones observado en las seis generaciones inoculadas con la cepa <i>Xap</i> UPR 3353 a los 21 días después de la inoculación.	24

LISTA DE APENDICES

Apéndices		Páginas
Apéndice 1.	Resultados de los análisis de varianzas de las tres lecturas de las seis generaciones a los 14, 21, 28 días después de la inoculación.	50
Apéndice 2.	Patrón de datos organizados para el <i>GMA</i> de acuerdo a Piepho y Mohring (2010).	51
Apéndice 3.	Resultados del diagnóstico molecular para los marcadores <i>SCAR</i> SU91 y SU91-CG11 en las seis generaciones (219 genotipos).	52
Apéndice 4.	Restante de líneas seleccionadas que combinan la alta resistencia al tizón bacteriano, al virus del mosaico dorado amarillo <i>BGYMV</i> , al virus del mosaico común <i>BCMV</i> y la tolerancia a altas temperaturas.	53

INTRODUCCIÓN

El tizón bacteriano del frijol causado por las bacterias Gram negativas *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ([Smith][Dye] Vauterin *et al.* 1995) (*Xap*) y *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. ([Burkholder] Alavi *et al.* 2008), es una de las enfermedades más importantes que limitan la producción del cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en muchas regiones a nivel mundial. Esta enfermedad puede ocasionar pérdidas en producción de entre 20 a 60% (Lema-Márquez *et al.*, 2007).

El tizón bacteriano, es una enfermedad portada por las semillas, pero que también puede ser transmitida por diversos factores como: los mismos agricultores, residuos de cosecha infectados, lluvias, insectos, maquinaria agrícola y sistemas de riego contaminados (Lema-Márquez *et al.*, 2007; Rosas, 2003). La variabilidad en la virulencia de las cepas de *Xap* se ha observado en aislados bacterianos de diferentes regiones de producción de frijol, tales como: Cuba, República Dominicana, Puerto Rico y Centroamérica (Lema-Márquez *et al.*, 2007; Zapata, 2006).

Algunas accesiones de germoplasma de frijol y líneas de mejoramiento, han mostrado reacciones diferenciales a ciertas cepas de *Xap*. Estos resultados sugieren la existencia de razas patogénicas. Los estudios sobre la herencia de la resistencia a cepas de *Xap* ayudan a desarrollar estrategias más efectivas para el mejoramiento de la resistencia al tizón bacteriano y puede ayudar con la identificación de marcadores moleculares más específicos para genes de resistencia que pueden ser utilizados en la selección asistida por marcadores (SAM).

En este estudio, la herencia de los altos niveles de resistencia al tizón bacteriano de la línea mejorada de frijol VAX 6, resistente a la cepa patogénica de *Xap* UPR 3353, fue evaluada en una población derivada de un cruce con la línea mejorada PR0313-58, una línea moderadamente resistente.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta investigación fueron:

1. Estudiar la herencia y posiblemente identificar gen o genes putativos que confieren alto nivel de resistencia al tizón bacteriano.
2. Estudiar la eficacia de los marcadores moleculares *SCAR* SU-91 y SU91-CG11 para identificar plantas con altos niveles de resistencia al tizón bacteriano.
3. Desarrollar líneas blancas y negras de frijol que combinen la resistencia al tizón bacteriano, la tolerancia a altas temperaturas y la resistencia a los virus *BGYMV* y *BCMV*.

REVISIÓN DE LITERATURA

El tizón bacteriano (bacteriosis común) del frijol, es causado por dos especies de *Xanthomonas axonopodis* (*Xap*), siendo estas, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ([Smith][Dye] Vauterin *et al.* 1995) y *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. ([Burkholder] Alavi *et al.* 2008).

El tizón bacteriano es una enfermedad sistémica y destructiva, portada por la semilla y está presente en todas regiones productoras de frijol del mundo. En los trópicos, la enfermedad es común en medias y bajas altitudes que tienen temperaturas medias a altas (>28 °C) y alta humedad relativa (Zapata *et al.*, 2011; Rosas, 2003; Msuku *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 1996; Singh, 1992; Melis, 1987;).

Según Lema-Márquez *et al.* (2007) los síntomas de esta enfermedad pueden presentarse en cualquier etapa del desarrollo de la planta y pueden causar pérdidas de rendimiento desde un 20 hasta un 60% de la producción total. Esta enfermedad también pueden reducir la calidad de la semilla y resultar inaceptable para el consumo humano (Yu *et al.*, 2000).

La primera descripción de los síntomas del tizón bacteriano fue hecha por el año 1800 en los Estados Unidos y la razón de la rápida distribución de esta enfermedad en el mundo se puede atribuir a la amplia propagación y distribución de semillas infectadas (Jung *et al.*, 1997). Los síntomas del tizón bacteriano son inicialmente visibles como pequeñas manchas acuosas en los márgenes de las hojas o entre las venas. Las áreas infectadas se secan con el avance de la enfermedad y se vuelven de color marrón (necrosis). Las manchas suelen rodearse por una banda estrecha de tejido clorótico (halo clorótico). Las manchas se agrandan conforme madura la hoja y aumenta el deterioro del tejido foliar. Las hojas muy infectadas pueden convertirse en jirones cuando el viento las azota. En casos graves de infección ya sistémica, las hojas infectadas mueren y permanecen unidas a la planta. En las vainas, las infecciones también comienzan como manchas acuosas, estas lesiones pueden tornarse de un color marrón rojizo en los márgenes o en toda la superficie; a su vez pueden tener un color marrón oscuro y variar en tamaño dependiendo de la edad de la vaina (Mutlu *et al.* 2008; Rosas, 1998; Allen *et al.*, 1996).

El exudado bacteriano puede también estar presente en las lesiones de la vaina, este signo es el principal método de diagnóstico convencional para detectar esta enfermedad. El exudado

eventualmente se seca, dando a la lesión, un aspecto glaseado que es el signo clave de diagnóstico convencional en las inspecciones de campo (Becerra, 2001).

Las semillas contaminadas por *Xap* pueden tornarse arrugadas y descoloridas o asintomáticas si la infección se contrajo en las últimas etapas del cultivo. Las semillas de las variedades blancas infectadas, generalmente muestran un cierto grado de coloración amarilla y brillante (Rosas, 1998; Allen *et al.*, 1996; Zapata *et al.*, 1985).

Las semillas son la principal forma de transmisión del tizón bacteriano. Los residuos de la cosecha a menudo sirven como inóculo primario. La diseminación puede ocurrir en el campo por medio de la lluvia, los sistemas de riego que usan fuentes de agua contaminadas con el patógeno, el viento, el movimiento de personas o de equipo e insectos que circulan por el predio. Debido a que el patógeno puede sobrevivir en las semillas, en los rastrojos de frijol y en los restos de malezas, éstos deben ser recogidos después de la cosecha, para evitar un posterior desarrollo de la enfermedad.

La manera más eficaz de control del tizón bacteriano incluye el uso de buenas prácticas agrícolas (BPA) como: el uso de semilla certificada libre de la enfermedad, rotación de cultivos, manejo de malezas, arado profundo o remoción de escombros y el uso de variedades resistentes. Sin embargo, en muchos países en vías de desarrollo, los agricultores no tienen acceso a semilla certificada libre de la enfermedad y desconocen de las buenas prácticas agrícolas y las opciones de rotación de cultivo para controlar la enfermedad son limitadas (Rosas, 1998; Gilbertson y Maxwell, 1992; Opio *et al.*, 1995; Gilbertson *et al.*, 1991; Saettler, 1989; Saettler *et al.*, 1986).

El control químico, es el tratamiento de las semillas con antibióticos como la estreptomycinina o la aplicación directa a la plantación o a la cosecha, a través de la pulverización foliar con pesticidas a base de cobre como Kocide™ (bactericida-fungicida) para controlar al patógeno. Estas prácticas, sin embargo, son parcialmente eficaces y pueden tener graves consecuencias a largo plazo sobre la salud humana y animal, especialmente para los productores de frijol a pequeña escala de los países en desarrollo (Fininsa, 2003; Forbes y Bretag, 1991).

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* ([Smith][Dye] Vauterin *et al.* 1995) y *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. ([Burkholder] Alavi *et al.* 2008), son especies distintas, identificadas con base en función patogénica, estudios genéticos y en ciertas propiedades bioquímicas y fisiológicas (Abd-Alla *et al.* 2010; Alavi *et al.* 2008; Mutlu *et al.*

2008. López *et al.*, 2006; Rademaker *et al.*, 2005; Mkandawire *et al.*, 2004; Chan y Goodwin 1999; Birch *et al.*, 1997; Goodwin y Sopher 1994; Gilbertson *et al.*, 1991; Hildebrand *et al.*, 1990; Rava y Romeiro 1990; Gilbertson *et al.*, 1989; Lazo *et al.*, 1987; Hayward y Waterston 1965; Sabet 1959).

En: Malawi, Tanzania, África Oriental y en Wisconsin (EE.UU.), algunas *Xanthomonas* de este patógeno asociado al tizón bacteriano, se caracterizaron basadas en la producción de pigmento marrón y en los síntomas de la patogenicidad que mostraron los genotipos de frijol común al ser inoculados con distintas cepas de *Xap* (Zaiter *et al.*, 1989; Schuster, 1983; Valladares-Sánchez *et al.*, 1979; Yoshii *et al.*, 1978; Schuster y Coyne, 1977; Schuster *et al.*, 1973; Schuster y Coyne 1971).

En el 2008 Alavi y colaboradores usando la técnica de F-AFLP lograron diferenciar cepas de estas dos especies de *Xap*, en cuatro grupos de linaje genético diferentes, donde un grupo correspondía a *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. ([Burkholder] Alavi *et al.* 2008) y los otros tres grupos pertenecientes a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ([Smith][Dye] Vauterin *et al.* 1995). Este estudio reveló que hay mayor heterogeneidad en *Xap* pv. *phaseoli* que en *X. fuscans*.

La RAPD-PCR es una manera rápida de diferenciar entre estas dos especies patógenas (Thot *et al.* 1998; Birch *et al.* 1997). La identificación y diferenciación de estos patógenos se ha logrado usando rep-PCR la cual es una PCR de las secuencias repetitivas palíndromas extragenómicas (secuencias REP) con pares de cebadores específicos para *Xap* pv. *phaseoli* o para *Xap* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Mahuku *et al.* 2006). Otra forma de diagnóstico molecular es usando marcadores moleculares tipo RFLPs (fragmentos de longitudes de restricción polimórfica) en los productos de las reacciones de amplificación del gen 16S ribosomal y de los espaciadores intergénicos de la región 16S-23S (Mahuku *et al.* 2006; Schaad *et al.*, 2001; Gabriel *et al.*, 1989). En 2010, He, desarrolló una manera eficiente, práctica y sensible de PCR en tiempo real usando *probes* tipo Taq Man y cebadores modificados que ayudaron a una diferenciación eficiente de estos dos patógenos (He, 2010; He *et al.* 2009).

Se han encontrado cepas de *Xap* pv. *phaseoli* que tienen una mayor variabilidad en la virulencia en el germoplasma de frijol común. Patovares de *Xap* pv. *phaseoli* también han sido

identificados con base en las reacciones diferenciales en genotipos de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* Gray) (Zapata *et al.*, 1985; Zapata 2006, 1998; Singh y Muñoz 1999).

La diversidad genética de *Xap* ha sido identificada en colecciones de diferentes regiones de producción de frijol (Rodríguez-Miranda y Rosas-Sotomayor, 2010; Mkandawire *et al.*, 2004; Zapata 1997, 1996). Zapata (1996) reportó la presencia de razas patogénicas de *Xap* al estudiar la reacción de la enfermedad, con una colección de cepas de *Xap* colectadas en América Central y el Caribe, en un grupo de variedades criollas y mejoradas de frijol común.

Utilizando cepas patógenas de *Xap* provenientes de: Costa Rica, Cuba, República Dominicana y Puerto Rico e inoculándolas en líneas de frijol común se lograron identificar reacciones diferenciales, proporcionando así, la primera evidencia de la interacción patógeno-hospedero en el tizón bacteriano (Zapata, 2006, 1996; Zapata *et al.*, 1985). Las cepas de *Xap* con una reacción positiva y con expresión de síntomas en genotipos diferentes de plantas de la misma especie, indicaron una reacción compatible; mientras que, la respuesta hipersensible y resistente indicaba una reacción incompatible con el hospedero (Zapata y Beaver 2005; Zaumeyer 1930). Estos resultados promovieron más investigaciones sobre la interacción patógeno-hospedero entre frijol común y *Xap* (Zapata *et al.*, 2009; Navarrete-Maya *et al.*, 1996).

La co-evolución entre el agente causal del tizón bacteriano y genotipos de frijol Andinos y Mesoamericanos fue descubierta, proporcionando evidencia adicional de la existencia de genes específicos que contribuyen a la resistencia de esta enfermedad (Zapata *et al.*, 2011; Mkandawire *et al.*, 2004; Zapata, 1996).

La posible existencia de razas patogénicas causantes del tizón bacteriano se discutió en 1996 en el Primer Taller Internacional sobre el tizón bacteriano del frijol, celebrada en Puerto Rico (Zapata *et al.*, 2011). La confirmación de la existencia de razas patogénicas de *Xap* se consideró fundamental para acelerar el desarrollo de cultivares de frijol con mayores niveles de resistencia a esta enfermedad (Coyne *et al.*, 1996).

Por otro lado, se encontró un alto nivel de resistencia al tizón bacteriano en el frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* Gray.), por Coyne y Schuster (1974), Yu *et al.* (1998) y Park *et al.* (1998). También Yu *et al.* (1998) y Miklas *et al.* (1999) reportaron resistencia en el frijol tipo habilla (*Phaseolus coccineus* L.) y en algunas líneas de frijol común. Una herencia de tipo cuantitativa,

fue reportada por Coyne y Schuster en 1974, con algún tipo de efecto de un gen mayor para la resistencia al tizón bacteriano en las líneas mejoradas GN# 1 Sel. 27 y en Montana N° 5.

Estos estudios llevaron a la generación de líneas mejoradas provenientes de cruces interespecíficos para tratar de transferir la resistencia hacia *Phaseolus vulgaris* L. Entre los años de 1978 y 1979 en la Universidad de California, Riverside, Thomas y Waines realizan una combinación de cruces interespecíficas entre líneas mejoradas, cultivares y accesiones silvestres de *Phaseolus vulgaris* L. con cultivares y accesiones silvestres de *Phaseolus acutifolius* Gray (var. *latifolius* y var. *tenuifolius*); posteriormente ciertas líneas de estos cruces fueron evaluados en Puerto Rico (Isabela) y en el Centro Internacional de Agricultura Tropical fueron generadas las líneas XAN 159, XAN 160 y XAN 161 (Thomas y Waines, 1984).

Freytag et al. (1982) generaron la variedad mejorada del frijol común, XR 235-1-1, la cual fue el resultado de la cruce interespecífica entre la línea mesoamericana de *P. vulgaris*, 6-19 y la línea de frijol tipo habilla Pc-H-46-1BK, la cual es una selección de la accesión PI 273667 de *Phaseolus coccineus* (Etiopía), liberada en 1979 como una línea con resistencia múltiple.

En 1985 McElroy, al estudiar la herencia de resistencia al tizón bacteriano de la línea PI 319443, reportó un tipo de herencia cuantitativa con efectos aditivos predominantes y con una ligera dominancia; al observar los datos de resistencia, se sugiere que hay un gen mayor prominente y otros dos genes menores contribuyendo a la resistencia al tizón bacteriano en la accesión de frijol tepari PI 319443.

Parker (1985) realizó una cruce interespecífica entre la accesión de frijol tepari, PI 440795 y la línea de frijol común 'ICA Pijao'. Luego, la generación F₁ fue cruzada con la línea de frijol común "Ex Rico 23" con el fin de mantener caracteres agronómicos deseables de frijol común. Entre los años 1985 y 1987 Scott y Michaels desarrollaron y estudiaron el comportamiento en campo de 20 líneas derivadas de un cruce interespecífico ICA Pijao/PI 440795//Ex Rico 23, las cuales fueron inoculadas en el follaje por una mezcla de cepas de *Xap*, generando seis líneas con alta niveles de resistencia en el campo similar a la de los testigos: 'GN #1 sel. 27', XR235- 1-1-9, XAN 159, XAN 160 y XAN 161 (Scott y Michaels, 1992).

Con el fin de transferir la resistencia al tizón bacteriano de *P. coccineus* a *P. vulgaris*, Park y Dhanvantari en 1987 generaron cuatro poblaciones (C1, C2, C3 y C4) derivadas de la retrocruza de las líneas mejoradas: 'OAC Seaforth', 'Harokent', 'Swan Valley' y C-20 con la F₁

interespecífica de ‘OAC Seaforth’ × PI 165421 (*P. coccineus*). Al realizar las inoculaciones en las hojas y en las vainas pudieron observar que hay una reacción diferencial entre estos dos órganos de la planta.

Silva *et al.* (1989) describió una herencia de la resistencia al tizón bacteriano en hojas trifoliadas y en vainas de las líneas XAN 40 y XAN 112, siendo esta resistencia controlada por un solo gen mayor, llegando a la conclusión que la aditividad seguida de efectos dominantes eran más importantes que las interacciones epistáticas.

En 1993 una línea de frijol tipo habilla de grano pinto rojo pequeño resistente a múltiples enfermedades, fue liberada bajo el nombre de TARS VCI-4B. Dicha línea proviene de la cruce manual entre las líneas Pc-50-1 y Pc-88-1. La línea mejorada Pc-50-1 es una selección de la accesión PI 311977 proveniente de México y la línea mejorada Pc-88-1, fue liberada por la Estación de Investigación de Agricultura Tropical (*USDA-ARS-TARS*) como una línea de resistencia múltiple y es una selección de la accesión PI 311950, proveniente también de México (Miklas *et al.*, 1994). La línea TARS VCI-4B constituye una fuente de resistencia al tizón bacteriano.

En el mismo año se generaron poblaciones interespecíficas con buenos caracteres agronómicos y sumados a la resistencia al tizón bacteriano, donde las cruces entre “ICA Pijao” con G40001 (*P. acutifolius*) y “ICA Pijao” con G40066 (*P. acutifolius*), generaron buen porcentaje de plantas F₁ con la ayuda de la técnica mejorada de rescate de embriones. Mediante la técnica de retrocruza se logró la introgresión de genes provenientes de frijol tepari, sugiriendo que las retrocruzas ayudan a mejorar la hibridación interespecífica entre *Phaseolus vulgaris* L. y *Phaseolus acutifolius* Gray (Mejía-Jiménez *et al.*, 1993). Más tarde, algunas líneas de estas cruces fueron evaluadas y liberadas en CIAT.

Desde el año 1995 hasta el 1997 las líneas mejoradas ICB-3, ICB-6, ICB-8 y ICB-10 fueron evaluadas para las reacciones a 11 cepas de *Xap* provenientes de Guatemala, Honduras, Nicaragua, Puerto Rico, República Dominicana, Costa Rica, El Salvador y Estados Unidos (Miklas *et al.*, 1999). Dichas líneas mostraron resistencia moderada en el invernadero y en el campo. La resistencia se deriva posiblemente del padre ‘GN #1, Sel. 27’ o de Pc-37 (*P. coccineus*).

Yu *et al.* (1998) al estudiar una familia endogámica recombinante, resultado de la cruce de la línea XR-235-1-1 (resistente) con la variedad andina “Calima” (susceptible), reportan cuatro genes para la resistencia al tizón bacteriano causado por la cepa de *Xap* 90-1; dos genes que provienen de la línea XR-235-1-1, los cuales que están ligados, uno a *Bng*40 en el Grupo de Ligamiento (*Linkage Group LG*) *Pv* 1 y el otro a *Bng*139 en el *LG Pv* 6. Los otros dos genes de resistencia se derivan de la variedad ‘Calima’, uno ligado a *Bng*25a en el *LG Pv* 10 y el otro ligado a *Bng*154 también en el grupo *Pv* 10.

Singh y Muñoz (1999) reportaron la liberación de las líneas denominadas: VAX 1, VAX 2, VAX 3, VAX 4, VAX 5 y VAX 6 la cuales fueron generadas por una cruce interespecífica entre el cultivar de frijol común ‘ICA Pijao’ y la accesión de frijol tepari G40001, siendo G40001 una de las fuentes de genes y *QTLs* que confieren resistencia al tizón bacteriano. La introgresión de los genes provenientes de *P. acutifolius* fue verificada por medio de análisis electroforético de proteínas y por medio de marcadores morfológicos (Mejía-Jiménez *et al.*, 1993).

Fitopatólogos y fitomejoradores de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez (RUM) y de la estación federal *TARS*, estudiaron la reacción de genotipos de diferentes razas de *Xap* en genotipos mejorados de frijol, para poder identificar nuevas fuentes de resistencia al tizón bacteriano (Zapata *et al.*, 2011; Zapata *et al.*, 2004). Esta investigación ayudó al desarrollo de las variedades mejoradas de frijol como 'Verano' y 'Badillo' con resistencia al tizón bacteriano (Beaver *et al.*, 2010; 2008).

Experimentos similares se llevaron a cabo en Honduras en el 2007, en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, para evaluar la reacción al tizón bacteriano de 37 líneas de frijol provenientes de Cuba y 27 líneas del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de Zamorano, Honduras. Las evaluaciones se hicieron usando la cepa de *Xap* EAP 9506. En esta investigación se identificaron las líneas de mejoramiento: X0104-45-3-5-5, X104-45-5-1-4 y X104-45-5-5-3, la cuales fueron el resultado de la cruce de las variedades 'Tío Canela 75' × VAX 6. Estas líneas mostraron niveles útiles de resistencia al tizón bacteriano (Rodríguez-Miranda y Rosas-Sotomayor, 2010). Fourie *et al.* (2011) señalaron que el desarrollo y uso de cultivares resistentes es considerada la mejor medida de control del tizón bacteriano.

La interacción planta-patógeno, la naturaleza genética compleja del tizón bacteriano, los factores ambientales y la etapa de desarrollo de la planta junto con el desarrollo de la enfermedad, son factores que constituyen un reto en los programas de mejoramiento de frijol para identificar resistencia al tizón bacteriano (Zapata *et al.*, 2011).

Las líneas mejoradas de frijol común generadas en CIAT: VAX 3, VAX 4, VAX 6 y XAN 159, que derivan su resistencia del frijol tepari, presentan los niveles más altos de resistencia al tizón bacteriano (Singh y Muñoz, 1999). De hecho los genotipos VAX 3, VAX 4 y VAX 6 se han reportado con niveles de resistencia al tizón bacteriano que son tan altos como los que presentan las accesiones de frijol tepari (Muimui *et al.*, 2011).

En la actualidad, no existen otras variedades de frijol común tan resistentes al tizón bacteriano como las líneas mejoradas VAX 3 y VAX 6; aunque algunas variedades con niveles moderados de resistencia se han desarrollado y liberado en programas de mejoramiento en la región (Rodríguez-Miranda y Rosas Sotomayor, 2010; Beaver y Osorno, 2009; Beaver, 2010, 2008; Rosas, 2003; Miklas *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 1999; Pedraza *et al.*, 1997; Coyne y Schuster 1974), ver Tabla 1).

En Sudáfrica, en el 2011, el método de la retrocruza se utilizó para desarrollar líneas con resistencia al tizón bacteriano en una variedad de frijol blanco pequeño utilizado para enlatado, 'Teebus'. Las líneas XAN 159 y Wilkinson 2 se utilizaron como fuentes de resistencia al tizón bacteriano. En dicha investigación se obtuvieron altos niveles de resistencia al tizón bacteriano en líneas isogámicas-cercanas (LICs o *near-isogenic lines (NIL's)*), indicando así una transferencia exitosa de la resistencia otorgada por ambos parentales recurrentes. La presencia del marcador tipo *SCAR (Sequencing and Characterized Amplified Region)* SU91 en 35 de 39 líneas derivadas de la retrocruza con XAN 159 y en todas las líneas derivadas del retrocruce con Wilkinson 2, aportó a la evidencia de la transferencia exitosa de la resistencia al tizón bacteriano. El cultivar 'Teebus-RCR2', con un rendimiento de semilla similar al de la *cv* 'Teebus' y con una mejor resistencia al tizón bacteriano, fue liberado como resultado de esta investigación (Fourie *et al.*, 2011).

Zapata *et al.* (2011) reportaron que la resistencia al tizón bacteriano está controlada por un gen mayor dominante denominado *Xap-1* asociado con el marcador SCAR SAP6. Dicho gen de resistencia está presente en la línea mejorada PR0313-58.

Tabla 1. Cultivares y germoplasma mejorados, identificados como fuentes de resistencia al tizón bacteriano.

Genotipo	Pedigrí/Fuente	Referencia
<i>Resistencia proveniente de Phaseolus vulgaris</i>		
UNECA (Mutante M6)	Mutación de Chimbolito	Mohamed <i>et al.</i> , 1995
PR0313-58	DOR 483//BelNeb RR1/MUS 83/// Arroyo Loro Negro	Beaver <i>et al.</i> , 1999
Flor de Junio Marcela	Flor de Junio/Flor de Mayo M38	Castellanos <i>et al.</i> , 2003
Jules	GN#1 sel 27 /GN 1140	Muñoz <i>et al.</i> , 2004
BF 13607	National Center for Bean Research in Khomein	Osdaghi <i>et al.</i> , 2009
BF 13608	National Center for Bean Research in Khomein	Osdaghi <i>et al.</i> , 2009
Ks51103	National Center for Bean Research in Khomein	Osdaghi <i>et al.</i> , 2009
Badillo	AFR 285/PR9443-4	Beaver <i>et al.</i> , 2010
<i>Resistencia proveniente de Phaseolus coccineus</i>		
XR 235-1-1	<i>P. vulgaris</i> (6-19)// <i>P. coccineus</i> Pc-H-46-1BK (PI273667)	Freytag <i>et al.</i> , 1982
TARS VCI4-B	PC-50-1 / Pc-50-1	Miklas <i>et al.</i> , 1994
IBC3	Great Northern #1, Sel27/Pc-37	Miklas <i>et al.</i> , 1999
TARS-PT03-1	TARS VCI-4B//Montcalm/MUS-PM-31-F5.	Smith <i>et al.</i> , 2005
Wilkinson 2	Combinación de los genes de resistencia mediante cruzamientos con <i>P. coccineus</i> y <i>P. acutifolius</i>	Lema <i>et al.</i> 2007
<i>Resistencia proveniente de Phaseolus acutifolius</i>		
XAN 159, 160, 161	Pinto UI 114PI 319441// <i>P. acutifolius</i> PI 319443/Masterpiece	Thomas and Waines, 1984
OAC 88-1(BLT 87-13)	ICA Pijao/PI440795//Ex Rico 23	Scott and Michaels, 1992
BLT 87-19	ICA Pijao/PI440795//Ex Rico 23	Scott and Michaels, 1992
VAX 1, VAX 2	A769//A775//ICA Pijao/G40001//	Singh and Muñoz, 1999
VAX 3, VAX 6	A769//A775//ICA Pijao/G40001//XAN309	Singh and Muñoz, 1999
VAX 4, VAX 5	A769//A775//ICA PijaoxG40001//XAN263	Singh and Muñoz, 1999
XAN 309	RAB39 /XAN90)//XAN263	Singh and Muñoz, 1999
RG 13410	VAX3/Calima//Catrachita/A483)	CIAT, 2000.
HR 67	Centralia/3/HR13-621//XAN159/OAC Rico	Yu <i>et al.</i> , 2002
XAN 87	BAT450 //G3130 / Jules	Muñoz <i>et al.</i> , 2004
XAN 112	XAN18 //G4495 / Jules	Muñoz <i>et al.</i> , 2004
XAN 263	RAB73 //BAT1579/XAN159	Muñoz <i>et al.</i> , 2004
USDK-CBB-15	K97305/3/SVM-2242//I9566-21-4-2/Montcalm	Miklas <i>et al.</i> , 2006
USWK-CBB-17	98MSU-837//I9566-21-4-2/USLK-2	Miklas <i>et al.</i> , 2006
Verano	DOR 364/WBB-20-1//Don Silvio/VAX 6	Beaver <i>et al.</i> , 2008
OAC Rex	HR20-728/MBE 7	Michaels <i>et al.</i> , 2009
X0104-45-3-5-5	'Tío Canela 75' / VAX6	Rodríguez y Rosas, 2010
X104-45-5-1-4	'Tío Canela 75' / VAX6	Rodríguez y Rosas, 2010
X104-45-5-5-3	'Tío Canela 75' / VAX6	Rodríguez y Rosas, 2010
Teebus-RCR2	TeebusxXAN159//XAN159	Fourie <i>et al.</i> , 2011

En estudios genéticos se han identificado numerosos loci de caracteres cuantitativos (*Quantitative Trait Loci, QTL*) para la resistencia al tizón bacteriano del frijol común (Miklas *et al.*, 2006; Urrea *et al.*, 1999). El desarrollo de marcadores moleculares específicos para algunos QTLs asociados a la resistencia al tizón bacteriano y su uso en selección asistida por marcadores (SAM) proporciona una herramienta útil para los mejoradores de frijol (Yu *et al.* 2012; Kelly *et al.*, 2003).

Los principales marcadores moleculares que fueron mapeados en grupos de ligamiento diferentes, son los de regiones amplificadas y caracterizadas por secuencias (*SCAR*) y han sido ampliamente utilizados en los programas de mejoramiento de frijol. El primer marcador *SCAR* SU91 ligado al *LG Pv* 8 fue desarrollado por Pedraza *et al.* (1997) y Mutlu *et al.* (2005). El segundo marcador *SCAR* SAP6 situado en el *LG Pv* 10 fue desarrollado por Miklas *et al.* (2000), y el tercer marcador *SCAR* BC420 situado en el *LG Pv* 6 fue desarrollado por Yu *et al.* en el 2000.

En 2012 se identificaron 37 genes candidatos (CG) usando mapeo clonal de dos clones de cromosomas artificiales bacterianos (*BAC*) que contenían el locus para BC420 y el locus para SU91. Cada locus fue secuenciado y posteriormente ensamblado, se identificaron 21 nuevos genes putativos ligados al locus BC420-QTL y 16 genes nuevos ligados al locus SU91-QTL. Se generaron marcadores para dichos genes, pero cuatro marcadores candidatos (*candidates gene markers, CGMs*) por cada locus, mostraron una buena asociación con la resistencia al tizón bacteriano. Dichos marcadores fueron evaluados en una población *RIL* de ‘Sanilac’ (susceptible) × ‘OAC 09-3’ (resistente). Los marcadores (*CGMs*) BC420-CG14 y SU91-CG11 fueron recomendados en la SAM para el tizón bacteriano del frijol común (Shi *et al.*, 2012). La identificación de genes únicos en hospederos resistentes utilizando cepas específicas y el desarrollo de marcadores fiables para los mismos es un aporte valioso para el avance en el mejoramiento contra esta enfermedad.

El análisis de medias generacionales (AMG o *Generation Mean Analysis (GMA)*), fue desarrollado para evaluar la importancia de los diferentes efectos genéticos (aditivo, dominante y epistasis) en la herencia de caracteres cuantitativos (Piepho y Möhring, 2010). El *GMA* ha sido ampliamente utilizado por los programas de fitomejoramiento y genética de los cultivos agronómicos de importancia (Oettler *et al.*, 2004; Hinze y Lamkey, 2003; Butrón *et al.*, 2002;

Revilla *et al.*, 2000; Rodríguez-Herrera *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000). Al igual que otros modelos estadísticos, Bernardo (2002) señala que el AMG tiene algunas limitaciones como el uso de igual número de unidades experimentales por parcela, si el número de UE es bajo, los coeficientes de aditividad, dominancia o epistasis son difíciles de estimar.

Para este método se requiere una población de líneas endogámicas recombinantes (*Recombinant Inbred Lines, RIL*) derivada de un cruce entre dos padres (P_1 y P_2) con caracteres contrastantes y que se analicen los resultados de las medias de las progenies de seis generaciones, lo cual puede generar información suficiente para estimar los componentes de varianza y los efectos de aditividad o dominancia. Las medias de los padres P_1 y P_2 , las medias de las generaciones F_1 y F_2 y las medias de las retrocruzas con las dos líneas parentales identificados como (*Backcross, BC*) BC_1 y BC_2 , se utilizan en este análisis combinado (Piepho y Möhring, 2010).

Las seis generaciones (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , BC_1 y BC_2) pueden ser evaluadas en ensayos de campo, invernadero o en laboratorio, dichas poblaciones deben estar organizadas en un diseño de bloques completos al azar (DBCA). Para cada generación, la unidad experimental (UE) se compone de una sola planta y los datos se colectan a base de una sola planta.

El tamaño de muestra por parcela a menudo difiere entre las generaciones, para optimizar la precisión de los estimados de los componentes genéticos de varianza. Idealmente se requiere un alto número de bloques y parcelas por réplica (Piepho y Möhring, 2010; Mather y Jinks, 1971; Kearsey y Pooni, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

La población estudiada fue desarrollada a partir de un cruce entre las líneas de mejoramiento PR0313-58 y VAX 6. Estos dos genotipos fueron seleccionados debido a que mostraron una reacción diferencial al tizón bacteriano con la cepa *Xap* UPR 3353, la cual es un aislado muy virulento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* de Puerto Rico.

PR0313-58 (P₁) es un frijol de grano blanco pequeño, con niveles moderados de resistencia al tizón bacteriano y con buenas características agronómicas. Esta línea tiene como pedigrí: DOR 483//BelNeb RR1//MUS 83/// 'Arroyo Loro Negro'. PR0313-58 tiene el marcador *SCAR* SAP6 para la resistencia al tizón bacteriano, su resistencia se deriva probablemente de la línea BelNeb RR1. La línea PR0313-58, sin embargo, no tiene el marcador *SCAR* SU91, otro marcador importante para la resistencia al tizón bacteriano. Por otro lado esta línea tiene el marcador *SCAR* SW13 para el gen dominante *I* de resistencia al virus de mosaico común del frijol (*BCMV*) y el marcador *SCAR* SR2 para el gen recesivo *bgm-1* que confiere resistencia al virus del mosaico dorado-amarillo del frijol (*BGYMV*) (Beaver *et al.*, 1999). Zapata *et al.* (2011), demostraron que PR0313-58 tiene un gen dominante para la resistencia al tizón bacteriano asociado con el marcador *SCAR* SAP6.

El otro padre (P₂), VAX 6, es una línea mejorada de frijol de CIAT de color rojo oscura con un alto nivel de resistencia al tizón bacteriano, arquitectura erecta y tolerancia al calor. VAX 6 se deriva de una cruce interespecífica y una piramidización génica de los cultivares de frijol 'ICA Pijao' × *Phaseolus acutifolius*. VAX 6 tiene el pedigrí: A 769 ///A 775/'ICA Pijao'/G40001///XAN 309 (Singh y Muñoz, 1999). Además VAX 6 tiene los marcadores *SCAR* SAP6, SU91-CG11 y SU91 que han sido identificados y utilizados ampliamente para la selección de genotipos con resistencia al tizón bacteriano.

La generación F₁ se desarrolló entre los meses de enero a mayo del 2011, siendo el resultado de la cruce de las líneas PR0313-58 × VAX 6, bajo condiciones de invernadero en la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Las semillas de los padres fueron plantadas en maceteros individuales de 30 cm de diámetro, con mezcla de turba Sunshine #1 (Sun Gro Horticulture, Vancouver, British Columbia). Al momento de la siembra, se aplicó 15 gramos/pote de fertilizante Osmocote® (14-14-14, Scotts Company LLC, Marysville, OH) y

100 ml del insecticida sistémico *ADMIRE®* Pro Systemic Protectant (IA:Imidacloprid.1-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine) a una dosis de 2.64 ml/L (insecticida : agua; 14.5 g de IA/L) fue aplicado en solución a cada macetero para controlar las plagas potenciales. El riego se aplicó manualmente dos veces al día durante el ciclo vegetativo de las plantas para evitar el estrés hídrico.

Las semillas obtenidas de la generación F_1 y las semillas de los padres fueron plantadas durante el mes de octubre del 2011 y fueron tratadas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Una vez se llegó a la etapa de floración, las plantas F_1 se retrocruzaron con cada padre y a su madurez de cosecha las semillas fueron recolectadas de cada planta e identificadas como las generaciones BC_1 , BC_2 y F_2 .

Las evaluaciones de la reacción al tizón bacteriano con la cepa de *Xap* UPR 3353 en las generaciones: P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , BC_1 y BC_2 se llevaron a cabo durante los meses de enero a abril del 2012, en dos invernaderos de la Finca Alzamora, de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Las generaciones en estudio fueron sembradas el 20 de enero del 2012 en maceteros de 30 cm de diámetro con turba Sunshine Mix #1 (Sun Gro Horticulture, Vancouver, British Columbia). Se aplicaron 15gramos/maceta de fertilizante Osmocote® (14-14-14, Scotts Company LLC, Marysville, OH) al momento de la siembra y 100 ml del insecticida sistémico *ADMIRE®* Pro Systemic Protectant (IA: Imidacloprid.1-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine) fue aplicado en solución al suelo a una dosis de 2.64 ml/L (insecticida : agua; 14.5 g de IA/L) a los 15 días después de la siembra para controlar plagas potenciales.

Para garantizar un número adecuado de plantas de las generaciones P_1 , P_2 y F_2 , se sembraron dos semillas por macetero y a los siete días después de la germinación, se hizo un raleo, dejando la planta más vigorosa. Una semilla por macetero, fue sembrada de las generaciones F_1 , BC_1 y BC_2 debido a que no habían número grande de semilla.

Para evitar estrés hídrico en las plantas el riego se aplicó dos veces al día mediante un sistema de riego por goteo. Las seis generaciones (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , BC_1 y BC_2) fueron distribuidas en tres bloques en donde cada bloque contenía: siete plantas de PR0313-58, siete plantas de VAX 6, cuatro plantas de la generación F_1 , 45 plantas F_2 , cuatro plantas de la BC_1 y dos plantas de la BC_2 . Las macetas se distribuyeron al azar en un diseño de DBCA, dos bloques fueron

ubicados en el invernadero #1 y el tercer bloque en el invernadero #2, los maceteros sobrantes fueron colocados al final del tercer bloque. (Figura 1).

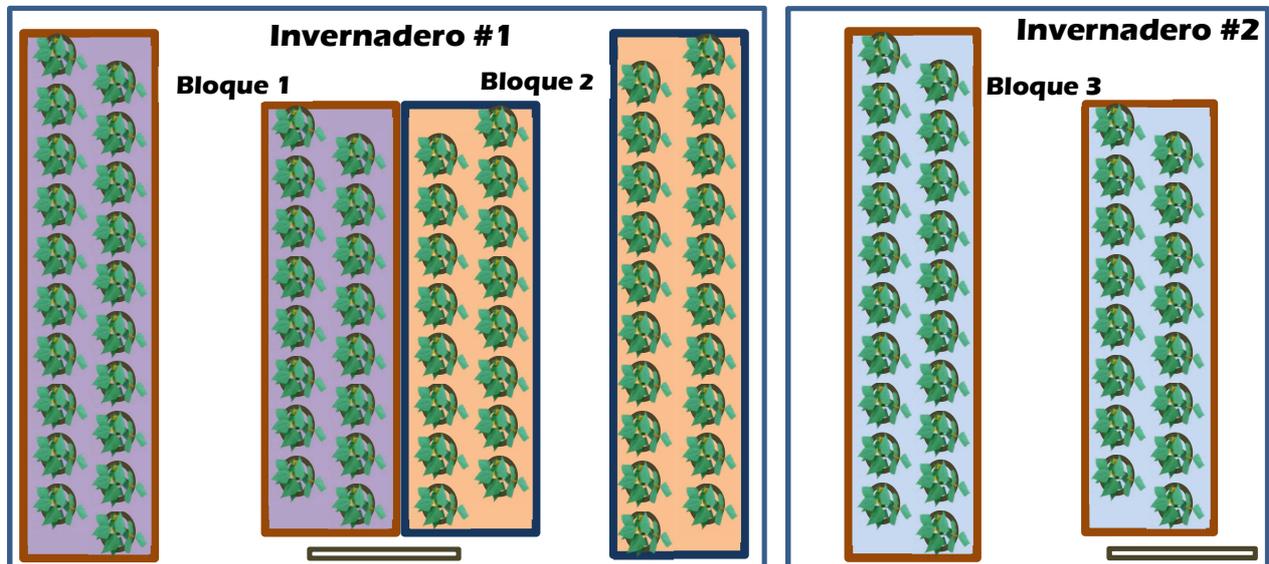


Figura 1. Diseño experimental: Diseño de bloques completos al azar. Genotipos distribuidos en dos invernaderos de la Finca Alzamora, en tres bloques con seis parcelas cada uno, las parcelas representan las seis generaciones compuestas de: siete plantas de PR0313-58, siete plantas de VAX 6, cuatro plantas de la generación F_1 , 45 plantas de la F_2 , cuatro plantas de la BC_1 dos plantas de la BC_2 .

En estudios anteriores, la reacción al tizón bacteriano de la línea PR0313-58 fue moderadamente resistente mientras que VAX 6 mostró un alto nivel de resistencia a la inoculación con la cepa de *Xap* UPR 3353 (Zapata *et al.*, 2011). Las plantas de cada parcela se evaluaron basadas en su respuesta a la inoculación con la cepa de *Xap* UPR 3353. La inoculación fue realizada en el trifolio central de las tres primeras hojas trifoliadas consecutivas de la misma planta (Figura 2 C). Las lecturas fueron tomadas a los 14, 21 y 28 días después de la inoculación (DDI). Cada hoja trifoliada inoculada en el trifolio central era una réplica.

La bacteria fue obtenida de la colección de bacterias fitopatógenas de la Universidad de Puerto Rico, que está bajo la dirección de la Dra. Mildred Zapata. El inóculo se preparó de acuerdo al protocolo establecido por Zapata (2006). En este experimento se utilizó como fuente de inóculo, cultivos bacterianos de la cepa de *Xap* UPR 3353 de 48 horas de crecimiento. El trifolio central fue dividido por la mitad, en donde el lado izquierdo era la zona de control y el

lado derecho constituía la zona de inoculación, ambos lados fueron lacerados en tres puntos equidistantes (Figura 2 A, B).

Se utilizaron puntas de micropipeta universales de 1-20 μ l (Eppendorf ®) esterilizadas, para lacerar los puntos en ambos lados. Las laceraciones fueron hechas en el tejido intervenoso del trifolio, evitando así las venas para no ocasionar una infección sistémica (Figura 2 B). El lado izquierdo de los trifolios fue el primero en ser lacerado en todos los bloques, para evitar contaminación cruzada. Una vez terminado de lacerar el área de control en todas las plantas del ensayo, se procedió a inocular el lado derecho (área de inoculación). Para inocular el lado derecho del trifolio central, las puntas de micropipeta fueron sumergidas directamente en el medio de cultivo bacteriano y luego de impregnarse con el cultivo bacteriano, fueron lacerados punto por punto siguiendo el mismo proceso. Se usaron platos Petri estériles como soporte bajo el trifolio, durante el proceso (Figura 2 A).

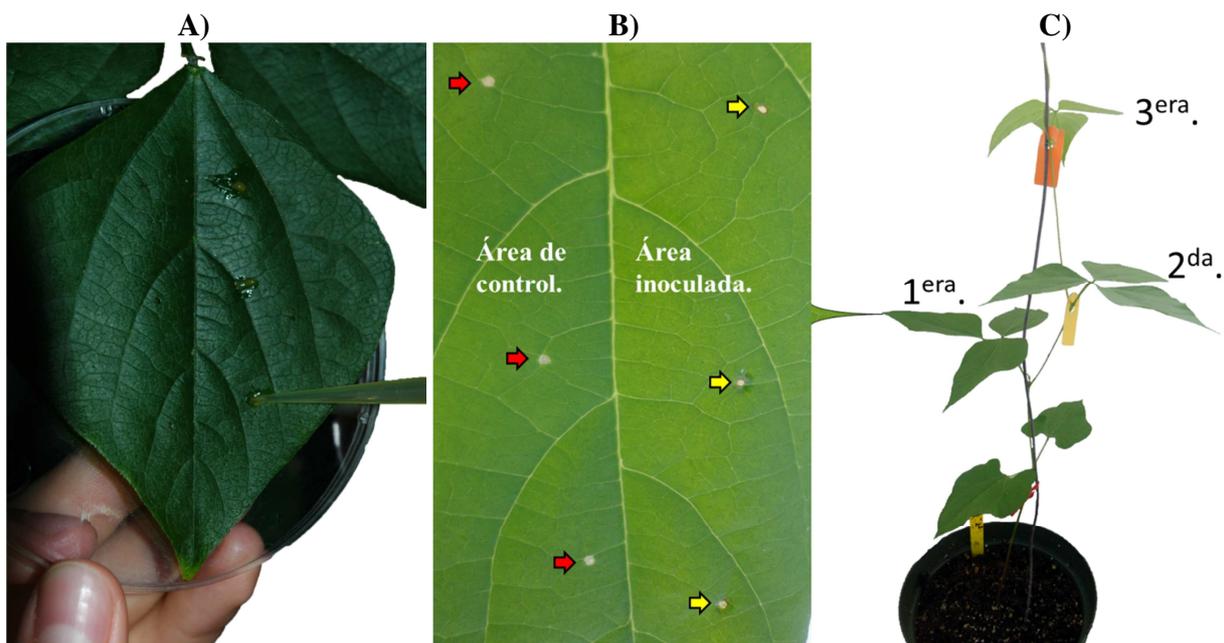
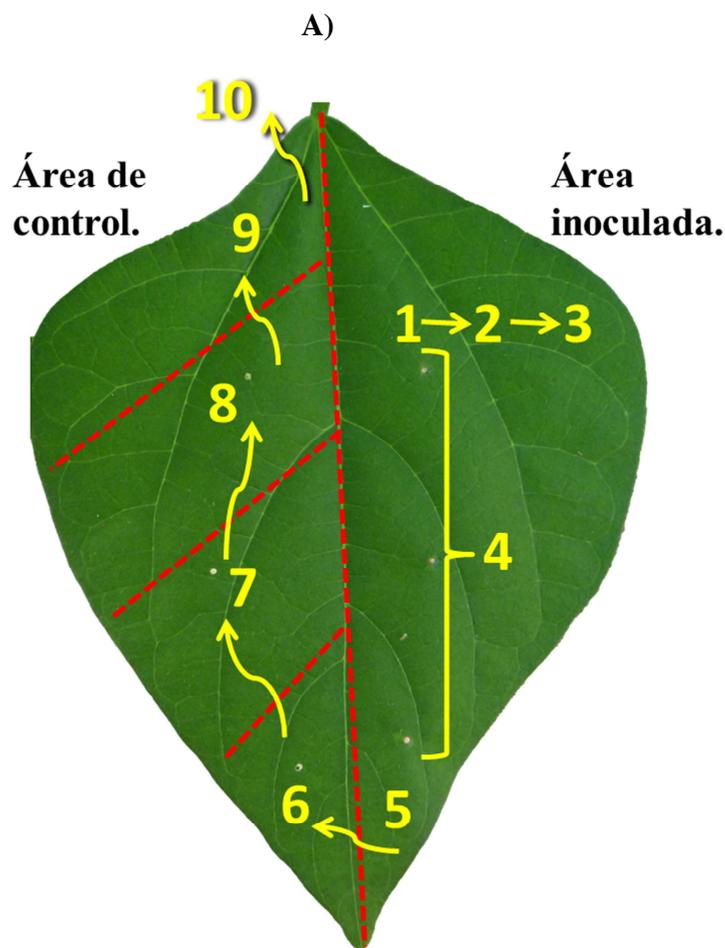


Figura 2. Metodología de inoculación de *Xap* de acuerdo a Zapata (2006). A) Inoculación utilizando puntas de micropipeta impregnadas con el cultivo puro bacteriano. B) Trifolio central dividido a la mitad, donde, el lado izquierdo es la zona de control y el lado derecho corresponde a la zona inoculada con el cultivo bacteriano de *Xap* UPR 3353. C) Tres primeras hojas trifoliadas consecutivas fueron elegidas en cada planta.

La reacción al tizón bacteriano de cada hoja se registró a los 14, 21 y 28 DDI y se evaluaron de acuerdo a una escala con valores enteros que va desde 1 hasta 10, estos valores son dados conforme avanza la infección sistémica en el trifolio inoculado (Figura 3 A).

Los valores de la escala se denominan de la siguiente manera: **1)** no muestra ninguna infección, solo cicatrización; **2)** presenta halos cloróticos de 1 a 2 mm de diámetro; **3)** las lesiones cloróticas miden aprox. entre 3 a 5 mm de diámetro; **4)** los halos cloróticos de los tres puntos se están uniendo, el tejido es más acuoso, flácido o necrótico; **5)** la mitad del trifolio presenta tejido acuoso, necrótico o flácido; **6)** el lado izquierdo del trifolio (área de control) está infectado hasta el primer punto de control lacerado y presenta tejido acuoso, flácido o necrótico, mostrando así el avance de la enfermedad hacia el lado del control; **7)** la infección ha avanzado hasta el segundo punto lacerado del área de control; **8)** la infección ha avanzado hasta el tercer punto lacerado del área de control, el tejido es clorótico, flácido o necrótico; **9)** ambos lados, control e inoculado del trifolio central han sido infectados totalmente por tejido acuoso, necrótico o clorótico, o a su vez defoliado y **10)** los trifolios laterales presentan tejido acuoso o necrosis, hay invasión sistémica e incluso puede haber defoliación total de la hoja trifoliada (Zapata *et al.*, 2011) (Figura 3 A y B).



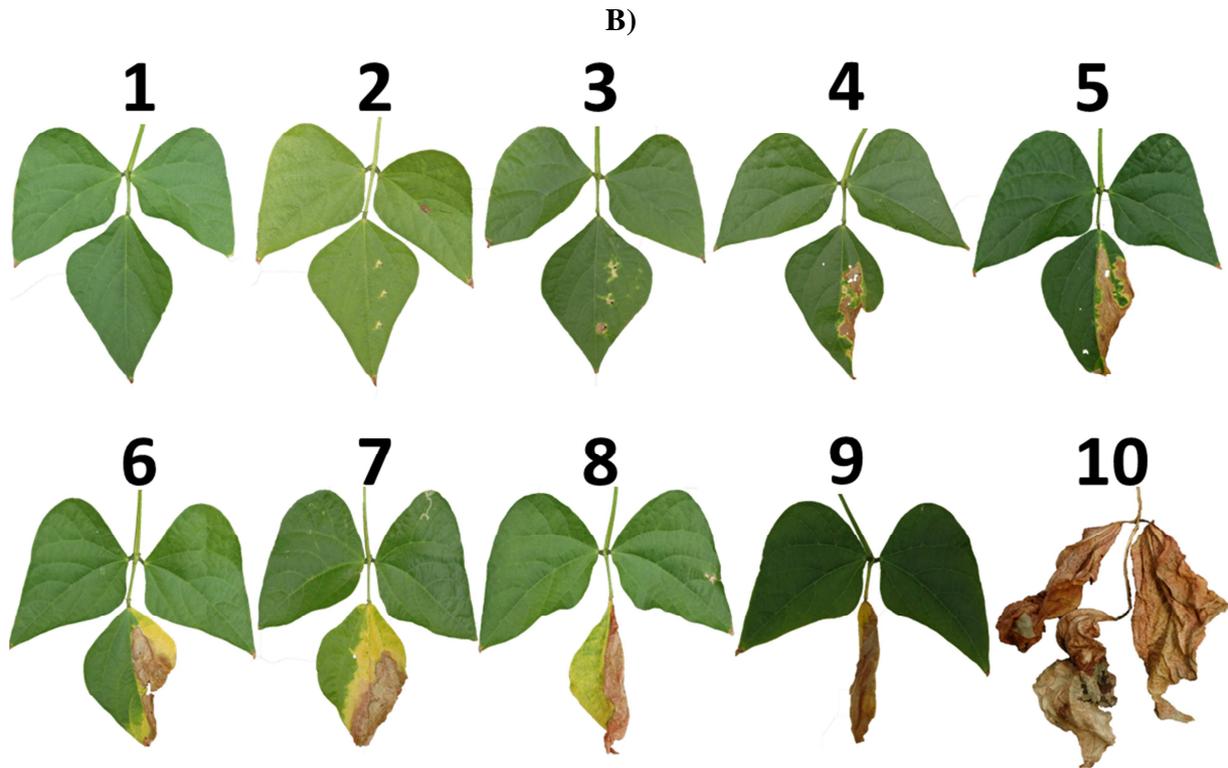


Figura 3. A) Diagrama de avance sistémico de la infección en el trifolio central. B) Escala de evaluación a la respuesta de la hoja trifoliada de *Phaseolus vulgaris* L. a la inoculación con *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* cepa UPR 3353 bajo condiciones de invernadero (con base a Zapata *et al.* 2011).

La prueba de Chi-cuadrado (χ^2) fue utilizada para evaluar los patrones de segregación de las lecturas de daño causado por el tizón bacteriano en las generaciones F₂ y F₃. Las plantas individuales de la generación F₂ fueron cosechadas de manera individual en el ensayo de invernadero. El 13 de abril de 2012, un total de 41 familias F_{2,3} (490 plantas) (Tabla 2), fueron sembradas en el invernadero de la Estación de Agricultura Tropical (TARS) en Mayagüez, Puerto Rico.

Dos semillas de cada línea F_{2,3} se plantaron en macetas de plástico de 20 cm de diámetro con una mezcla de turba Sunshine # 1 (Sun Gro Horticulture, Vancouver, British Columbia). A los ocho días después de la germinación se hizo un raleo, dejando la planta más vigorosa por macetero. En el momento de la siembra, 10 gramos/maceta del fertilizante Osmocote (14-14-14, Scotts Company LLC, Marysville, OH) fue aplicado y el insecticida sistémico Admire® Pro se aplicó al suelo a los 15 días después de la siembra para controlar las plagas potenciales.

El riego se aplicó por la mañana, todos los días, hasta la época de cosecha para evitar el estrés hídrico. Las mismas técnicas experimentales y metodologías de inoculación fueron realizadas tal como se describió en el ensayo de invernadero de la Finca Alzamora.

El ANOVA fue generado a partir de los datos de las 216 plantas de las seis generaciones que estaban distribuidas en tres bloques y estaban compuestas de la siguiente manera: 7 plantas de la BC_2 , 22 plantas del P_1 , 142 plantas de la generación F_2 , 13 plantas de la BC_1 , 11 plantas de la generación F_1 y 21 plantas del P_1 .

Las familias $F_{2,3}$ fueron divididas en tres grupos basados en su respuesta al tizón bacteriano a los 28 DDI. El primer grupo estaba formado por las familias de las plantas F_2 altamente resistentes y que habían recibido puntuaciones de 1 según la escala utilizada. El segundo grupo incluía las familias de las plantas F_2 resistentes que habían recibido las puntuaciones de entre 1.3 a 2.3 según la escala. El tercer grupo estaba formado por las familias de las plantas F_2 moderadamente susceptibles y que recibieron puntuaciones de entre 2.7 a 3.7 según la escala.

Los padres (VAX 6 y PR0313-58), el cultivar 'Verano' (Beaver *et al.*, 2008) resistente al tizón bacteriano y el cultivar 'Morales' (Beaver y Miklas, 1999) susceptible al tizón bacteriano, se incluyeron en el estudio como controles y se distribuyeron al azar entre repeticiones. Análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Chi-cuadrado se utilizaron para evaluar los patrones de segregación dentro y entre de las familias sembradas.

Las mismas 41 familias $F_{2,3}$ (Tabla 2), se plantaron el 23 de julio de 2012 en un ensayo de campo en la Subestación Experimental de Isabela de la Universidad de Puerto Rico. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (DBCA) con tres repeticiones. Las unidades experimentales (UE) fueron plantas individuales elegidas de los surcos de 1 m de longitud en los que se sembraron 10 semillas de cada familia $F_{2,3}$. Los padres (VAX 6 y PR0313-58), el cultivar 'Verano' resistente al tizón bacteriano y el cultivar 'Morales' muy susceptible al tizón bacteriano se incluyeron en el ensayo de campo como controles. Los surcos estaban espaciados a 0.6 m de distancia. Los bordes del experimento fueron sembrados con la variedad 'Verano' para evitar el efecto de borde.

Se suministró el riego por aspersión según la demanda y condiciones de suelo y clima, evitando así el estrés hídrico en las plantas. Las malezas se controlaron manualmente. A los 20

días después de la germinación, un total de 360 plantas, tres plantas de cada surco, fueron inoculadas con la cepa de *Xap* UPR 3353 usando las mismas técnicas descritas para las evaluaciones del ensayo de invernadero (Zapata, 2006). La reacción al tizón bacteriano se registró a los 14 y 21 DDI. Pruebas de Chi-cuadrado se utilizaron para evaluar los patrones de segregación dentro y entre las familias $F_{2:3}$.

Se seleccionó las líneas de las familias $F_{2:3}$ con altos niveles de resistencia al tizón bacteriano, tolerantes a altas temperaturas y buen rendimiento en los ensayos de invernadero y de campo. Estas líneas se sembraron nuevamente durante el mes de enero de 2013 en un ensayo de campo en la Subestación de Isabela, con el fin de seleccionar líneas que combinan alta nivel de resistencia al tizón bacteriano, resistencia al mosaico dorado amarillo y tolerancia al calor.

El ADN de todas las 711 plantas (219 del ensayo uno, 490 de la prueba de progenie, 1 de VAX6 y 1 de PR0313-58), fue extraído utilizando el kit DNeasy Plant 96 (Qiagen, Valencia, CA). La presencia de los marcadores *SCAR* SAP6 y SU91 se diagnosticaron usando los protocolos de *PCR* descritos por Miklas *et al.* (2000) y Pedraza *et al.* (1997), respectivamente. La asociación entre la respuesta al tizón bacteriano, resistente o susceptible y la presencia o ausencia de los marcadores moleculares *SCAR* SU91, SU91-CG11 y SAP6 fue determinada para todas las plantas de todas las seis generaciones (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , BC_1 y BC_2).

Los dos padres, PR0313-58 y VAX 6, se utilizaron como controles en el diagnóstico molecular. El ADN de PR0313-58, VAX 6, un grupo de 10 líneas F_3 con altos niveles de resistencia al tizón bacteriano y un grupo de 11 líneas F_3 susceptibles al tizón bacteriano se utilizaran a futuro para un análisis con marcadores moleculares tipo *SNPs* e *INDELS*, para intentar identificar un marcador polimórfico que podría ser utilizado como sustituto o en combinación con el marcador molecular *SCAR* SU91-CG11 y como un marcador molecular fiable para la selección de altos niveles de resistencia al tizón bacteriano.

Los resultados de las evaluaciones de las seis generaciones se analizaron mediante un análisis de medias generacionales (*GMA*) utilizando el programa estadístico SAS. Para ejecutar el modelo, las seis generaciones fueron dispuestas en un diseño de bloques completos al azar (DBCA), el bloque estaba compuesto por las seis parcelas y cada parcela representaba una generación.

Según Piepho y Möhring, 2010, (2010) los códigos del programa SAS para llevar a cabo el análisis del modelo aditivo-dominante con la prueba de ajuste (*lack of fit*) para este experimento fueron:

SAS code 1:

```
proc mixed covtest;
class gen block plant plot lackfit;
model depvar=block a d lackfit/htype=1 ddfm=kr;
random gen/subject=plant*plot type=lin(3) ldata=lin3;
random int/sub=plot;
run;
```

En el mismo análisis, para realizar las comparaciones múltiples de las medias de cada generación basadas en las diferencias significativas (*LSD*) <0.05 y que sean denominadas con letras distintas se utilizó el código SAS (Piepho y Möhring, 2010, 2010):

SAS code 2:

```
proc mixed;
class gen block plant plot;
model depvar=block gen/htype=1 ddfm=kr;
random gen/subject=plant*plot type=lin(3) ldata=lin3;
random int/sub=plot;
lsmeans gen/pdiff;
```

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el ensayo del *GMA* llevado a cabo en la finca Alzamora, un total de 219 plantas de las seis generaciones fueron evaluadas para reacción al tizón bacteriano. Un total de 1971 datos de las tres lecturas y de los tres trifolios por planta, fueron utilizados para calcular las correlaciones, análisis de varianza y el índice de severidad de la enfermedad (*disease severity index, DSI*).

Las correlaciones fenotípicas entre los promedios de las tres lecturas durante tres diferentes días después de la inoculación fueron positivas y altamente significativas (Tabla 2). Los datos de la lectura a los 14 DDI mostraron un CV de 29.6%, pero la sintomatología a este tiempo no era la adecuada para distinguir diferencias entre plantas en reacción al tizón bacteriano (Apéndice 1). Se observó la mayor variabilidad (CV de 43.0%) en las lecturas a los 28 DDI debido a que las hojas tendían a madurar y defoliarse y la expresión de los síntomas del tizón bacteriano era difícil o imposible de determinar. Las lecturas a los 21 DDI mostraron variabilidad intermedia (CV de 39.2%) y un mayor rango de expresión de síntomas entre las plantas inoculadas. Por lo tanto, se utilizaron las lecturas a los 21 DDI para el análisis de herencia de la resistencia.

Tabla 2. Correlaciones fenotípicas entre los promedios de las tres lecturas (14, 21 y 28 días después de la inoculación) en la generación F₂ sembrada en los invernaderos de la Finca Alzamora.

	Correlación fenotípica	
	14 DDI	21 DDI
14 DDI		
21 DDI	0.74**	
28 DDI	0.74**	0.88**

** Valor altamente significativo

El valor mínimo registrado en las lecturas, según la escala, fue de 1 y el valor máximo fue de 4 (Figura 4). Este rango de reacciones es lo que esperamos porque ambos progenitores tuvieron por lo menos un nivel moderado de resistencia al tizón bacteriano.

El análisis de varianza de los síntomas a los 21 DDI mostró diferencias mínimas significativas (*Fisher, LSD, p<0.05*) y una separación de medias de las seis generaciones, en tres grupos donde: el primer grupo estaba compuesto por las generaciones BC_2 y P_2 identificadas como altamente resistentes al tizón bacteriano, la segunda clase corresponde a la generación F_2 y se identificó como resistente y la tercera clase, estaba formada por las generaciones BC_1 , F_1 y P_1 (Tabla 3).

Tabla 3. Promedios de las lecturas de reacción al tizón bacteriano a los 21 días después de inoculación de las seis generaciones (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , BC_1 y BC_2) sembradas en los invernaderos de la Finca Alzamora.

Generación	N	Media	Clase ^ψ
BC_2	21	1.38	A
P_2	66	1.49	A
F_2	426	1.95	B
BC_1	39	2.27	C
F_1	33	2.47	C
P_1	63	2.54	C

^ψ Promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes.

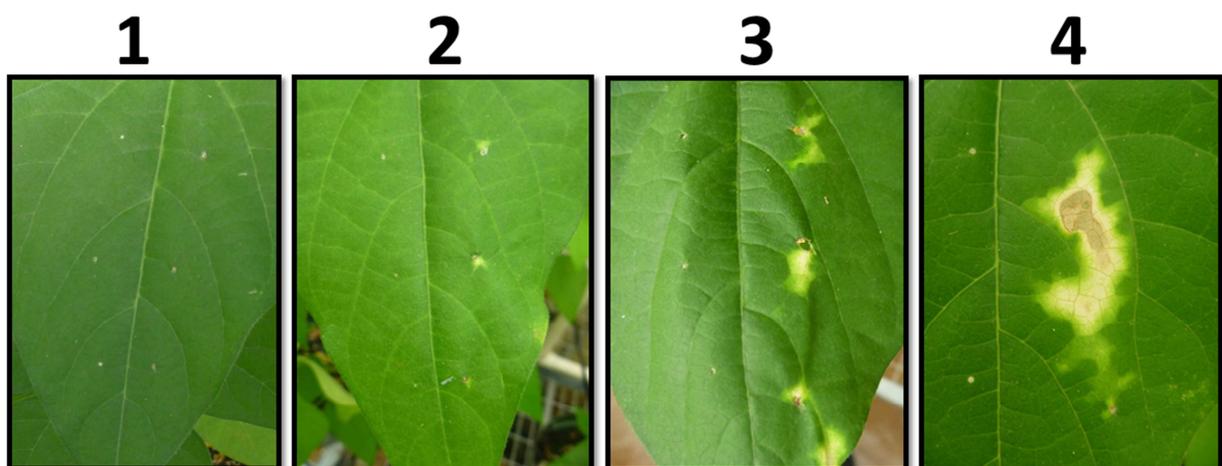


Figura 4. Rango de las reacciones observado en las seis generaciones inoculadas con la cepa *Xap* UPR 3353 a los 21 días después de la inoculación.

La presencia de los marcadores moleculares SAP6 y SU91 y la frecuencia de respuesta al tizón bacteriano de las seis generaciones (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , BC_1 y BC_2) se muestran en la Tabla 4. La reacción al tizón bacteriano se dividió en tres categorías: 1) altamente resistente, con una puntuación de entre 1 a 1.99 según la escala; 2) resistente, con valores de entre 2.0 a 2.99 según la escala y 3) susceptible, con valores de más de 3.00 según la escala. El índice de severidad de la enfermedad se calculó de acuerdo a las medias de los puntajes de las reacciones al tizón bacteriano de cada planta en las tres réplicas.

Los padres mostraron una respuesta predecible a la inoculación con la cepa de *Xap* UPR 3353 donde: de las 22 plantas del progenitor resistente VAX 6 (P_2), solo una planta mostró susceptibilidad con un valor medio de 3.17 de *DSI*, cuatro plantas resistentes, con una media de 2.25 de *DSI* y se identificaron 17 plantas altamente resistentes con una media de 1.52 de *DSI*. Los resultados demuestran que hay algo de variabilidad en la reacción de los padres. Por lo tanto, el *DSI* es el mejor estimado de la reacción de los padres y la generación F_1 al tizón bacteriano.

PR0313-58 (P_1) presentó nueve plantas con altos niveles de resistencia, con una media de 1.63 de *DSI*. Se observaron 11 plantas resistentes con 2.42 de *DSI* y una planta susceptible con una media de 3.17 de *DSI*. La generación P_1 presentó una media poblacional de 2.12 de *DSI*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zapata *et al.* en el 2011, ya que reportan una resistencia en línea mejorada PR0313-58 ante la inoculación con la cepa *Xap* UPR 3353 con un valor ≤ 4 según la escala de 1-10.

La generación F_1 mostró una media poblacional de 2.29 de *DSI*. Se identificó una planta altamente resistente en esta generación con 1.83 de *DSI*; nueve plantas resistentes con 2.22 de *DSI* y una planta con 3.33 de *DSI* fueron identificadas. La mayoría de los genotipos se ubican en la zona intermedia de los valores mínimos y máximos obtenidos.

La generación segregante, F_2 , presentó una media poblacional de 1.96 de *DSI* y mostró un rango de datos que van desde 1 hasta 3.33 de *DSI*. De las 142 plantas F_2 , 74 fueron altamente resistentes con 1.51 de *DSI*, 59 plantas fueron resistentes con una media de 2.34 de *DSI* y solamente nueve plantas susceptibles con un promedio de 3.11 de *DSI* se identificaron en las condiciones de invernadero de la Finca Alzamora.

La generación BC_1 , de padre recurrente PR 0313-58, tuvo una media poblacional de 2.51 de *DSI* y de acuerdo a la separación de medias (*LSD*) de Fisher se considera susceptible a esta

generación; aunque se obtuvieron dos plantas altamente resistentes con 1.67 de *DSI*, siete resistentes con 2.43 de *DSI* y cuatro plantas susceptibles.

Se obtuvo una media poblacional de 1.81 de *DSI* para la generación *BC*₂, esta generación de acuerdo a la separación de medias es considerada muy resistente. Este resultado asevera el efecto que tiene el método de la retrocruza al tratar de fijar y añadir genes que contribuyen a la resistencia al tizón bacteriano (Fourie y Mienie, 2011; Bernardo, 2002).

Esta generación presentó cuatro plantas con alta resistencia con 1.50 de *DSI* y tres plantas resistentes con 2.22 de *DSI* y un rango alta de resistencia desde 1.17 a 2.33 de *DSI* que incluso es más estrecho que el obtenido en las plantas del *P*₂, VAX6. Estos resultados son evidencia de la transferencia de los altos niveles de resistencia al tizón bacteriano causada por la cepa de *Xap* UPR 3353.

Tabla 4: Frecuencias y medias (en paréntesis) de las seis generaciones evaluadas bajo condiciones de invernadero en la Finca Alzamora, Mayagüez, PR, a los 21 DDI.

Generación/ marcadores	# de Plantas	Valores obtenidos según la escala de reacción al tizón bacteriano					Media Poblacional <i>DSI</i> ¹
		Altamente Resistentes	Resistentes	Susceptible			
		1 a 1.99	2.00 a 2.99	>3	Min.	Max.	
<i>P</i> ₁ (PR0313-58)	21	9 (1.63 ¹)	11 (2.42)	1 (3.17)	1.00	3.17	2.12
<i>P</i> ₂ (VAX 6)	22	17 (1.52)	4 (2.25)	1 (3.17)	1.17	3.17	1.73
<i>F</i> ₁	11	1 (1.83)	9 (2.22)	1 (3.33)	1.83	3.33	2.29
<i>F</i> ₂	142	74 (1.51)	59 (2.34)	9 (3.11)	1.00	3.33	1.96
<i>BC</i> ₁	13	2 (1.67)	7 (2.43)	4 (3.08)	1.50	3.33	2.51
<i>BC</i> ₂	7	4 (1.50)	3 (2.22)	0	1.17	2.33	1.81
<i>F</i> ₂ /SAP6	142	74	59	9	-	+	1.96
<i>F</i> ₂ /SU91	142	18	15	4	-	+	1.96
<i>F</i> ₂ /SU91-CG11	142	18	15	4	-	+	1.96
<i>F</i> ₂ /SAP6 & SU91	105	56	44	5	--	++	1.96

¹ Índice de severidad, (*Disease Severity Index (DSI)*) son medias calculadas con base en los valores de la escala (1 a 10) obtenidos a los 21 DDI.

El marcador *SCAR* SAP6 estaba presente en todas las plantas de la generación *F*₂ ya que ambos padres lo poseen; por tal razón este marcador no identifica el alto nivel de resistencia

presente en los genotipos estudiados. La presencia de los marcadores *SCAR* SU91 y SU91-CG11 fue exactamente la misma en los genotipos diagnosticados, es decir la ausencia del marcador SU91 era igual a la presencia del marcador del alelo recesivo del *CG*-11. Los dos marcadores fueron identificados en 18 de los 74 genotipos con altos niveles de resistencia, en 15 de los 59 resistentes y en 4 de los 9 susceptibles. (Apéndice 3. Tabla 4).

La correlación entre la presencia de los dos marcadores y la resistencia al tizón bacteriano causada por a la cepa de *Xap* UPR 3353, fue positiva con un valor de *r* de 0.52. Pero estos dos marcadores no identificaron bien a las plantas F_2 con altos niveles de resistencia a la cepa de *Xap* UPR 3353 obtenida en los genotipos superiores de la generación F_2 . En este estudio la falta de asociación (cosegregación) no permite el uso del marcador SU91 o de SU91-CG11, para seleccionar plantas con altos niveles de resistencia al tizón bacteriano, aunque fueron efectivos y recomendados por otros investigadores en la SAM contra esta enfermedad (Shi *et al.*, 2012; Mutlu *et al.*, 2005; Pedraza *et al.*, 1997).

La resistencia al tizón bacteriano se considera hasta la fecha un caracter complejo, que está controlado por factores genéticos menores y mayores, por genes simples, complejos y por *QTLs* (Zapata *et al.*, 2011; Miklas *et al.*, 2006). Sin embargo, Zapata *et al.* (2011) reportó el primer gen mayor dominante (*Xap-1*) que confiere resistencia al tizón bacteriano causada por la cepa de *Xap* UPR 3353 y cuya fuente de dicho gen fue la línea mejorada PR 0313-58. Esta información sugiere también, que los altos niveles de resistencia a esta cepa, detectados en este estudio, fueron aporte también del P_1 .

El patrón de respuesta a la resistencia al tizón bacteriano de la generación F_2 , se analizó con base en los datos obtenidos de la lectura a los 21 DDI, el resultado obtenido sugirió un modelo para dos genes dominantes que confiere la alta resistencia al tizón bacteriano causada por la cepa *Xap* UPR 3353 y la prueba de Chi-cuadrado ajustó bien para este modelo (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de χ^2 para la el patrón de dos genes dominantes basado en la reacción al tizón bacteriano causada por la cepa de *Xap* UPR 3353 en la población F_2 .

Dos genes dominantes en la generación F_2 (relación 15:1)		
	Esperados	Observados
S > 3	8.875	9
R < 3	133.125	133

χ^2 Chi-cuadrado = 0.15 Valor p = 0.70

Los análisis del presente estudio mostraron un ajuste al modelo para dos genes dominantes que confieren altos niveles de resistencia al tizón bacteriano causado por la cepa de *Xap* UPR 3353. Los resultados de segregación en la generación F_2 se ajustan a la relación fenotípica de 1 susceptible: 15 resistentes (Tabla 5).

Con el fin de analizar el patrón de segregación esperado para los dos genes que confieren alta resistencia al tizón bacteriano, un grupo de 41 familias $F_{2:3}$, junto con P_1 , P_2 y el testigo 'Morales' (línea muy susceptible) fueron evaluados para reacción al tizón bacteriano en el invernadero durante el verano de 2012 (Tabla 7). Todas las familias $F_{2:3}$ seleccionadas, expresaron valores mayores en la escala que los valores observados en el primer ensayo.

Esta expresión alta de los síntomas del tizón bacteriano podría deberse a las altas temperaturas registradas durante el verano (Tabla 6). La temperatura media dentro del invernadero fue de 26.9 grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$) con temperaturas mínimas registradas de 18.3 $^{\circ}\text{C}$ y con máximas de 39.2 $^{\circ}\text{C}$. Estas condiciones también ayudaron a la selección de plantas individuales con buena carga de vainas en la presencia de las altas temperaturas.

Tabla 6. Segregación en la generación F₃ dentro de las familias resistentes y susceptibles bajo las condiciones de invernadero en el *USDA-ARS-TARS*.

Generación F ₂		F ₃ - Evaluación en el invernadero de <i>TARS</i>											
#	ID de Familias F ₂	Reacción al tizón bacteriano	Valores de la escala										Total plantas
			(medias de <i>DSI</i>)	1	1.1-2.0	2.1-3.0	3.1-4.0	4.1-5.0	5.1-6.0	6.1-7.0	7.1-8.0	8.1-9.0	
1	MG 176	Resistente (1.8)	0	0	5	4	1	0	0	0	0	0	10
2	MG 203	Resistente (1.7)	0	1	3	3	0	0	2	1	0	0	10
3	MG 74	Resistente (1.5)	0	4	4	2	0	0	0	0	0	0	10
4	MG 119	Resistente (1.5)	1	1	5	1	0	2	0	0	0	0	10
5	MG 141	Resistente (1.7)	0	2	2	3	1	2	0	0	0	0	10
6	MG 133	Resistente (1.5)	0	5	4	1	0	0	0	0	0	0	10
7	MG 32	Resistente (1.8)	0	2	1	2	3	2	0	0	0	0	10
8	MG 41	Resistente (1.5)	1	1	3	3	2	0	0	0	0	0	10
9	MG 135	Resistente (2.0)	0	3	1	2	2	1	0	0	0	1	10
10	MG 60	Resistente (1.7)	0	1	1	1	3	2	2	0	0	0	10
1	MG 123	Susceptible (3.0)	0	2	2	8	1	1	0	1	0	0	15
2	MG 98	Susceptible (3.2)	0	0	1	5	4	3	2	0	0	0	15
3	MG 121	Susceptible (3.0)	1	0	6	5	2	0	1	0	0	0	15
4	MG 49	Susceptible (3.0)	0	2	5	1	3	4	0	0	0	0	15
5	MG 103	Susceptible (2.8)	0	2	1	5	2	3	2	0	0	0	15
6	MG 47	Susceptible (3.2)	0	1	6	4	1	2	1	0	0	0	15
7	MG 57	Susceptible (2.7)	0	2	1	4	6	1	1	0	0	0	15
8	MG 25	Susceptible (3.2)	0	1	4	4	1	5	0	0	0	0	15
P ₁	PR0313-58	Padre susceptible	0	0	1	0	2	3	3	1	0	0	10
P ₂	VAX 6	Padre resistente	1	8	1	0	0	0	0	0	0	0	10
C ¹	Morales	Control susceptible	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10

C¹= testigo susceptible

Tabla 7. Listado de las de las familias of F_{2,3} seleccionadas para la prueba de progenie.

No	ID #MG	Generación	Presencia de los marcadores moleculares			Lectura a los 21 DDI
10 plantas por genotipo						
1	176	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.83
2	73	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.50
3	203	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.67
4	124	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.67
5	74	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.50
6	119	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.50
7	141	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.67
8	133	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.50
9	32	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.83
10	41	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.50
11	60	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	1.67
10 plantas por genotipo						
1	135	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.00
2	28	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.17
3	90	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.00
4	117	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.17
5	112	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.00
6	68	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.00
7	84	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.00
8	22	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.33
9	102	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.17
10	23	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.33
11	12	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.67
12	2	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.83
13	48	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.67
14	164	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.17
15 plantas por genotipo						
1	155	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.83
2	15	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.50
3	115	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.67
4	163	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.50
5	10	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.33
6	53	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.50
7	168	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	3.00
8	51	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	3.00
9	123	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	3.00
10	98	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	3.17
11	121	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	3.00
12	49	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	3.00
13	103	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.67
14	47	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	3.17
15	57	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.67
16	25	F ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	3.17
15 plantas por genotipo						
1	PR0313-58	P ₁	SAP 6	-	-	3.30
2	VAX 6	P ₂	SAP 6	SU91	SU91-CG11	2.70
3	Morales	Control	-	-	-	8.92

Las mismas líneas F_{2:3} fueron sembradas en un ensayo de campo en la Subestación de Isabela (Tabla 7). Estas líneas presentaron el patrón de segregación esperado y de respuesta similar al ensayo de invernadero, aunque la intensidad de expresión de los síntomas fue más baja. Esto pudo deberse a que las temperaturas máximas fueron menores que las del invernadero.

El rango de reacciones en el campo fue similar al observado en el primer ensayo de invernadero. Las líneas susceptibles mostraron valores máximos de entre 3 y 4 según la escala. El padre susceptible PR0313-58 mostró valores entre 4 y 5 según la escala, mientras que el testigo susceptible, Morales, mostro valores de entre 9 a 10 según la escala, es decir una infección sistémica en todas las plantas inoculadas, estos datos son muy cercanos a los reportados por Zapata *et al.* (2011) (Tabla 8).

Estos resultados indican que los procesos de inoculación, metodología y manejo del ensayo de campo fueron llevados correctamente. En general, la respuesta de las familias F_{2:3} seleccionadas en el invernadero con altos niveles de resistencia al tizón bacteriano causada por la cepa de *Xap* UPR 3353 mantuvieron su resistencia en el campo.

Tabla 8. Segregación de las familias F_{2,3} resistentes y susceptibles bajo condiciones de campo en la Subestación de Isabela.

Generación F ₂ (medias de <i>DSI</i>)			F ₃ – Evaluación en el campo										
#	ID de familias F ₂	Reacción al tizón bacteriano	Valores en la escala										Total plantas
			1	1.1-2.0	2.1-3.0	3.1-4.0	4.1-5.0	5.1-6.0	6.1-7.0	7.1-8.0	8.1-9.0	9.1-10	
1	MG 176	Resistente (1.8)	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	9
2	MG 203	Resistente (1.7)	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6
3	MG 74	Resistente (1.5)	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	9
4	MG 119	Resistente (1.5)	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0	9
5	MG 141	Resistente (1.7)	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0	9
6	MG 133	Resistente (1.5)	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	9
7	MG 32	Resistente (1.8)	0	5	4	0	0	0	0	0	0	0	9
8	MG 41	Resistente (1.5)	0	2	7	0	0	0	0	0	0	0	9
9	MG 135	Resistente (2.0)	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	9
10	MG 60	Resistente (1.7)	0	6	3	0	0	0	0	0	0	0	9
1	MG 123	Susceptible (3.0)	0	4	4	1	0	0	0	0	0	0	9
2	MG 98	Susceptible (3.2)	0	0	7	2	0	0	0	0	0	0	9
3	MG 121	Susceptible (3.0)	0	4	5	0	0	0	0	0	0	0	9
4	MG 49	Susceptible (3.0)	0	6	3	0	0	0	0	0	0	0	9
5	MG 103	Susceptible (2.8)	0	4	5	0	0	0	0	0	0	0	9
6	MG 47	Susceptible (3.2)	0	1	5	3	0	0	0	0	0	0	9
7	MG 57	Susceptible (2.7)	0	1	7	1	0	0	0	0	0	0	9
8	MG 25	Susceptible (3.2)	0	3	5	1	0	0	0	0	0	0	9
P ₁	PR0313-58	Padre susceptible	0	0	0	4	5	0	0	0	0	0	9
P ₂	VAX 6	Padre resistente	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	9
C ¹	Morales	Testigo suscep,	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9
C ²	Verano	Testigo resistente	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	9

C¹= testigo susceptible, C²= testigo resistente

Los patrones de segregación esperados en la prueba de progenie en la generación F₃ confirmaron el modelo propuesto para dos genes dominantes. Suponiendo que dos genes dominantes (*R1R2*) confieren altos niveles de resistencia al tizón bacteriano, plantas F₂ con altos niveles de resistencia tendrían cuatro posibles genotipos (*R1/r1 R2/r2*, *R1/R1 R2/r2*, *R1/r1 R2/R2* y *R1R1R2R2*). Líneas F_{2:3} de las plantas F₂ con el genotipo *R1/r1 R2/r2* podrían producir plantas F_{2:3} con mayores niveles de susceptibilidad al tizón bacteriano, tal como se observa para las líneas MG 203 y MG 119 (Tabla 9).

Las líneas F_{2:3} de plantas F₂ con los genotipos *R1/R1 R2/r2* o *R1/r1 R2/R2* se podrían segregar en una proporción de 3 altamente resistentes y 1 moderadamente resistente. Las cuatro líneas F_{2:3} que segregaron para niveles altos y moderados de resistencia, ajustaron a la relación esperada de 3 altamente resistentes a 1 moderadamente resistente (Tabla 10). Todas las plantas de las dos líneas F₂ (MG74 y MG133) con el genotipo putativo *R1/R1R2R2* fueron altamente resistentes al tizón bacteriano. Por lo tanto, existe una buena concordancia entre los resultados fenotípicos obtenidos en las generaciones F₂ y F₃.

Con el fin de estimar los coeficientes dominante (*d*) y aditivo (*a*), y los parámetros genéticos de la herencia a la alta resistencia al tizón bacteriano causada por la cepa de *Xap* UPR 3353, se realizó un análisis de medias generacionales. Se tomó el supuesto del modelo mendeliano base para dos genes dominantes (*R1R2*), en donde los alelos dominantes provienen del padre resistente (VAX6) y que el padre susceptible (PR0313-58) posee los alelos recesivos (*r1r2*).

En este modelo combinado se utilizaron matrices codificadas para que fueran leídas por el programa estadístico SAS, en donde cada coeficiente recibió un valor. El valor atribuido a cada coeficiente fue de 0.5 ó ½. El P₁ tomó un valor del coeficiente de aditividad (*a*) igual a 1 (P₁= *aa*= 0.5 + 0.5= 1). El P₂ tomó un valor de aditividad igual a -1 (negativo uno) ya que carece del mismo, es decir P₂= *dd* o *-a-a* = -0.5*a* - 0.5*a* = -1 (Piepho y Möhring, 2010, 2010).

Tabla 9. Patrón de segregación en las familias de la generación F₃ en el invernadero de TARS en Mayagüez, PR y en el campo en Isabela, PR.

Familias F ₃	Lecturas de reacción al tizón bacteriano ¹		
	Lectura F ₂	Promedios de las lecturas de invernadero F ₃	Promedio de las lecturas del campo F ₃
R1/r1 R2/r2			
MG 203	1.7	7 plantas ≤ 4.0 & 3 plantas ≥ 6.0	Todas ≤ 2
MG 119	1.5	8 plantas ≤ 4.0 & 2 plantas ≥ 5.0	Todas ≤ 3
R1/R1 R2/r2 o R1/r1 R2/R2			
MG 141	1.7	7 plantas ≤ 4.0 & 3 plantas > 4.0	Todas ≤ 2
MG 32	1.8	5 plantas ≤ 4.0 & 5 plantas > 4.0	Todas ≤ 3
MG 41	1.5	8 plantas ≤ 4.0 & 2 plantas > 4.0	Todas ≤ 3
MG 176	1.8	9 plantas ≤ 4.0 & 1 plantas > 4.0	
Total		29 plantas ≤ 4.0 & 11 plantas > 4.0	
R1/R1 R2/R2			
MG 74	1.5	10 plantas ≤ 4.0	Todas < 2
MG 133	1.5	10 plantas ≤ 4.0	Todas < 2

¹ Escala de 1-10 donde: 1) no muestra ninguna infección, solo cicatrización; 2) presenta halos cloróticos de 1 a 2 mm de diámetro; 3) las lesiones cloróticas miden aprox. entre 3 a 5 mm de diámetro; 4) los halos cloróticos de los tres puntos se están uniendo, el tejido es más acuoso, flácido o necrótico; 5) la mitad del trifolio presenta tejido acuoso, necrótico o flácido; 6) el lado izquierdo del trifolio (área de control) está infectado hasta el primer punto de control lacerado y presenta tejido acuoso, flácido o necrótico, mostrando así el avance de la enfermedad hacia el lado del control; 7) la infección ha avanzado hasta el segundo punto lacerado del área de control; 8) la infección ha avanzado hasta el tercer punto lacerado del área de control, el tejido es clorótico, flácido o necrótico; 9) ambos lados, control e inoculado del trifolio central han sido infectados totalmente por tejido acuoso, necrótico o clorótico, o a su vez se defoliado y 10) los trifolios laterales presentan tejido acuoso o necrosis, hay invasión sistémica e incluso puede haber defoliación total de la hoja trifoliada.

Tabla 10. Pruebas de Chi-cuadrado para el patrón de segregación esperado en las familias F_{2:3} con genotipo R1/R1 R2/r2 o R1/r1 R2/R2 de la prueba de progenie, sembradas en el invernadero de TARS.

	Observados	Esperados
Resistentes	29	30
Susceptibles	11	10
Total	40	40
	Chi-cuadrado = 1.33	P = 0.24 ^{NS}

*Valor significativo. ^{NS} valor no significativo.

La generación F_1 tiene un valor igual a 0 ($F_1 = a - a = 0.5 - 0.5 = 0$). F_2 toma un valor igual a cero también. La BC_1 asume un valor igual a 0.5 ($BC_1 = 0F_1 + 0.5a = 0.5$) y la BC_2 un valor de aditividad igual a -0.5 ($BC_2 = 0F_1 - 0.5a = -0.5$); los valores del coeficiente de dominancia d se estimaron de la misma manera que los valores para el coeficiente de aditividad a . Las varianzas también son codificadas con valores de 0, 0.5, 1 y -1 (Kearsey y Pooni, 1996) (Tabla 11).

Tabla 11. Valores de los coeficientes a , d y de las varianzas genéticas de las medias fenotípicas para las seis generaciones (modificado de Kearsey y Pooni, 1996) evaluadas en los invernaderos de la Finca Alzamora.

Valores de los coeficientes y parámetros de las medias								
Generaciones	a	d	aa	ad	dd	δ^2_A	δ^2_D	δ^2_{AD}
P ₁ (PR0313-58)	1	0	1	0	0	0	0	0
P ₂ (VAX 6)	-1	0	1	0	0	0	0	0
F ₁	0	1	0	0	1	0	0	0
F ₂	0	0.5	0	0	0.5	1	1	0
BC ₁	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	-1
BC ₂	-0.5	0.5	0.5	-0.5	0.5	0.5	1	1

En este modelo combinado se utilizó una matriz diagonal codificada de coeficientes tipo LIN (3) para ser usada en el cálculo de la estructura de las varianzas y covarianzas (δ^2_A , δ^2_D y δ^2_{AD}) (Tabla 12).

Los datos crudos fueron organizados en el siguiente orden: bloques, parcelas, plantas, generación, variable dependiente, prueba de ajuste, coeficiente a y coeficiente d (Apéndice 2). Los valores de a y d fueron dados a cada UE de acuerdo a los cálculos estimados en la Tabla 11.

Para este análisis combinado (*GMA*) 213 de las 219 plantas de las seis generaciones fueron seleccionadas y distribuidas en tres bloques de seis parcelas cada uno, cada parcela contenía: cuatro plantas de la BC_1 , dos plantas de la BC_2 de plantas, tres plantas de la generación F_1 , 48 plantas de la generación F_2 , siete plantas del P_1 (PR0313-58) y siete plantas del P_2 (padre recurrente VAX 6). Esta selección y distribución fueron realizadas ya que el modelo necesita un número igual de unidades experimentales por parcela (Piepho y Möhring, 2010).

Tabla 12. Matriz codificada de coeficientes para la estimación de las varianzas δ^2_A (*parm 1*), δ^2_D (*parm 2*) y δ^2_{AD} (*parm 3*) modificada de Piepho y Möhring, 2010 (2010).

	<i>parm</i>	<i>gen</i>	<i>Row</i> (<i>gen</i>)	<i>col1</i> (<i>B1</i>)	<i>col2</i> (<i>B2</i>)	<i>col3</i> (<i>F1</i>)	<i>col4</i> (<i>F2</i>)	<i>col5</i> (<i>P1</i>)	<i>col6</i> (<i>p2</i>)
δ^2_A (<i>parm 1</i>)	1	<i>B1</i>	1	0.5	0	0	0	0	0
	1	<i>B2</i>	2	0	0.5	0	0	0	0
	1	<i>F1</i>	3	0	0	0	0	0	0
	1	<i>F2</i>	4	0	0	0	1	0	0
	1	<i>P1</i>	5	0	0	0	0	0	0
	1	<i>P2</i>	6	0	0	0	0	0	0
δ^2_D (<i>parm 2</i>)	2	<i>B1</i>	1	1	0	0	0	0	0
	2	<i>B2</i>	2	0	1	0	0	0	0
	2	<i>F1</i>	3	0	0	0	0	0	0
	2	<i>F2</i>	4	0	0	0	1	0	0
	2	<i>P1</i>	5	0	0	0	0	0	0
	2	<i>P2</i>	6	0	0	0	0	0	0
δ^2_{AD} (<i>parm 3</i>)	3	<i>B1</i>	1	-1	0	0	0	0	0
	3	<i>B2</i>	2	0	1	0	0	0	0
	3	<i>F1</i>	3	0	0	0	0	0	0
	3	<i>F2</i>	4	0	0	0	0	0	0
	3	<i>P1</i>	5	0	0	0	0	0	0
	3	<i>P2</i>	6	0	0	0	0	0	0

Se observó una distribución de medias con un rango de 1.35 a 2.76 basado en la escala de 1 a 10. La separación de medias generacionales del análisis combinado fue calculada con base en el promedio de la reacción al tizón bacteriano observada en las tres hojas trifoliadas por planta. Se generaron tres grupos o clases de reacción al tizón bacteriano con diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que la experimentación bajo las condiciones de invernadero fue eficaz y capaz de distinguir las plantas altamente resistentes, las resistentes y las susceptibles, tal como se había planteado en el ANOVA de la primera parte del estudio.

La primera clase (A) está compuesta por las generaciones: P_1 , F_1 y la BC_1 , esa clase corresponde a los genotipos que mostraron susceptibilidad a la cepa de *Xap* UPR 3353. La segunda clase (B) está compuesta por la generación F_2 con una media-LS de 2.00 según la escala utilizada. Esta clase corresponde a los genotipos identificados como resistentes; esta es la

generación segregante, la cual fue base para identificar el patrón mendeliano de los dos genes dominantes. La tercera clase (C) agrupa al P₂ VAX 6 con una media-LS de 1.50 y también incluye a la BC₂ con 1.35 de media-LS, un valor numérico de media más bajo que el padre resistente pero un valor no estadísticamente significativo como para ubicarlo en otra clase (Tabla 13).

Tabla 13. Separación de medias de las seis generaciones sembradas en la Finca Alzamora con base en el análisis de medias generacionales (GMA).

Agrupamiento T para las seis generaciones		
Generación	Media-LS estimada [†]	Clase
P ₁	2.76	A
F ₁	2.70	A
BC ₁	2.64	A B
F ₂	2.01	B
P ₂	1.50	C
BC ₂	1.35	C

[†]Medias calculadas con base en diferencias estadísticas > 0.05 (*LSM Least Squares Means*). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, esto de acuerdo a la prueba-t que realiza el modelo combinado.

La prueba tipo 1 de los efectos ajustados mostró alta significancia para el coeficiente de aditividad (*a*), pero no hubo significancia para el coeficiente de dominancia (*d*). Este resultado sugiere en primera instancia que la resistencia causada por la cepa de *Xap* UPR 3353 tiene una acción génica aditiva, pero al observar el valor *P* de la prueba de ajuste, se observa una alta significancia, lo cual indica que el modelo no se ajusta al experimento, por tanto no podemos decir que hubo un efecto génico aditivo (*a*) de los genes que están asociados a la alta resistencia al tizón bacteriano causada por la cepa de *Xap* UPR 3353 (Tabla 14). Sin embargo, los resultados de las pruebas de Chi-cuadrado indican que la herencia de los altos niveles de resistencia al tizón bacteriano no es cuantitativa, sino que es controlada por dos genes dominantes.

Según Sunil y Prakash (2010) el *GMA* y otros modelos estadísticos para análisis genéticos, proporcionan información útil basada en los efectos ajustados (Bloque, *a*, *d* y prueba de ajuste). Este modelo genera información del efecto aditivo o dominante, pero también genera información de los efectos de interacción entre ellos y con factores externos como el ambiente (Piepho y Möhring, 2010, 2010). La falta de la prueba de ajuste, que es altamente significativa, refleja también un bajo número de réplicas y UE en las parcelas, sobre todo en las generaciones F_2 , F_1 , BC_1 y la BC_2 usadas en este experimento.

Los datos generados en este estudio no son suficientes si tratáramos de estimar los componentes de varianza, pero la información generada es confiable si solamente queremos separar clases discretas con diferencias significativas para comprobar un modelo mendeliano base.

Tabla 14. Prueba F para el modelo aditivo-dominante tipo *Wald*, que incluye la prueba de ajuste (prueba escalonada conjunta *joint scaling test*) del *GMA* de las seis generaciones evaluadas en los invernaderos de la Finca Alzamora.

Prueba tipo 1 de los efectos ajustados				
Efecto	Grados de libertad (GL)	Denominador de los GL	Valor F- <i>Wald</i>	Probabilidad > F
Bloque	2	94.1	3.35	0.0392
<i>a</i>	1	58.9	60.17	<.0001**
<i>d</i>	1	61.3	1.24	0.2705 ^{NS}
Prueba de ajuste	3	23.8	7.37	0.0012**

† Calculado por el método *Kenward-Roger* (Kenword y Roger, 2009). **Alta significancia. ^{NS} No significancia.

Bajo las condiciones de campo, a madurez de cosecha, fueron seleccionadas plantas individuales con buena arquitectura y carga de vainas. Las semillas (F_3) fueron recolectadas, pesadas e identificadas por color y tipo, para posteriormente sembrarlas y seguir el proceso de selección.

Las líneas F_{3:4} de la prueba de progenie, que mostraron alta resistencia al tizón bacteriano y tolerancia a altas temperaturas en el invernadero de TARS y en campo, fueron sembradas en la Subestación de Isabela durante los meses de febrero a mayo de 2013, con el fin de identificar líneas que mostraran buenos caracteres agronómicos y genéticos.

Se sembraron 100 líneas F_{3:4} en tres repeticiones, formando un grupo de 300 parcelas, cada parcela tenía un metro de longitud con 10 a 15 plantas. A los 25 días después de la germinación, se hizo un muestreo de tejido foliar joven en 50 plantas que mostraban buena arquitectura y vigor, para diagnosticar la presencia de los marcadores: SU91, SU91-CG11, SW13, ENM (*pv.eif4e*), SR2 y SR21, de lo cual se obtuvo la información suficiente para seleccionar líneas promisorias con características agronómicas y genéticas deseables (Tabla 15).

Los resultados mostraron 12 grupos de líneas con varias combinaciones. El primer grupo está formado de seis líneas elite con los caracteres agronómicos deseados y que combinan los marcadores SR2 y SR21 para el gen recesivo *bgm I* y el marcador SW12 para el *QTL* mayor de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo (*BGYMV*).

Este grupo presenta también: el gen *I* que confiere resistencia al virus del mosaico común (*BCMV*); el *QTL* *SU91*, el gen candidato *CG-11*, la alta resistencia al tizón bacteriano y la tolerancia al calor.

Tres líneas de este grupo son retrocruzas con PR0313-58 lo que contribuye a una buena forma, tamaño y color de grano. Las líneas MG 133-3 y MG 68-1, no presentaron los marcadores SU91 y SU91-CG11, indicando nuevamente que estos dos marcadores no son suficientes para identificar la alta resistencia al tizón bacteriano.

Estos resultados enfatizan la necesidad de buscar marcadores moleculares que ayuden a seleccionar genotipos con alta resistencia al tizón bacteriano.

El segundo grupo formado por cinco líneas, combinaron los marcadores para *bgm I*, gen *I*, *QTL* *SU91*, *CG-11* y para tolerancia al calor. El tercer grupo de 10 líneas combinaron la presencia del *QTL* mayor para *BGYMV*, el gen *I*, el *QTL* mayor *SU91*, el gen candidato *CG-11* y la tolerancia al calor. Un cuarto grupo formado por 16 líneas combinaron: gen *I*, *QTL* *SU91*, *CG-11* y tolerancia al calor.

Los demás grupos combinan en varias maneras los marcadores utilizados en el diagnóstico, pero se sigue observando la ausencia de los marcadores SU91 y SU91-CG11 en las líneas con alta resistencia al tizón bacteriano (Apéndice 4).

Las líneas de los cuatro primeros grupos, serán sembradas para continuar con el proceso de mejoramiento para características agronómicas, con el fin de obtener líneas fuente para la alta resistencia al tizón bacteriano.

Podemos concluir de este estudio que, en la población derivada de la cruce entre PR0313-58 y VAX 6, dos genes dominantes putativos confieren los altos niveles de resistencia al tizón bacteriano causado por la cepa de *Xap* UPR 3353.

Los marcadores tipo *SCAR* SU91 y SU91-CG11 no fueron efectivos para identificar las plantas con altos niveles de resistencia al tizón bacteriano. Por lo tanto, es necesario identificar nuevos marcadores para estos dos genes dominantes putativos de alta resistencia. La identificación de marcadores eficaces para estos genes permitiría el uso de retrocruzamiento y selección asistida por marcadores para la introgresión de esta resistencia.

Por último, líneas blancas y negras, que combinan la alta resistencia al tizón bacteriano, la tolerancia al calor, la resistencia a los virus *BGYMV* y *BCMV* fueron identificadas.

Tabla 15. Líneas seleccionadas que combinan la alta resistencia al tizón bacteriano, al virus del mosaico dorado amarillo *BGYMV*, al virus del mosaico común *BCMV* y la tolerancia a altas temperaturas.

#	ID	Fuente	Gen.	21DDI	Reac. Ψ	SR21	SR2	SW12	SW13	SU91	SU91- CG11	T. calor	EiF4e
Grupo # 1													
1	MG 219	BC ₁	F ₃	1	AR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	MG 166-1	BC ₁	F ₃	1	AR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
3	MG 166-2	BC ₁	F ₃	1	AR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
4	MG 133-1	R3 P06-1	F ₄	1.3	AR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
5	MG 133-3	R3 P06-3	F ₄	1.3	AR	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
6	MG 68-1	R3 P14-1	F ₄	1.7	AR	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Grupo # 2													
1	MG188-1	BC ₂	F ₃	1	AR	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	MG 41-4	94	F ₄	1.3	AR	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
3	MG 22-1	R1 P16-1	F ₄	1.7	AR	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
4	MG 112-1	R3 P3-1	F ₄	2	R	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
5	MG 112-1	R1 P13-1	F ₄	2	R	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Grupo # 3													
1	MG 23-1	R1 P18-1	F ₄	1	AR	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	MG 181		F ₃	1.2	AR	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
3	MG 25-2	R2 P38-2	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
4	MG 117-8	163	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
5	MG 84-7	162	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
6	MG 49-2	R1 P34-2	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
7	MG 12-2	R2 P19-2	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
8	MG 135-2	R3 P09-2	F ₄	2	R	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
9	MG 68-1	R1 P14-1	F ₄	2	R	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
10	MG 84-1	R1 P15-1	F ₄	2	R	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Grupo # 4													
1	MG 135-10	125	F ₄	1	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	MG 203-1	21	F ₄	1	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
3	MG 203-1	21	F ₄	1	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
4	MG 176-2	R1P01-2	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
5	MG 176-3	R2 P01-3	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
6	MG 90-9	154	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
7	MG 176-3	R2 P01-3	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
8	MG 90-9	154	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
9	MG 90-9	154	F ₄	1.3	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
10	MG 23-4	219	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
11	MG 203-1	R2 P02-1	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
12	MG 32-1	R1 P07-1	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
13	MG 60-10	135	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
14	MG 203-2	R1 P02-1	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
15	MG 203-1	21	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
16	MG 135-10	125	F ₄	2.3	R	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

Gen.: generación, 21DDI: lectura a los 21 días después de la inoculación, Reac.Ψ: AR: altamente resistente, R: resistente.

REFERENCIAS

- Abd-Alla, M.H., S.R. Bashandy and S. Schenell. 2010. Occurrence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, the Causal Agent of Common Bacterial Blight Disease, on Seeds of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Upper Egypt. *Folia Microbiol.* 55(1):47-52.
- Allen, D.J., J.K.O. Ampofo and C.S. Wortman, 1996. Pests, diseases and nutritional disorders of the common bean in Africa: A field guide. CIAT Publication No. 260, Cali, Colombia. 132 p.
- Beaver, J.S., T.G. Porch and M. Zapata, 2008. Registration of 'Verano' white bean. *J. Plant Reg.* 2:187-189.
- Beaver, J.S., T.G. Porch and M. Zapata, 2010. 'Badillo' light red kidney bean. *J. Plant Reg.* 4:1-4.
- Beaver, J.S. and P.N. Miklas, 1999. Registration of 'Morales' small white bean. *Crop Sci* 39:1257.
- Beaver, J. and J. Osorno, 2009. Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. *Euphytica.* 168:145-175.
- Beaver, J.S., T.G. Porch and M. Zapata, 2008. Registration of 'Verano' white bean. *J. Plant Reg.* 2:187-189.
- Bernardo, R., 2002. Breeding for quantitative traits in plants. Stemma Press, Woodbury, MN. 400p.
- Birch, P.R.J., L.J. Hyman, R. Taylor, A.F. Opio, C. Bragard and I.K. Toth, 1997. RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:809-814.
- Butron, A., R.A. Malvar, P. Revilla, P. Soengas, and A. Ordas, 2002. Rind puncture resistance in maize: Inheritance and relationship with resistance to pink stem borer. *Plant Breed.* 121:378-382.
- Castellanos-Ramos, J. Z., Guzmán-Maldonado, H. and J.A. Acosta-Gallegos. 2003. Registration of 'Flor de Junio Marcela' Common Bean. *Crop Sci.* 43:1121-1122.
- Chan, J.W.Y.F. and P.H. Goodwin, 1999. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:867-878.
- CIAT. 2000. Annual report of the bean project.
- Coyne, D.P. and M.L. Schuster, 1974. 'Great Northern Valley' dry bean. *HortSci* 9:482.
- Ekpo, E.J.A., and A.W. Saettler, 1976. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. *Plant Dis. Rep.* 60:80-83.

- Fininsa, C., 2003. Relationship between common bacterial blight severity and bean yield loss in pure stand and bean–maize intercropping systems. *Int. J. of Pest Management* 49:177-185.
- Forbes, C.J., and T.W. Bretag, 1991. Efficacy of foliar applied streptomycin for the control of bacterial blight of peas. *Australasian Plant Pathology*, 20:115-118.
- Fourie, D., L. Herselman and C. Mienie, 2011. Improvement of common bacterial blight resistance in southafrican dry bean cultivar teeбус. *African Crop Sci. J.* 19(4):377-386.
- Gabriel, D.W., Kingsley, M.T., J.E. Hunter and T. Gottwald, 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:14-22.
- Gilbertson, R.L., D.P. Maxwell, D.J. Hagedorn and S.A. Leong, 1989. Development and application of a plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. *Phytopathology* 79:518-525.
- Gilbertson, R.L., M.M. Otoyа, M.A. Pastor-Corrales and D. P. Maxwell, 1991. Genetic diversity in common blight bacteria is revealed by cloned repetitive DNA sequences. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 34:37-38.
- Gilbertson, R.L. and D.P. Maxwell, 1992. Common blight of bean. p. 18-39 *In: Diseases of International Importance. Vol 2.* H. S. Chaube, U. S. Singh, and A. N. Mukhopadhyay, eds. Prentice Hall, Inglewood Cliffs, NJ.
- Gilbertson, R.L., M.M. Otoyа, M.A Pastor-Corrales and D.P. Maxwell, 1991. Genetic diversity in common blight bacteria is revealed by clonal repetitive DNA sequences. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 34:37-38.
- Goodwin, P.H. and C.R. Sopher, 1994. Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentisic acid. *Can. J. Microbiol.* 40:28-34.
- Hayward, A.C. and J.M. Waterston, 1965. *Xanthomonas phaseoli*. No. 48 and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. No. 49 *In: CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Common. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, England.* 6p.
- He, Yiqing. Improved seed health tests for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in common bean. 2010. *Graduate Theses and Dissertations.* Paper 11565.
- He, Y., A. Fessehaie, L. Shepherd and G. Munkvold. 2009. A diagnostic real -time PCR assay for the detection and quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *X-axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. *Phytopathology*, 99, S34-S34.

Hildebrand, D.C., N.J. Palleroni and M.N. Schroth, 1990. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonad strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. J. Appl. Bacteriol. 68:263-269.

Hinze, L.L., and K.R. Lamkey, 2003. Absence of epistasis for grain yield in elite maize hybrids. Crop Sci. 43:46-56.

Jung, G., P.W. Skroch, D.P. Coyne, J. Nienhuis, E. Arnaud-Santana, H.M. Ariyaratne, S.M. Kaeppler and M.J. Bassett, 1997. Molecular marker-based genetic analysis of tepary bean-derived common bacterial blight resistance in different developmental stages of common bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122:329-337.

Jung, G., P.W. Skroch, J. Nienhuis, D.P. Coyne, E. Arnaud-Santana, H.M. Ariyaratne, and J.M. Marita, 1999. Confirmation of QTL associated with common bacterial blight resistance in four different genetic backgrounds in common bean. Crop Sci. 39, 1448-1455.

Kearsey, M.J. and H.S. Pooni, 1996. The genetical analysis of quantitative traits. Chapman and Hall, London. 381p.

Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas and D.P. Coyne, 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. Field Crops Res. 82:135-154.

Kenward M.G. and J.H. Roger. 2009. An improved approximation to the precision of fixed effects from restricted maximum likelihood. Comp. Stat. Data Anal. 55:2583-2595.

Lazo, G.R., R. Robin and D.W. Gabriel, 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:214-221.

Lema-Marquez, M., Terán and Singh, S.P, 2007. Selecting common bean with genes of different evolutionary origins for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Crop Sci. 47:1367-1374.

López, R., C. Asensio and R.L. Gilbertson, 2006. Phenotypic and genetic diversity in strains of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) in a secondary center of diversity of the common bean host suggests multiple introduction events. Phytopathology 96:1204-1213.

Mahuku, G. S., C. Jara, M. A. Henriquez, G. Castellanos and J. Cuasquer. 2006. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR-RFLP of the ribosomal genes. *Journal of Phytopathology*, 154, 35-44

Mather, K., and J.L. Jinks, 1971. Biometrical genetics. 2nd ed. Chapman and Hall, London. 382p.

- Mejía-Jiménez, A., C. Muñoz, H.J. Jacobsen, W.M. Roca and S.P. Singh. 1993. Interspecific hybridization between common and tepary beans: increased hybrid embryo growth, fertility, and efficiency of hybridization through recurrent and congruity backcrossing. *Theor Appl Genet.* 88:324-331.
- Mesli, R.J.M., 1987. Disease and pest problems of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. Occasional Publication No. 7. University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa. 62p.
- Miklas, P.N., M. Zapata, J.S. Beaver and K.F. Grafton, 1999. Registration of four dry bean germplasms resistant to common bacterial blight: ICB-3, ICB-6, ICB-8, and ICB-10. *Crop Sci.* 39:594.
- Miklas, P.N., J.D. Kelly, S.E. Beebe and M.W. Blair, 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica* 147:105-131.
- Miklas, P.N., J.R. Smith, R. Riley, K.F. Grafton, S.P. Singh, G. Jung, and D. P. Coyne, 2000. Marker-assisted breeding for pyramided resistance to common bacterial blight in common bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 43:39-40.
- Miklas, P.N., J.R. Smith and S.P. Singh. 2006. Registration of Common Bacterial Blight Resistant dark red Kidney Bean Germplasm Line USDK-CBB-15. *Crop Sci.* 46: 1005-1006.
- Miklas, P.N., J.R. Smith and S.P. Singh. 2006. Registration of Common Bacterial Blight Resistant White Kidney Bean Germplasm Line USDK-CBB-17. *Crop Sci.* 46: 2338.
- Miklas, P.N., D.P. Coyne, K.F. Grafton, N. Mutlu, J. Reiser, D.T. Lindgren and S.P. Singh, 2003. A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana no. 5. *Euphytica* 131:137-146.
- Mohamed, M.F., D.P. Coyne and P.E. Read. 1995. A Radiation-Induced Mutant with Resistance to Common Bacterial Blight Disease in Common Beans. *Hort Science.* 30(3):577-578.
- Mkandawire, A.B.C., R.B. Mabagala, P. Guzmán, P. Gepts and R.L. Gilbertson, 2004. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology* 94:593-603.
- Msuku, W.A.B., V.W. Saka and D.C. Munthali, 2000. Major diseases and insect pests of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Malawi: Problems and their control. University of Malawi, Lilongwe, Malawi. 62 p.
- Muimui, K.K., P.M. Kimani and J.W. Muthomi, 2011. Resistance and inheritance of common bacterial blight in yellow bean. *African Crop Sci. J.* 19(4):277-287.

- Muñoz, L.C., M.W. Blair, M.C. Duque, J. Tohme and W. Roca. 2004. Introgression in Common Bean _ Tepary Bean Interspecific Congruity-Backcross Lines as Measured by AFLP Markers. *Crop Sci.* 44:637-645.
- Mutlu, N., P.N. Miklas, J. Reiser and D.P. Coyne, 2005. Backcross breeding for improved resistance to common bacterial blight in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Breed.* 124:282-287.
- Mutlu, N., A. K. Vidaver, D. P. Coyne, J. R. Steadman, P. A. Lambrecht and J. Reiser. 2008. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. *Plant Dis.* 92:546-554.
- Oettler, G., N. Heinrich and T. Miedaner, 2004. Estimates of additive and dominance effects for Fusarium head blight resistance of winter triticale. *Plant Breed.* 123:525-530.
- Opio, A.F., D.J. Allen and J.M. Teri, 1995. The role of weeds and nonhost crops in the survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Uganda. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 38:166-167.
- Osdaghi, E., A. Alizadeh, M. Shams-Bakhsh and M. Reza Lak. 2009. Evaluation of common bean lines for their reaction to the common bacterial blight pathogen. *Phytopathol. Mediterr.* 48:461-468.
- Park, S.O., D.P. Coyne and G. Jung, 1998. Gene estimation, associations of traits, and confirmation of QTL for common bacterial blight resistance in common bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 41:145-146.
- Park, S.J., and B.N. Dhanvantari. 1987. Transfer of common blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) resistance from *Phaseolus coccineus* Lam. to *P. vulgaris* L. through interspecific hybridization. *Can. J. Plant Sci.* 67:685-695.
- Pedraza, F., G. Gallego, S. Beebe and J. Tohme, 1997. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis común (CBB). p.130-134. *En Singh, S.P. y O. Voysest (eds.). Taller de mejoramiento de frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina.* CIAT, Cali, Colombia. 559p.
- Piepho, H.P. and J. Mohring, 2010. Generation mean analysis using mixed models. *Crop Sci.* 50:1674-1680.
- Rademaker, J.L.W., F.J. Louws, M.H. Schultz, U. Rossbach, L. Vauterin, J. Swings and F.J de Bruijn, 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95:1098-1111.
- Rava, C.A. and R.S. Romeiro, 1990. Variability among isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in relation to their pathogenicity on *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Summa Phytopathol.* 16:225-232.

- Revilla, P., R.A. Malvar, M.E. Cartea, A. Butron and A. Ordas, 2000. Inheritance of cold tolerance at emergence and during early season growth in maize. *Crop Sci.* 40:1579-1585.
- Rodriguez-Herrera, R., W.L. Rooney, D.T. Rosenow, and R.A. Frederiksen, 2000. Inheritance of grain mold resistance in grain sorghum without a pigmented testa. *Crop Sci.* 40:1573-1578.
- Rodriguez-Miranda, O. and J.C. Rosas-Sotomayor, 2010. Selección de genotipos de frijol común por su resistencia al tizón bacteriano. *Agronomía Mesoamericana* 21(2):275-280.
- Rosas, J.C., 1998. El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press. 52 p.
- Sabet, K.A., 1959. Studies in the bacterial diseases of Sudan crops. III. On the occurrence, host range and taxonomy of bacteria causing leaf blight diseases of certain leguminous hosts. *Ann. Appl. Biol.* 47:318-331.
- Saettler, A.W., 1989. Common bacterial blight. p. 261-283. *In: Bean production problems in the Tropics.* H.F. Schwartz and M.A. Pastor-Corrales. (eds.) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 725p.
- Saettler, A.W., C.R. Cafati and D.M. Weller, 1986. Non-overwintering of *Xanthomonas* bean blight bacteria in Michigan. *Plant Dis.* 70:285-287.
- Scott, M.E. and T.E. Michaelis. 1992. *Xanthomonas* Resistance of Phaseolus Interspecific Cross Slections Confirmed by Field Performance. *Hort Science.* 27(4):348-350.
- Schaad, N.W., J.B. Jones, and W. Chun, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant-Pathogenic Bacteria, 3rd ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 373p.
- Schuster, M.L., 1983. Variability in virulence of Dominican Republic *Xanthomonas phaseoli* in CIAT Phaseolus vulgaris cultivars. *Fitopatol. Bras.* 8:339-345.
- Schuster, M.L., and D.P. Coyne, 1971. New virulent strains of *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Dis. Rep.* 55:505-506.
- Schuster, M.L. and D.P. Coyne, 1977. Characterization and variation of *Xanthomonas* and *Corynebacterium* incited diseases of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Fitopatol. Bras.* 2:200-207.
- Schuster, M.L., D.P. Coyne and B. Hoff, 1973. Comparative virulence of *Xanthomonas phaseoli* strains from Uganda, Colombia, and Nebraska. *Plant Dis. Rep.* 57:74-75.
- Shi, C., K. Yu, W. Xie, G. Perry, A. Navabi, k.P. Pauls, P.N. Miklas and D. Fourie. 2012. Development of candidate gene markers associated to common bacterial blight resistance in common bean.
- Silva, L.O., S.P. Singh and M.A. Pastor-Corrales, 1989. Inheritance of resistance to common bacterial blight in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 78: 619-624.

- Singh, S.P., 1992. Common bean improvement in the tropics. *Plant. Breed. Rev.* 10:199-269.
- Singh, S.P. and C.G. Muñoz, 1999. Resistance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvement. *Crop Sci.* 39:80–89.
- Smith, J.R., S. J. Park., P.N. Miklas and C.H. Canaday. 2005. Registration of TARS-PT03-1 Inter-Racial Multiple Disease-Resistant Dry bean Germplasm. *Crop Sci.* 45: 1669-1670.
- Sunil, B. and M. Prackash. 2010. Generation mean analysis of seed protein architect in mungbean (*Vigna radiata* (L) Wilczek). *International Journal of Current Research.* 3:017-019.
- Thomas, C.V. and J.G. Waines. 1984. Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. *Heredity.* 75:93-98.
- Toth, I. K., L. J. Hyman, R. Taylor and P. R. J. Birch (1998) PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 327-336.
- Urrea, C.A., Miklas, P.N. and J.S. Beaver. 1999. Inheritance of resistance to common bacterial blight in four tepary bean lines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124:24-27.
- Valladares-Sanchez, N. E., D.P. Coyne and M.L. Schuster, 1979. Differential reaction of leaves and pods of *Phaseolus* germplasm to strains of *Xanthomonas phaseoli* and transgressive segregation for tolerance from crosses of susceptible germplasm. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104:648-654.
- Vidaver, A.K. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: Cause of common bacterial blight of bean. p. 40-44 *In: Xanthomonas.* J. G. Swings and E. L. Civerolo (eds.) Chapman & Hall, London. 399p.
- Wilson, J.A., D.V. Glove, and W.E. Nyquist, 2000. Genetic effects of the soft starch (*h*) and background loci on volume of starch granules in five inbreds of maize. *Plant Breed.* 119:173-176.
- Yoshii, K., G.E. Galvez and G. Alvarez, 1978. Screening bean germplasm for tolerance to common blight caused by *Xanthomonas phaseoli* and the importance of pathogenic variation to varietal improvement. *Plant Dis. Rep.* 62:343-347.
- Yu, K., S.J. Park and V, Poysa. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficiency and economics. *Plant Breed* 119:411-416.
- Yu. K., C. Shi, and B. Zhang.2012. Development and Application of Molecular Markers to Breed Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for Resistance to Common Bacterial Blight (CBB) — Current Status and Future Directions, Applied Photosynthesis, Dr Mohammad Najafpour (Ed.), ISBN: 978-953-51-0061-4, InTech, Available from:

<http://www.intechopen.com/books/applied-photosynthesis/development-and-application-of-molecular-markers-to-breed-common-bean-phaseolus-vulgaris-l-for-resis>

Yu, Z.H., R.E. Stall and C.E. Vallejos, 1998. Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans. *Crop Sci.* 38:1290-1296.

Zaiter, H.Z., D.P. Coyne, A.K. Vidaver and J.R. Steadman, 1989. Differential reaction of tepary bean lines to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *HortSci.* 24:134-137.

Zapata, M., J.S. Beaver and T.G. Porch. 2011. Dominant gene for common bean resistance to common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Euphytica* 179:373-382.

Zapata, M., G.F. Freytag and R.E. Wilkinson, 1985. Evaluation for bacterial blight resistance in beans. *Phytopathology* 75:1032-1039.

Zapata, M. Beaver, J.S. and T. Porch. 2009. Evidence for a dominant gene on leaves of common bean to the common bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 52:72-73.

Zapata, M. and J.S. Beaver. 2005. Differential leaf reaction of common bean lines to pathogenic races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* from Costa Rica, Nicaragua, and Puerto Rico. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 48:102-103.

Zapata, M., 1998. Hypersensitive reaction of tepary bean upon inoculation with the common bean blight pathogen. *J. Agric. University of Puerto Rico* 81:181-190.

Zapata, M., 1996. Pathogenic variability of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Ann. Rep. Bean. Improv. Coop.* 39:136-137.

Zapata, M., 1997. Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* races in *Phaseolus vulgaris* leaves. *Agron. Mesoam.* 8:44-52.

Zapata, M., 2006. Proposed of a uniform screening procedure for the evaluation of variability of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and resistance on leaves of *Phaseolus vulgaris* under greenhouse conditions. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 49:213-214.

Zaumeier, W.J. and H.R. Thomas, 1957. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. 868p.

APENDICES

Apéndice 1. Resultados de los análisis de varianzas de las tres lecturas de las seis generaciones a los 14, 21, 28 días después de la inoculación.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
14DAI	648	0.07	0.06	29.60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10.46	7	1.49	6.52	<0.0001
Replica	0.32	2	0.16	0.69	0.5001
Generat	10.14	5	2.03	8.85	<0.0001
Error	146.63	640	0.23		
Total	157.09	647			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.09044

Error: 0.2291 gl: 640

Replica	Medias	n	E.E.
R3	1.60	216	0.04 A
R1	1.61	216	0.04 A
R2	1.65	216	0.04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.17124

Error: 0.2291 gl: 640

Generat	Medias	n	E.E.
P2	1.38	66	0.06 A
BC2	1.38	21	0.10 A
F2	1.61	426	0.02 B
BC1	1.69	39	0.08 B C
F1	1.82	33	0.08 C
P1	1.86	63	0.06 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
21DAI	648	0.13	0.12	39.19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	56.98	7	8.14	13.39	<0.0001
Replica	2.60	2	1.30	2.14	0.1190
Generat	54.38	5	10.88	17.88	<0.0001
Error	389.21	640	0.61		
Total	446.18	647			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.14735

Error: 0.6081 gl: 640

Replica	Medias	n	E.E.
R3	1.93	216	0.06 A
R1	2.06	216	0.06 A
R2	2.06	216	0.06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.27898

Error: 0.6081 gl: 640

Generat	Medias	n	E.E.
BC2	1.38	21	0.17 A
P2	1.49	66	0.10 A
F2	1.95	426	0.04 B
BC1	2.27	39	0.12 C
F1	2.47	33	0.14 C
P1	2.54	63	0.10 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
28DAI	648	0.13	0.12	43.02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	78.66	7	11.24	14.18	<0.0001
Replica	1.40	2	0.70	0.88	0.4144
Generat	77.26	5	15.45	19.50	<0.0001
Error	507.22	640	0.79		
Total	585.87	647			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.16822

Error: 0.7925 gl: 640

Replica	Medias	n	E.E.
R3	2.09	216	0.07 A
R2	2.10	216	0.07 A
R1	2.19	216	0.07 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.31848

Error: 0.7925 gl: 640

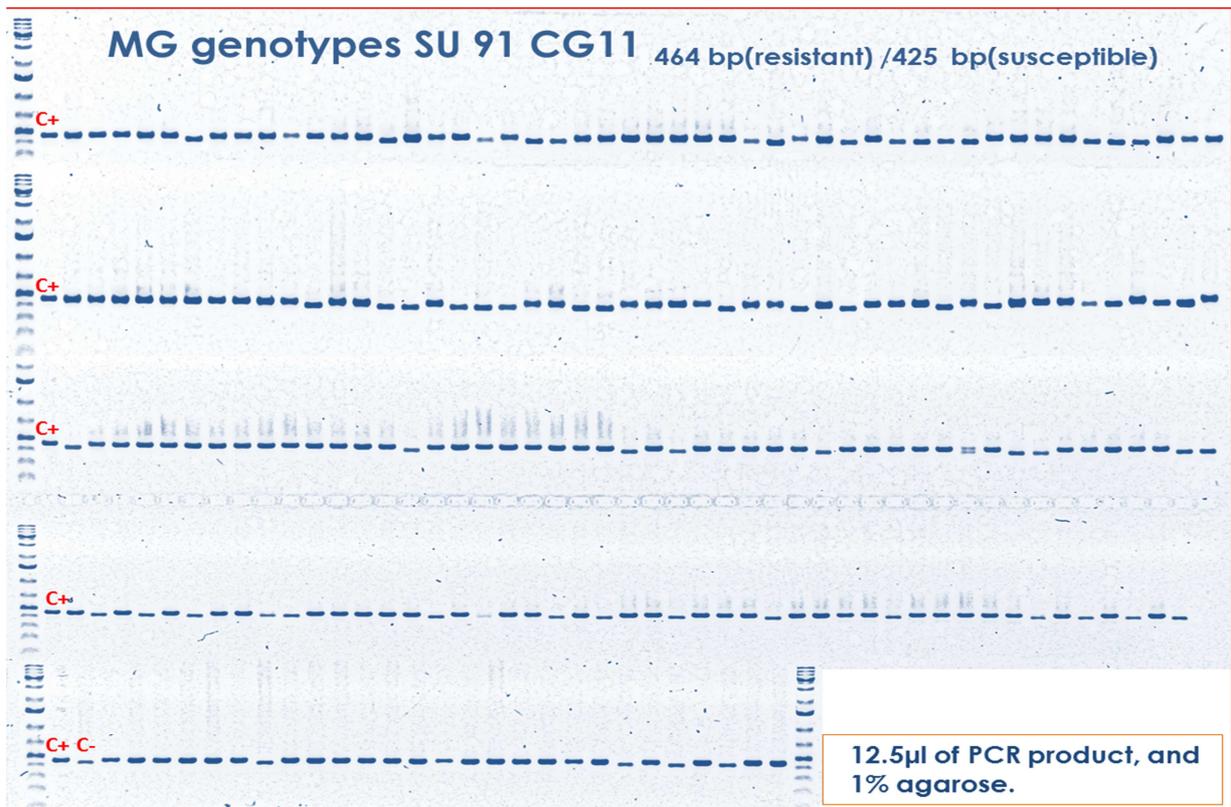
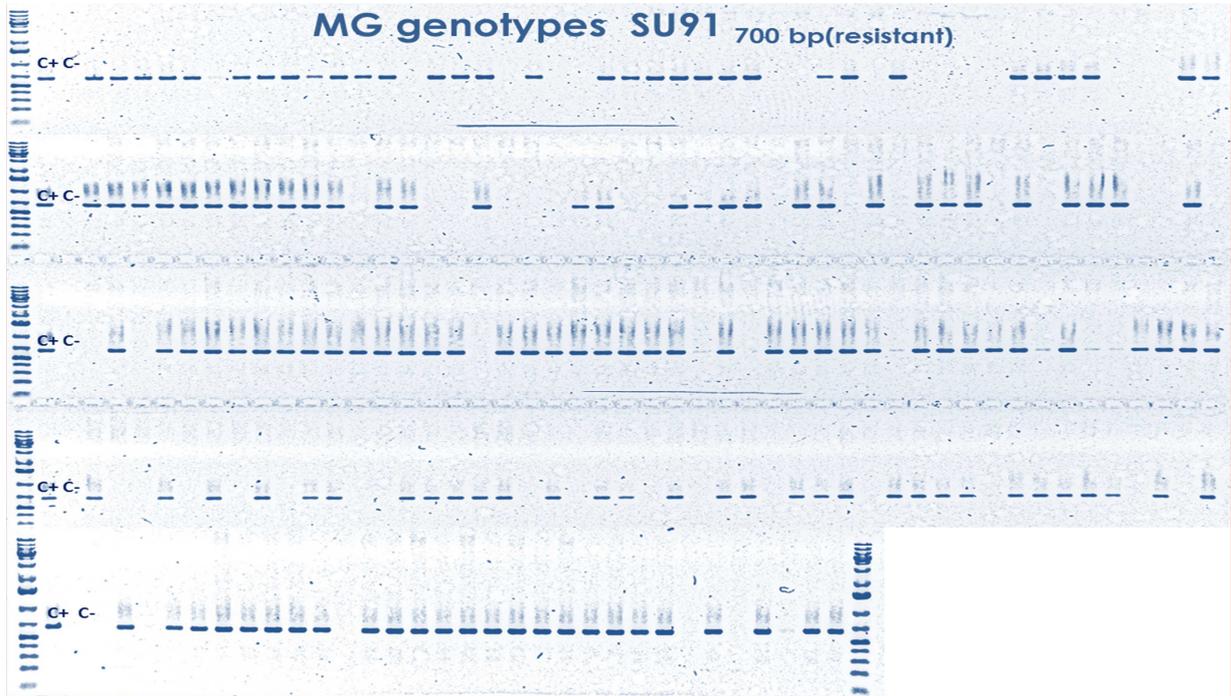
Generat	Medias	n	E.E.
BC2	1.38	21	0.19 A
P2	1.53	66	0.11 A
F2	2.00	426	0.04 B
BC1	2.51	39	0.14 C
F1	2.58	33	0.15 C
P1	2.76	63	0.11 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Apéndice 2. Patrón de datos organizados para el GMA de acuerdo a Piepho y Morhring (2010).

block	plot	plant	gen	depvar	lackfit	a	d	block	plot	plant	gen	depvar	Lackfit	a	d
1	1	1	B1	2.33	B1	0.5	0.5	2	10	108	F2	1.50	F2	0	0.5
1	1	2	B1	1.00	B1	0.5	0.5	2	10	109	F2	2.00	F2	0	0.5
1	1	3	B1	2.17	B1	0.5	0.5	2	10	110	F2	1.83	F2	0	0.5
1	1	4	B1	3.00	B1	0.5	0.5	2	10	111	F2	2.83	F2	0	0.5
1	2	5	B2	1.50	B2	-0.5	0.5	2	10	112	F2	2.83	F2	0	0.5
1	2	6	B2	1.00	B2	-0.5	0.5	2	10	113	F2	1.67	F2	0	0.5
1	3	7	F1	2.67	F1	0	1	2	10	114	F2	2.83	F2	0	0.5
1	3	8	F1	2.00	F1	0	1	2	10	115	F2	2.75	F2	0	0.5
1	3	9	F1	2.83	F1	0	1	2	10	116	F2	2.33	F2	0	0.5
1	4	10	F2	1.67	F2	0	0.5	2	10	117	F2	2.00	F2	0	0.5
1	4	11	F2	1.67	F2	0	0.5	2	10	118	F2	1.83	F2	0	0.5
1	4	12	F2	2.67	F2	0	0.5	2	10	119	F2	2.33	F2	0	0.5
1	4	13	F2	3.33	F2	0	0.5	2	10	120	F2	3.00	F2	0	0.5
1	4	14	F2	1.17	F2	0	0.5	2	10	121	F2	2.33	F2	0	0.5
1	4	15	F2	2.33	F2	0	0.5	2	10	122	F2	1.50	F2	0	0.5
1	4	16	F2	1.67	F2	0	0.5	2	10	123	F2	1.33	F2	0	0.5
1	4	17	F2	1.67	F2	0	0.5	2	10	124	F2	2.50	F2	0	0.5
1	4	18	F2	2.67	F2	0	0.5	2	10	125	F2	3.00	F2	0	0.5
1	4	19	F2	1.67	F2	0	0.5	2	10	126	F2	2.50	F2	0	0.5
1	4	20	F2	1.83	F2	0	0.5	2	10	127	F2	1.67	F2	0	0.5
1	4	21	F2	1.83	F2	0	0.5	2	10	128	F2	1.00	F2	0	0.5
1	4	22	F2	2.50	F2	0	0.5	2	11	129	P1	2.17	P1	1	0
1	4	23	F2	1.33	F2	0	0.5	2	11	130	P1	2.83	P1	1	0
1	4	24	F2	1.83	F2	0	0.5	2	11	131	P1	1.17	P1	1	0
1	4	25	F2	1.83	F2	0	0.5	2	11	132	P1	2.67	P1	1	0
1	4	26	F2	2.17	F2	0	0.5	2	11	133	P1	3.17	P1	1	0
1	4	27	F2	2.00	F2	0	0.5	2	11	134	P1	2.33	P1	1	0
1	4	28	F2	2.67	F2	0	0.5	2	11	135	P1	2.83	P1	1	0
1	4	29	F2	1.67	F2	0	0.5	2	12	136	P2	1.67	P2	-1	0
1	4	30	F2	1.00	F2	0	0.5	2	12	137	P2	1.50	P2	-1	0
1	4	31	F2	2.00	F2	0	0.5	2	12	138	P2	1.17	P2	-1	0
1	4	32	F2	1.33	F2	0	0.5	2	12	139	P2	1.17	P2	-1	0
1	4	33	F2	1.00	F2	0	0.5	2	12	140	P2	1.67	P2	-1	0
1	4	34	F2	1.50	F2	0	0.5	2	12	141	P2	1.67	P2	-1	0
1	4	35	F2	1.00	F2	0	0.5	2	12	142	P2	1.17	P2	-1	0
1	4	36	F2	1.50	F2	0	0.5	3	13	143	B1	1.33	B1	0.5	0.5
1	4	37	F2	2.83	F2	0	0.5	3	13	144	B1	2.33	B1	0.5	0.5
1	4	38	F2	2.83	F2	0	0.5	3	13	145	B1	3.33	B1	0.5	0.5
1	4	39	F2	1.17	F2	0	0.5	3	13	146	B1	1.00	B1	0.5	0.5
1	4	40	F2	1.17	F2	0	0.5	3	14	147	B2	1.50	B2	-0.5	0.5
1	4	41	F2	2.00	F2	0	0.5	3	14	148	B2	1.67	B2	-0.5	0.5
1	4	42	F2	2.33	F2	0	0.5	3	15	149	F1	2.00	F1	0	1
1	4	43	F2	1.33	F2	0	0.5	3	15	150	F1	2.83	F1	0	1
1	4	44	F2	1.83	F2	0	0.5	3	15	151	F1	2.83	F1	0	1
1	4	45	F2	1.33	F2	0	0.5	3	16	152	F2	2.33	F2	0	0.5
1	4	46	F2	2.50	F2	0	0.5	3	16	153	F2	1.83	F2	0	0.5
1	4	47	F2	1.50	F2	0	0.5	3	16	154	F2	2.50	F2	0	0.5
1	4	48	F2	1.17	F2	0	0.5	3	16	155	F2	1.50	F2	0	0.5
1	4	49	F2	1.83	F2	0	0.5	3	16	156	F2	1.50	F2	0	0.5
1	4	50	F2	1.83	F2	0	0.5	3	16	157	F2	1.17	F2	0	0.5
1	4	51	F2	1.50	F2	0	0.5	3	16	158	F2	1.00	F2	0	0.5
1	4	52	F2	1.50	F2	0	0.5	3	16	159	F2	2.17	F2	0	0.5
1	4	53	F2	2.33	F2	0	0.5	3	16	160	F2	2.17	F2	0	0.5
1	4	54	F2	1.50	F2	0	0.5	3	16	161	F2	2.17	F2	0	0.5
1	4	55	F2	1.17	F2	0	0.5	3	16	162	F2	2.33	F2	0	0.5
1	4	56	F2	1.50	F2	0	0.5	3	16	163	F2	2.33	F2	0	0.5
1	4	57	F2	1.33	F2	0	0.5	3	16	164	F2	2.67	F2	0	0.5
1	5	58	P1	2.83	P1	1	0	3	16	165	F2	2.00	F2	0	0.5
1	5	59	P1	2.50	P1	1	0	3	16	166	F2	3.33	F2	0	0.5
1	5	60	P1	3.33	P1	1	0	3	16	167	F2	1.50	F2	0	0.5
1	5	61	P1	2.50	P1	1	0	3	16	168	F2	1.83	F2	0	0.5
1	5	62	P1	2.33	P1	1	0	3	16	169	F2	1.83	F2	0	0.5
1	5	63	P1	2.50	P1	1	0	3	16	170	F2	3.00	F2	0	0.5
1	5	64	P1	1.83	P1	1	0	3	16	171	F2	2.00	F2	0	0.5
1	6	65	P2	1.33	P2	-1	0	3	16	172	F2	1.33	F2	0	0.5
1	6	66	P2	1.67	P2	-1	0	3	16	173	F2	2.00	F2	0	0.5
1	6	67	P2	1.83	P2	-1	0	3	16	174	F2	3.00	F2	0	0.5
1	6	68	P2	1.17	P2	-1	0	3	16	175	F2	1.83	F2	0	0.5
1	6	69	P2	1.00	P2	-1	0	3	16	176	F2	1.83	F2	0	0.5
1	6	70	P2	1.00	P2	-1	0	3	16	177	F2	3.00	F2	0	0.5
1	6	71	P2	1.33	P2	-1	0	3	16	178	F2	1.50	F2	0	0.5
2	7	72	B1	3.33	B1	0.5	0.5	3	16	179	F2	1.50	F2	0	0.5
2	7	73	B1	2.00	B1	0.5	0.5	3	16	180	F2	2.00	F2	0	0.5
2	7	74	B1	2.17	B1	0.5	0.5	3	16	181	F2	2.00	F2	0	0.5
2	7	75	B1	2.83	B1	0.5	0.5	3	16	182	F2	3.00	F2	0	0.5
2	8	76	B2	1.50	B2	-0.5	0.5	3	16	183	F2	1.83	F2	0	0.5
2	8	77	B2	1.33	B2	-0.5	0.5	3	16	184	F2	2.33	F2	0	0.5
2	9	78	F1	2.67	F1	0	1	3	16	185	F2	1.83	F2	0	0.5
2	9	79	F1	2.00	F1	0	1	3	16	186	F2	2.00	F2	0	0.5
2	9	80	F1	2.83	F1	0	1	3	16	187	F2	2.17	F2	0	0.5
2	10	81	F2	2.50	F2	0	0.5	3	16	188	F2	1.67	F2	0	0.5
2	10	82	F2	1.50	F2	0	0.5	3	16	189	F2	1.33	F2	0	0.5
2	10	83	F2	1.33	F2	0	0.5	3	16	190	F2	1.67	F2	0	0.5
2	10	84	F2	1.33	F2	0	0.5	3	16	191	F2	2.17	F2	0	0.5
2	10	85	F2	1.83	F2	0	0.5	3	16	192	F2	1.83	F2	0	0.5
2	10	86	F2	1.50	F2	0	0.5	3	16	193	F2	1.83	F2	0	0.5
2	10	87	F2	1.83	F2	0	0.5	3	16	194	F2	2.33	F2	0	0.5
2	10	88	F2	1.17	F2	0	0.5	3	16	195	F2	2.67	F2	0	0.5
2	10	89	F2	1.83	F2	0	0.5	3	16	196	F2	1.50	F2	0	0.5
2	10	90	F2	2.50	F2	0	0.5	3	16	197	F2	1.83	F2	0	0.5
2	10	91	F2	1.50	F2	0	0.5	3	16	198	F2	2.00	F2	0	0.5
2	10	92	F2	1.00	F2	0	0.5	3	16	199	F2	1.00	F2	0	0.5
2	10	93	F2	2.00	F2	0	0.5	3	17	200	P1	2.67	P1	1	0
2	10	94	F2	1.67	F2	0	0.5	3	17	201	P1	2.17	P1	1	0
2	10	95	F2	3.17	F2	0	0.5	3	17	202	P1	3.17	P1	1	0
2	10	96	F2	2.33	F2	0	0.5	3	17	203	P1	2.50	P1	1	0
2	10	97	F2	2.00	F2	0	0.5	3	17	204	P1	3.17	P1	1	0
2	10	98	F2	2.83	F2	0	0.5	3	17	205	P1	2.83	P1	1	0
2	10	99	F2	2.33	F2	0	0.5	3	17	206	P1	1.83	P1	1	0
2	10	100	F2	2.00	F2	0	0.5	3	18	207	P2	1.17	P2	-1	0
2	10	101	F2	1.83	F2	0	0.5	3	18	208	P2	1.33	P2	-1	0
2	10	102	F2	2.33	F2	0	0.5	3	18	209	P2	1.83	P2	-1	0
2	10	103	F2	1.50	F2	0	0.5	3	18	210	P2	1.17	P2	-1	0
2	10	104	F2	3.17	F2	0	0.5	3	18	211	P2	1.33	P2	-1	0
2	10	105	F2	1.17	F2	0	0.5	3	18	212	P2	2.17	P2	-1	0
2	10	106	F2	2.33	F2	0	0.5	3	18	213	P2	2.67	P2	-1	0
2	10	1													

Apéndice 3. Resultados del diagnóstico molecular para los marcadores SCAR SU91 y SU91-CG11 en las seis generaciones (219 genotipos).



Apéndice 4. Restante de líneas seleccionadas que combinan la alta resistencia al tizón bacteriano, al virus del mosaico dorado amarillo *BGYMV*, al virus del mosaico común *BCMV* y la tolerancia a altas temperaturas.

#	ID	Fuente	Gen.	21DAI	Reac.	SR21	SR2	SW12	SW13	SU91	SU91-CG11	T. calor	EiF4e
Grupo # 5													
1	MG 171		F ₃	1	AR	Heterocigoto	Heterocigoto	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	MG 188-2	BC ₂	F ₃	1	AR	Heterocigoto	Heterocigoto	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
3	MG 156	BC ₂	F ₃	1.5	AR	Heterocigoto	Heterocigoto	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
4	MG 121-3	R3 P33-3	F ₄	2	R	Heterocigoto	Heterocigoto	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Grupo # 6													
1	MG 60-5	130	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Grupo # 7													
1	MG 41		F ₃	1.8	AR	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Grupo # 8													
1	MG 117-3	R3 P12-3	F ₄	1	AR	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Grupo # 9													
1	MG 115-2	R3 P25-2	F ₄	2.3	R	Heterocigoto	Heterocigoto	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Grupo # 10													
1	MG 215		F ₃	1.5	AR	Heterocigoto	Heterocigoto	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Grupo # 11													
1	MG 68-1	R2 P14-1	F ₄	2	R	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	MG 76		F ₃	2	R	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Grupo # 12													
1	MG 156	BC ₂	F ₃	1.5	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	MG 203-1	R2 P02-1	F ₄	1.7	AR	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)

Gen.: generación, 21DDI: lectura a los 21 días después de la inoculación, Reac.Ψ: AR: altamente resistente, R: resistente.