



INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIAS PROFESIONALES

**IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALELOS RESISTENTES AL BCMV Y  
BCMN EN EL GEN I Y/O EL GEN BC-3 EN UNA COLECCIÓN DE  
GERMOPLASMA DE POROTOS (*PHASEOLUS VULGARIS L.*) CHILENOS**

QUE PRESENTA

**RUIZ PÁEZ JOSÉ ARMANDO**

No. DE CONTROL

**15940014**

EMPRESA

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIA) QUILAMAPU**

ASESOR INTERNO

**MIGUEL HERNÁNDEZ FLORES**

ASESOR EXTERNO

**GERARDO MARCELO TAPIA SAN MARTÍN**

### **Agradecimientos:**

Agradezco al Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Al Ing. Miguel Hernández, coordinador de la carrera, y al Ing. Alejandro Larios por el apoyo que me brindaron he hizo posible mi viaje de prácticas, al igual que al MC. Alejandro Frías jefe del departamento de gestión tecnológica y vinculación del ITTJ.

Agradezco al Ing. Alejandro Navarro y a su esposa la Lic. Paola Pérez, por su apoyo incondicional en todos los aspectos, por que sin ellos no hubiera sido posible este viaje; por creer en mí y por darme la oportunidad de poder alcanzar mis metas académicamente.

Agradezco a mi mamá y a mi papá; a mi familia, mi hermano, mis abuelos, mis tíos y mis primos por su apoyo, por estar al pendiente mío, por sus mensajes y buenos deseos. Gracias.

Agradezco al INIA. Al Dr. Gerardo Tapia por recibirme y darme la oportunidad de poder trabajar y aprender. Un agradecimiento especial al Dr. Javier Barros por sus enseñanzas, sus consejos, por permitirme aprender de él y ayudarme a formarme como investigador. A mis compañeros de laboratorio Pablo, Cristian, Nataly y la Sra. Filomena, por que todos formaron parte de este proyecto y por compartir este tiempo conmigo, gracias.

Hago una dedicatoria especial para mi abuelo, el Arquitecto Horacio Páez Chanes, mi toto; porque no alcanzaría en una sola hoja el poder expresar todo mi amor y agradecimiento por todas sus enseñanzas y sabiduría que compartió conmigo. Descansa en paz.

## Resumen

La siembra de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) se ha visto reducida debido a las pérdidas económicas producidas por el virus del mosaico común del frijol, este *potyvirus* es el causante de severas mermas en la producción del poroto y puede infestar a una amplia gama de especies de leguminosa. Esto implica un problema en los países en vías de desarrollo, donde la producción de poroto representa un importante ingreso económico y se sitúa como un alimento en la dieta básica, debido a los valores nutricionales que aporta a los consumidores. Se ha detectado resistencia al virus del mosaico común en variedades de poroto con el gen dominante *I* presente, sin embargo, el gen *I* confiere una resistencia incompleta, siendo susceptible a las cepas necróticas del virus. Esta resistencia incompleta se resuelve con la combinación de genes recesivos *bc*, como el *bc-3*, que confiere resistencia al virus del mosaico común necrótico del frijol. Este estudio identificó en 45 accesiones de poroto chileno, 12 accesiones que presentaban el gen *I* en su combinación alélica resistente y ninguna accesión con la combinación alélica resistente del gen *bc-3*.

## Abstract

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production is one of the biggest crops world consumed because it's nutrition benefits and also represent a significant economical contribution to the developed countries. This crop has been in decease because a world-wide dissipated bean virus. The BCMV is high spread around the world and causes great damage in bean crops. Recent studies shows than the dominant gene *I* confers incomplete resistance to BCMV, while a combination with recessive gene *bc-3* and dominant *I* can give a complete resistance to BCMV and it's necrotic form. In this study we search for the combination of alleles than confers resistance to BCMV and BCMV in the gens *I* and *bc-3* in a germplasm colección of Chilean beans.

## Índice

- I. Introducción.
- II. Descripción del problema.
- III. Objetivos.
  - I. Objetivo general.
  - II. Objetivo específico.
- IV. Justificación.
- V. Marco teórico:
  - I. Phaseolus Vulgaris.
  - II. Virus del mosaico común del frijol (BCMV)
  - III. Gen I y bc-3
- VI. Materiales y métodos:
  - I. Ubicación del área de trabajo.
  - II. Material vegetal.
  - III. Desinfección y germinación del material vegetal .
  - IV. Extracción de ADN.
  - V. Cuantificación de ADN.
  - VI. Gel de calidad.
  - VII. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
  - VIII. Electroforesis de producto de PCR

- IX. Restricción longitudinal del fragmento polimorfo.
- X. Electroforesis producto digestión.
  
- VII. Resultados:
  - I. Detección de marcadores moleculares.
  - II. Detección de combinaciones alélicas resistentes.
  
- VIII. Conclusiones.
  
- IX. Competencias.
  
- X. Anexos.
  
- XI. Bibliografía.

## Introducción

El poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) fue domesticado hace aproximadamente 8000 años en el centro de México y América del Sur (Shii *et al.*, 1980; Koinange *et al.*, 1992). Dos eventos independientes de domesticación dieron lugar a poblaciones que difieren en morfología, características agronómicas y composiciones de proteínas de semilla, estas son: el genotipo mesoamericano y un grupo de genes andinos (Singh *et al.*, 1991). Para cada una se definen tres razas, en el caso del genotipo Mesoamericano corresponden las razas Durango, Jalisco y Mesoamérica, para los Andes sudamericanos corresponden las razas Chile, Nueva Granada y Perú. Esto significa que Chile es considerado un subcentro de diversidad genética de *P. vulgaris* L., cuyos ecotipos poseen ciertas características que no se encuentran presentes en otras razas (Voyses, 2000; Bascur y Tay, 2005).

La siembra de poroto común es una de las principales actividades de la economía campesina en varias regiones de Sudamérica, siendo de mucha importancia como generador de ingresos y empleo rural y como producto básico en la dieta alimenticia de la población (FAO 2007). El poroto es una especie que se encuentra adaptada desde el extremo norte de Chile, Arica (18°28' lat. Sur) hasta la provincia de Chiloé por el sur (42°29' lat. Sur). El área cultivada para producción comercial se encuentra en la zona central. Las variedades destinadas a producción comercial corresponden en su mayoría a genotipos mejorados, existiendo una gran diversidad de tipos, de los cuales algunos son utilizados sólo para el consumo en el país y otras clases comerciales destinadas al mercado externo. El poroto es consumido al estado fresco (vaina verde y granada) y en grano seco (Bascur y Tay, 1983; Bascur, 2001). En la actualidad muchos pequeños agricultores en los secanos interiores y costeros de la zona centro sur de Chile siembran leguminosas para autoconsumo y mercados locales.

De los patógenos del poroto, los virus son los causantes de pérdidas significativas en el rendimiento del cultivo y la producción en todo el mundo (Anderson et al., 2004). A menudo se transmiten por un organismo vectorial (insectos, artrópodos, hongos, nematodos), a través de heridas producidas durante las prácticas agrícolas o a través del polen o las semillas (Mink, 1993). Estas variadas vías de transmisión hacen que el control y el manejo del virus sea un proceso complejo y limitan la erradicación de la enfermedad viral. Uno de los virus más importantes causantes de mermas graves en la producción del poroto es el virus del mosaico común del poroto (BCMV por sus siglas en inglés), perteneciente a la familia *Potyviridae* (Morales, 2006; Worrall et al., 2015). La alta incidencia de infección del embrión por BCMV y el virus del mosaico común necrótico del frijol (BCMNV por sus siglas en inglés), con porcentajes que pueden llegar hasta 80%, hace que la semilla sea el principal medio de diseminación (Morales y Castaño, 1987). Posteriormente, la transmisión secundaria es mediada por varias especies de áfidos, que transmiten al virus de manera no persistente dentro y fuera del cultivo, perpetuando al agente etiológico y dando lugar a un nuevo ciclo de la enfermedad (Morales y Castaño, 2008). El BCMV y el BCMNV producen las enfermedades conocidas como mosaico común y raíz negra del frijol. En variedades susceptibles, el BCMV puede ocasionar pérdidas en el rendimiento entre 53% y 83% (Sastry, 2013). Aunque la incorporación de resistencia dominante monogénica conferida por el gen *I* previene la infección sistémica crónica o mosaico común ocasionado por algunas cepas de BCMV, cuando estas variedades se infectan con BCMNV o alguna cepa inductora de necrosis de BCMV, se desarrolla una respuesta hipersensible conocida como necrosis apical o raíz negra (Drijfhout, 1978).

La mejor estrategia para controlar al mosaico común y la raíz negra es el uso de variedades de poroto genéticamente resistentes que combine la resistencia dominante conferida por el gen *I* con los genes recesivos *bc*, en especial el gen *bc-3*, con el fin de eliminar la posibilidad de infección por cepas del BCMV o BCMNV (Morales y Castaño, 2008). Según Bourguet (2016), la resistencia

genética aparece como la estrategia de control más confiable y económica para manejar las enfermedades virales, especialmente en el contexto ecológico actual de preservación de la biodiversidad y el medio ambiente, en el que el uso de productos fitosanitarios es limitado. Tomando a consideración lo mencionado anteriormente, esta investigación tuvo el objetivo de identificar molecularmente la presencia de alelos con resistencia viral en los genes *I* y/o *bc-3* usando los marcadores tipo SCAR (Secuencia Caracterizada de una Región Amplificada por sus siglas en inglés) y CAPS (Secuencia Polimórfica Amplificada y Cortada por sus siglas en inglés) BCMV\_48289723 y ENM en una colección de germoplasma de poroto Chileno.



## Descripción del problema

Hace unos cinco siglos el poroto se exportó desde América a otros continentes y se convirtió en una planta económica y geográficamente importante, especialmente en los países en desarrollo donde representa una fuente importante de proteínas dietéticas (Santalla *et al.*, 2002; Castro- Guerrero *et al.*, 2016). El poroto es una leguminosa de grano particularmente interesante para la salud humana y la producción sostenible de alimentos debido a su capacidad para la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico (Foyer *et al.*, 2016).

De los patógenos que se encuentran presentes en el poroto, los virus son los de mayor dificultad para erradicar, debido a que los virus dependen de las células, no hay productos químicos antivirales disponibles para atacar solo al virus sin afectar a la planta hospedadora infectada. En consecuencia la lucha contra el virus depende principalmente del uso de semillas certificadas, el control químico de los vectores y el uso de variedades de semillas resistentes, sin embargo los dos primeros controles representan un alto costo para el productor, además certificar plantas sanas y el descontaminar herramientas hortícolas no proporcionan una garantía durante todo el ciclo del cultivo, mientras que el control químico del vector es preventivo y debe hacerse antes de la aparición del virus y su transmisión (Hadidi *et al.*, 1998).

El BCMV, es un virus pertenece al género *Potyvirus* que se distribuye por todo el mundo en áreas de cultivo de leguminosas (Drijfhout, 1978; Makkouk *et al.*, 2012) infectando una amplia gama de especies (Bos, 1971). El BCMNV es el virus más común y destructivo que infecta al poroto común y se encuentra distribuido a escala mundial. Las pérdidas de rendimiento debidas a BCMV están entre 6 y 98% dependiendo del cultivo y el tiempo de infección (Worral *et al.*, 2015; Hagedorn, 1986). En Chile se conocen 3 razas tipo NY15 y necrótica (Sepúlveda, 2000).

En *Phaseolus spp.* el BCMV produce síntomas distintos. En genotipos susceptibles a temperaturas de crecimiento típicas (26-28°C) puede aparecer un

mosaico severo, rizado de las hojas, bandas de venas y vainas moteadas y malformadas (Bos, 1971). A temperaturas elevadas (por encima de 30°C), estas plantas muestran retraso en el crecimiento y síntomas de "raíz negra" o necrosis sistémica cuando se infectan con el tipo de cepa US 1 (Bos, 1971). Las variedades tolerantes pueden infectarse sistemáticamente, pero muestran solo una leve deformación o estrechamiento de las hojas (Bos, 1971). Algunos genotipos muestran una resistencia extrema (ER) contra las cepas a temperaturas de crecimiento típicas no manifestando síntomas visibles (Bos, 1971; Fisher y Kyle, 1994), pero a temperaturas más altas (por encima de 30°C) aparece la necrosis vascular en propagación y a menudo la muerte típica de la "raíz negra" (Bos, 1971).

La resistencia a diferentes cepas de BCMV está controlada por el gen *I* dominante y/o con combinaciones de varios genes recesivos (*bc-u*, *bc-1*, *bc-12*, *bc-2*, *bc-22* y *bc-3*) (Kelly *et al.*, 1995; Strausbauhg *et al.*, 1999). Este proyecto se dedicó a identificar la presencia de las combinaciones alélicas homocigota resistente *I I* y *eIF4E<sup>2</sup>/eIF4E<sup>2</sup>* (eukaryotic initiation factor 4E) del gen *I* y *bc-3* resistentes al BCMV y al BCMNV respectivamente, usando los marcadores moleculares BCMV\_48289723\_CAPS y CAPS ENM en una colección de porotos chilenos, para generar un registro de porotos con resistencia y habilitar estrategias de mejora genética.

## Objetivos

Objetivo general:

- A) Identificar molecularmente la presencia de las combinaciones alélicas resistentes a las cepas del BCMV usando los marcadores moleculares tipo SCAR BCMV\_48289723\_CAPS y CAPS ENM asociados al gen *I* y *b-c3* respectivamente, en una colección de germoplasma de poroto chileno usando la técnica de PCR y RFLP.

Objetivo específico:

- A) Identificar la presencia de la combinación alélica homocigota resistente al BCMV (II) del gen *I*, usando el marcador molecular BCMV\_48289723\_CAPS y la enzima de restricción *TaqI* con las técnicas de PCR y RFLP, en una colección de germoplasma de poroto chileno.
- B) Identificar la presencia de la combinación alélica homocigota resistente al BCMNV (*eIF4E<sup>2</sup>/eIF4E<sup>2</sup>*) del gen *bc-3*, usando el marcador molecular CAPS ENM y la enzima de restricción *RsaI* con las técnicas de PCR y RFLP, en una colección de germoplasma de poroto chileno.

## Justificación

Hace tres décadas Chile era exportador de leguminosas con mercados de destino a prácticamente todo el mundo, incluso a mercados tan exigentes como el europeo, sin embargo el escenario cambió debido a la aparición de cultivos más rentables como hortalizas y frutillas, especialmente en el valle central, disminuyendo así su superficie de siembra (ODEPA, 2012). Según la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA, 2017), se estima que en Chile la superficie sembrada de poroto en la temporada 1979/1980 fue de 110.700 hectáreas en cambio en la temporada 2017/2018 fue de 9.723 hectáreas. Esta situación fue debido a la disminución en el rendimiento causada por enfermedades víricas que provocaron grandes pérdidas económicas, en consecuencia esto generó la transición de los agricultores a otros cultivos más rentables.

El BCMV y BCMNV se encuentran entre las mayores amenazas para la producción de frijol debido a sus variadas vías de transmisión como son la mecánica, por áfidos y por semilla. Es un patógeno de importancia para los genotipos de *P. vulgaris* en todo el mundo, siendo la transmisión por semilla una fuente importante de infección inicial causando hasta el 80% de la infección en el cultivo (Boss, 1971). La enfermedad del mosaico común del frijol puede controlarse eficazmente mediante la plantación de semillas y/o la creación y el uso de variedades resistentes. La resistencia contra algunas cepas de BCMV es conferida por el locus *I* solo, mientras que la resistencia específica y no específica es conferida por un conjunto de genes *bc* recesivos (*bc-1*, *bc-12*, *bc-2*, *bc-22*, *bc-3*, *bc-u*) (Drijfhout, 1978). Si una variedad tiene el gen *I* dominante, es resistente a las cepas del BCMV, pero hipersensible a las cepas del BCMNV (Ali 1950; Drijfhout 1978; Kelly 1992).

En el poroto, la estrategia más efectiva para el control de los *Potyvirus* es combinar los genes *I* y *bc-3* (Mukeshimana et al., 2005). El gen *I* confiere resistencia a las cepas no necróticas del BCMV (Drijfhout, 1978), mientras que el gen *bc-3* condiciona la inmunidad a todas las cepas conocidas de BCMV y

BCMNV (Miklas et al. 1998). La combinación de genes dominantes y recesivos con diferentes mecanismos de resistencia ofrece una resistencia de amplio espectro a diferencia de cuando se usa un solo gen, además, debido a que algunos de estos genes residen en distintos grupos de ligamiento, su piramidación es una estrategia aplicable a los programas de mejoramiento genético de poroto (Kelly et al., 2003).

En los años 1990 y 1991 se efectuó en Chile una recolección de germoplasma de poroto, mediante un proyecto desarrollado entre el International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) con sede en Roma y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Chile (Proyecto IBPGR/INIA, N° 88/ 112), con el propósito de preservar la diversidad genética presente en el poroto común, especialmente en la raza Chile, para su posterior evaluación y uso en el mejoramiento de esta especie. El objetivo de esta investigación fue identificar de manera molecular la presencia de la combinación alélica resistente a las cepas del BCMV presentes en el gen *I* y el gen *bc-3* en la colección de germoplasma de porotos chilenos antes mencionada con el fin de generar estrategias de mejora para este cultivo.

## Marco teórico

### ***Phaseolus Vulgaris:***

El poroto es una especie dicotiledónea anual perteneciente a la familia de las fabáceas que presenta una gran variabilidad genética. Existen miles de variedades que producen semillas de los más diversos colores, formas y tamaños (Faiguenbaum, 2003). Las plantas poseen un tallo principal, que dependiendo de la variedad, puede presentar un hábito de crecimiento erecto, semipostrado o postrado. La pigmentación de los tallos presenta tonalidades derivadas fundamentalmente del verde, del rosado y del morado. Las plantas de poroto presentan hojas simples y compuestas. Las simples son opuestas, unifoliadas y acuminadas. Las hojas compuestas, en tanto, son trifoliadas y corresponden a las hojas características del poroto. La flor, que es una típica flor papilionácea, está compuesta por un pedicelo, por un cáliz gamosépalo y por una corola pentámera. La corola, a su vez, está formada por el estandarte o pétalo posterior, las alas y la quilla. Su fruto es una vaina (Faiguenbaum, 2003). Estudios realizados recientemente con el tipo de proteína de semilla de diversos orígenes y sus características morfológicas han demostrado que el poroto (*P. vulgaris L.*) es originario de América, siendo una especie sin un centro de origen específico y con dos grandes áreas de domesticación: Mesoamérica y Sudamérica. Para esta última se han determinado tres razas, una de las cuales se ha denominado “raza Chile”, que lo señala como un subcentro de diversidad genética para esta especie. La raza Chile ha sido descrita principalmente a través de su morfología. La planta tiene hojas pequeñas, hábito de crecimiento postrado, rosa claro a flores blancas, las vainas no son muy fibrosas, son de tamaño pequeño y son fenotípicamente similares a la raza cultivada Durango de la reserva genética mesoamericana (Paredes et al., 2009). La producción del poroto común en Chile se lleva a cabo sobre la base de selecciones locales y cultivares mejorados que se comercializan como líneas comerciales.

La composición promedio del grano seco de poroto es la siguiente: humedad 10%, proteína 22%, carbohidratos 58%, grasa 1,5%, fibra 4% y ceniza 3,5% (Kay, 1979). El frijol común es la principal leguminosa de grano para el consumo humano directo, y representa una fuente rica de proteínas, vitaminas, minerales y fibra, especialmente para las poblaciones más pobres de África y América Latina. Al igual que en Chile, en Centro y Sudamérica como en Asia y en muchas regiones de África, el poroto es principalmente consumido en forma de grano seco y en menor cantidad fresco (granado). En Estados Unidos y en países de Europa se consume además, de manera importante, como producto enlatado (Faiguenbaum, 2003).

#### **Virus del mosaico común del frijol (BCMV):**

El virus del mosaico común del frijol es un *Potyvirus* de 680-900 nm de largo y 11-15 nm de ancho flexible, no envuelto en forma de varilla y un tamaño de genoma de 10 Kb (Bos, 1971; Urcuqui-Inchima et al., 2001) rodeado de unas 2000 copias de unidades de proteína de recubrimiento (CP) que encapsulan el genoma de ARN (Urcuqui-Inchima et al., 2001). Los miembros del género *Potyvirus* son virus de ARN de sentido positivo de una hebra, con una proteína ligada al genoma 5 '(VPg) y una cola de poli adenosina 3' (Hull, 2002).

El BCMV es uno de los primeros agentes patógenos virales reportados en el mundo (CIAT,1980), causante de una de las enfermedades más serias que afectan la producción de poroto común (Johnson et al., 1997). Recibió prioridad en los programas de mejoramiento en los años 80, principalmente por las altas pérdidas económicas que ocasionó y por ser la enfermedad de más amplia distribución geográfica (CIAT, 1985). Los *Potyvirus* se encuentran a menudo en infecciones mixtas y se ha demostrado que su capacidad para suprimir las defensas del huésped (silenciamiento) permite que otros virus se repliquen y se muevan (Vance et al., 1995; Yang y Ravelonandro, 2002). En tales casos, los niveles de expresión de *potyviral* se han mantenido en niveles típicos, mientras que el virus complementario (a menudo un virus de potencia) puede replicarse a niveles muy

altos y la expresión de los síntomas es más grave que una sola infección (Yang y Ravelonandro, 2002).

Una vez que un *Potyvirus* ingresa a la célula huésped, primero se desenrolla y se traduce en su poliproteína por la maquinaria de traducción del huésped. Esta poliproteína se divide de forma cotranslacional por sus propias proteinasas codificadas en seis a ocho proteínas: proteinasa P1, proteinasa componente ayudante (HC-Pro), P3, helicasa (CI) de inclusión cilíndrica, proteína genómica viral (VPg), proteína A de inclusión nuclear (NIa), Inclusión nuclear B ARN dependiente de ARN polimerasa (NIb / RdRp) y proteína de recubrimiento (CP) (Hull, 2002). La proteinasa P1 y el HC-Pro son responsables de la escisión del tercio N-terminal de la poliproteína y la proteinasa NIa de los dos tercios C-terminales (Revers et al., 1999). La proteinasa HC-Pro se ha implicado en la supresión del silenciamiento del gen del huésped y se cree que permite la amplificación del genoma, juega un rol en la infección viral sinérgica (Revers et al., 1999; Urcuqui-Inchima et al., 2001). En varios casos de genes de resistencia recesiva se ha demostrado que el VPg desempeña un papel importante (Jenner et al., 2000; Keller et al., 1998; Masuta et al., 1999). Su función más general es actuar como un límite de 5' y dirigir el inicio de la traducción (Revers et al., 1999). Finalmente, la proteína NIb es la proteína replicasa para un *Potyvirus* y después de la traducción inicial y la escisión de la poliproteína, esta molécula inicia la síntesis de una copia del genoma de sentido negativo (Revers et al., 1999). A partir de este ARN antisentido se crean muchos más ARN con sentido genómico y se pueden ensamblar nuevos virus.

El BCMV y BCMNV son dos especies del género *Potyvirus* que producen las enfermedades conocidas como mosaico común y raíz negra. Existen varias cepas de BCMV con diferentes virulencias y se han categorizado en grupos de patogenicidad I (NL 1, US 1, PR 1), II (NL 7), III (NL 8), IVa (US 5), IVb (US 4; , US 3, NL 6), Va (US 2), Vb (NL 2), VIa (NL 3), VIb (NL 5) y VII (US 6, NL 4) en base a su virulencia en 11 variedades diferenciales establecidos por Drijfhout (Drijfhout,



1978). Estas cepas se dividen en dos serovares diferentes, el tipo A incluye NL 8, NL 3 y NL 5, mientras que el tipo B abarca el resto (Vetten et al., 1992). El serotipo A de BCMV ha sido renombrado como virus necrótico del mosaico común del frijol (BCMNV) en función de las diferencias serológicas y sintomáticas entre los dos grupos (McKern et al., 1992a; Vetten et al., 1992).

La alta incidencia de infección del embrión por estos *potyvirus*, hacen de la semilla el medio de diseminación más importante, ya que su transmisibilidad por semilla puede ser de hasta 80% dependiendo del genotipo de frijol, las condiciones ambientales y la cepa del virus (Morales y Castaño, 1987). Una vez transmitidos por la semilla, estos virus pueden transmitirse secundariamente por varias especies de áfidos como pulgones, aunque algunos son transportados por moscas blancas (Colinet et al., 1996; Hull, 2002), dentro y fuera del cultivo, perpetuando al agente etiológico y dando lugar a un nuevo ciclo de la enfermedad (Morales y Castaño, 2008), por lo que el mosaico común es la enfermedad viral más difundida a nivel mundial en este cultivo.

Los síntomas ocasionados por el BCMV corresponden a un patrón de mosaico verde claro a amarillo y verde oscuro que se desarrolla en las hojas trifoliadas. Normalmente, las venas son de color verde oscuro, mientras que las áreas intervenales se vuelven de color verde-amarillo claro. Por lo general estos síntomas van acompañados de una deformación de hojas debido a la producción de ampollas, curvatura y rotación hacia abajo de la lámina de la hoja. La intensidad y gravedad de los síntomas depende de la cepa del virus, de la variedad del poroto y del estado de desarrollo en que se encuentra la planta cuando se infecta. Las pérdidas ocasionadas por BCMV impactan severamente no sólo a escala comercial, sino también en la producción de pequeños agricultores (INIA, 2017).

### **Gen I y bc-3:**

La resistencia conferida por el gen *I* fue descubierta a principios de la década de 1930 por Ralph Corbett mientras trabajaba para Sioux City Seed Company en Sioux City, IA (Pierce, 1934). La función de este sistema de virus-frijol fue explorada por primera vez por Ali en la década de 1950 (Ali, 1950), quien determinó que dos factores estaban involucrados en la resistencia al BCMV: Un gen dominante *I* y un gen recesivo *bc* (Ali, 1950).

El gen *I* se localiza en el brazo distal del cromosoma Pv02, confiere resistencia a nueve *Potyvirus* cuyas respuestas fenotípicas caen en necrosis independiente de la temperatura, necrosis dependiente de la temperatura y clases no necróticas. Es una proteína que contiene siete genes putativos de resistencia viral de tipo NBS-LRR (sitio de unión de nucleótidos-repetición rica en leucina por sus siglas en inglés) con función receptora potencial, la cual reconoce algún factor viral en variedades resistentes y no en variedades susceptibles (Astua-Monge et al., 2000; Martin et al., 2003).

El locus *I* se ha incorporado a las variedades de frijol en todo el mundo, lo que confiere resistencia al BCMV y evita la transmisión de semillas. Cuando los genotipos que tienen el gen *I* (sin ningún gen de resistencia adicional) son inoculados con BCMV el resultado se denomina resistencia extrema (ER). No se presentan síntomas notables a 25°C y ningún virus se recupera de las hojas inoculadas (Bos, 1971; Fisher y Kyle, 1994). Sin embargo, a temperaturas superiores a los 30°C la resistencia falla y genera una necrosis venial sistémica. Collmer y sus colegas (Collmer et al., 2000) han demostrado que el locus de resistencia de amplio espectro *I* confiere una resistencia dominante incompleta contra el BCMV a nivel de toda la planta. El gen inhibidor *I* dominante (Ali, 1950) condiciona una respuesta de resistencia hipersensible, mientras que los genes recesivos se expresan de manera constitutiva y actúan restringiendo la replicación o el movimiento del virus dentro de la planta (Kelly, 1997; Kelly et al., 1995, 2003).

La respuesta hipersensible se disminuye o elimina al piramidarse con los genes recesivos, principalmente con *bc-3*.

Drijfhout et al. (1978a, 1978b) dedujeron la existencia de seis genes recesivos *bc* localizados en cuatro loci, de los cuales *bc-1*, *bc-1<sup>2</sup>*, *bc-2*, *bc-2<sup>2</sup>*, y *bc-3* son genes específicos de resistencia a algún patogruppo. El gen *bc-u* parece ser necesario para la expresión de los otros genes *bc*, a menos que el gen *I* esté presente (Drijfhout, 1978a). El gen *bc-3* es epistático al gen *I* mientras que todos los otros genes recesivos son hipostáticos al gen *I* en su modo de acción. Los genes *bc* muestran distintas respuestas en función del patogruppo del virus y la combinación entre ellos y el gen *I*. En presencia del gen *I* los genes *bc-1*, *bc-1<sup>2</sup>* y *bc-3* confieren resistencia aún en ausencia de *bc-u* (Silbernagel, 1995, Miklas et al., 2000a). Por su parte, *bc-1<sup>2</sup>* es dominante a *bc-1* en conferir resistencia a la necrosis apical en presencia del gen *I* (Miklas et al., 2000a). Se han identificado al menos tres alelos, *bc-3<sup>1</sup>*, *bc-3<sup>2</sup>* y *bc-3<sup>3</sup>*, de los cuales solo el alelo *bc-3<sup>2</sup>*, en combinación con el gen *I*, confiere inmunidad a la cepa NL3 de BCMNV. No se ha identificado lesiones o respuesta en las hojas inoculadas con patogruppos de BCMV o BCMNV si los genes *bc-u* y *bc-3* están presentes, independientemente de la presencia o ausencia del gen *I* (Drijfhout et al. 1978a).

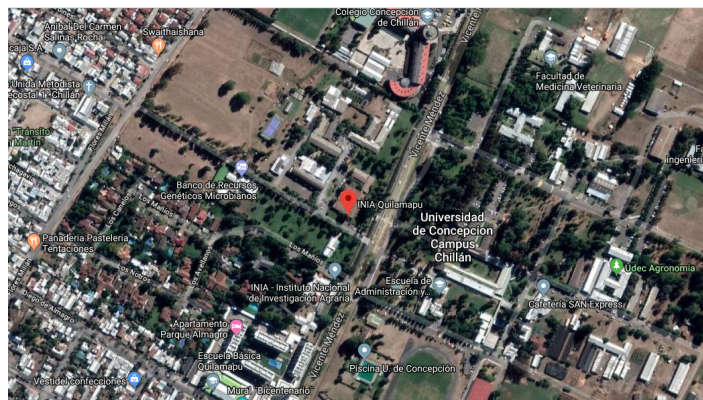
El gen *bc-3* se localiza en el cromosoma B6 (Mukeshimana et al., 2005). La resistencia de locus *bc-3* en poroto está ligada a una mutación en el factor de iniciación en la traducción de la proteína *eIF4E* en su variante alélica *eIF4E<sup>2</sup>/eIF4E<sup>2</sup>* homocigótica, la cual muestra la ausencia de síntomas comunes del BCMNV en las plantas (Naderpour et al. 2010). Naderpour et al. (2010) demostraron que la resistencia atribuida al gen *bc-3* se relaciona con mutaciones puntuales en cuatro nucleótidos posicionados en los sitios 159, 194, 227 y 332 de la secuencia del gen *eIF4E* de *P. vulgaris* (*PveIF4E*), y que la resistencia a BCMV requiere el estado homocigótico de estas mutaciones. El gen *bc-3* se identificó como un gen de factor de iniciación de la traducción *eIF4E* que mediaba

resistencia a través de la interrupción de la interacción entre esta proteína y la proteína VPg del virus.

## Materiales y métodos

### Ubicación del área de trabajo:

El trabajo se realizó en el laboratorio de Recursos Genéticos del instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Quilamapu, Chillán, Región del Bío Bío, Chile (ilustración 1).



*Ilustración 1: Ubicación satelital del INIA Quilamapu*

### Material vegetal:

Se utilizaron 45 accesiones de *Phaseolus vulgaris* que forman parte del banco de semillas del laboratorio de recursos genéticos del INIA Quilamapu (Tabla 1).

**Tabla 1: Accesiones analizadas.**

Código Banco	Variedad
QUI 8	Avalato
QUI 24	Coscorrón Méndez 1
QUI 48	Tortóla corriente
QUI 50	Manteca
QUI 115	-
QUI 118	Blanco

QUI 136	-
QUI 171	Pinto
QUI 172	Negro argel
QUI 175 A	Tórtola corriente
QUI 175 B	Tórtola corriente
QUI 214	Payar morado
QUI 282	Varillas
QUI 403	Manteca
QUI 420	Blanco tipo payar
QUI 421	Bayote
QUI 10217	Enriqueta
QUI 10228	Plomo 100 días
QUI 10241	Frutilla
QUI 10263	Hallado
QUI 10269	Sapito
QUI 10272	Sapo
QUI 10273	Sapito
QUI 10274	Sapito
QUI 10478	Pallar Licanten
QUI 10479	Manteca
QUI 10480	Blanco Español
QUI 10481	Curi
QUI 10481 S.I.	Curi S.I.
QUI 10482	Araucano
QUI 10483	Torcaza
QUI 10484	Coyunda
QUI 10485	Quilapallar
QUI 10486	Lpci 106
QUI 10487	Zorzal
QUI 10488	Cachiporra

QUI 10489	Colihuadp
QUI 10490	Rubí
QUI 10491	Magnum
QUI 10492	Timoteo
QUI 10493	Azufrado
QUI 10494	Cabruto
QUI 10495	Mantequilla
QUI 10496	Juanita
QUI 10497	Arroz

### **Desinfección y germinación del material vegetal:**

Previo a la germinación las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 20% por 10 minutos. Después, las semillas se colocaron sobre contenedores de plástico cubiertos de papel absorbente. Se hidrataron con 50 mL de agua destilada y se dispusieron en una cámara de germinación iluminada artificialmente a una temperatura de 20 – 25°C. Al tener las plantas 2 hojas verdaderas se trasladaron a contenedores plásticos individuales fuera de la cámara de germinación.

### **Extracción de ADN:**

Se siguió el protocolo de Coelho *et. al.* (2009) modificado para la extracción de ADN. Se recolectaron de 1 a 2 hojas (0.4–0.5 gr) de la planta de poroto y se trituraron en mortero con nitrógeno líquido hasta quedar en un polvo fino, después se transfirieron a un tubo de colecta *Eppendorff* de 1.5 ml. Se añadió 800 µL de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) buffer al 2X (NaCl 1.4 M, Tris-Hcl 10 mM pH 8 y EDTA 20 mM) previamente calentado a 65°C al tubo de colecta y se incubó por 60 minutos a 65°C. Después, dentro de la campana de gases, se añadió 600 µL de cloroformo. El tubo se agitó en vortex y centrifugó a 10,000 revoluciones por

minuto (rpm) por 10 minutos. Este paso se repitió una segunda vez. Se recuperó el sobrenadante (600  $\mu$ L) a un tubo nuevo de colecta y se añadió 500  $\mu$ L de isopropanol frío (-20°C), se homogeneizó por inversión hasta aparición de hebras de ADN y se incubó a -20°C por 3 minutos. A continuación, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante sin perder el pellet, después se agregó 300  $\mu$ L de TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM) y 150  $\mu$ L de NaCl 5 M. Se agregó 900  $\mu$ L de etanol absoluto frío (-20°C), y se incubó a -20°C por 30 minutos. Después se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas, se descartó el sobrenadante sin perder el pellet y se agregó 500  $\mu$ L de etanol al 75% como un lavado final. Se centrifugo con las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante sin perder el pellet y se dejó secar boca abajo sobre papel absorbente durante toda la noche. Finalmente el pellet seco se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua de PCR y se almacenó a -20°C para uso posterior.

#### **Cuantificación de ADN:**

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Epoch® Take3 para todas las accesiones. Los datos recabados fueron concentración del ADN (ng/ $\mu$ L) y pureza (260/280). (Anexo, tabla 2)

#### **Gel de calidad:**

Se verificó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1X (Tris, acetato y EDTA) mediante la técnica de electroforesis, de escalera molecular se usó el reactivo Lambda DNA Hind III (New England Biolabs). Se dejó correr el gel a 90 voltios por 90 minutos y se visualizó en el transiluminador Vilber Lourmat TFX-20, por último los geles se fotodocumentados.

#### **Reacción en Cadena de Polimerasa PCR:**

La detección de los marcadores moleculares SCAR BCMV\_48289723\_CAPS y CAPS ENM, relacionados al gen *I* y *bc3*, respectivamente, se realizó utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), según la metodología propuesta por Bello *et. al.* 2014 y Pasev *et. al.* 2014. Para la detección de



marcador molecular BCMV\_48289723\_CAPS se utilizaron los partidores Frente (5' AGG AGG AAG AAC GGT GGT C 3') y Reversa (5' TTT GGT GGT AAT TTG AAA ATG G 3') descritos por Bello *et. al.* 2014. Por otro lado, para la detección del marcador molecular CAPS ENM se utilizaron los partidores ENM-F (5' ACC GAT GAG CAA AAC CCT 3') ENM-R (5' CAA CCA ACT GGT ATC GGA 3') descritos por Naderpour *et. al.* 2010. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el kit comercial *KAPA Taq PCR Kit* (KAPA BIOSYSTEMS), utilizando 0.1 µL de *KAPA Taq DNA Polymerase*, 1.5 µL de *KAPA Taq Buffer A 10X*, 0.3 µL de dNTPs (10 mM), 0.6 µL (8 mM) de los partidores F y R, o 0.3 µL (4 mM) de los partidores ENM-F y ENM-R, 2 µL de ADN para el marcador BCMV\_48289723 o 1 µL para el marcador ENM, por último se agregó agua libre de nucleasas para un volumen final de 15.1 µL. Esta reacción se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems® 2720 con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95° por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos para el BCMV\_48289723 o 40 segundos para el marcador ENM, una hibridación por 30 segundos a 58°C para el marcador BCMV\_48289723 o 55°C para el marcador ENM y una elongación 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 2 minutos.

#### **Electroforesis del producto de PCR:**

La visualización de los productos de PCR se realizó a través de la técnica de electroforesis con un gel de agarosa al 2% usando buffer TAE 1X y una escalera molecular de 100 pares de bases (pb). Se dejó correr a 60 volts por 90 minutos y se visualizó en el transiluminador Vilber Lourmat TFX-20, después se fotodocumentó.

#### **Restricción Longitudinal del fragmento Polimorfo RFLP:**

La detección de las accesiones con las combinaciones alélicas resistentes, en el gen *l* y/o *bc-3*, se determinó utilizando la técnica RFLP. En el marcador molecular BCMV\_48289723 se usó la enzima de restricción *TaqI*, que reconoce el sitio de restricción 5' TCGA y separa el alelo de resistencia en dos bandas a 201 y 110 pb

que indican la combinación alélica resistente al BCMV (II), por el contrario, la presencia de una banda a 311 pb representa los genotipos susceptibles (ii e li) que no fueron cortados por la enzima de restricción *TaqI* debido a alteraciones en el sitio de restricción. En el marcador ENM se usó la enzima de restricción *RsaI*® con sitio de reconocimiento 5' GTAC y 3' CATG que separa el alelo de resistencia en dos bandas a 381 y 160 pb que indican la combinación alélica resistente al BCMNV (*eIF4E<sup>2</sup>/eIF4E<sup>2</sup>*), de igual manera la presencia de una sola banda a 511 pb representa los genotipos susceptibles (*elf4E<sup>1</sup>/elf4E<sup>1</sup>* y *elf4E<sup>1</sup>/elf4E<sup>2</sup>*) que no fueron cortados por la enzima de restricción. Los componentes usados para la digestión fueron: 2 µL del buffer CutSmart®, 1µL de enzima (*TaqI* o *RsaI*), 5 µL del producto de PCR y agua libre de nucleasas para un volumen final de 20 µL. Esta reacción se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems® 2720 con las condiciones de 65°C por 15 minutos y 80°C por 20 minutos para la enzima *TaqI* y 37°C por 15 minutos para la enzima *RsaI*.

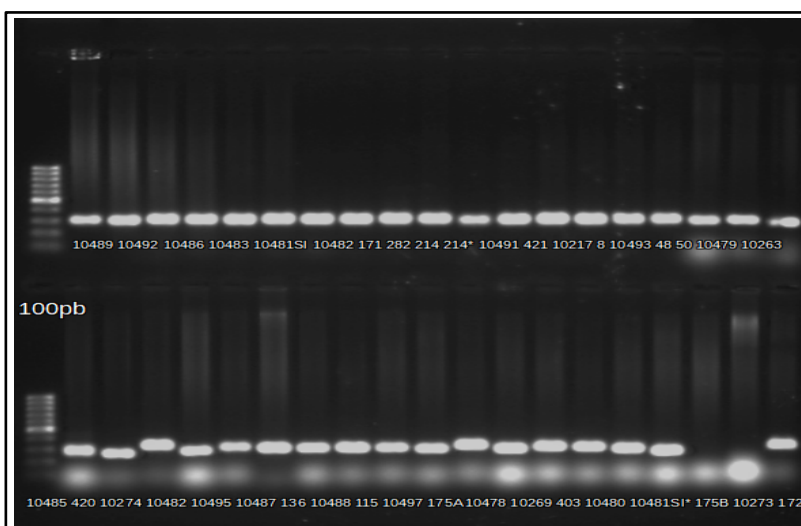
#### **Electroforesis del producto de digestión:**

La visualización del producto de las enzimas de restricción, se determinó por la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 2% usando buffer TAE 1X y una escalera molecular de 100 pb. El gel corrió a 60 voltios por 90 minutos y se visualizó en el transiluminador antes mencionado, por último se fotodocumentó.

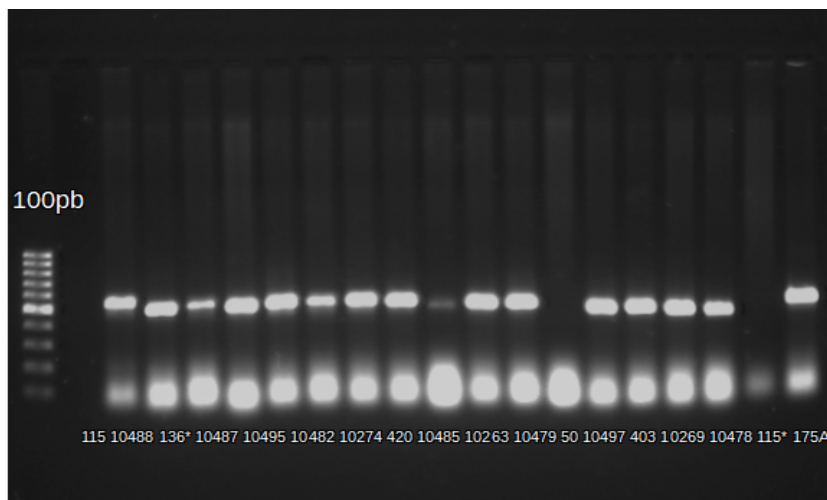
## Resultados

### Detección de marcadores moleculares

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que del total de 45 accesiones de poroto analizadas, todas mostraron un fragmento único a 311 pb correspondientes al marcador molecular BCMV\_48289723\_CAPS asociado al el gen dominante *I*, lo cual representa al genotipo resistente (*I/I* e *I/i*) (figura 1). Por otro lado, para el caso del marcador molecular CAPS ENM asociado al gen recesivo *bc-3*, todas las accesiones mostraron un fragmento único a 541 pb, correspondientes al genotipo homocigota recesivo (*bc-3/bc-3*) (figura 2).



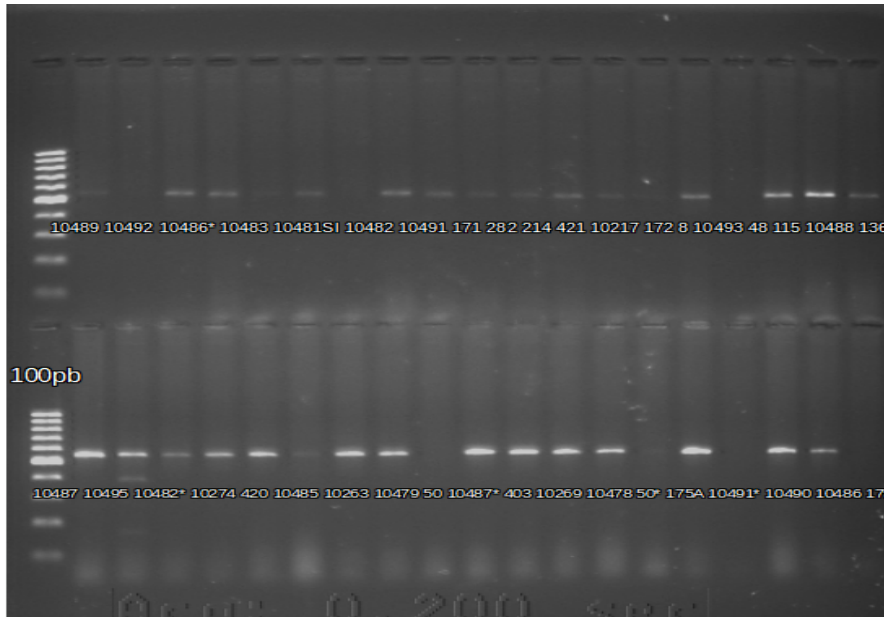
*Figura 1: Visualización de electroforesis del producto de PCR. Las bandas a 311 pb representan la amplificación del marcador molecular BCMV\_48289723\_CAPS.*



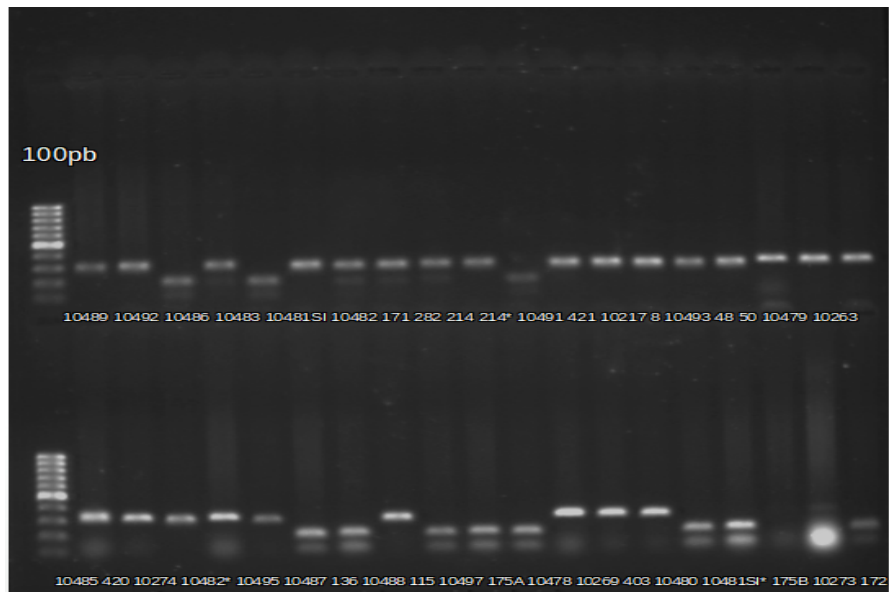
*Figura 2: Visualización de electroforesis producto de PCR. Las bandas a 541 pb representan la amplificación del marcador molecular CAPS ENM.*

### **Detección de combinaciones alélicas resistentes:**

De las 45 accesiones de poroto, 12 presentaron las combinación alélica homocigota resistente (II) del gen *I* que confiere resistencia al BCMV, generando dos bandas a 201 y 110 pb generadas por la enzima de restricción *TaqI*. Por su parte ninguna accesión presentó las bandas a 381 y 160 pb generadas por la enzima *RsaI* que indican la presencia de los alelos eIF4E del gen *bc-3* en su combinación homocigota recesiva (eIF4E<sup>2</sup>/eIF4E<sup>2</sup>) que confiere resistencia al BCMNV (figura 3 y 4 ).



*Figura 3: Visualización de electroforesis producto de digestión con la enzima de restricción RsaI. Las bandas a 541 pb representas las combinaciones homocigotas y heterocigotas susceptibles (eIF4E1/eIF4E1 y eIF4E1/eIF4E2). Ninguna accesión presento bandas a 381 y 160 pb que indican la combinación homocigota resistente (eIF4E2/eIF4E2)*



*Figura 4: Visualización de electroforesis producto de digestión con la enzima de restricción TaqI. La bandas a 201 y 110 pb representan la combinación alélica homocigota resistente II. Las bandas a 311 pb representan la combinación homocigota susceptible ii y heterocigota susceptible li*

## Conclusiones

De este trabajo se concluye que, como bien se mencionó, el gen dominante *I* está presente en la mayoría de las variedades de poroto analizadas en su combinación alélica resistente, sin embargo, la ausencia de bandas a 318 y 160 pb que se visualizaron en los productos de digestión con la enzima de restricción *RsaI*, indicaron que las accesiones analizadas portaban las combinaciones alélicas homocigota susceptibles ( $elf4E^1/elf4E^1$ ) y heterocigota susceptible ( $elf4E^1/elf4E^2$ ) de los alelos *elf4E* del gen *bc-3*, de manera que ninguna de las accesiones analizadas en el proyecto confiere la resistencia al BCMNV. Por lo tanto, las variedades de poroto presentes en el banco de germoplasma del INIA Quilamapu, presentan una resistencia incompleta contra el BCMV y sus cepas necróticas. Esto frena la posibilidad de crear nuevas variedades resistentes al BCMV y BCMNV mediante las variedades de poroto chilenas presentadas en este proyecto.

## Competencias

A través del proyecto elaborado durante la estancia en residencias profesionales, se lograron desarrollar competencias laborales tales como:

- 1) Desarrollo de habilidad deductiva para la interpretación de resultados.
- 2) Desarrollo de pensamiento científico para la resolución de problemas.
- 3) Resiliencia contra la frustración y las equivocaciones.
- 4) Adquisición de responsabilidad en el manejo de tiempos conforme a los periodos establecidos.
- 5) Interpretación y análisis de técnicas moleculares.
- 6) Habilidad para gestionar la información adquirida, resultado de los procesos llevados a cabo, en forma ordenada y cronológica para su uso posterior.
- 7) Desarrollo de conocimiento sobre el manejo de programas informáticos relacionados con las técnicas moleculares utilizadas.
- 8) Desarrollo de habilidad para trabajar sobre tiempos establecidos.
- 9) Adquisición de compromiso en la entrega de resultados mediante tablas e imágenes ilustrativas.
- 10) Adquisición del hábito de registrar diariamente actividades realizadas y resultados de forma ordenada y cronológica.

## Anexos

**Tabla 2: Cuantificación del ADN extraído de las accesiones de poroto.**

Código Banco	Concentración ng/μl	Pureza 260/280
QUI 8	176.89	1.96
QUI 24	2003.96	2.1
QUI 48	703.53	1.94
QUI 50	1139.62	2
QUI 115	1674.28	1.97
QUI 118	3439.13	1.7
QUI 136	1571.49	1.99
QUI 171	1003.9	2
QUI 172	845.28	1.92
QUI 175 A	807.8	1.98
QUI 175 B	3263.71	1.5
QUI 214	1342.3	2.1
QUI 282	1119.16	1.96
QUI 403	1412.48	2.1
QUI 420	628.07	2
QUI 421	738.74	1.98
QUI 10217	582.1	2
QUI 10228	8.44	1.6
QUI 10241	2164.29	2.1
QUI 10263	408.03	2
QUI 10269	1524.48	2.1
QUI 10272	2478.7	2.1
QUI 10273	3266.63	1.5
QUI 10274	2586.76	1.97
QUI 10478	2560.05	2.1
QUI 10479	2406.28	1.93



QUI 10480	3002.44	1.9
QUI 10481	3136.35	2
QUI 10481 S.I.	535.64	1.87
QUI 10482	1225.59	1.9
QUI 10483	1192.17	1.95
QUI 10484	1199.58	2.1
QUI 10485	2984.8	2
QUI 10486	1216.11	1.97
QUI 10487	3356.49	1
QUI 10488	1340.37	2
QUI 10489	579.77	1.89
QUI 10490	2528.48	2.1
QUI 10491	543.29	2
QUI 10492	2125.27	1.96
QUI 10493	139.85	1.97
QUI 10494	91.89	1.8
QUI 10495	753.47	1.95
QUI 10496	95.61	1.8
QUI 10497	408.84	2

## Bibliografía

- Ali M. 1950. *Genetics of resistance to the common bean mosaic virus (bean virus 1) in the bean (Phaseolus vulgaris L.)*. *Phytopathology*. 40: 69-79. [en línea]
- Anderson, P.K., A.A. Cunningham, N.G. Patel, F.J. Morales, P.R. Epstein y P. Daszak. 2004. *Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers*. *Trends Ecol. Evol.* 19 (10): 535-544.
- Bascur, G., J. Tay. 2005. *Collection, characterization and use of genetic variation in Chilean bean germplasm (Phaseolus vulgaris L.)*. *Agric. Téc.* 65(2):135-146.
- Bello et al.: *Application of in silico bulked segregant analysis for rapid development of markers linked to Bean common mosaic virus resistance in common bean*. *BMC Genomics* 2014 15:903.
- Bos, L. 1971. *Bean common mosaic virus*. *Descriptions of Plant Viruses* 73. [en línea]. Institute of Phytopathological Research <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=73>> .[Consulta: 03 abril 2019]
- Bourguet, D., T. Guillemaud. 2016. *The hidden and external costs of pesticide use*. pp: 35-120. In: E. Lichtfouse (ed.). *Sustainable Agriculture Reviews*. 19a. ed. Francia.
- Cadle-Davidson, M. M., & Jahn, M. M. (2005). *Resistance conferred against Bean common mosaic virus by the incompletely dominant I locus of Phaseolus vulgaris is active at the single cell level*. *Archives of virology*, 150(12), 2601-2608.
- Castro-Guerrero, N.A., M.C. Isidra-Arellano, D.G. Mendoza-Cozatl y O. Valdés-López. 2016. *Common Bean: A legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies*. *Front. Plant. Sci.* 7(600).

- Drijfhout E. 1978. *Genetic Interaction between Phaseolus vulgaris L. And Bean Common Mosaic Virus with Implications for Strain Identification and Breeding for Resistance.*
- Faiguenbaum, H. 2003. *Labranza, siembra y producción de los principales cultivos de Chile.* Vivaldi y Asociados. Santiago, Chile.
- Fisher M., M. Kyle. 1996. *Inheritance of resistance to potyviruses in Phaseolus vulgaris L. IV. Inheritance, linkage relations, and environmental effects on systemic resistance to four potyviruses.* Theor Appl Genet. 92 (2): 204–212.
- Foyer, C.H., H-M. Lam, H.T. Nguyen, K.H.M. Siddique, R.K. Varshney, T.D. Colmer, W. Cowling, H. Bramley, T.A. Mori, J.M. Hodgson, J.W. Cooper, A.J. Miller, K. Kunert, J. Vorster, C. Cullis, J.A. Ozga, M.L. Wahlqvist, Y. Liang, H. Shou, K. Shi, J. Yu, N. Fodor, B.N. Kaiser, F-L. Wong, B. Valliyodan y M.J. Conside. 2016. *Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production.* Nat. Plants. 2(16112).
- Hadidi, A., R.K. Khetarpal, H. Koganezawa. 1998. *Plant virus disease control.* 36(1):127-131.
- Hagedorn, D.J. y D.A. Inglis. 1986. *Handbook of bean diseases.* Wisconsin, E.E.U.U.
- Herrera G. 1983. *Enfermedades del poroto causadas por virus.* pp: 10-13. IPA La Platina N°19. Santiago, Chile.
- Holmes, M.O. 1954. *Inheritance of resistance to viral diseases in plants.* Adv. Virus Res. 2: 1-30.
- INIA. 2017. *Sanidad vegetal. Ficha técnica N° 23.* INIA La Platina. Santiago Chile.
- Kay, D. 1979. *Crop and product digest. Food legumes.* (3a. ed.) Tropical Products Institute. London, England.
- Kelly, J.D., L. Afanador, S.D. Haley. 1995. *Pyramiding genes for resistance to Bean Common Mosaic Virus.* Euphytica. 82:207–212.

- Koinange E.M.K y P. Gepts.1992. *Hybrid Weakness in Wild Phaseolus Vulgaris L. J. Hered.* 83(2):135-139.
- Makkouk, K., H. Pappu y S.G. Kumari. 2012. *Virus diseases of peas, beans, and faba bean in the mediterranean región. Adv. Virus Res.* 84: 367-402.
- Melotto, M., L. Afanador y J.D. Kelly. 1996. *Development of a SCAR marker linked to the I gene in common bean. Genome.* 39: 1216-1219.
- Meziadi, C., S. Blanchet, V. Geffroy, S. Pflieger. 2017. *Genetic resistance against viruses inPhaseolus vulgarisL.: State of the art and future prospects. Plant Sci.* 265: 39-50.
- Miklas, P., S. Lambert, G. Mink, M. Silbernagel. 1998. *Many beans with bc-3 resistance to BCMNV are susceptible to BCMV. Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 41:33-34.
- Mink, G.I. 1993. *Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. Annu. Rev. Phytopatol.* 31: 375-402.
- Morales, F.J. 2006. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses.*
- Mukeshimana G., A. Pañeda, C. Rodríguez-Suárez, J. Ferreira, R. Giraldez, J. Kelly. 2005. *Markers linked to the bc-3 gene conditioning resistance to bean common mosaic potyviruses in common bean. Euphytica.* 144: 291–299.
- Murray, M.G., y W.F. Thompson. 1980. *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res.* 8:19
- Naderpour, M., Lund, O. S., Larsen, R., & Johansen, E. (2010). *Potyviral resistance derived from cultivars of Phaseolus vulgaris carrying bc-3 is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele. Molecular plant pathology,* 11(2), 255-263.
- Nicaise, V. 2014. *Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. Front. Plant Sci.* 5(660).
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. 2017. *Estimación de superficie sembrada de cultivos anuales a nivel nacional [en línea]. ODEPA.*

<<http://www.odepa.cl/wp-content/uploads/2017/05/CultivosAnualesHistorico-03.04.2017.xls>>.

[Consulta: 03 Abril 2019].

- Pasev, G., D. Kostova, S. Sofkova. 2014. Identification of genes for resistance to Bean Common Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Breeding lines using conventional and molecular methods. *J. Phytopathol.* 162: 19–25.
- Ruiz, C., J. González, J. Tay. 2012. Estudio: “Propuesta de desarrollo del cultivo de leguminosas para la pequeña agricultura”. pp:6-8. Informe final. INIA. Chillán, Chile.
- Santalla, M., A. Rodiño y A. De Ron. 2002. Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean. *Theor. Appl. Genet.* 104(6-7): 934-944.
- Sepúlveda P. 2000. Transmisión de virus por semilla. *Tierra adentro.* (33): 18-21.
- Shii C.T., M.C. Mok, S.R. Temple y D.W.S. Mok. 1980. Expression of developmental abnormalities in hybrids of *Phaseolus vulgaris* L.: Interaction between temperature and allelic dosage. *J. Hered.*
- Singh, S.P., P. Gepts y D.G. Debouck. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 45(3): 379-396.
- Strausbaugh, C.A., J.R. Myers, R.L. Forster, P.E. McClean. 1999. Bc-1 and Bc-u- two loci controlling Bean common mosaic virus resistance in common bean are linked. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124:644-648.
- Tay, J. 1999. ¿Por qué preferir semillas certificadas en el uso de variedades mejoradas? pp: 17-19. Informativo Agropecuario Bioleche-INIA Quilamapu. Chillán, Chile.
- Urcuqui-Inchima S., A. Haenni, F. Bernardi. 2000. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74: 157–175.

- Voyses O. 2000. *Mejoramiento genético del frijol (Phaseolus vulgaris L.): Legado de variedades de América latina 1930-1999*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- Worrall, E.A., F.O. Wamonje, G. Mukeshimana, J.J.W. Harvey, [J.P. Carr](#), [N. Mitter](#). 2015. *Bean Common Mosaic Virus and Bean Common Mosaic Necrosis Virus: relationships, biology, and prospects for control*. *Adv. Virus Res.* 93: 1-46.