

**Desarrollo de líneas de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.)
con resistencia al gorgojo común (*Acanthoscelides obtectus* Say)**

Por

Abiezer González Vélez

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS
en

Agronomía

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por:

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

Fecha

Feiko Ferwerda, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edwin Abreu Rodríguez, M.S.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Maribel Acosta Lugo, Ph.D.
Representante Estudios Graduados

Fecha

Hipólito O'Farrill-Nieves, Ph.D.
Director Interino del Departamento

Fecha

Resumen

El gorgojo común (*Acanthoscelides obtectus* Say) es una plaga agresiva en la cosecha de habichuelas (*Phaseolus vulgaris* L.). Esta plaga ataca la semilla almacenada, lo que reduce la germinación y la calidad comercial de los granos. El uso de insecticidas es la práctica principal para controlar el gorgojo. El desarrollo de líneas de habichuelas con resistencia a los gorgojos puede reducir el daño causado por esta plaga y disminuir el uso de plaguicidas durante el periodo de almacenaje del grano. Los investigadores del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) han identificado líneas de habichuelas con resistencia a los gorgojos en la habichuela y el frijol tépari (*P. acutifolius* L.). En los últimos años, los fitomejoradores en la Universidad del Estado de Oregon (UEO) han desarrollado poblaciones interespecíficas que presentan un mayor nivel de resistencia a esta invasiva plaga. En Puerto Rico no hay información sobre la reacción de las líneas de habichuela de UEO cuando son expuestas a los gorgojos presentes en la Isla. *A. obtectus* Say fue identificado como la especie de gorgojo de la habichuela en la Subestación Experimental de Isabela. Una técnica de evaluación sencilla fue efectiva en la identificación de líneas de frijol con resistencia a los gorgojos. Cultivares de habichuela de Puerto Rico, República Dominicana, Haití, Honduras, Ecuador y Angola fueron susceptibles a esta especie de gorgojo. La línea, PR1012-29-3, derivada del cruzamiento ‘Rojo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199’, tenía el nivel más alto de resistencia a los gorgojos. Esta línea fue utilizada como progenitor en cruzamientos para combinar la resistencia a los gorgojos con la resistencia a las enfermedades virales Bean Golden Yellow Mosaic Virus (BGYMV), Bean Common Mosaic Necrosis Virus (BCMNV) y Bean Common Mosaic Virus (BCMV).

Abstract

The common bean weevil (*Acanthoscelides obtectus* Say) is a serious post-harvest pest in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). This pest attacks the stored seed, reducing germination and commercial quality of beans. The use of insecticide is the main practice employed to control bean weevils. The development of bean lines with resistance to weevils can reduce the damage caused by this pest and reduce the use of pesticides during the storage of grain. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) researchers have identified sources of resistance to weevils in common bean and tepary bean (*P. acutifolius* L.). In recent years, breeders at Oregon State University (UEO) have developed interspecific populations that provide a higher level of resistance to this important pest. In Puerto Rico, there is no information concerning the reaction of the UEO bean lines when infested with weevils present on this island. *Acanthoscelides obtectus* Say was identified as the species of weevils present at the Isabela Substation. A simple evaluation technique was effective in identifying lines with resistance to bean weevils. Bean cultivars from Puerto Rico, Dominican Republic, Haiti, Honduras, Ecuador and Angola were susceptible to the common bean weevil. The line, PR1012-29-3, derived from the cross 'Red *3/SMARC2 /// ICAPijao *2/G40199' had the highest level of resistance to weevils. This line was used as parent in crosses to combine resistance to weevils with resistance to the viral diseases Bean Golden Yellow Mosaic Virus (BGYMV), Bean Common Mosaic Necrosis Virus (BCMNV) y Bean Common Mosaic Virus (BCMV).

Declaratoria de derechos de autor

© Abiezer González Vélez, 2012.

Dedicatoria

Dedico este grado universitario a mi esposa Giselle N. Mejías, a mis amados padres Cesar A. González y Luz M. Vélez, y a mi querido hermano Abdel A. González Vélez, a la memoria de mi hermano Cesar González Vélez y a mi futura generación. Reconozco que sin el apoyo incondicional de estos seres queridos no hubiese podido llegar a donde he llegado hoy día y ser el ser humano especial que soy y que seré.

Reconocimiento

Reconozco en primer lugar a Dios por otorgarme el conocimiento y el valor para culminar un grado de maestría, a mis familiares y esposa por brindarme el apoyo necesario en el transcurso de mi vida. Agradezco al Dr. James S. Beaver por brindarme su experiencia en fitomejoramiento, por creer en mí y brindarme la oportunidad de estudiar una maestría bajo su supervisión, por colaborar y proveer su conocimiento en mi desarrollo de tesis y ser mi presidente de comité.

A la Facultad de Ciencias Agrícolas y a sus empleados como: Pedro E. Márquez Méndez, Floripe Cancel Rivera, Jeannette Morales, Janice Pérez Caro, Evelyn Roselló Rodríguez, Gloria G. Aguilar, entre otros, por ayudarme y orientarme con situaciones administrativas. Al Recinto Universitario de Mayagüez (UPR-RUM) por permitirme cursar estudios graduados en tan prestigiosa institución. Al Dr. Feiko Ferwerda por ayudar en las pruebas moleculares y orientarme en todo lo respecto a los trabajos moleculares, al profesor Edwin Abreu por brindarme sus conocimientos en entomología.

A la Subestación Experimental de Isabela por permitirme llevar a cabo mis siembras y experimentos en sus instalaciones, a sus empleados particularmente a Kemuel, Erick, entre otros, por su ayuda y disponibilidad en todo momento. Mi agradecimiento especial al Dr. James S. Beaver por brindarme todo lo necesario para poder llevar a cabo todos mis experimentos y al personal de la oficina de estudios graduados por brindarme su ayuda y orientarme en todo momento que lo necesité.

Tabla de contenido

Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Declaratoria de derechos de autor.....	iv
Dedicatoria.....	v
Reconocimiento	vi
Tabla de contenido.....	vii
Lista de cuadros	viii
Lista de figuras.....	ix
Introducción	1
Objetivos.....	5
Revisión de literatura	6
Materiales y métodos	12
<i>Desarrollo de una técnica para evaluar las líneas de habichuela con resistencia a los gorgojos.</i>	12
<i>Fuente potencial de resistencia al gorgojo</i>	14
<i>Desarrollo de poblaciones derivadas de cruzamientos con AO1012-29-3</i>	20
<i>Evaluación de líneas resistentes al gorgojo con marcadores moleculares</i>	21
Resultados y discusión.....	24
<i>Desarrollo de una técnica para evaluar las líneas para la resistencia a los gorgojos.</i>	24
<i>Fuente potencial de resistencia al gorgojo</i>	25
Referencias.....	35

Lista de cuadros

Cuadro 1	Líneas BC ₂ F ₃ de habichuela de la Universidad del Estado de Oregon utilizadas como fuentes potenciales de resistencia al gorgojo <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say.	15
Cuadro 2.	Líneas BC ₃ F ₄ de habichuela de la Universidad del Estado de Oregon utilizadas como fuentes potenciales de resistencia al gorgojo <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say.	16
Cuadro 3.	Líneas del programa de mejoramiento de habichuela de Puerto Rico que fueron evaluadas para determinar la resistencia al gorgojo <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say.	17
Cuadro 4.	Cultivares y líneas de habichuela evaluadas para su reacción a <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say.	19
Cuadro 5.	Reacción al gorgojo <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say de líneas de la Universidad del Estado de Oregon en un ensayo realizado entre marzo y mayo de 2010.	27
Cuadro 6.	Líneas derivadas de cruzamientos con AO-1012-29-3 y el número de plantas seleccionadas de un ensayo sembradas en Isabela, Puerto Rico en junio de 2011.	28
Cuadro 7.	Reacción al gorgojo <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say de líneas avanzadas del programa del mejoramiento de la Universidad de Puerto Rico.	29
Cuadro 8.	Reacción al gorgojo <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say de tres líneas seleccionadas para resistencia y cultivares de Centroamérica, el Caribe, Ecuador y Angola.	31

Lista de figuras

- Figura 1 Potes utilizados para la exposición y mantenimiento de la colonia.
- Figura 2 Ejemplo de daño causado por la exposición de los gorgojos en almacenamiento.
- Figura 3 Daño causado por los gorgojos en el cultivar de la habichuela ‘Verano’ 45 días después de la inoculación.
- Figura 4 Presencia de los marcadores Arcelina, Alfa amilasa y Fitoheماغلوتينina en líneas de la Universidad del Estado de Oregon y los testigos susceptibles ‘Verano’ y ‘Morales’.
- Figura 5 *Zabrotes subfasciatus* (gorgojo mexicano de la habichuela).
- Figura 6 *Acanthoscelides obtectus* (gorgojo común de la habichuela).
- Figura 7 Foto de línea 1012-29-3, luego de exposición al gorgojo durante 45 días.

Introducción

El gorgojo de la habichuela, *Acanthoscelides obtectus* Say es una plaga invasiva en la post cosecha de la habichuela, *Phaseolus vulgaris* L. Esta plaga ataca la semilla almacenada afectando la germinación y la calidad comercial de los granos. Los métodos de control incluyen las prácticas que crean ambientes que sean menos atractivos para las plagas y menos favorables para su supervivencia, crecimiento, dispersión y reproducción (Casida Quistad y 1998).

Algunas prácticas culturales utilizadas para manejar las plagas de habichuela incluyen la modificación de la densidad de plantas, la rotación de los cultivos, los cultivos intercalados, la destrucción de plantas hospederas, el saneamiento y el control de malezas. La variación en el tiempo de siembra, según lo informado por Teetes (1991) y Metcalf (1993), crea una sincronía entre la fenología de plantas, la población y la dinámica de las especies de plagas, lo que retarda las tasas de colonización, la reproducción y la supervivencia de los insectos. En la práctica, esto puede mantener el número de plagas por debajo del nivel umbral económico o poblaciones de plagas suficientemente bajas para que los controles naturales o biológicos no permitan su alcance al nivel de acción (Hill, 1989).

Estas prácticas culturales de campo no ofrecen un control efectivo de los gorgojos, que son plagas, principalmente de almacenamiento. La limpieza de la semilla y el saneamiento en el almacén son prácticas importantes para reducir la población de los gorgojos. Sin embargo, los plaguicidas han proporcionado el medio principal y una práctica esencial para controlar el gorgojo (Casida y Quistad, 1998; Dent, 2000).

Los insecticidas tienen inconvenientes asociados a su uso (Watson et al, 1976). El uso de insecticidas se asocia con la resistencia a éstos, la destrucción de insectos benéficos, la contaminación ambiental y el riesgo para el usuario, en particular en los países en desarrollo debido a los altos niveles de analfabetismo (Acrey et al, 2007). Además, los insecticidas son

costosos y, por lo tanto, inaccesibles para los agricultores de subsistencia, mientras que en las zonas rurales, los plaguicidas no son fáciles de obtener. El gorgojo ataca la habichuela seca tanto en el campo, antes de la cosecha, como en los lugares de almacenamiento.

El gorgojo adulto deposita los huevos en la superficie de las vainas o directamente en la semilla. Los huevos se convierten en larvas que penetran directamente el grano, alimentándose del endospermo que contiene los cotiledones. Las larvas permanecen dentro de la semilla durante su metamorfosis de larva a adulto, cuando ésta emerge continua su ciclo reproductivo, incluso cuando ésta se encuentra almacenada. Mientras el grano continúa almacenado, tanto la calidad como cantidad del grano disminuye sucesivamente con el desarrollo de nuevas generaciones de la plaga.

Las habichuelas se refieren a las leguminosas del género *Phaseolus*, familia de las leguminosas, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseoleae, subtribu Phaseolineae. Distribuido principalmente en el América y África subsahariana, el género *Phaseolus* contiene alrededor de unas 50 especies de crecimiento salvaje y cinco especies domesticadas, como el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), habas (*P. lunatus* L), la judía (*P. coccineus* L), frijol tépari (*P. acutifolius* A.Gray) y el frijol al año (*P. polyanthus* Greenman), entre otros. (Gepts, 2001).

Todas las especies del género son diploides y la mayoría tienen 22 cromosomas ($2n = 2x = 22$). Una reducción de 20 cromosomas aneuploides se encuentra en unas pocas especies. Consta de 625 Mbps por genoma haploide. El genoma del frijol común es uno de los más pequeños de la familia de las leguminosas (Gepts, 2001). El frijol común es de clima cálido, leguminosa anual, que consta de varios tipos y clases.

La emergencia se produce con un segmento del hipocotilo arqueando arriba a través del suelo, entre la raíz en desarrollo (anclado radícula) y los cotiledones grandes en el extremo del hipocotilo. Los hipocotilos arqueados se enderezan una vez que los cotiledones y las primeras dos hojas unifoliadas se amplían desde el nudo de cotiledones a lo largo del tallo y la yema

terminal. Todas las hojas son trifoliadas posteriores y tienen yemas axilares. Los colores de las flores varían desde el blanco, hasta rosa o púrpura.

Según a Schoonhoven y Cardona (1986), los insectos en la semilla de frijol almacenado pueden causar dos tipos de pérdidas. Estas son las pérdidas cuantitativas debido a la cantidad de las semillas, o trozos de las semillas comidos por los insectos, mientras que las pérdidas cualitativas se deben a cadáveres, excrementos o insectos en el grano. Cuando se almacena a una humedad relativamente alta ($> 17\%$), el grano es también un excelente medio para el desarrollo rápido de las larvas de insectos y hongos como el *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. y *Phomopsis* spp. El ataque se evita cuando la semilla se almacena a baja humedad relativa ($<14\%$). A causa del ataque de los gorgojos, la calidad de la semilla de habichuela se deteriora y es por lo tanto no negociable, lo que provoca pérdidas económicas a los productores y afecta la calidad, lo que representa pérdidas para los consumidores (Schoonhoven y Cardona, 1986).

Los investigadores del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) encontraron en los años setenta del siglo pasado una línea de germoplasma silvestre de habichuela con resistencia al gorgojo en el estado de Guerrero en México. Los investigadores identificaron Arcelina, una proteína de la semilla que confiere la resistencia al gorgojo *Zabrotes subfasciatus*. Estudios adicionales demostraron que las líneas de habichuela con Arcelina no fueron eficientes en reducir las poblaciones de *Acanthoscelides obtectus* Say (Osborn et al. 1988). Kornegay et al. (1993) confirmaron que la expresión de arcelina es controlada por un sólo gen dominante. Osborn et al. (1986) demostraron que las diferentes formas de Arcelina (*Arc 1*, *Arc 2*, *Arc 3*, *Arc 4*, *Arc 5*) eran alelos. Investigadores del CIAT reportaron que ciertas líneas de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius* L.) como G40199 confieren altos niveles de resistencia a ambos géneros de gorgojos tanto a *Zabrotes subfasciatus* como a *A. obtectus* (Mejia-Jiménez et al. 2002; Cardona et al. 2005). Mbogo et al. (2009), de la Universidad del Estado de Oregon (UEO) por sus siglas en inglés, realizaron cruces interespecíficos entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius* con el

objetivo de transferir la proteína lectina del frijol silvestre al frijol común que confiere resistencia a los gorgojos. Ellos utilizaron retrocruzamiento para transferir genes de resistencia a líneas de interés. Los padres recurrentes fueron la línea negra ‘ICA Pijao’ y la línea rojo arriñonado ‘Rojo’.

En Puerto Rico no hay información de la resistencia de estas líneas de habichuela con los gorgojos presentes en la Isla. El desarrollo de líneas de habichuela con resistencia a los gorgojos puede reducir el daño causado por esta plaga y disminuir el uso de plaguicidas durante el periodo de almacenaje del grano.



Figura 2: Ejemplo de daño causado por la infestación de gorgojo en almacenamiento

Foto suministrada por:commons.wikimedia.org/wiki/Image:Bonenkever_Acanthoscelides_obtectus.jpg

Objetivos

1. Identificar las especies de gorgojos que atacan la habichuela en Puerto Rico.
2. Desarrollar una técnica sencilla y barata para evaluar líneas de habichuelas con resistencia a los gorgojos.
3. Determinar el nivel de resistencia o susceptibilidad a los gorgojos de los principales cultivares de habichuela sembradas en Centroamérica, El Caribe, Ecuador y Angola.
4. Seleccionar plantas de las poblaciones de UEO que demuestran adaptación local y evaluar su reacción a los gorgojos.
5. Desarrollar poblaciones de habichuela que segregan para resistencia a los gorgojos y los virus BGYMV, BCMV y BCMNV

Revisión de literatura

En los últimos miles de años, diferentes especies de *Phaseolus* fueron domesticadas y cultivadas en varias regiones agro-ecológicas desde México hasta Chile (Kaplan & Kaplan, 1988). La habichuela *P. vulgaris* L. tiene dos centros de origen, estos son: Andino y Mesoamericano (Voysesst, 2000). Las variedades de habichuela del centro Andino poseen semillas más grandes y tienen mejor adaptación las altitudes. La habichuela del centro Mesoamericano se caracteriza por tener semillas más pequeñas, además de adaptarse mejor a las temperaturas menos frías (Gepts & Bliss, 1986).

Las líneas de habichuela de los dos acervos genéticos de habichuela poseen diferentes características útiles, que combinadas podrían producir nuevas variedades de habichuelas que se adapten mejor a las necesidades de los agricultores en las regiones de producción de habichuela. Otras especies de habichuelas domesticadas tales como *P. acutifolius* L. y *P. coccineus* L. también poseen genes de valor económico que se podrían utilizar para el mejoramiento genético del *P. vulgaris* L. (Singh, 2001).

Tanto el gorgojo común de la habichuela *A. obtectus*, como el gorgojo mexicano de la habichuela *Z. subfasciatus* son plagas que atacan el grano de la habichuela. La exposición de *A. obtectus* son más severas y causan más daños en comparación con *Z. subfasciatus*. Las hembras de *Z. subfasciatus* adhieren firmemente los huevos a la testa del grano. Esta característica es una diferencia muy importante para distinguir el *Z. subfasciatus* de *A. obtectus*, el cual nunca adhiere sus huevos a la semilla.

A. obtectus comienza su ataque y exposición al grano en el campo, siendo la causa del problema, ya que al almacenar el grano se magnifica su reproducción (Cardona et al, 1982). Estos gorgojos son poco frecuentes en regiones templadas, pero puede ocurrir. Estas dos especies se pueden encontrar en las mismas regiones, aunque el clima puede influir en su

localización. Las temperaturas cálidas tienden a favorecer a *Z. subfasciatus*, mientras que *A. obtectus* y tiende a favorecerlo altitudes y temperaturas más frías (Abate and Ampofo, 1996).

Los adultos de *A. obtectus* miden 0.25 cm de largo y se caracterizan porque los élitros no cubren totalmente el abdomen. Las hembras ponen sus huevos en las vainas ya maduras en el campo. Estas ovopositan encima de las vainas, de manera que cuando el grano se almacena ya viene infestado. Al eclosionar la larva, ésta atraviesa la testa de la semilla y se desarrolla en el interior del grano consumiendo el endospermo. Las larvas se alimentan hasta la etapa de pupa. El adulto corta y empuja el tejido al salir de la semilla. En el almacén se repite el ciclo de apareamiento y ovoposición, con lo que se mantiene así una infestación continua (Kornegay et al., 1993). *A. obtectus* disminuye la calidad y reduce la germinación de semilla de habichuela infestada con la plaga.

Simmonds et al. (1989) describe seis etapas en la interacción gorgojo-leguminosa en las que la resistencia puede ocurrir, tal como se muestra: no oviposición; embrión alterado desarrollo, las larvas no pueden penetrar en la testa, las larvas mueren dentro de los cotiledones, fracaso de la fase de pupa o la emergencia de adultos y la capacidad reducida de los insectos adultos. Schoonhoven y Cardona (1982) reportaron bajos niveles de resistencia de frijol, cuando más de 4.000 accesiones fueron evaluadas para resistencia a la *Z. subfasciatus*. Aunque se encontraron diferencias significativas entre las accesiones, los niveles de resistencia fueron demasiado bajos para ser de valor económico.

Los investigadores de CIAT encontraron en semilla de germoplasma de habichuela silvestres de la habichuela de México proteínas conocidas como lectina, que pertenecen a la familia llamada arcelina que confieren resistencia a los gorgojos (Osborn et al.1988). Se han identificado siete alelos del gen de Arcelina relacionados entre sí y todos ellos fueron encontrados en las variedades *P. vulgaris* de México (Acosta-Gallegos et al., 1998). Uno de ellos fue llamado Arcelina 1 y conocido como (*Arc-1*), fue encontrado en la variedad criolla de

habichuela cosechada aproximadamente en los años sesenta del siglo pasado, muy cerca de la población de Arcelia del cual proviene el nombre de Arcelina, en el sudeste del estado de Guerrero, México. Se ha demostrado que *Arc-1* es muy eficaz contra *Z. subfasciatus* pero no tan eficiente con el control de las poblaciones de *A. obtectus*. (Fory et al., 1996). Kornegay et al. (1993) confirmaron que la expresión de arcelina es controlada por un solo gen dominante. Osborn et al. (1986) demostraron que *Arc-1*, *Arc-2*, *Arc-3*, *Arc-4* y *Arc-5* eran alelos. Arcelina cinco (*Arl-5*) seguido por arcelina (*Arl-1*), arcelina (*Arl-2*), arcelina (*Arl-4*) y arcelina (*Arl-3*) mostraron un buen nivel de resistencia contra *Z. subfasciatus*. (Cardona et al. 1990; Kornegay et al. 1993). A diferencia de las otras formas de Arcelina, las arcelinas *Arl-4* y *Arl-5* muestran resistencia moderada contra *A. obtectus* (Kornegay and Cardona 1991; Goossens et al. 2000). Algunos alelos de arcelina han sido retrocruzados en algunos cultivares de habichuela para lograr resistencia al gorgojo (Osborn et al. 1986; 1988; Cardona et al. 1990; Kornegay and Cardona 1991; Kornegay et al. 1993; Misangu 1997).

Goossens et al. (2000) demostraron que la arcelina no es la única fuente de resistencia para las dos especies de gorgojos, al concluir que los factores ligados a arcelina pueden ser los responsables de la resistencia. Se ha encontrado que otros alelos de arcelina confieren resistencia, sin atenuar esa resistencia de la habichuela silvestre a la habichuela común. El caso de la transferencia de arcelina (*Arc-1*) resulta en una mejora de variedades de habichuelas en Tanzania para ofrecer resistencia a *Z. subfasciatus* (Misangu, 1997; Myers et al. 2001).

Pratt et al. (1984, 1990) informaron que las lectinas presentes en algunas variedades de habichuela tépari confieren un alto nivel de resistencia al gorgojo *A. obtectus*. Los investigadores del CIAT reportaron que algunas líneas de frijol tépari como G40199 confieren altos niveles de resistencia a ambos tipos de gorgojos tanto a *Z. subfasciatus* como a *A. obtectus* (Mejia-Jiménez et al. 2002; Cardona et al. 2005). Mbogo et al. (2009) realizaron cruces interespecíficos entre

P. vulgaris y *P. acutifolius* con el objetivo de transferir la proteína lectina del frijol tépari al frijol común, lo que confiere resistencia a los gorgojos.

El gorgojo común de la habichuela *A. obtectus* pertenece al Orden Coleóptera, a la Familia Bruchidae, y Especie *Acanthoscelides obtectus*. El *A. obtectus* se distingue por su cabeza pequeña, ojos grandes y salientes, antenas largas y aserradas. Tiene un cuerpo ovoidal grueso y cubierto de pelos, más ancho en la parte posterior. Sus élitros se caracterizan porque son cortos y no cubren completamente la parte posterior del abdomen. Posee fémur posterior con un diente grande y dos pequeños. El gorgojo común de la habichuela puede volar. El adulto es de color pardo, con pequeñas bandas pardas transversales en los élitros, mide de 3.5 a 4.5 mm de longitud. Este limita su ataque a la habichuela, no se alimenta de cereales u otros productos, aunque algunos autores los identifican como otros huéspedes del garbanzo.

Se considera que este *A. obtectus* fue introducido a América del Norte al final de la década del 1930 y, poco a poco, se ha ido extendiendo a todas las zonas productoras de habichuelas. Su ataque comienza en el campo y continúa en el almacenamiento. La hembra de dicha especie se caracteriza porque deposita los huevos sobre las perforaciones de las vainas secas y en las habichuelas almacenadas. Las larvas perforan los granos y se alimenta en el interior del grano, específicamente del endospermo. Poco antes de pupar hacen una galería o canal hacia el exterior del grano, dejándolo cubierto solamente con la testa del grano. Una vez transformado en adulto, este remueve la testa para salir del grano dejando un orificio característico de forma circular. Su ciclo biológico dura de 4 a 6 semanas, si las condiciones para su desarrollo son apropiadas. El ciclo se alarga con bajas temperaturas. Los adultos son de vida corta y no se alimentan de granos almacenados, aunque se ha detectado que pueden sobrevivir por más tiempo cuando se alimentan con néctar de flores. A estos se le considera una plaga primaria por atacar granos enteros y porque en un grano, pueden desarrollarse varias larvas. Ataca tanto en el campo como en el almacén. Son capaces de sobrevivir en el campo

durante el invierno en estado larvario. El daño económico que ocasionan es importante porque ataca la habichuela desde el campo, siendo sumamente difícil su control, y porque los granos dañados pierden parcial o totalmente su valor comercial y germinativo (Cubillos, 1983).



Figura 5: *Zabrotes subfasciatus* (gorgojo mexicano de la habichuela)
Fuente de la foto: www.flyaqis.mov.vic.gov.au/padil/beetles.html



Figura 6: *Acanthoscelides obtectus* (gorgojo común de la habichuela)
Fuente de la foto: www.padil.gov.au/viewPestDiagnosticImages.asp.

Materiales y métodos

Desarrollo de una técnica para evaluar las líneas de habichuela con resistencia a los gorgojos.

Durante agosto del 2009 se seleccionaron muestras de gorgojos del cuarto frío de la Subestación de Isabela de la Universidad de Puerto Rico. Estas muestras fueron evaluadas por el profesor Edwin Abreu, entomólogo de la Estación Experimental Agrícola. Las características de los gorgojos fueron analizadas meticulosamente y comparadas con las llaves o claves entomológicas en la literatura para confirmar su identificación como *A. obtectus*.

La colonia de *A. obtectus* fue multiplicada y mantenida utilizando semillas de las variedades de habichuela ‘Verano’ y ‘Morales’. Todos los meses se renovaban las colonias y se verificaba que no hubiese contaminación con otras especies de insecto. Para el desarrollo y mantenimiento de la colonia se exponía cerca de 250 g de habichuela con cerca de 200 de gorgojos adultos dentro de un envase plástico. La tapa tenía una ventana cubierta con malla para permitir la ventilación y evitar la salida o entrada de insectos. Los envases de habichuelas infestadas con gorgojos fueron guardados en un cuarto oscuro con temperaturas ambientales.

En la evaluación de líneas individuales de habichuela para determinar la resistencia al gorgojo, se utilizaron 20 de gorgojos adultos de *A. obtectus*. Se colocaron los adultos en envases de plástico con veinte semillas de habichuela. Se pesaron las muestras de 20 semillas antes de inocular con los gorgojos. La probabilidad que una muestra aleatoria de 20 de gorgojos adultos sean todos machos es muy baja ($P = 0.000000954$).

Los envases plásticos, que tienen una capacidad de 118 cc, se sellaron para evitar el escape de los gorgojos o la infestación de otros insectos (Figura 1). Previamente se agujeraron las tapas y se cubrieron con tela para de aerear el envase. Una vez las semillas fueron inoculadas con los gorgojos se colocaron los envases en un cuarto oscuro con temperaturas ambientales.

Aproximadamente 35 días después de la inoculación, los adultos comenzaron a emerger de la semilla. Una vez eclosionaron los adultos fueron retirados de las semillas y se pesaron las semillas para comparar con el peso inicial de éstas y para estimar el grado de daño causado por los gorgojos. Se contó el número total de perforaciones causadas por los gorgojos en cada envase (Figura 2). Las variedades de habichuela ‘Verano’ y ‘Morales’ se utilizaron como testigos susceptibles al ataque del gorgojo.



Figura 1: Potes utilizados para la exposición y mantenimiento de la colonia de *Acanthoscelides obtectus* Say.



Figura 3: Daño causado por los gorgojos en el cultivar de la habichuela ‘Verano’ 45 días después de la inoculación.

Fuente potencial de resistencia al gorgojo

Recibí del Dr. James Myers, fitomejorador de habichuela de la Universidad del Estado de Oregon, semillas de 26 líneas BC₂F₃ del cruzamiento 'ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary' y 17 líneas BC₃F₄ del cruzamiento 'Rojo*3/SMARC 2///ICAPijao*2/G40199' (Cuadros 1 y 2). Estas poblaciones fueron desarrolladas para segregar la resistencia al gorgojo *A. obtectus* (Mbogo et al., 2009).

Estas líneas fueron sembradas en la Subestación Experimental de Isabela el 8 de diciembre de 2010. Cincuenta semillas de cada línea fueron sembradas en un surco de 5 m. La distancia entre los surcos fue 0.76 m. Se utilizaron las prácticas recomendadas en el Conjunto Tecnológico de Habichuela (Beaver, 2009) para mantener la siembra. Se seleccionaron plantas individuales de las dos poblaciones con las mejores características agronómicas.

Cuadro 1. Líneas BC₂F₃ de habichuela de la Universidad del Estado de Oregon utilizadas como fuentes potenciales de resistencia al gorgojo *Acanthoscelides obtectus* Say.

Identidad	Línea	Pedigrí	Generación
AO-1012-1	BTICA 132.3-1	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-2	BTICA 132.3-2	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-3	BTICA 132.4-1	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-4	BTICA 132.4-2	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-5	BTICA 132.4-3	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-6	BTICA 132.4-4	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-7	BTICA 132.4-5	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-8	BTICA 132.4-6	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-9	BTICA 132.4-7	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-10	BTICA 132.4-8	ICA Pijao*2/G40199/Brown Tepary	BC ₂ F ₃
AO-1012-11	ICA43.9/10.2-1	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-12	ICA43.9/10.2-2	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-13	ICA43.9/10.3-1	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-14	ICA43.9/10.3-2	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-15	ICA43.9/10.3-3	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-16	ICA43.9/10.4-1	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-17	ICA43.9/10.4-2	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-18	ICA43.9/10.6-3	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-19	ICA43.9/10.7-1	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-20	ICA43.9/10.7-2	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-21	ICA43.3/4.7-1	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-22	ICA43.3/4.7-2	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-23	ICA43.3/4.7-3	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-24	ICA43.3/4.7-4	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-25	ICA43.3/4.7-5	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃
AO-1012-26	ICA43.3/4.7-6	ICA Pijao*2/G40199	BC ₂ F ₃

Cuadro 2. Líneas BC₃F₄ de habichuela de la Universidad del Estado de Oregon utilizadas como fuentes potenciales de resistencia al gorgojo *Acanthoscelides obtectus* Say.

Identidad	Línea	Pedigrí	Generación
AO-1012-27	ROBC2-25	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-28	ROBC3-29	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-29	ROBC4-34-1	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-30	ROBC4-34-2	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-31	ROBC5-38-1	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-32	ROBC5-38-2	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-33	ROBC7-48	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-34	ROBC8-54	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-35	ROBC8-55	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-36	ROBC12-59	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄
AO-1012-37	ROBC19-68	Royo*3/SMARC2///ICAPIjao*2/G40199	BC ₃ F ₄

Treinta y nueve líneas BC₂F_{3:4} con grano negro y 100 líneas BC₃F_{4:5} con grano rojo arriñonado de las dos poblaciones fueron evaluadas para determinar la resistencia al gorgojo *A. obtectus*. El experimento se llevó a cabo entre marzo y mayo de 2010. Los métodos descritos anteriormente fueron utilizados para las evaluaciones. La reacción de cada línea fue evaluada en un envase con 20 semillas.

Las 39 líneas BC₂F_{3:4} con grano negro y 100 líneas BC₃F_{4:5} con grano rojo arriñonado de las dos poblaciones también fueron sembradas en la Subestación Experimental de Isabela el 24 de junio de 2011. Se sembraron 10 semillas de cada línea en un surco de un metro con un esparcimiento de 0.76 m entre surcos. Las semillas fueron cosechadas de las líneas que mostraron resistencia al gorgojo *A. obtectus* en los ensayos realizados en el laboratorio.

Además, un grupo de líneas del programa de mejoramiento de habichuela de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez fueron evaluadas en el experimento llevado a cabo entre marzo y junio de 2010 (Cuadro 3). Se utilizaron los mismos métodos para las evaluaciones.

Cuadro 3. Líneas del programa de mejoramiento de habichuela de Puerto Rico que fueron evaluadas para determinar la resistencia al gorgojo *Acanthoscelides obtectus* Say.

Identificación	Semilla	Características
PR0826-1-3	Blanca arriñonada	Snap, <i>bgm</i> , <i>I</i>
PR0826-3	Blanca arriñonada	Snap, <i>bgm</i> , <i>I</i>
PR0826-6-4	Blanca arriñonada	Snap, <i>bgm</i> , <i>I</i>
PR0826-7-2	Blanca arriñonada	Snap, <i>bgm</i> , <i>I</i>
PR0776-14-1	Rojo moteado	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
GH0808-1	Rojo moteado	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
GH0808-2	Rojo moteado	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
GH0808-5	Rojo moteado	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
GH0808-19	Rojo moteado	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
RAZ 25	Rojo moteado	<i>I</i> , <i>Arc-1</i>
PR0776-66-3	Rojo pequeño	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
GH0808-18	Rojo pequeño	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
PR0775-8-2	Blanca	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
GH0807-1	Blanca	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
GH0807-6	Blanca	<i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>Arc-1</i>
Verano	Blanca	<i>bgm</i> , SW12, <i>I</i> , res. CBB
Morales	Blanca	<i>bgm</i> , SW12, <i>I</i>

Otro experimento del laboratorio para evaluar el nivel de daño causado por los gorgojos *A. obtectus* fue establecido en marzo del 2011. En este experimento se utilizó un diseño completamente aleatorizado con dos replicaciones. Se utilizaron como testigos los cultivares susceptibles a ‘Morales y Verano’. Este experimento incluyó las tres líneas, AO-1012-27-2, AO-1012-29-3 y AO-1012-31-4, que mostraron el mayor nivel de resistencia a *A. obtectus* en el experimento llevado a cabo en 2010. El experimento también incluyó tres líneas de CIAT, RAZ 25, RAZ 50 y RAZ 75 que tienen el gen *Arc-1* y 17 cultivares y líneas avanzadas de Honduras, la República Dominicana, Puerto Rico, Ecuador y Angola.

Se prepararon 118 potes plásticos, la unidad experimental, aireados y cubiertos con mallas para evitar la salida o la entrada de insectos o animales indeseados. Se colocaron veinte

semillas de cada línea y se expusieron a veinte gorgojos adultos. El experimento se encontraba en el laboratorio de la Subestación Experimental de Isabela con una temperatura del ambiente (entre 25-30° C y entre 60 y 70 por ciento de humedad). Se evaluaron las líneas sesenta días después de la inoculación. Se calculó el % de peso perdido de la semilla: $[(\text{Peso original} - \text{peso después de 60 días}) / \text{Peso original}] \times 100$. Se cuantificó la cantidad de perforaciones producidas por los gorgojos en cada pote.

Los resultados fueron evaluados utilizando un análisis de varianza. Los promedios de % de peso perdido de semilla y el número de perforaciones por línea fueron comparados utilizando Diferencias Mínimas Significativas (0.05).

Cuadro 4. Cultivares y líneas de habichuela evaluadas para su reacción a *Acanthoscelides obtectus* Say.

Identificación	Tipo de grano	País de origen	Características
AO-1012-27-2	Rojo arriñonada	UEO	Resistencia al gorgojo
AO-1012-29-3	Rojo arriñonada	UEO	Resistencia al gorgojo
AO-1012-31-4	Rojo arriñonada	UEO	Resistencia al gorgojo
Badillo	Rojo arriñonada	UPR	Cultivar con gen <i>I</i> y resistencia a bacteriosis común
INIAP Franesquero	Blanca arriñonada	Ecuador	Cultivar
RAZ- 25	Rojo moteado	CIAT	<i>I</i> y <i>Arc-1</i>
INIAP Portillo	Rojo moteado	Ecuador	Cultivar
INIAP Yungilla	Rojo moteado	Ecuador	Cultivar
INIAP Concepción	Rojo moteado	Ecuador	Cultivar
PR9745-232	Rojo moteado	UPR	<i>bgm, I</i>
Catarina	Crema rayada	Angola	Cultivar
Calembe	Verde	Angola	Cultivar
Canaria	Amarillo	Angola	Cultivar
Verano	Blanca	UPR	Cultivar con <i>bgm, I</i> y resistencia a bacteriosis común
RAZ 75	Blanca	CIAT	<i>Arc-1</i>
INTA Precoz	Small red	Guatemala	Cultivar con <i>bgm, I</i> , precóz
DEHORO	Rojo pequeño	Zamorano	Cultivar con <i>bgm, I</i> , adaptación
Amadeus 77	Rojo pequeño	Zamorano	Cultivar con <i>bgm, I</i> , adaptación
Carrizalito	Rojo pequeño	Zamorano	Cultivar con <i>bgm, I</i> , adaptación
CENTA Pupil	Rojo pequeño	Zamorano	Cultivar con <i>bgm, I</i> , adaptación
RAZ 50	Rojo pequeño	CIAT	<i>I, Arc-1</i>
Aifi Wuriti	Negro	Zamorano	Cultivar con <i>bgm, I</i> , precoz
DPC 40	Negro	Rep. Dom.	Cultivar con <i>bgm, I, bc3</i>
ICA Pijao	Negro	Colombia	<i>I, Arc-1</i>

Desarrollo de poblaciones derivadas de cruzamientos con AO1012-29-3

Durante el invierno de 2010-2011 se hicieron varios cruzamientos utilizando AO1012-29-3 como progenitor. Los otros progenitores fueron líneas negras (XRAV-40-4, DPC-40, 'Aifi Wuriti' y 'ICTA Ligero') y blancas (PR0634-13, PR0806-70 y PR0806-82) con genes de resistencia al 'Bean Golden Yellow Mosaic Virus (BGYMV)', el gen *bgm*, 'Bean Common Mosaic Necrosis Virus (BCMNV)', el gen *bc-3*, y Bean Common Mosaic Virus (BCMNV), el gen *I*. Las Plantas F₁ fueron sembradas en el invernadero para producir semilla F₂ y para hacer cruzamientos dobles.

Las poblaciones F₂ de los cruzamientos sencillos y los F₁ de los cruzamientos dobles fueron sembradas en la Subestación Experimental de Isabela el 8 de febrero de 2011. Fueron seleccionadas plantas individuales de las poblaciones F₂ basado en las características agronómicas y el tipo de grano. Las semillas de los cruzamientos dobles fueron cosechadas en masal.

El 24 de junio de 2011 se sembraron en la Subestación Experimental de Isabela las poblaciones F_{2:3} y los F₂ de los cruzamientos dobles. Las plantas F_{3:4} y F_{2:3} de los cruzamientos doble fueron sembradas en la Subestación Experimental de Isabela en 10 de octubre de 2011. Fueron seleccionadas plantas individuales de las poblaciones F_{3:4} y F_{2:3} basado en las características agronómicas y el tipo de grano. Las plantas F_{4:5} y F_{3:4} seleccionadas fueron sembradas en la Subestación Experimental de Isabela el 7 de febrero de 2012. Diez semillas de cada línea F_{4:5} y F_{3:4} fueron seleccionadas para evaluar para la resistencia al gorgojo. Otras cinco semillas de cada línea fueron separadas para evaluar en el invernadero la reacción a BCMNV. Las líneas con resistencia al BCMNV serán evaluadas con el marcador SR2 con la presencia del gen *bgm* para la resistencia al BGYMV y el marcador SW13 con la presencia del

gen *I* para determinar la resistencia al BCMNV. El trabajo con las generaciones F_{4:5} y F_{3:4} no es parte de la investigación de esta tesis.

Evaluación de líneas resistentes al gorgojo con marcadores moleculares

Mbogo et al. (2009) identificaron tres marcadores moleculares que son Arcelina, Fithoemaglutinina y alfa amilasa que fueron asociados con la resistencia al gorgojo. Se evaluó la presencia de estos marcadores en las líneas AO-1012-10-1, AO-1012-27-1, AO-1012-29-3 y AO-1012-29-1, que mostraron resistencia a los gorgojos en la prueba inicial y los cultivares susceptibles ‘Verano’ y ‘Morales’.

Luego de recolectados las hojas de las plántulas germinadas en los platos petri, se combinaron 45 ml AP1, 112.5 µl Rnase A, y 112.5 µl DX en envases por separados. Se añadieron 395 µl de la mezcla y esferas de acero inoxidable en cada micro tubo. Una vez preparado el plato se colocó en el “Mixer Mill” 300 por 1.5 min. a 30Hz para triturar las muestras, después se rotó el plato en la máquina y se dejó triturando por 1.5 minutos adicionales.

Al terminar el proceso de trituración se removieron los platos y se colocaron en la centrifugadora a 2000RPM para secar las tapas. Las tapas fueron descartadas y se añadieron 130 µl de AP2 en cada hueco. Una vez colocadas las nuevas tapas de cada micro tubo se cubrió el plato y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Luego los platos se colocaron en el centrifugador a 2000RPM y se incubaron las muestras a -200 C por 10 min. Al finalizar el periodo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 5050x “Gigahertz” por 8 minutos.

Una vez centrifugadas las muestras, se descartaron las tapas y se transfirieron 400 µl del sobrenadante sin perturbar las partículas en los nuevos platos; 1.5 vol. de AP3/E fueron añadidos en cada hueco y se colocaron nuevas tapas. Los platos fueron agitados nuevamente de manera vigorosa por 15 segundos y luego se secaron en el centrifugador. El plato “Dneasy” de 96

muestras fue colocado encima del “S-Blocks” y se transfirió 1 ml de las muestras a este nuevo plato.

Después de la transferencia se cubrió el plato “Dneasy” con la cinta “AirPore” y fue centrifugado a 5050 xG por 6 minutos. La cinta fue removida y se descartaron los residuos del “S-Block”, luego de colocado nuevamente el plato en el “S-Block” se añadieron 800 µl de AW y se cubrió otra vez con una cinta “AirPore” nueva y fue centrifugado a 5050 xG por 15 min. Finalmente, se removió la cinta, se procedió a diluir el ADN en los tubos de dilución añadiendo 100 µl de AE. Se cubrió el plato con la cinta “AirPore” y fue incubado por 1 minuto a temperatura ambiente; al final de la incubación se centrifugó a 5050 x “Gigahertz” por 2 minutos. Este paso de dilución del ADN se repitió nuevamente y luego de centrifugado fue almacenado en el congelador a -200 C.

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante la técnica de PCR. Una vez llevada a cabo la dilución del extracto de ADN crudo se procedió a preparar los platos para los termocicladores. En cada espacio provisto en el micro plato se agregaron 2ul de ADN y 23ul de la mezcla de PCR. Cada placa posee 96 espacios para las muestras, se calculó el volumen final para 110 reacciones, para un total de 2760 ml. de solución de PCR por micro plato. Una vez agregado el ADN y la solución de PCR al micro plato se llevaron al termociclador para realizar la amplificación de las bandas del marcador.

Programación del termo ciclado para el marcador de “Arcelina”, “Tepary Bean”, alfa amilasa y “Phitohemaglutinina”.

- a. Desnaturalización de 5 minutos a 940C.
- b. 35 ciclos de 30s a 940C.
- c. 40s a 620C.
- d. 60s a 720C.
- e. 1 ciclo de 5 minutos a 720C.

f. La duración aproximada del programa es de 2 horas y media.

Una vez terminada la amplificación de las bandas de Arcelina se procedió a preparar el gel de agarosa siguiendo los siguientes pasos:

- a. Se preparó un gel de agarosa con 150 ml de 1x TBE con 1.5 gramos de agarosa y 15ul.
- b. Se dejó enfriar y se vertió en la cubeta de electroforesis y se dejó reposar por 30 minutos.
- c. Esta cubeta se colocó en la cámara de electroforesis la cual contenía buffer de corrida TBE 1x.
- d. Luego se sembró en cada pozo del gel 12ul de reacción dejando espacios al principio para sembrar la escalera.
- e. Se conectó el equipo de electroforesis a la fuente de corriente dejando correr las bandas sobre el gel a 100 voltios por 35 minutos.

Por último se leyó el gel en la cámara de luz ultravioleta para verificar la presencia de las bandas y se tomaron las fotos. La “Arcelina” muestra bandas a 800 pares de bases (pb); la banda para “Tepary bean” se encuentra a 800 pares de bases (pb), mientras que para alfa amilasa se encuentran a 750 pares de bases (pb) y para fitohemaglutinina se encuentran a 830pb (Mbogo, 2009).

Resultados y discusión

Desarrollo de una técnica para evaluar las líneas para la resistencia a los gorgojos.

No existen informes en la literatura científica de las especies de gorgojo que ataca la habichuela en Puerto Rico. Se tomó una muestra de gorgojo del cuarto frío de la Subestación Experimental de Isabela, por el profesor Edwin Abreu. Por medio de claves entomológicas se identificó el gorgojo como *A. obtectus*. Estos gorgojos se distinguen de *Z. subfasciatus*, ya que sus élitros no cubren completamente su cuerpo. Además, *A. obtectus* no pega los huevos directamente a la testa, sino que los deja sueltos en el área de almacenamiento de la semilla. Este gorgojo se caracteriza porque es sumamente agresivo en el ataque a la habichuela y su ciclo se repite hasta que se agota su alimento, culminando con la pérdida total de la cosecha.

Una vez que se confirmó la plaga como *A. obtectus* se comenzaron a ensayar técnicas diferentes de incremento de la colonia de gorgojos. Obtuvimos buenos resultados manteniendo una población de gorgojos utilizando variedades susceptibles como ‘Verano’ o ‘Morales’. La semilla fue inoculada directamente con gorgojos adultos. Al comienzo, confrontamos problemas, ya que las hormigas entraban a los potes, se llevaban las larvas de los gorgojos y mataban a los adultos. Las hormigas podían romper la malla que se estaba utilizando. Para resolver este problema se identificó una malla de plástico que las hormigas no podían romper. La cantidad de adultos que la colonia podía producir estaba directamente relacionada con la cantidad de semillas infestadas. Para poder manipular los gorgojos adultos se expusieron al frío colocándolos en la nevera a -20° C durante un periodo de cinco minutos. Luego se podían contar y colocar en los envases correspondientes sin el riesgo que los insectos se escaparan volando. Este procedimiento se repetía una o dos veces al mes dependiendo de la cantidad de gorgojos que necesitaba para las evaluaciones.

La inoculación de las veinte semillas de habichuelas con veinte gorgojos adultos funcionó bien. Los testigos susceptibles siempre tuvieron daño significativo con este método de inoculación. También este método permitió la identificación de líneas que mostraron resistencia al gorgojo. A veces, hubo una cantidad limitada de semillas disponibles de las selecciones de plantas individuales. Se deben llevar a cabo ensayos adicionales con menor cantidad de semillas y gorgojos para determinar si se pueden identificar líneas con resistencia.

Fuente potencial de resistencia al gorgojo

En noviembre de 2009 se sembró en la Subestación Experimental de Isabela un ensayo que contenían 37 líneas BC₂F₃ y BC₃F₄ de la Universidad del Estado de Oregon. Estas líneas debían poseer diferentes combinaciones de genes de resistencia al gorgojo *A. obtectus*. Una investigación previa con arcelina sugiere que un sólo gen no es suficiente para contralar a *A. obtectus*.

Durante el mes de marzo del año 2010 se iniciaron unas evaluaciones preliminares de las líneas BC₂F₄ y BC₃F₅ seleccionadas en el campo por las características agronómicas. Estas evaluaciones comenzaron el 12 de marzo de 2010, con un total de 20 semillas por pote y 32 líneas evaluadas (Cuadro 5).

Todas las semillas de los testigos susceptibles ‘Verano’ y ‘Morales’ tuvieron perforaciones. Varias líneas mostraron poca pérdida en peso de la semilla, sin embargo solamente las líneas 1012-15-2, 1012-23-1, 1012-27-1, 1012-29-3 y 1012-30-3 tuvieron menos de 10 perforaciones en las muestras de 20 semillas. Estos resultados sugieren que el número de perforaciones es un estimado confiable del daño potencial del gorgojo. Las líneas que mostraron el mayor nivel de resistencia al gorgojo tuvieron una eclosión de gorgojos, aproximadamente tres semanas después los testigos susceptibles aunque varias líneas que sufrieron daño significativo eclosionaron después que los testigos.

El 22 de junio 2010 se sembraron las líneas BC₂F_{3:4} y BC₃F_{4:5} provenientes del ensayo sembrado en noviembre del año anterior. Este experimento contó con 138 líneas sembradas en surcos de un metro sin replicación. Se seleccionaron plantas individuales con la mayor producción de semilla. Durante esta época de siembra, las plantas estuvieron expuestas a estrés causado por las altas temperaturas y mucha precipitación pluvial. La mayoría de las líneas, en particular las líneas derivadas de cruzamientos con ‘ICA Pijao’, no fueron adaptadas a estas condiciones climáticas. La línea AO-1012-29-3 fue una de las pocas líneas que fueron resistente al gorgojo y adaptada a las condiciones de calor y mucha precipitación. Por lo tanto, AO-1012-29-3 fue escogido como progenitor para desarrollar poblaciones que combinaron la resistencia al gorgojo con resistencia al BGYMV, BCMNV y BCMV. AO-1012-29-3 tampoco tiene los genes dominante DL₁ o DL₂ que podrían dificultar cruzamientos entre los acervos genéticos de habichuela.

Los cruzamientos se llevaron a cabo en invernaderos localizados en el Recinto de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico. Las poblaciones fueron avanzadas hasta las generaciones F₄ y F₅ utilizando selección pedigrí, donde el grano comercial y las buenas características agronómicas fueron los criterios de selección (Cuadro 6). Las líneas F₄ y F₅ serán evaluadas en el invernadero para reacción al BCMNV. Las líneas que demuestran resistencia a este virus serán evaluadas con los marcadores moleculares SR2 y SW13 para identificar los genotipos que combinan los genes *bgm* y *I* para resistencia al BGYMV BCMNV, respectivamente.

Cuadro 5. Reacción al gorgojo *Acanthoscelides obtectus* Say de líneas de la Universidad del Estado de Oregon en un ensayo realizado entre marzo y mayo de 2010.

Identificación	Peso de semilla inicial (g)	Peso de semilla final (g)	% pérdida de peso inicial	Fecha de emergencia de adultos	Número de semillas agujeradas	Número de semillas no agujeradas	Número total de perforaciones
1012-1-3	5	4	20.0	24-mayo	15	10	51
1012-2-2	5	4	20.0	24-mayo	10	15	16
1012-3-1	5	5	0.0	24-mayo	13	12	27
1012-4-2	5	5	0.0	24-mayo	14	11	22
1012-5-1	5	3	40.0	03-mayo	23	2	106
1012-6-2	6	2	66.7	03-mayo	25	0	209
1012-7-4	6	2	66.7	05-mayo	24	1	199
1012-8-1	6	4	33.3	24-mayo	24	1	88
1012-9-3	6	5	16.7	17-mayo	17	8	30
1012-10-1	6	5	16.7	24-mayo	21	4	53
1012-11-1	5	4	20.0	24-mayo	11	14	29
1012-12-3	5	3	40.0	03-mayo	17	8	53
1012-13-1	5	2	60.0	03-mayo	25	0	193
1012-14-4	7	3	57.1	24-mayo	25	0	138
1012-15-2	6	5	16.7	24-mayo	6	19	9
1012-16-1	7	4	42.9	24-mayo	16	9	31
1012-17-1	5	3	40.0	24-mayo	16	9	40
1012-18-1	5	5	0.0	24-mayo	4	21	10
1012-21-2	6	5	16.7	24-mayo	9	16	19
1012-22-1	6	5	16.7	24-mayo	9	16	14
1012-23-1	6	6	0.0	24-mayo	7	18	8
1012-24-3	4	4	0.0	24-mayo	7	18	10
1012-25-1	6	3	50.0	24-mayo	25	0	97
1012-26-3	5	3	40.0	24-mayo	20	5	47
1012-27-1	9	9	0.0	24-mayo	0	25	0
1012-28-8	12	11	8.3	24-mayo	10	15	22
1012-29-3	11	10	9.1	24-mayo	2	23	4
1012-30-3	11	11	0.0	24-mayo	5	20	8
1012-31-4	10	8	20.0	24-mayo	23	2	106
1012-32-5	12	11	8.3	24-mayo	13	12	23
Verano	7	3	57.1	01-mayo	25	0	223
Morales	5	2	60.0	01-mayo	25	0	219

Cuadro 6. Líneas derivadas de cruzamientos con AO-1012-29-3 y el número de plantas seleccionadas de un ensayo sembradas en Isabela, Puerto Rico en junio de 2011.

Línea	Generación	Pedigrí	Número de plantas seleccionadas
1163-1-1	F _{3:4}	AO-1012-29-3 / PR0634-13	13
9-1	F _{3:4}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4	20
28-1	F _{3:4}	AO-1012-29-3 / PR0634-13	4
32-1	F _{3:4}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4	25
42-1	F _{3:4}	AO-1012-29-3 / PR0634-13	1
47-1	F _{3:4}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4	7
54-1	F _{3:4}	AO-1012-29-3 / PR0634-13	32
71-1	F _{2:3}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4 // PR0806-70 / XRAV-40-4	28
77-1	F _{2:3}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4 // AIFI WURITI / PR0634-13	4
80-1	F _{2:3}	AIFI WURITI / PR0806-70 // AO-1012-29-3 / XRAV-40-4	4
84-1	F _{2:3}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4 // ICTA LIGERO / XRAV-40-4	18
93-2	F _{2:3}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4 // AIFI WURITI / PR0634-13	3
95-1	F _{2:3}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4 // 0806-82 / AIFI WURITI	9
100-1	F _{2:3}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4 // PR0806-70 / XRAV-40-4	6
104-2	F _{2:3}	AO-1012-29-3 / XRAV-40-4 // AIFI WURITI / PR0634-13	19

Al mismo tiempo, pretendemos evaluar la reacción al gorgojo, inoculando muestras de 10 semillas de cada línea con 10 adultos de *A. obtectus*. La evaluación de las líneas F₄ y F₅ no se considera parte de la investigación de esta tesis.

Durante el mes de agosto de 2009 se evaluaron líneas del programa de fitomejoramiento de la Universidad de Puerto Rico para intentar identificar fuentes de resistencia al gorgojo *A. obtectus*. Las semillas de los cultivares Andino y Mesoamericano sufrieron daños significativos causados por los gorgojos, como se demuestra en el cuadro (Cuadro 8). La semilla de los cultivares susceptibles tuvieron por lo menos 100 agujerados y perdieron por lo menos 25% de su peso inicial. Las tres líneas RAZ de CIAT con el alelo *Arc-1* de arcelina mostraron menos daños que las cultivares susceptibles. Sin embargo, la semilla de todas de estas líneas RAZ perdieron por lo menos 15% de su peso inicial. Las líneas PR1012-27-2 y PR1012-29-3 mostraron el mayor nivel de resistencia a los gorgojos. Las muestras de 20 semillas de estas líneas tuvieron menos de 15 agujerados y por lo menos un 65% de las semillas de estas líneas no fueron agujeradas. La reducción en peso de la semilla de estas líneas fue mínima.

Los métodos utilizados por esta investigación de tesis fueron exitosos para identificar líneas con mayores niveles de resistencia a los gorgojos. Estas líneas con resistencia a los gorgojos pueden servir como progenitores para desarrollar líneas de habichuela que combinen grano comercial, diferentes tipos de resistencia, buenas características agronómicas y resistencia a los gorgojos y enfermedades.

Cuadro 7. Reacción al gorgojo *Acanthoscelides obtectus* Say de líneas avanzadas del programa del mejoramiento de la Universidad de Puerto Rico.

Identificación	Peso inicial (g)	Peso final (g)	% pérdida de peso inicial	# semillas	Fecha de emergencia	Semillas agujeradas	Semillas no agujeradas	Total de perforaciones
PR 0826-3	12	7	42	50	28-junio	49	1	269
PR 0826-12	12	8	33	58	28-junio	54	4	278
PR 0826-6-4	12	7	42	51	28-junio	49	2	261
PR 0826-7-2	12	8	33	46	28-junio	44	2	219
PR 0826-1-3	12	7	42	38	28-junio	38	0	207
PR 0826-11	12	11	8	54	30-junio	38	16	170
PR 0776-14-1	12	8	33	29	30-junio	29	0	171
PR 0776-14-1	12	9	25	32	30-junio	32	0	176
RAZ 25	12	10	17	44	30-junio	35	9	126
GH 0808-5	12	7	42	28	28-junio	28	0	188
PR 0776-66-3	12	8	33	47	28-junio	47	0	211
GH 0808-2	12	9	25	27	28-junio	24	3	169
GH 0808-18	12	7	42	50	28-junio	48	2	260
GH 0808-19	12	10	17	29	28-junio	27	2	119
PR 0826-12	12	8	33	57	28-junio	55	3	269
PR0775-66-3	12	7	42	50	28-junio	48	2	257
GH 0808-1	12	11	8	30	30-junio	23	7	117
PR 0775-8-2	12	9	25	56	30-junio	49	7	254
PR 0826-10	12	9	25	53	30-junio	43	10	239
PR 0826-11	12	11	8	58	30-junio	52	6	190
GH 0807-1	12	9	25	59	30-junio	49	10	257
GH0808-2	12	10	17	26	28-junio	22	4	161
PR 0826-12	12	9	25	63	28-junio	53	10	260
GH 0807-1	12	9	25	46	28-junio	44	2	198
PR 0826-10	12	8	33	56	28-junio	50	6	261
GH 0807-6	12	7	42	55	30-junio	55	0	271
PR 0826-10	12	8	33	50	30-junio	50	0	222
GH 0808-2	12	11	8	35	30-junio	22	13	91
PR 0775-66-3	12	8	33	50	27-junio	50	0	219
Verano	12	7	42	52	27-junio	50	2	272
Morales	12	7	42	72	27-junio	68	4	311

Cuadro 8. Reacción al gorgojo *Acanthoscelides obtectus* Say de tres líneas seleccionadas para resistencia y cultivares de Centroamérica, el Caribe, Ecuador y Angola.

Línea	Tipo de semilla	Fuente	Número total de agujeradas en la semilla	Por ciento de semillas sin perforaciones	Por ciento de peso de semilla perdido
PR-1012-27-2	Rojo arriñonado	UEO	9.5	65.0	0.0
PR-1012-29-3	Rojo arriñonado	UEO	14.5	75.0	0.0
PR-1012-31-4	Rojo arriñonado	UEO	14.0	65.0	18.8
Badillo	Rojo arriñonado	UPR	129.0	0.0	45.0
INIAP Fanesquero	Blanco arrinoñado	Ecuador	122.0	0.0	25.0
RAZ 25	Rojo moteado	CIAT	13.5	62.5	16.7
INIAP Portillo	Rojo moteado	Ecuador	180.5	0.0	37.5
INIAP Yungilla	Rojo moteado	Ecuador	132.5	0.0	37.5
PR9745-232	Rojo moteado	UPR	125.5	0.0	35.8
INIAP Concepcion	Rojo moteado	Ecuador	150.0	0.0	37.5
Catarina	Crema rayada	Angola	132.0	0.0	37.5
Calembe	Verde	Angola	143.0	0.0	25.0
Canaria	Amarillo	Angola	129.5	0.0	25.0
Verano	Blanco	UPR	150.0	0.0	25.0
Morales	Blanco	UPR	112.5	0.0	25.0
RAZ 75	Rojo pequeño	CIAT	23.5	35.0	16.7
INTA Precoz	Rojo pequeño	Honduras	120.5	0.0	37.5
DEHORO	Rojo pequeño	Honduras	128.0	0.0	33.3
Amadeus 77	Rojo pequeño	Honduras	122.5	0.0	33.3
Carrizalito	Rojo pequeño	Honduras	106.5	0.0	33.3
CENTA Pupil	Rojo pequeño	Honduras	110.0	0.0	25.0
RAZ 50	Negro	CIAT	79.5	10.0	16.7
Aifi Wuriti	Negro	Honduras	140.5	0.0	33.3
DPC 40	Negro	Dom. Rep.	103.5	0.0	40.0
ICA Pijao	Negro	Colombia	109.0	0.0	25.0
Mean			93.8	9.0	30.7
LSD(0.05)			18.0	8.9	12.6
CV(%)			9.7	50.1	20.7

La media en este experimento en total de perforaciones fue de 93.8 perforaciones en semilla, el porcentaje de semilla sin agujerar fue de 9% y el porcentaje de pérdida de peso en semilla fue de 30.7% de su peso. Las líneas utilizadas como control en este experimento (Morales y Verano) presentaron un total de 112 y 150 perforaciones respectivamente, al exponer 20 semillas a 20 gorgojos. La línea PR1012-27-2 presentó sólo 9 perforaciones en total, un 65% de las semillas no fueron perforadas y las semillas no perdieron peso, PR1012-29-3 tuvo 14.5 perforaciones en total, un 75% de su semilla no sufrió daño a causa del gorgojo o no fue agujerada y no obtuvo pérdida en peso, la línea PR1012-31-4 presentó un total de 14 perforaciones en la semilla, un 65% de su semilla no presentó perforaciones y obtuvo un 18.8% de pérdida de peso.



Figura 7: Foto de línea 1012-29-3, luego de exposición al gorgojo durante 45 días.

La línea AO-1012-10-1 presentó en el laboratorio el marcador de arcelina, pero no así el marcador de alfa amilasa y fitohemaglutinina. La línea AO-1012-27-1 no estuvo presente en ninguno de los marcadores. Las líneas AO-1012-29-1 y AO-1012-29-3, que mostraron el más alto nivel de resistencia a los gorgojos, presentaron los tres marcadores moleculares. Los testigos susceptibles 'Morales' y 'Verano' no presentaron ninguno de los marcadores. Estos

resultados sugieren que los marcadores para arcelina, alfa amilasa y fitohemaglutinina podrían servir en la selección indirecta para determinar la resistencia a los gorgojos.

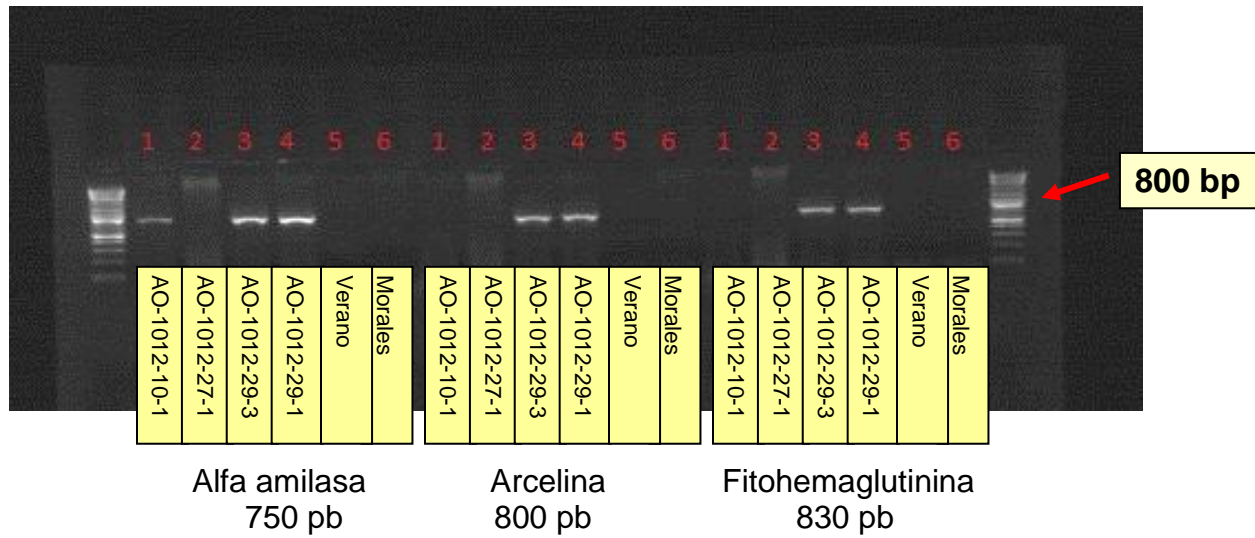


Figura 4: Presencia de los marcadores Arcelina, Alfa amilasa y Fitohemaglutinina en líneas de la Universidad del Estado de Oregon y los testigos susceptibles 'Verano' y 'Morales'.

Referencias

- Abate T, Ampofo JKO (1996) Insect pests of common bean in Africa: Their ecology and management. *Ann. Rep. Entomol.* 41: 45-75.
- Acosta-Gallegos J.A., Quintero C., Vargas J., Toro O., Tohme J, and C. Cardona. 1998. A new variant of arcelin in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from southern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45(3):235-242.
- Beaver, J. 2009. Conjunto tecnológico de habichuela. <http://academic.uprm.edu/jbeaver/> (Verificado 22 de noviembre de 2006).
- Blair, M.W., Prieto, S. & Cardona, C. 2002. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Annual Report. Biotechnology. 1.2.6 Marker assisted selection of Arcelin derived bruchid resistance, 23-27.
- Cardona C., Valor J.F., Mejia-Jiménez A., Beebe S., Tohme J. 2005. Developing germplasm with resistance to pests: Zabrotes, *Acanthoscelides* - bruchids. CIAT - Ann. Rep. 53-59.
- Cardona C., Kornegay J., Posso C.E., Morales F., Ramirez H. 1990. Comparative value of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil *Entomol. Exp. Appl.* 56:197-206.
- Casida, J.E. and G.B. Quistad. 1998. Golden age of insecticide research: past, present or future *Annual Review of Entomology* 43:1-16.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1987. CIAT. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Aart van Schoonhoven y Marcial A. Pastor-Corrales (comps.). Cali, Colombia. 56p.
- Cubillos P., Bosch A. 1983. Estudio de Evaluación de pérdidas de granos básicos pos cosecha, Proyecto FAO PFL/CH1/001 Estudio granos básicos Documento de campo 1.
- Dent, D. 2000. *Insect Pest Management*. 2nd Edition. CABI publishing, Wallingford, UK.
- Fory, L. F., Fuibardu-Filho, F., Quintero, C. M., Osborn, T. C., Cardona, C., Chrispeels, M. J. and Mayoer, J. E. 1996. Alpha-amylase inhibitors in resistance of common beans to Mexican bean weevil and the bean weevil (Coleoptera: Bruchidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 204-210.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2005. FAO - Statistics online - Crop production statistics. Recuperado en <http://faostat.fao.org>, verificada el 11 de enero de 2011.

- Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2005. FAOSTAT - Agriculture data. Recuperado en <http://www.fao.org>, verificada el 11 de enero de 2011.
- Gepts, P. and F.A. Bliss. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Colombia. *Economic Botany* 40:469-478.
- Gepts, P. 2001. *Phaseolus vulgaris* (Beans). Recuperado en <http://agronomy.ucdavis.edu/gepts/getslab.htm>, verificada el 29 de enero de 2012
- Genchev, D. 2007. The artificial crossing of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rastenievudni Nauki* 44: 387-394.
- Geoffrey Acrey African 2007 Centre for Crop Improvement (ACCI) School of Biochemistry, Genetics, Microbiology and Plant Pathology Faculty of Science and Agriculture University of KwaZulu.27-44
- Goossens A, Quintero C, Dillen W, De Rycke R, Flower Valor J, De Clercq J, Van Montagu M, Cardona C, Angenon G (2000) Analysis of bruchid resistance in the wild common bean accession G02771: No evidence for insecticidal activity of arcelin 5. *J. Exp. Bot.* 51: 1229-1236.
- Hill, S.B. 1989. Cultural control methods: Ecological agriculture projects. EAP publication number 58. Recuperado en http://eap.mcgill.ca/publications/eap_foot.htm, verificada el 29 enero de 2012
- Kaplan, L. and Kaplan, L.N. 1988. *Phaseolus* in archeology. In: Gepts, P. (Ed). *Genetic Resources of Phaseolus beans*. Kluwer, Dordrecht, Netherland. 125-143
- Kornegay J., Cardona C. and C.E. Posso. 1993. Inheritance of resistance to Mexican bean weevil in common bean, determined by bioassay and biochemical tests. *Crop Sci.* 33:589-594.
- Kornegay J.L. and C. Cardona. 1991. Inheritance of resistance to *Acanthoscelides obtectus* in a wild common bean accession crossed to commercial bean cultivars. *Euphytica* 52:103-111.
- Kornegay, J. and C. Cardona. 1991. Breeding for insect resistance in beans. In: Van Schoonhoven, V and Voysest, O (Eds.). *Research for Crop Improvement*, CAB International, Wallingford. UK. 91-106
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lioi L., Galasso I., Santantonio M., Lanave C., Bollini R. and F. Sparvoli .2006. Lectin gene sequences and species relationships among cultivated legumes. *Genet. Res. Crop Evol.* 53:1615-1623.

- Lioi L., Sparvoli F., Galasso I., Lanave C. and R. Bollini. 2003. Lectin related resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events. *Theor. Appl. Genet.* 107: 814-822.
- Mbogo, K.P., J. Davis and J.R. Myers. 2009. Transfer of the Arcelin-Phytohaemagglutinin- α Amylase Inhibitor Seed Protein Locus from Tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) to Common Bean (*P. vulgaris* L.). *Biotechnology* 8(3):285-295.
- Mbogo Kusolwa, P., 2007. Breeding for Bruchid Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Interspecific Introgression of Lectin-like Seed Proteins from Tepary Bean (*P. acutifolius* A. Gray), *Genetic Control and Bruchid Resistance Characterization*.46-62
- McGown J. 2003. El caso de la reivindicación del gen de frijol Mexicano. Teatro Misterios de Biodiversidad. Recuperado en <http://www.edmonds-institute.org>, verificado el 18 diciembre de 2011.
- Mejia-Jiménez A., Galindo L., Criollo A., Beebe S., Cardona C. and J. Tohme. 2002. Interspecific hybridization of common and tepary bean through double congruity backcrosses. *CIAT Biotech. Annu. Rep.* pp. 6-11.
- Metcalf, R.L. and Metcalf, R.A. 1993. *Destructive and Useful Insects*. 5th Edition. McGraw-Hill, New York, USA.
- Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe, S.E. & Blair, M.W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105-131.
- Misangu NR (1997) Distribution of bean bruchid species in the major bean growing regions of Tanzania and breeding beans for resistance to *Acanthoscelides obtectus* (Say) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh). Ph.D. thesis pp 37-170.
- Morales, F.J. 2000. El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. CIAT, Cali, Colombia, 169 p.
- Myers JR, Davis J, Kean D, Nchimbi-Msolla S, Misangu R (2001) Backcross Breeding to Introduce Arcelin Alleles into Improved African Bean Cultivars. Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program. East Africa Proceedings: Bean Seed Workshop Arusha, Tanzania January 12-14.
- Osborn T.C., Alexander D., Sun S.S.M., Cardona C. and F.A. Bliss. 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science* 240:207-210.
- Osborn T.C., Blake T., Gepts P., Bliss F.A. 1986. Bean arcelin 2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 71:847-855.

- Parkin, E.A., and G.T. Bills. 1955. Insecticidal dusts for the protection of stored peas and beans against bruchid infestation. *Bull. Entomol. Res.* 46:625-641.
- Parsons, D.M. and P.F. Credland. 2003. Determinants of oviposition in *Acanthoscelides obtectus*: A nonconformist bruchid. *Physiol. Entomol.*, 28:211-231.
- Salas, L. and R. F. Ruppel. 1959. Efectividad de insecticidas aplicados en polvo para controlar las principales plagas del frijol y del maíz almacenados en Colombia. 93-108
- Schoonhoven AV, Cardona C (1986) Main insect pests of stored beans and their control. Study guide CIAT.1-3
- Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M. & Birch, A.N.E. 1989. Legume Seeds: The defence of wild and cultivated species of *Phaseolus* against attack by bruchid beetles. *Annals of Botany* 63: 177-184.
- Singh SP (2001) Broadening the genetic base of common bean cultivars. A review. *Crop Sci.* 41: 1659-1675.
- 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.
- Slumpa, S. and J.K.O. Ampofo. 1991. Evaluation of different methods for the control of bean bruchid (*Acanthoscelides obtectus*). *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.*, 34: 66-67.
- Teetes, G.L. 1991. The environmental control of insects using planting times and plant spacing. In: Pimentel, D. (Ed.) *Handbook of Pest Management in Agriculture*, volume 1, 2nd Edition. CRC, Florida, USA.
- Voysest O., 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Legado de variedades de América Latina 1930 - 1999. CIAT. Cali. Colombia. 31-40
- Watson, T.F., L. Moore and G.W. Ware. 1976. *Practical Insect Pest Management. A self Instruction Manual.* W.H. Freeman and Company. San Francisco. USA.