

# Determinación de hipersensibilidad al mosaico común del frejol en hojas amputadas y factores genéticos que condicionan su herencia<sup>1</sup>

Mario Alvarez A.<sup>2</sup>

## INTRODUCCION

El Mosaico Común del Frejol (MCF), provocado por el virus *Phaseolus virus 1*, Smith (= *Marmor phaseoli Holmes*) es la enfermedad más importante de esta leguminosa en Chile, ya que se encuentra difundida a través de toda el área del cultivo afectando en un alto porcentaje a las principales variedades cultivadas tanto de consumo interno como de exportación.

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), lleva a cabo un programa de mejoramiento por hibridación basado fundamentalmente en retrocruzadas; las variedades nacionales susceptibles son cruzadas por padres extranjeros mejorantes que poseen genes de resistencia por hipersensibilidad y luego retrocruzadas hacia el padre nacional (Cafati y Alvarez, 1975). En la práctica es difícil determinar si plantas individuales o líneas disociantes, producto de cruzamientos, son resistentes o susceptibles al MCF. El típico síntoma de mosaico provocado por el virus está condicionado a varios factores varietales y ambientales lo que trae consigo que incluso plantas susceptibles, bajo determinadas condiciones no presenten síntomas. Por otra parte, cuando se trabaja con gran cantidad de plantas en invernadero, interesa descartar, por razones de tiempo y espacio, la mayor cantidad posible de material susceptible. Al efectuarse inoculaciones artificiales en las hojas prima-

rias se debe esperar necesariamente la presencia de las primeras hojas trifoliadas plenamente desarrolladas, para efectuar lectura de los síntomas. Es decir que la primera observación sólo se puede realizar a partir de 10 a 15 días después de la inoculación.

La primera variedad comercial que demostró resistencia al virus fue Robust (Rands y Brotherton, 1925). En 1932 se obtuvo Corbett Refugee, a partir de una selección de la variedad Stringless Green Refugee, lo que sirvió de base para obtener mediante hibridación, otros tipos resistentes (Walker, 1969). Pierce (1935) fue el primero en demostrar que las variedades Robust y Corbett Refugee poseían genes de resistencia distintos, ya que en el F<sub>2</sub> de un cruzamiento entre ellos, aparecieron individuos susceptibles.

Jenkins (1940) describió una afección en frejol que designó como "black-root", cuyos síntomas consistían en marchitez apical que se hacía sistémica afectando las partes inferiores de las plantas, para terminar con la muerte total de ellas. Grogan y Walker (1948), demostraron que el "black-root" se debía a una expresión sintomatológica de la variedad Corbett Refugee y sus derivados cuando se inoculaba mediante injertos de aproximación con el virus del MCF debido a fenómenos de hipersensibilidad provocada por genes para este carácter. Estos síntomas no se producían en variedades como Robust que poseían genes de resistencia recesivos.

Ali (1950), indujo hipersensibilidad artificialmente mediante injertos de aproximación para realizar estudios de herencia de la resistencia al MCF. Thomas (1954), produjo arti-

<sup>1</sup>Recepción originales: 12 de marzo de 1976.

<sup>2</sup>Ing. Agr., Ph. D., Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

ficialmente necrosis en plantas con resistencia tipo Corbett Refugee, inoculando por frotación mecánica hojas primarias de frejol y sometiendo luego a las plantas a temperaturas de 32°C. Thomas y Fisher (1954), recomiendan el uso de esa técnica para diagnósticos rápidos en pruebas de resistencia al MCF. Quantz (1957), mediante inoculaciones en hojas amputadas de frejol y luego colocadas en condiciones de alta humedad, luz continua y temperatura entre 28 y 35°C, indujo necrosis venal 3-4 días después de la inoculación en hojas provenientes de plantas con genes para hipersensibilidad. Alvarez (1965), comparó ambos métodos en series de variedades con genes para hipersensibilidad, resistencia y susceptibilidad al MCF, estableciendo que la técnica de hojas amputadas era especialmente efectiva si se utilizaban las 2 hojas primarias de cada planta. Bruna (1967), confirmó mediante inoculaciones por frotación mecánica, empleando productos de cruzamiento de cuatro variedades derivadas de Corbett Refugee con cuatro variedades chilenas, en sus distintas combinaciones, que la herencia de la resistencia por hipersensibilidad se debía a un par de factores de tipo dominante.

El presente trabajo tuvo por objetivo probar en gran escala la técnica de inoculación en hojas amputadas para establecer la susceptibilidad o resistencia de plantas frente al MCF y determinar mediante esa misma técnica los factores que regulan la herencia a la resistencia al virus en frejoles.

#### MATERIALES Y METODOS

El material empleado constó de productos de cruzamientos entre variedades chilenas susceptibles al MCF con extranjeras resistentes, derivadas de Corbett Refugee, en las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y  $RC_1$  (retrocruza del  $F_1$ , hacia el padre recurrente susceptible).

Como padres susceptibles se utilizaron cuatro variedades chilenas incluidas en los planes de mejoramiento del INIA: Cristal Bayo (consumo en verde), Cristal Blanco (de exportación), Coscorrón (consumo en granado y seco) y Tórtola (consumo en grano seco). Como padres extranjeros resistentes se usaron las variedades US 5 Refugee y Wisconsin Refugee.

El número de plantas probadas en las distintas combinaciones de cruzamientos y generaciones, se indican en el Cuadro I.

Los granos de las distintas combinaciones

de cruzamientos y generaciones se sembraron en invernadero, en maceteros individuales. Para determinar la resistencia o susceptibilidad de las plantas al MCF, se utilizó el método de inoculación en hojas amputadas (Alvarez, 1965). Cuando las plantas comenzaban a formar sus primeras hojas trifoliadas y habían desarrollado completamente ambas hojas primarias, éstas fueron amputadas e inoculadas por el haz con savia procedente de plantas enfermas, diluida 1:10. Previamente, habían sido espolvoreadas con carborundum 320 mesh. Una vez inoculadas, las hojas fueron colocadas en discos Petri con papel filtro humedecido en su interior y colocadas en una cámara de luz continua de aproximadamente 1.500 lux de intensidad y a una temperatura fluctuante entre 29 y 32°C. Como testigos se usaron hojas amputadas de las cuatro variedades chilenas susceptibles y extranjeras resistentes, respectivamente. Las mismas plantas, sin sus hojas primarias fueron inoculadas en sus hojas trifoliadas por frotación mecánica, aproximadamente a los siete días siguientes con el propósito de comparar las reacciones. Después de la inoculación se procedió a lavar de las hojas el exceso de carborundum.

La lectura de las reacciones en hojas amputadas se realizó a los tres y siete días después de la inoculación. Aquellas hojas que no mostraron síntomas de hipersensibilidad fueron consideradas susceptibles; las que presentaron necrosis en las venas fueron consideradas resistentes. La lectura de las plantas testigo inoculadas en las primeras hojas trifoliadas se realizó a los 15 y 25 días después de la inoculación. Aquellas plantas que mostraron síntomas de mosaico fueron consideradas susceptibles y las que se mantuvieron sanas a través de todo el período de lectura, resistentes.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Los síntomas comenzaron a aparecer en algunas hojas amputadas sometidas a condiciones de luz continua y temperatura de 29-32°C, tres días después de la inoculación. Estos síntomas consistieron en necrosis de ciertos sectores de las venas secundarias que luego se extendía a las principales. En ciertos casos, la necrosis se hacía visible en el envés de las hojas en correspondencia con la necrosis de la cara superior. Esta reacción positiva se obtuvo en las cuatro variedades derivadas de Corbett Refugee usadas como testigo. Por lo tanto, aquellas plantas provenientes de pro-

Cuadro 1 — Número de plantas probadas en las distintas combinaciones de cruzamientos entre variedades susceptibles y resistentes, para las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y  $RC_1$ .

Padre Susceptible	Padre Resistente	Nº Plantas en generaciones		
		$F_1$	$F_2$	$RC_1$
Cristal Bayo	U. S. 5 Refugee	4	9	5
	Topcrop	6	17	6
	Idaho Refugee	6	14	5
	Wisconsin Refugee	3	12	3
Cristal Blanco	U. S. 5 Refugee	2	10	4
	Topcrop	7	14	5
	Idaho Refugee	3	9	5
	Wisconsin Refugee	4	18	6
Coscorrón	U. S. 5 Refugee	4	16	8
	Topcrop	5	12	3
	Idaho Refugee	5	22	5
	Wisconsin Refugee	4	16	3
Tórtola	U. S. 5 Refugee	7	13	4
	Topcrop	4	19	6
	Idaho Refugee	2	10	6
	Wisconsin Refugee	6	24	3
<b>TOTAL</b>		<b>72*</b>	<b>235</b>	<b>77</b>

\*Las 72 plantas  $F_1$  probadas demostraron poseer genes de hipersensibilidad.

ductos de cruzamientos, en las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y  $RC_1$ , cuyas hojas primarias presentaron necrosis venal, se consideraron genéticamente iguales a esas variedades en lo concerniente a resistencia al MCF, es decir con genes para hipersensibilidad. Para considerar una planta como hipersensible, bastaba que una sola de sus dos hojas primarias mostrara reacción necrótica de venas (Figura 1). Las plantas inoculadas en las primeras hojas trifoliadas de las variedades con resistencia tipo Corbett Refugee no mostraron síntomas de virus a través de todo el período de observación.

Las hojas primarias de las cuatro variedades chilenas usadas como testigos permanecieron normales. Por lo tanto aquellas plantas producto de cruzamiento, en las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y  $RC_1$ , cuyas hojas primarias no presentaron necrosis venal, se consideraron genéticamente iguales a esas variedades en lo referente al MCF, es decir con genes para susceptibilidad al virus. Las plantas testigos inoculadas con el virus en las primeras hojas tri-

foliadas desarrollaron claros síntomas de mosaico.

Las 72 plantas  $F_1$  probadas, demostraron poseer genes de hipersensibilidad. En la totalidad de los casos, una o dos de las hojas primarias provenientes de esas plantas reaccionaron positivamente. Estos resultados indican que el carácter hipersensible es dominante sobre susceptible.

El número de plantas con reacción de hipersensibilidad y reacción negativa (susceptible) en las distintas combinaciones de cruzamientos, para las generaciones  $F_2$  y  $RC_1$ , se indica en el Cuadro 2. Los resultados fueron sometidos a la prueba de ji cuadrado ( $X^2$ ). En el Cuadro 3 se presentan los resultados de esta prueba para las generaciones  $F_2$  y  $RC_1$ , respectivamente.

Los valores indicados en el Cuadro 3, en base a la reacción de las plantas  $F_2$ , indican una relación adecuada de la proporción 3:1, en donde el carácter hipersensible de las variedades extranjeras, que confiere la resisten-

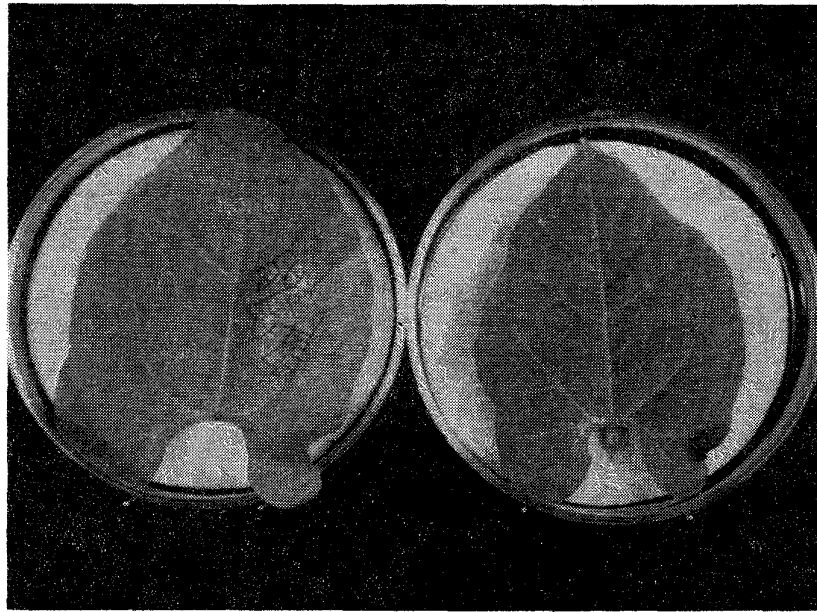


Figura 1 — Izq. Hoja amputada con necrosis de venas, provenientes de planta con genes de resistencia por hipersensibilidad.  
Der. Hoja amputada sin reacción, proveniente de planta susceptible.

Cuadro 2 — Número de plantas con reacción hipersensible y susceptible (reacción negativa) en las generaciones  $F_2$  y  $RC_1$ , provenientes de cruzamiento entre variedades resistentes y susceptibles al MCF.

Padre Susceptible	Padre Hipersensible	Generación $F_2$		Generación $RC_1$	
		Número de Plantas Hipersensible	Número de Plantas Susceptible	Número de Plantas Hipersensible	Número de Plantas Susceptible
Cristal Bayo	U. S. 5 Refugee	7	2	2	3
	Topcrop	12	5	4	2
	Idaho Refugee	8	6	2	3
	Wisconsin Refugee	7	5	0	3
Cristal Blanco	U. S. 5 Refugee	7	3	3	1
	Topcrop	8	6	3	2
	Idaho Refugee	8	1	3	2
	Wisconsin Refugee	14	4	2	4
Coscorrón	U. S. 5 Refugee	10	6	2	6
	Topcrop	10	2	2	1
	Idaho Refugee	19	3	2	3
	Wisconsin Refugee	13	3	1	2
Tórtola	U. S. 5 Refugee	8	5	1	3
	Topcrop	13	6	4	2
	Idaho Refugee	5	5	4	2
	Wisconsin Refugee	18	6	1	2
<b>TOTAL</b>		<b>167</b>	<b>68</b>	<b>36</b>	<b>41</b>

Cuadro 3 — Número de plantas  $F_2$  y  $RC_1$ , con reacción de hipersensibilidad y susceptibilidad. Se indican los valores de  $X^2$  para las proporciones 3:1 y 1:1, respectivamente y de la probabilidad.

Generación	NUMERO DE PLANTAS				Proporción	$X^2$	P
	OBSERVADO		ESPERADO				
	Hipersensibles	Susceptibles	Hipersensibles	Susceptibles			
$F_2$	167	68	176,3	58,7	3 : 1	1,191	0,75 — 0,90
$RC_1$	36	41	38,5	38,5	1 : 1	0,322	0,50 — 0,75

cia, sería dominante sobre el carácter no hipersensible, que confiere susceptibilidad, implicando la existencia para el carácter en cuestión, de un solo par de alelos, heredados en forma mendeliana. Los valores de la reacción de las plantas  $RC_1$ , establecen una adecuada proporción 1:1, que es lo que debe esperarse, de acuerdo a lo establecido en el  $F_1$  y  $F_2$ .

De acuerdo a los resultados considerados en el análisis de las reacciones de las tres generaciones estudiadas, se puede establecer, siguiendo el esquema sugerido por Ali (1950) que las variedades chilenas usadas en este ensayo son de constitución genotípica *A*A*i*; las variedades extranjeras, con resistencia tipo Corbett Refugee, poseen el genotipo *A*A*I*, que les confiere el carácter de hipersensible por la presencia de los factores *A* e *I*, que actúan en forma complementaria. La diferencia del par de alelos *I* e *i* que poseen las variedades extranjeras y chilenas, respectivamente, explican los resultados obtenidos en las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y  $RC_1$  del presente ensayo. Los resultados son concordantes con lo encontrado por Bruna (1967) al realizar su trabajo usando técnicas de inoculación artificial por frotación mecánica.

El presente trabajo demuestra la efectividad de la determinación de resistencia al virus mediante el sistema de inoculación en hojas amputadas. El empleo de este método permite trabajar con un alto porcentaje de eficiencia en el establecimiento de la resis-

cia o susceptibilidad al MCF de plantas individuales o líneas disociantes producto de cruzamientos en los cuales se utilizan variedades con resistencia por hipersensibilidad al MCF. Significa además ahorro de tiempo y espacio en invernadero, ya que la rapidez en la aparición de síntomas permite comenzar a descartar el material susceptible tres días después de la inoculación.

### CONCLUSIONES

Se confirmó mediante el empleo de la técnica de inoculación de virus en hojas amputadas, resultados anteriores obtenidos con inoculaciones mecánicas en plántulas, en relación a los factores que condicionan la herencia a la resistencia del Mosaico Común del Frejol. Se estableció que las variedades derivadas de Corbett Refugee, resistentes al Mosaico Común del Frejol por hipersensibilidad, se diferencian de las variedades chilenas susceptibles en un par de genes, en donde el factor para hipersensibilidad es dominante y susceptible recesivo. Se constató que la técnica de hojas amputadas en la determinación de resistencia o susceptibilidad al Mosaico Común del Frejol es altamente efectiva, ya que permite ahorrar tiempo y espacio a los sistemas de selección de plantas individuales o líneas segregantes destinadas a observar variedades resistentes.

### R E S U M E N

El presente trabajo tuvo por objetivo probar en gran escala la inoculación con el virus del Mosaico Común del Frejol (MCF) en hojas amputadas de frejol y determinar a la vez los factores que regulan la herencia de la resistencia al virus.

Se empleó producto de cruzamientos entre las variedades chilenas susceptibles Cristal Bayo, Cristal Blanco, Coscorrón y Tórtola con las extranjeras resistentes US 5

Refugee, Topcrop, Idaho Refugee y Wisconsin Refugee. Las dos hojas primarias amputadas de plántulas de generaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y  $RC_1$  fueron inoculadas por frotación y luego colocadas en cámara húmeda a luz permanente y a temperatura fluctuante entre 29 y 32°C. Como testigos, se inocularon hojas amputadas de las ocho variedades padres empleadas en los cruzamientos. Las lecturas de síntomas se efectuaron a los tres y siete días después de la inoculación. Los testigos resistentes presentaron necrosis en las venas; así, las plantas provenientes de cruzamientos cuyas hojas presentaron necrosis venal, se consideraron genéticamente iguales a esas variedades en lo concerniente a resistencia al MCF.

Las hojas amputadas de las variedades chilenas permanecieron normales, por lo tanto las plantas provenientes de cruzamientos que no reaccionaron con necrosis en las venas se consideraron genéticamente iguales a ellas en lo referente a reacción frente al MCF, es decir susceptibles.

En la generación  $F_1$ , la totalidad de las plantas reaccionaron con necrosis, lo que indica que el carácter hipersensible es dominante sobre susceptible. En el  $F_2$  se estableció una proporción de 3 plantas hipersensibles: 1 planta susceptible y en la  $RC_1$  una proporción 1:1 lo que indica la existencia de un par de alelos heredados en forma mendeliana que diferencia a las variedades extranjeras derivadas de Corbett Refugee de las chilenas en cuanto a reacción frente al MCF.

Se demostró la alta efectividad de la inoculación en hojas primarias amputadas en la determinación de la resistencia o susceptibilidad al virus aplicable a plantas individuales en trabajos de mejoramiento genético hacia la búsqueda de variedades resistentes.

## S U M M A R Y

### DETERMINATION OF HIPERSENSIBILITY TO BEAN COMMON MOSAIC IN DETACHED LEAVES OF BEANS AND GENETIC FACTORS CONDITIONING ITS INHERITANCE

Detached  $F_1$ ,  $F_2$  and  $RC_1$  primary leaves of bean plants obtained from crosses between the Chilean susceptible varieties Cristal Bayo, Cristal Blanco, Coscorrón and Tortola with foreign resistant varieties as U.S. 5 Refugee, Topcrop, Idaho Refugee and Wisconsin Refugee were mechanically inoculated with bean common mosaic virus (BCMV) and placed in a moist chamber under constant light and a temperature of 29 - 32°C. As control, detached leaves of the eight parental varieties were inoculated. Symptoms were recorded three and seven days after the inoculation. Resistant controls reacted with veinal necrosis. Hybrid plants with leaves reacting with veinal necrosis upon inoculation were considered genetically similar to these varieties in relation to their resistance to BCMV. Inoculated leaves of the Chilean varieties remained normal. Thus, those plants that did not react with veinal necrosis were considered susceptible.

All  $F_1$  plants reacted with necrosis, demonstrating that hypersensitivity is dominant over susceptibility. A proportion of 3:1 and 1:1 hypersensitive and susceptible plants was established in the  $F_2$  and  $RC_1$  generations respectively, indicating the presence of one pair of genes, which differentiates the varieties derived of Corbett Refugee from the Chilean susceptible varieties. The efficiency of inoculating detached cotyledonary leaves of bean plants when screening for resistant material to the virus was also demonstrated.

## LITERATURA CITADA

- ALI, M. A. 1950. Genetics of resistance to the Common Bean Mosaic Virus (Bean virus 1) in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopath.* 40: 69-79.
- ALVAREZ A., M. 1965. Determinación de la resistencia por hipersensibilidad al mosaico común del frejol, *Phaseolus virus* 1. *Agricultura Técnica* (Chile). 25 (3): 114-119.
- BRUNA V., A. 1967. Estudio de los factores hereditarios que condicionan la resistencia del frejol (*Phaseolus vulgaris*) al Mosaico Común (*Phaseolus virus* 1). Tesis de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad de Chile. 88 p.
- CAFATI, C. y ALVAREZ, M. 1975. Mejoramiento en frejoles (*Phaseolus vulgaris* L.) para resistencia al mosaico común (*Phaseolus virus* 1) y su strain N.Y. 15. *Agricultura Técnica* (Chile). 35 (3): 152-157.
- GROGAN R. G. and WALKER, J. C. 1948. The relation of common mosaic to black root of bean. *Jour. Agr. Res.* 77: 315-331.
- JENKINS, W. A. 1940. A new virus disease of snap beans. *Jour. Agr. Res.* 60: 279-288.
- PIERCE, W. H. 1935. The inheritance of resistance to common bean mosaic in field and garden beans. *Phytopath.* 25: 875-883.
- QUANTZ, LUDWIG. 1957. Ein Schalentest zum Schnellnachweis des Gewöhnlichen Bohnenmosaikvirus (*Phaseolus virus* 1). *Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd.* Band. 9. 5: 71-74.
- RANDS, R. D. and BROTHERTON, W. 1925. Bean varietal tests for disease resistance. *Jour. Agr. Res.* 31: 101-154.
- THOMAS, H. R. 1954. Factors affecting development of necrosis in some bean varieties inoculated with common bean mosaic virus. *Phytopath.* 44: 508.
- and FISHER, H. H. 1954. A rapid method of testing snap beans for resistance to common bean mosaic virus. *Plant Dis. Rptr.* 38: 410-411.
- WALKER, J. C. 1969. *Plant Pathology*. Mc Graw-Hill Book. Co., Inc. 3ª Ed., p. 819.