

## SELECCIÓN DE GENOTIPOS DE FRIJOL COMÚN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) RESISTENTES AL VIRUS DEL MOSAICO DORADO AMARILLO DEL FRIJOL (BGYMV) POR HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Ana Lidia Echemendía Gómez,<sup>1</sup> Pedro Luis Ramos González,<sup>2</sup> Rudy Peral Pérez,<sup>2</sup> Ángela C. Porras González y Gloria A. González Arias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, aechemendia@inisav.cu

<sup>2</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, AP 6162, CP 10600, Playa, Ciudad de La Habana

### RESUMEN

Para contribuir a la metodología de selección de variedades de frijol con resistencia al Virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) se realizaron ensayos con materiales del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Hortícola Liliana Dimitrova. Se puso a punto la validación del método de hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva, el cual resultó eficiente y específico para la evaluación de materiales de frijol provenientes de programas de mejoramiento. Se usó una sonda de ADN en el ensayo no radiactivo para determinar los parámetros de especificidad, eficacia, sensibilidad, repetibilidad relativa y el límite de detección. Los resultados mostraron porcentajes del 100% para los parámetros analizados. El procedimiento fue eficiente para la evaluación de material de frijol mejorado.

Palabras claves: validación, hibridación no radiactiva, BGYMV, begomovirus, frijol común

### ABSTRACT

In contribution to bean varieties selection methodology with resistance to Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV), trials with germplasm materials from Horticultural Research Institute Liliana Dimitrova were carried out. Validation of non radioactive nucleic acid hybridization method was realized which was efficient and specific for the evaluation of bean genetic materials coming from improvement programs. A DNA probe was used in not radioactive trial to determine the parameters of specificity, efficacy, sensibility, relative repeatability and limit of detection. Results showed percentages of 100% for the parameters analyzed. The procedure was efficient for the evaluation of bean material genetically improved.

Key words: validation, non-radioactive hybridization, BGYMV, begomovirus, common bean

### INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), originario de América, se considera uno de los alimentos básicos, ya que representa un aporte proteico del 15-30% con 340 cal/100 g. Su producción en América tropical y subtropical asciende a más de cuatro millones de toneladas al año, donde los mayores productores son Brasil y México, con cinco y dos millones de hectáreas cultivadas, mientras que en los países de Centroamérica se cultivan aproximadamente 500 000 ha, y en el Caribe, particularmente Cuba, República Dominicana y Haití, la cifra asciende a 250 000 ha [Morales, 2000].

En Cuba se cultivan aproximadamente 52 000 ha de frijol, sin incluir las áreas dedicadas al autoabas-

tecimiento. La producción estatal solamente cubre el 5% de la demanda, lo que exige la importación de 120 000 t anuales de este grano, equivalente a 40 millones de dólares [ONE, 2006].

En la región de América la baja productividad del frijol se debe a diversos factores, entre los que se encuentran la falta de asistencia técnica, el bajo uso de insumos dedicados a la atención del cultivo y los problemas fitosanitarios; entre estos últimos los que más se destacan son las enfermedades virales del tipo del mosaico dorado, transmitidas por moscas blancas *Bemisia tabaci* [Morales, 2000].

Las enfermedades virales causadas por begomovirus que afectan al frijol en América Latina son el *Virus del*

*mosaico dorado del frijol* (BGMV), el *Virus del mosaico cálico del frijol* (BCaMV) y el *Virus del mosaico enano del frijol* (BDMV) [Morales *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1999], y de ellos el de mayor importancia es el mosaico dorado del frijol, señalado por primera vez en Brasil [Costa, 1965], y que se diseminó a regiones productoras de América Latina y el Caribe para convertirse en la década de los ochenta del pasado siglo en la enfermedad más devastadora del cultivo de todos los tiempos [Schieber, 1969; Gamez, 1970; Bird *et al.*, 1972; Baltasar, 1978; Blanco y Bencomo, 1978; 1981; López-Salinas y Becerra, 1994].

Con posterioridad se distinguieron dos especies del virus que causan el síntoma de mosaico dorado: la suramericana –*Virus del mosaico dorado del frijol* (BGMV)– y la mesoamericana –*Virus del mosaico dorado amarillo del frijol* (BGYMV)–. La primera se transmite solo por moscas blancas, y está distribuida en Brasil, Argentina y Bolivia, mientras que la mesoamericana se transmite por moscas blancas, y por vía mecánica, y se encuentra en República Dominicana, Nicaragua, Costa Rica, Puerto Rico, Haití y México [Morales, 2000].

En Cuba el cultivo comenzó a tener la afectación desde inicios de la década de los setenta, y se señalaron los síntomas de amarillamiento en el frijol como causados por el BGMV [Blanco y Bencomo, 1978] asociado a poblaciones de moscas blancas. El BGMV provocó, en las campañas de los años 1989-1991, porcentajes máximos de infección en las provincias de Pinar del Río, Matanzas y Holguín, que conllevó la destrucción de más de 1000 ha del cultivo. Posteriormente, a finales de la década de los noventa, con la presencia de *Bemisia tabaci* biotipo B, la enfermedad alcanzó afectaciones de 90% y se convirtió en el principal patógeno viral del frijol común en Cuba [Blanco y Faure, 1994; Vázquez, 1999]. Los estudios realizados hasta hoy en Cuba y relacionados con el BGMV se basaron en algunos aspectos epidemiológicos [Blanco y Bencomo, 1978; Blanco *et al.*, 1984].

Las medidas implementadas para proteger al cultivo de enfermedades virales se basan en la utilización de variedades mejoradas genéticamente, la aplicación de plaguicidas para reducir los niveles del insecto vector, implantación de los manejos integrales, aplicación de técnicas moleculares, producción de plantas resistentes al BGMV aislado de Brasil y el mejoramiento de frijoles de diferentes cultivares de semilla pequeña con resistencia a mosaico dorado [Dardon, 1993; Beebe *et al.*, 1993; 1995; Aragão *et al.*, 1998].

De acuerdo con estos aspectos, en Cuba se realizan esfuerzos para transferir a *P. vulgaris* los genes deseables de resistencia que se encuentren en otras especies de

*Phaseolus*, lo que puede contribuir a la piramidación de genes y a la ampliación de la base genética para la resistencia estable a los begomovirus transmitidos por mosca blanca, de ahí que sea necesario el conocimiento de aspectos de la enfermedad viral presente en el país, así como contar con un diagnóstico de calidad. De esa manera se obtendrían resultados para enriquecer los métodos evaluativos de la selección de variedades de frijol mejoradas genéticamente, y aportar al programa de mejoramiento genético del cultivo del frijol los elementos para el diagnóstico del begomovirus presente en Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Establecimiento de parámetros analíticos para la detección de BGYMV en plantas de frijol por hibridación de ácidos nucleicos

*Obtención, marcaje de la sonda y procedimiento de hibridación.* Para el procesamiento de las muestras se tomaron dos discos de 6 mm de diámetro de las hojas de frijol de la parte apical de las plantas por evaluar y se maceraron con 30  $\mu$ L de NaOH 0,4 N en tubos eppendoff; se usó una punta de cristal estéril con ayuda de un macerador vertical [Rom *et al.*, 1993]. Se aplicaron 3  $\mu$ L de cada muestra en la membrana de nailon Hybon N+ con el uso del dispositivo conectado al vacío. El ADN se fijó con luz ultravioleta con el horno de UV.

La sonda empleada se obtuvo al amplificar por PCR la región intergénica del BGYMV aislado de Holguín, y para ello se diseñó un oligonucleótido para esta zona denominado PAR1c90 (<sup>5'</sup> CATTGG TCAGTCAAAA <sup>3'</sup>), de manera que se usó el par de oligonucleótidos PAL1v1978, informado por Rojas *et al.* (1993), y el PAR1c90 antes descrito.

Las condiciones de PCR fueron las señaladas por Rojas *et al.* (1993). Se partió de un fragmento de una talla aproximada de 800 pb, con una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L de forma tal que la sonda pZBGY-RI se hibridó a una concentración de 32 ng/ $\mu$ L. El marcaje de la sonda, la prehibridación, hibridación, detección y la exposición se realizó según describen Sambrook *et al.* (1989).

*Evaluación de la sonda para la detección de BGYMV.* Se analizaron 10 controles infectados procedentes de plantas de frijol previamente inoculadas con el virus y 10 sanos de plantas sanas de frijol mantenidas en condiciones aisladas, ambas confirmadas por ELISA-DAS con el anticuerpo 3F7 [Cancino *et al.*, 1995]. Se utilizó la sonda pZBGY-RI, y se hicieron cuatro réplicas de cada muestra y cinco de este experimento. Se determinó la intensidad de la señal de cada muestra con un densitómetro

auxiliado por el Molecular Analyst Software (versión 1.4.1, 1992-1996). Se determinó el porcentaje de concordancia de los resultados, para lo que se estableció la repetibilidad relativa del método.

*Límite de detección y establecimiento de los parámetros evaluativos del método de hibridación.* Para establecer el límite de detección se evaluaron diluciones de un clon del componente A del BGYMV, preparado en extracto de savia de plantas sanas de frijol. Las diluciones ensayadas fueron 5 pg, 10 pg, 20 pg, 39 pg, 78 pg, 156 pg, 313 pg, 625 pg, 1,3 ng, 2,5 ng, 5 ng, 10 ng, 140 ng, 560 ng, 1 µg hasta 4,5 µg. Se determinó la intensidad de la señal en tres réplicas del experimento mediante el Molecular Analyst Software (versión 1.4.1, 1992-1996). A partir de los valores de concentración e intensidad estimadas se establecieron las curvas de mejor ajuste mediante análisis de regresión con el programa Statistica (1984-1995).

Para la determinación de los parámetros por el método de hibridación de ácidos nucleicos no radiactivo se eva-

luaron 325 muestras, de ellas 205 positivas (plantas de frijol inoculadas con BGYMV) y 120 negativas (plantas de frijol sanas), que se comprobaron por el ELISA-DAS descrito anteriormente. Se realizaron dos réplicas interensayo y dos intraensayo para establecer la repetibilidad relativa. Los resultados del método de hibridación de ácidos nucleicos (HAN) no radiactivo permitió determinar los indicadores de validación del ensayo según lo establecido por Peralta y Villoch (1999).

*Evaluación del germoplasma de frijol frente a BGYMV.* El método validado se utilizó para evaluar el comportamiento de 30 líneas o variedades del germoplasma de frijol del Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova, frente al BGYMV aislado de la provincia de Holguín. De ellas siete eran comerciales, cuatro precomerciales y 21 líneas avanzadas. Del total, 28 eran de origen mesoamericano y dos de origen andino (*Tabla 1*).

**Tabla 1. Material del germoplasma de frijol evaluado y sus características**

Material	Color del grano	Fuente de resistencia	Raza	Tipo de material
Velasco Largo	Rojo	Desconocido	A	Comercial
Red Kloud	Rojo	Red Kidney	A	Comercial
Delicias 364	Rojo	DOR 364	M	Comercial
MD 30-75	Rojo	DOR 483	M	Precomercial
MD 30-37	Rojo	DOR 483	M	Precomercial
CC-25-9	Negro	Negro San Luis	M	Comercial
Tomeguín 93	Negro	DOR 364	M	Comercial
BAT 304	Negro	Porrillo sintético	M	Comercial
Tazumal	Negro	Turrealba 1, Porrillo sintético	M	Comercial
CUT 45	Negro	NXDO 10855-3	M	Precomercial
CUT 53	Negro	DOR 41	M	Precomercial
FM 22	Negro	Negro San Luis	M	Línea avanzada
FM 15	Negro	Negro San Luis	M	Línea avanzada
FM 30	Negro	Negro San Luis	M	Línea avanzada
FM 25	Negro	Porrillo sintético	M	Línea avanzada
FM 28	Negro	Porrillo sintético	M	Línea avanzada
FM 11	Negro	DOR 364	M	Línea avanzada
FM 20	Negro	DOR 364	M	Línea avanzada
FM 13	Rojo	DOR 482	M	Línea avanzada
FM 23	Rojo	DOR 482	M	Línea avanzada
FM 21	Rojo	A 429	M	Línea avanzada
FM 17	Rojo	A 429	M	Línea avanzada
FM 29	Rojo	A 429	M	Línea avanzada
FM 16	Rojo	DOR 482 y A 429	M	Línea avanzada
FM 27	Rojo	DOR 482 y A 429	M	Línea avanzada
FM 14	Rojo	DOR 364	M	Línea avanzada
FM 18	Rojo	DOR 364	M	Línea avanzada
FM 26	Rojo	DOR 483	M	Línea avanzada
FM 10	Café	DOR 364	M	Línea avanzada
FM 19	Crema	DOR 364	M	Línea avanzada

A: Andino M: Mesoamericano

El experimento se realizó en casa de cristal con condiciones controladas de temperatura (24-26°C), y el inóculo se obtuvo de plantas de frijol variedad Delicias 364, después de 15 días de infectarse por biobalística y comprobarse por PCR. La inoculación fue de forma mecánica y la evaluación se realizó mediante una escala de sintomatología de 1-9 [CIAT, 1987] a los 7, 14, 21 y 45 días después de inoculadas las plantas (dpi). Para determinar el grado de severidad de los síntomas de un material se tomó como válido el grado que mostró más del 60% de las plantas infectadas de cada línea o variedad probada. Para la inoculación mecánica los fragmentos de hojas de frijol con BGYMV se maceraron con tampón fosfato 0,1 M a pH 7,5, (1 g en 10 mL de buffer), que contenía 2-mercaptoetanol al 1% y se utilizó carborundum como agente abrasivo.

La evaluación por hibridación de ácidos nucleicos se realizó sobre 16 plantas por cada línea o variedad, a los 7 y 14 días (dpi), para lo que se tomaron en consideración los valores de intensidad (DO/mm<sup>2</sup>) de las muestras, determinados por el programa Molecular Analyst, comparados con los de la curva de calibración del BGYMV. Los resultados se sometieron a una prueba de Duncan y un análisis de varianza con el programa Statística.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Parámetros analíticos para la detección de BGYMV en plantas de frijol

*Evaluación de la sonda para la detección de BGYMV.* La intensidad de la señal de hibridación con respecto a los

controles positivos fue suficientemente distinguible para valores mayores de 1500 DO/mm<sup>2</sup>, de manera que los controles negativos no mostraron señal de hibridación, por lo que su intensidad fue de valor 0 DO/mm<sup>2</sup>, lo que posibilitó una alta precisión en la detección del BGYMV.

*Límite de detección y establecimiento de los parámetros evaluativos.* El valor del índice de correlación (R<sup>2</sup>) es muy cercano a 1, de manera que se observa la exactitud del ajuste de la curva exponencial a los valores medios de intensidad (Fig. 1). El método es capaz de diferenciar entre positivos y negativos, de forma que se detectó la presencia de una señal de hibridación hasta alcanzar valores de concentraciones del virus de 10 pg. Para concentraciones menores fue imposible la detección de la señal. Este valor se consideró adecuado como límite de detección o sensibilidad analítica de este método, ya que es capaz de detectar bajas concentraciones del virus dentro del vegetal [Matthews, 1991]. Este límite de detección en el rango de los picogramos coincide con los informados al emplear una sonda genérica y otra específica al evaluar por HAN no radiactivo para la detección del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en plantas transgénicas de tomate [Rodríguez *et al.*, 2003]. Otros autores han señalado que no existen diferencias para el límite de detección cuando se utilizaron métodos no radiactivos (quimioluminiscente y colorimétrico) en la detección de *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) en papa, y de TYLCV en tomate, respectivamente [González *et al.*, 2001; Quiñones, 2002].

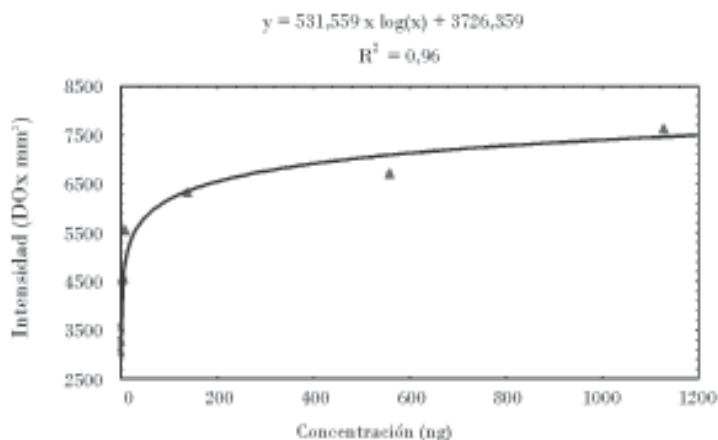


Figura 1. Curva de mejor ajuste para la detección del BGYMV por el método de hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva.

Los resultados de los valores básicos de los controles positivos y negativos por la hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva (HAN) no mostraron falsos negativos (FN), ni se detectaron falsos positivos (FP), como evidencia que no se incurrió en el desarrollo de contaminaciones exógenas, lo que condicionaría la disminución de la especificidad de la técnica (Tabla 2).

**Tabla 2. Resultados de evaluación de controles de referencia**

Resultados del HAN	Controles de infectados	Referencia de sanos
Positivos	205 Vp	Fp 0
Negativos	0 Fn	Vn 120

Verdaderos positivos (Vp)      Falsos positivos (Fp)  
Verdaderos negativos (Vn)      Falsos negativos (Fn)

Los resultados de los parámetros evaluativos determinados a partir de los valores básicos (Tabla 3) demost-

tró que la técnica HAN no radiactiva permite la detección de diluciones de hasta 10 pg de material infectado con BGMV-CU, del 100% de los controles verdaderamente infectados y 100% de seguridad de que los controles sanos no revelen señal al realizar la técnica, lo que le confiere alta eficiencia y factibilidad de aplicación para análisis rutinarios y masivos, y coincide con resultados de evaluaciones realizadas por Peralta y Villoch (1999) y Quiñones (2002), con una sonda específica a material de tomate mejorado genéticamente con resistencia al TYLCV.

Los valores de los parámetros restantes reafirman la eficacia de la utilidad de esta técnica para el diagnóstico de BGYMV-CU. Además de que presenta fácil y rápida manipulación, se obtiene una señal con una nitidez excelente y no ocasiona daño ambiental. Estos resultados coinciden con los de otros autores al evaluar material importado de papa en la detección de PSTVd por un método HAN no radiactivo, al demostrar que el método quimioluminiscente es sensible y confiable para la detección de este patógeno [González *et al.*, 2001].

**Tabla 3. Parámetros evaluativos determinados para la detección de BGYMV por el método HAN no radiactivo**

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Sensibilidad analítica A-SN	10 pg	Eficacia E	100%
Sensibilidad diagnóstica D-SN	100%	Valor predictivo negativo (VPN)	100%
Especificidad diagnóstica D-SP	100%	Valor predictivo positivo (VPP)	100%

pg: Picogramo.

*Evaluación del germoplasma de frijol frente a BGYMV.* Del total de las variedades y líneas del germoplasma de frijol evaluado por observación de síntomas, el 53,3% resultó resistentes con síntomas de grado 2 y 3 de severidad. El 43,3% tuvo un comportamiento intermedio con síntomas de grado 4, 5 y 6 de severidad, y en algunos casos se observó encrespamiento foliar severo, que produce deformación del patrón de crecimiento de las plantas, y el 3,3% fue sensible al virus con grado 8 de severidad (Tabla 4).

En la evaluación visual ningún material resultó inmune al virus, pero la mayoría tuvo un buen comportamiento frente al BGYMV CU, teniendo en cuenta el grado de severidad, de forma tal que son útiles como material comercial o como portador de genes de resis-

tencia al BGYMV para la obtención de nuevas líneas en el programa de mejoramiento genético. La resistencia relativa o susceptibilidad ensayada, basada en el porcentaje de plantas infectadas por el virus, la severidad de los síntomas y estimación de la cantidad de ADN viral, a los 7 y 14 días después de inoculadas (dpi) se muestra en la Tabla 4.

El tiempo requerido para la aparición de los síntomas fue diferente para cada línea o variedad, de forma tal que los genotipos que alcanzaron mayor cantidad de ADN viral en los primeros 7 dpi desarrollaron más rápidamente los síntomas típicos de mosaico dorado y encrespamiento foliar. Este hecho está directamente relacionado con la severidad de los síntomas mostrados por cada genotipo evaluado (Tabla 4).

Los porcentajes más altos de infección y grado de severidad fueron observados en una línea denominada Velasco Largo. La mejor combinación de los más bajos valores de infectividad y severidad se encontró en los materiales Red Kloud, Tomeguín 93, MD 30-75, CUT 45, CUT 53, FM 13, FM 18; sin embargo, de acuerdo con la produc-

ción de vainas y la severidad de los síntomas, los mejores resultados se observaron en Red Kloud, FM 13, FM 23, FM 14 y CUT 53. Esta última variedad tuvo un comportamiento similar en estudios anteriores, y en condiciones de producción alcanzó un rendimiento de 1,166 kg/ha, considerados como aceptables (Tabla 4).

**Tabla 4. Relación de la severidad, el número de plantas infectadas, la DO/mm<sup>2</sup> y la evaluación de la producción de vainas de los materiales evaluados del germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) frente al virus del mosaico dorado amarillo del frijol de Cuba**

Material evaluado	Severidad	PI/PT (%)	DO/mm <sup>2</sup> 7 dpi	PI/PT (%)	DO/mm <sup>2</sup> 14 dpi	Producción de vainas
CC-25-9	2 (R)	1/16 (6,3)	1884	13/16 (81,3)	2716,8	+
Red Kloud	2 (R)	0/16 (0)	0	7/16 (43,8)	4424,7	++
Tomeguín 93	3 (R)	1/16 (6,3)	2740,5	6/16 (37,5)	2723,7	+
MD 30-75	2 (R)	0/16 (0)	0	11/16 (68,8)	4152,2	+
MD 30-37	2 (R)	4/16 (25)	2277	15/16 (93,8)	2249,9	+
Delicias 364	2 (R)	0/16 (0)	0	12/16 (75)	3639,5	+
FM 10	3 (R)	2/16 (12,5)	2589,8	12/16 (75)	4388,8	+
FM 11	3 (R)	0/16 (0)	0	12/16 (75)	4008,8	+
FM 13	2 (R)	1/16 (6,3)	2914	10/16 (62,5)	2343,1	++
FM 14	2 (R)	0/16 (0)	0	15/16 (93,8)	3655,1	++
FM 16*	3 (R)	0/16 (0)	0	11/16 (68,8)	4792	-
FM 18*	3 (R)	5/16 (31,3)	4692,3	8/16 (50)	4692,3	+
FM 23	2 (R)	0/16 (0)	0	8/16 (50)	5649,9	++
FM 26*	2 (R)	1/16 (6,3)	1566	16/16 (100)	4108,7	+
CUT 45	2 (R)	3/16 (18,8)	2389,7	11/16 (68,8)	3293,5	+
CUT 53	3 (R)	0/16 (0)	0	10/16 (62,5)	3550,1	++
Velasco Largo	8 (S)	7/16 (43,8)	5482,9	16/16 (100)	3887,9	-
Tazumal	5 (I)	5/16 (31,3)	3085	14/16 (87,6)	3576,1	+
BAT 304	4 (I)	4/16 (25)	2049	13/16 (81,3)	3689	+
FM 15*	6 (I)	9/16 (56,3)	5689,3	16/16 (100)	2367,8	-
FM 17**	I (6)	10/16 (62,5)	5019	15/16 (93,8)	3475,9	+
FM 19*	5 (I)	5/16 (31,3)	3129,3	15/16 (93,8)	6287,9	+
FM 20*	6 (I)	9/16 (56,3)	4557,6	16/16 (100)	3955,3	+
FM 21**	5 (I)	6/16 (37,5)	4358,3	15/16 (93,8)	2531,3	+
FM 22	5 (I)	4/16 (25)	3052,2	14/16 (87,6)	5398,4	+
FM 25	6 (I)	8/16 (50)	6191,8	15/16 (93,8)	2285	+
FM 27	4 (I)	5/16 (31,3)	1792,6	15/16 (93,8)	4343,1	+
FM 28*	5 (I)	1/16 (6,3)	1789	16/16 (100)	2009,1	+
FM 29*	4 (I)	4/16 (25)	3929,3	16/16 (100)	2137,9	+
FM 30	5 (I)	4/16 (25)	2402	14/16 (87,6)	5133,4	+

PI/PT: Plantas infectadas/Total de plantas inoculadas \* Plantas con encrespamiento foliar severo.

R: Plantas resistentes I: Plantas con comportamiento intermedio S: Plantas sensibles

++ Todas las plantas producen vainas \*\* Plantas con encrespamiento foliar severo y deformación total

- Ninguna de las plantas producen vainas.

Las variedades Delicias 364, MD 30-75, MD 30-37, CC-25-9, Tomeguín 93, BAT 304, CUT 45 y CUT 53 tuvieron buen comportamiento frente a la infección con BGYMV en Cuba, en ensayos realizados en campo donde la incidencia del virus y la mosca blanca son elevadas;

sin embargo, no existen referencias sobre el comportamiento de las líneas avanzadas en estudio y denominadas FM 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29 y 30. La variedad Red Kloud, cuya fuente de resistencia proviene de Red Kidney, posee la

cualidad de resistir el efecto abortivo de las flores, la deformación de las vainas, y tienen tolerancia a la infección por el BGYMV/BGMV, de forma tal que producen aceptablemente a pesar de estar infectados [Moraes, 2000].

Algunos autores encontraron en el material Andino los valores más altos de infección y los síntomas más severos al compararlos con líneas de origen mesoamericano, y señalan como mucho más susceptible al material del germoplasma Andino, frente a la infección con BGYMV-Mx. De igual forma, al ensayar diferentes métodos de inoculación en líneas mesoamericanas, se detectaron bajos porcentajes de infección cuando usaron la inoculación de savia [Garrido-Ramírez *et al.*, 2000]. Muchos autores coinciden en que la infección de BGYMV en frijol depende del método de inoculación experimental utilizado, del genotipo y el estado de crecimiento de las plantas en el momento de la inoculación. Este aspecto es importante para evaluar el material del germoplasma con el método que mejor refleje la capacidad de un material para resistir la infección del virus en condiciones naturales [Garrido-Ramírez *et al.*, 2000].

En cuanto a los resultados por HAN, el tiempo requerido para la aparición de los síntomas fue diferente para cada línea o variedad, de forma tal que los genotipos que alcanzaron mayor cantidad de ADN viral y de valores altos de DO/mm<sup>2</sup>, en los primeros 7 dpi, desarrollaron más rápido los síntomas típicos de mosaico dorado y encrespamiento foliar, lo que está directamente relacionado con la severidad de los síntomas mostrado por cada genotipo evaluado (Tabla 4). Se puede obser-

var que a los 14 días, aunque existen diferencias significativas, el comportamiento entre las líneas y variedades fue muy homogéneo, y no se puede diferenciar entre variedades resistentes, intermedias y sensibles, por lo que estos resultados indican que el momento óptimo para realizar las evaluaciones es a los 7 dpi, lo que se corroboró al realizar el análisis estadístico y encontrar diferencias significativas entre los genotipos que se comportaron como resistentes e intermedios con grado 4 y 5 de severidad, y los que se comportaron como intermedios con grado 6 y sensible con grado 8 (Fig. 2).

Al analizar la relación existente entre la DO/mm<sup>2</sup> y la concentración viral por cada genotipo en estudio a los 7 dpi, se obtuvo una diferenciación en dos grupos. En los primeros, se encontraban los genotipos resistentes y los intermedios con grado 4 y 5 que representaron el 76,7% de los materiales evaluados, y la concentración viral varió entre 0-300 pg (Tabla 4). Otro aspecto interesante es el hecho de que estos genotipos intermedios poseen grado 4 o 5 de severidad, con los más bajos valores de incidencia dentro del grupo de los intermedios (Tabla 4).

Un segundo grupo en el que se incluyen los genotipos con comportamiento sensibles e intermedios con grado 6, que representan el 23,3%, y la concentración viral oscila entre 1.3-140 ng; sin embargo, las líneas intermedias FM 15, FM 17, FM 21, FM 25, FM 29, FM 20 poseen un comportamiento similar a la variedad sensible Velasco Largo, y con excepción de FM 29, los demás casos poseen grado de severidad 6 y porcentajes de plantas infectadas entre 37,5 y 62,5% (Tabla 4).

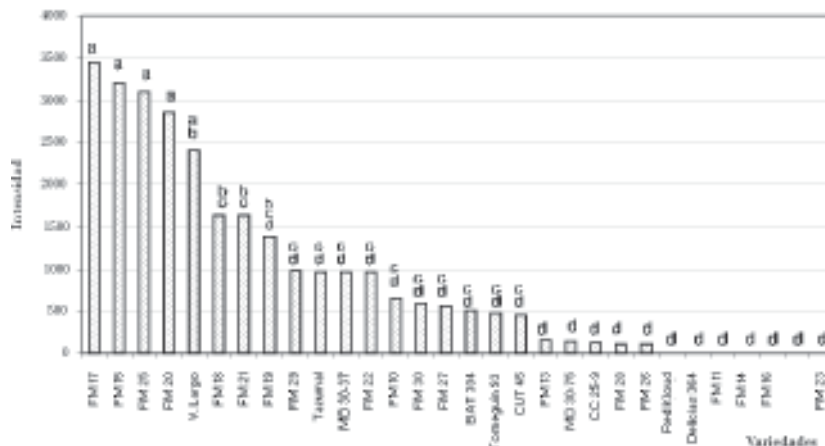


Figura 2. Diferencias significativas entre la intensidad (DOxmm<sup>2</sup>) de los genotipos evaluados a los siete días después de inoculados.

En la evaluación realizada a los 14 dpi se encontró una tendencia de los genotipos con mejor comportamiento al aumento de la concentración viral, de forma tal que en los materiales sensibles e intermedios la mayor concentración viral se encuentra en el entorno de los 7 dpi. En los materiales resistentes este valor tiende a desplazarse en el entorno de los 14 dpi. Esto pudiera explicarse por el mecanismo de resistencia de varias especies de plantas que se basan en limitar la replicación viral y su expansión por toda la planta, lo que favorece su recuperación ante los patógenos y reducen los daños que estos pueden ocasionar en infecciones tempranas [Morales, 2000]. Este tipo de resistencia pudiera estar asociado a caracteres cuantitativos que al parecer reducen la iniciación y el grado de síntomas foliares en este material resistente [Miklas y Santiago, 1996; Morales, 2000].

Resultados de otros autores señalan que el amplio rango de respuesta a la infección por BGYMV—obtenido a partir de cruces con distintas fuentes de genes de resistencia— sugiere que la resistencia al BGYMV es controlada por múltiples genes que pudieran ser cuantitativos [Morales y Singh, 1993].

Los procedimientos moleculares generalmente se usan para la cuantificación específica de fitopatógenos. El uso de sondas de ácidos nucleicos para estimar cantidad de virus en el tejido de las plantas ha sido una herramienta útil para la selección de genotipos resistentes [Gilbertson *et al.*, 1991; Lorens *et al.*, 1989; Raffo *et al.*, 1989]. La práctica de la inoculación por savia es sencilla y posibilita la infección de gran cantidad de plantas por evaluar en condiciones controladas y similares a las del cultivo. Este método, aparejado a la hibridación de ácidos nucleicos no radiactivo, conforma un aporte significativo a la metodología para la evaluación del material del germoplasma de frijol con resistencia al BGYMV en las condiciones del país; constituye un resultado científico-técnico novedoso, no antes introducido en Cuba, y que permite la evaluación de un número de materiales considerables, la eliminación de las poblaciones segregantes y el ahorro de tiempo en la obtención de genotipos resistentes al virus.

## CONCLUSIONES

- La técnica HAN no radiactiva para el diagnóstico de BGYMV-CU mostró una eficacia de 100%, al igual que una sensibilidad y especificidad diagnósticas, por lo que es útil y confiable para la evaluación de materiales de frijol provenientes de programas de mejoramiento.

- La aplicación del diagnóstico por HAN no radiactivo facilitó la detección de 16 genotipos resistentes, 13 con comportamiento intermedio y uno sensible.

## REFERENCIAS

- Aragão, F. J. L.; S. G. Ribeiro; L. M. G. Barros; A. C. M. Brasileiro; D. P. Maxwell; E. L. Rech; J. C. Faria: «Transgenic Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Engineered to Express Viral Antisense RNAs Show Delayed and Attenuated Symptoms to Bean Golden Mosaic Geminivirus», *Molecular Breeding* 4:491-499, 1998.
- Balthazar, S.: «Les viroses du haricot común en Haïti», DARNDR-SENASA, Tech. Rapp 5 Damien, Haïti, 1978.
- Beebe, S.; C. Cardona; O. Díaz; F. Rodríguez; E. Mancía; S. Ajquejay: «Development of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Lines Resistant to the Pod Weevil *Apion godmani* Wagner, in Central America», *Euphytica* 69:83-88, 1993.
- Beebe, S. E.; I. Ochoa; P. Skroch; J. Nienhuis; J. Tivang: «Genetic Diversity Among Common Bean Breeding Lines Developed for Central America», *Crop Sci.* 35:1178-1183, 1995.
- Bird, J.; J. E. Pérez; R. Alconero; N. G. Vakili; P. L. Meléndez: «A Whitefly-Transmitted Golden-Yellow Mosaic of *Phaseolus lunatus* in Puerto Rico», *J. Agric. Univ., P.R.* 56: 64-74, 1972.
- Blanco, N.; I. Bencomo: «Afluencia de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) vector del virus del mosaico dorado en plantaciones de frijol», *Ciencias de la Agricultura* 2:39-46, 1978.
- : «Presencia del virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) en Cuba», *Ciencias de la Agricultura* 9:118, 1981.
- Blanco, N.; N. Lastres; I. Bencomo: «Incidencia de enfermedades virosas del frijol en Cuba», *Ciencias de la Agricultura* 19: 21-22, 1984.
- Blanco, N.; B. Faure: «Situación actual del mosaico dorado del frijol en el Caribe: Cuba» *El mosaico dorado del frijol, avances de investigación*, Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Cali, Colombia, 1994, pp. 82-89.
- Brown, J. K.; K. M. Ostrow; A. M. Idris; D. C. Stenger: «Biotic, Molecular and Phylogenetic Characterization of Bean Calico Mosaic Virus, a Distinct Begomovirus Species with Affiliation in the Squash Leaf Curl Virus Cluster», *Phytopathology*. 89(4):273-280, 1999.
- Cancino, M.; A. M. Abouzid; F. J. Morales; D. E. Purcifull; J. E. Polston; E. Hiebert: «Generation and Characterization of Three Monoclonal Antibodies Useful in Detecting and Distinguishing Bean Golden Mosaic Virus Isolate», *Phytopathology* 85:484-490, 1995.
- IAT: *Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol*, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 1987.
- Costa, A. S.: «Three Whitefly-Transmitted Virus Diseases of Beans in São Paulo, Brazil», *FAO Plant Protection Bull.* 13(6):1-12, 1965.
- Dardon, D. E.: «La mosca blanca en Guatemala», *Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe*, CATIE. Turrialba, Costa Rica, 1993, pp. 38-41.
- Gámez, R.: «Los virus del frijol en Centroamérica. Transmisión por mosca blanca (*Bemisia tabaci* L.) y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado», *Turrialba* 21:22-27, 1970.
- Garrido-Ramírez, E. R.; M. R. Sudarshana; R. L. Gilbertson: «Bean Golden Yellow Mosaic Virus from Chiapas, Mexico: Characterization, Pseudorecombination with Other Bean-infecting Geminiviruses and Germ Plasm Screening», *Phytopathology* 90.11:1224-1232, 2000.
- Gilbertson, R. L.; S. H. Hidayat; R. T. Martínez; S. A. Leong; J. C. Fione; F. Morales; D. P. Maxwell: «Differentiation of Bean Infecting

### Desarrollo de genotipos del frijol común...

- Geminivirus by Nucleic Acid Polimerasa on Probes and Aspects of Bean Golden Mosaic in Brazil», *Plant Disease* 75:336-342, 1991.
- González, L.; M. Soto; M. I. Ortiz; E. L. Peralta: «Determinación de parámetros analíticos de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos para la defección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV)», *Fitopatología* 36(1):24-33, 2001.
- López-Salinas, E.; E. N. Becerra: *El mosaico dorado del frijol: México Sur*. Bean Golden Mosaic: 1994 Research Advances, CIAT, Palmira, Colombia, 1994, pp. 28-33.
- Lorens, G. F.; B. W. Falk; C. O. Qualset: «Inheritance of Resistance to Barley Dwarf Virus Detected by Northern Blot Analysis», *Crop Sci.* 29:1076-1081, 1989.
- Mathews, R. E. F.: *Plant Virology*, Ed. Academic Press, 1991, pp. 54-67.
- Mirklas, P.; J. Santiago: «Reaction of Selected Therapy Bean to Bean Golden Mosaic Virus», *Hort. Science* 31:430-432, 1996.
- Morales, F. J., A.; I. Niessen; B. Ramírez; M. Castaño: «Isolation and Partial Characterization of a Geminivirus Causing Bean Dwarf Mosaic», *Phytopathology* 80: 96-101, 1990.
- Morales, F. J.; S. P. Singh: «Breeding for Resistance to Bean Golden Mosaic Virus in an Interracial Populations of *Phaseolus vulgaris* L.», *Euphytica* 67:59-63, 1993.
- Morales, F. J.: *El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en América Latina*, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia, 2000.
- ONE (Oficina Nacional de Estadística): Cap. X «Agropecuaria», <http://www.one.cu> (revisado en junio del 2007).
- Peralta, E. L.; A. Villoch: «Validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados en el diagnóstico de fitopatógenos», *Fitopatología* 34(4), 1999.
- Quiñones, M. L.: «Distribución, variabilidad genética y perfeccionamiento del sistema de diagnóstico molecular del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba», Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, 2002.
- Raffo, A. J.; I. A. Khan; L. F. Lippert; M. O. Hall; G. E. Jones: «A Screening Procedure for ZYMV Resistance in Muskmelons Cucumber», *Genetic Coop.* 12:46-49, 1989.
- Rodríguez, R.; P. L. Ramos; V. Dorestes; K. Velásquez; R. Peral; A. Fuentes; M. Pujol: «Establishment of a Non-Radioactive Nucleic Acid Hybridization Technique for Begomovirus Detection», *Biotecnología Aplicada* : 20:164-169, 2003.
- Rojas, M. R.; R. L. Gilbertson; D. R. Russell; D. P. Maxwell: «Use of Degenerate Primers in the Polimerasa Chain Reaction to Detect Whitefly Transmitted Geminiviruses», *Plant Disease* 77:340-347, 1993.
- Rom, M.; Y. Antignus; D. Gidoni; M. Pilowsky; S. Cohen: «Accumulation of Tomato Yellow Leaf Curl Virus DNA in Tolerant and Susceptible Tomato Lines», *Plant Disease* 77:253-257, 1993.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.
- Schieber, E.: «Enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en la República Dominicana», *Turrialba* 20:20-23, 1969.
- Vázquez, L.: «Caracterización del polimorfismo de la mosca blanca *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera:Aleyrodidae)», *Fitosanidad* 3 (2):21-23, 1999.