



CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO

IX CONAFE

Ciência e Tecnologia na Cadeia Produtiva do Feijão
Campinas, 21 a 23 de outubro de 2008



DOCUMENTOS IAC, 85 / ISSN 1809-7685
INSTITUTO AGRÔNOMICO
CAMPINAS (SP), 2008



MEJORAMIENTO GENÉTICO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.), ASISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES (MAS) EN ECUADOR

Ana ESTRELLA¹
Ángel MURILLO¹
Eduardo PERALTA¹

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano comestible más importante por la superficie cultivada, consumo y el mercado. Se siembran alrededor de 120 000 ha de fréjol, de los cuales 24 379 ha corresponden a fréjol arbustivo (monocultivo) y 97 212 ha en asociación con maíz.

El fréjol arbustivo se siembra en los valles mesotérmicos entre los 1800 y 2400 m s.n.m. y la producción está limitado por enfermedades foliares como la roya (*Uromyces appendiculatus*), antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) que pueden reducir más del 50 % del rendimiento. Para prevenir esta pérdida, los productores realizan controles con fungicidas, lo cual incrementa los costos de producción. Ante esta situación, el Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP de Ecuador, a partir de 1996 inició el mejoramiento genético por hibridación y desde el 2004 ha trabajado en la implementación de selección asistida por marcadores moleculares (MAS) tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions= Amplificación de regiones secuenciadas y caracterizadas), como una herramienta que facilita el proceso de selección de genotipos y líneas con genes de resistencia a estas enfermedades.

El PRONALEG-GA ha adoptado esta herramienta de selección debido a las siguientes ventajas: 1) selección indirecta de caracteres simples y complejos. 2) disminución del número de generaciones. 3) no hay necesidad de evaluación fenotípica en generaciones tempranas y 4) piramidación de genes de resistencia a enfermedades. La validación de marcadores moleculares reportados ligados a genes de resistencia a enfermedades fue la primera fase en la implementación de la selección asistida por marcadores moleculares. Al momento, cuatro marcadores SCAR se aplican como un proceso de rutina en las líneas generadas en el proceso de mejoramiento.

Los resultados de la presencia o no de marcadores ligados a genes de resistencia para enfermedades son un parámetro que se incluye al momento de seleccionar una línea mejorada para ser utilizada en las evaluaciones posteriores, además de evaluaciones agronómicas, de calidad de grano y de reacción a enfermedades

MATERIALES Y MÉTODOS

El enfoque del plan de cruzamientos se dirige hacia la introducción de genes de resistencia en materiales comerciales. Cuando los genes están presentes en materiales tipo comercial es necesario una cruce simple, mientras que cuando el tipo de grano de la fuente de resistencia no es comercial se requiere realizar retrocruzas hasta obtener grano tipo comercial. En el Cuadro 1 se detalla las cruces simples y retrocruzas que han

¹ Técnicos del Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP. Ecuador. e-mail: legumin@pi.pro.ec

sido evaluadas mediante marcadores moleculares ligadas a los genes *Co 4²* para resistencia a antracnosis y *Phg 1* para mancha angular.

Cuadro 1. Cruzamientos para introducir genes de resistencia a antracnosis y mancha angular en variedades comerciales fréjol evaluados con marcadores moleculares tipo SCAR, INIAP, Ecuador.

Cruzamiento	Marcador
A: (ACE 1/G2333)//ACE1///ACE1///	SH18 SBB14
B: AMPR/AND277 F ₄	SH13

La aplicación de marcadores moleculares en la selección de plantas resistentes a las principales enfermedades incluye: extracción de ADN, amplificación de marcadores SCAR para cada gen de las diferentes enfermedades y análisis de resultados.

El ADN se extrajo a partir de trifolios jóvenes frescos o congelados aplicando el protocolo reportado por ERAZO, 2004. En el Cuadro 2 se detalla los marcadores tipo SCAR que se aplican en el PRONALEG-GA, así como los protocolos que se aplicaron para su amplificación. El producto de la amplificación fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y luego se registró mediante fotografías para proceder al análisis de resultados.

Cuadro 2. Marcadores tipo SCAR ligados a genes de resistencia para enfermedades que afectan al fréjol utilizados por el PRONALEG-GA, INIAP, Ecuador.

Enfermedad	Gen	Marcador	Protocolo	Tipo
Antracnosis	<i>Co 4²</i>	SBB 14 _{1050/1150}	Erazo, 2006	Codominante
Antracnosis	<i>Co 4²</i>	SH 18 ₁₁₀₀	Ernest, 2004	Dominante
Roya	<i>Ur 3</i>	SK 14 ₆₂₀	Ernest, 2004	Dominante
Mancha Angular	<i>Phg 1</i>	SH13 ₅₂₀	Erazo, 2006	Dominante
BCMV (virus)	<i>I</i>	SW 13 ₆₉₀	Ernest, 2004	Dominante

Dos poblaciones fueron evaluadas para determinar la presencia de marcadores ligados a genes de resistencia aplicándose tres marcadores: SBB 14_{1050/1150}, SH 18₁₁₀₀, para antracnosis y SH13₅₂₀ para mancha angular.

La cruce A fue evaluada por dos ocasiones con el marcador SBB 14 y también dos veces con el marcador SH18 para el mismo gen *Co 4²* que confiere resistencia a antracnosis, se utilizó como control positivo (resistente) la línea G 2333 portadora del gen *Co 4²*, como controles negativos (susceptibles) fueron: Paragachi y Black Magic. Para el marcador SBB14, se utilizó un control heterocigoto, en una mezcla de ADN de G 2333 y Paragachi.

La cruce B se evaluó con el marcador SH 13 en donde la línea AND 277 portadora del gen *Phg 1* se utilizó como control positivo y como negativo se utilizó Cocacho, variedad susceptible.

Además, estas líneas fueron inoculadas con las respectivas enfermedades a nivel de invernadero para confirmar los resultados, que posteriormente fueron comparados con los resultados obtenidos a nivel molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la cruce A, 15 líneas presentaron el marcador SH 18, esto se debe a que el marcador es de tipo dominante y no puede discriminar en resistente homocigoto y heterocigoto, solo identifica la presencia del alelo de resistencia.

Con el marcador SBB 14 se encontró cinco líneas resistentes que fueron seleccionadas y 10 líneas heterocigotas (fotografía 1) que pueden seguir siendo evaluadas en las siguientes progenies si por su calidad de grano u otras características son seleccionadas y llevadas a heterocigosis (cuadro 3).



Fotografía 1. Amplificación de 18 líneas de la cruce A con el marcador SBB14.

Cuadro 3. Resultado de la aplicación de marcadores moleculares a dos poblaciones de fréjol, INIAP, Ecuador.

Cruzamiento	Marcador	Número de individuos	Resultado
A: (ACE 1/G2333)//ACE1///ACE1////	SH18	18	15 resistentes
	SBB14		5 resistentes; 10 heterocigotas
B: AMPR/AND277 F ₄	SH13	75	41 resistentes

Mediante el marcador SH 13, se pudo identificar 41 líneas portadoras del marcador ligado al gen *Phg 1*, en la cruce B. Esta identificación fue muy importante ya que la evaluación de reacción a la enfermedad no fue exitosa, mediante el marcador se pudo seleccionar las líneas que seguirán en el proceso de mejoramiento y eliminar las susceptibles. Estos resultados concuerdan con TEBALDI et al (2004) quienes aseguran al desarrollar el marcador que podría utilizarse en selección asistida de fréjol.

CONCLUSIONES

La selección asistida por marcadores moleculares es una técnica de selección indirecta que ha permitido identificar marcadores ligados a genes que confieren resistencia a enfermedades en líneas generadas dentro del plan de cruces que maneja el PRONALEG-GA, sobre todo cuando la presión de la enfermedad no permite realizar evaluaciones fenotípicas de reacción a la misma.

El marcador codominante SBB14, es de gran utilidad para la selección asistida de fréjol ya que permite discriminar entre homocigotos resistentes y heterocigotos. Sin embargo, también son útiles los marcadores de tipo dominante como SH 18 y SH 13 cuando no existen marcadores de tipo codominante.

Combinar evaluaciones fenotípicas de reacción a enfermedades con evaluaciones de marcadores moleculares ligados a genes que confieren resistencia a enfermedades es al momento la alternativa más adecuada para la selección de líneas con resistencia a enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ERAZO N. 2006. "Evaluación de 214 líneas de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.), para resistencia a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), mediante selección asistida por marcadores moleculares con fines de mejoramiento genético". Tesis Ing. Agrop. Fac. Ciencias Agropecuarias IASA. Escuela Politécnica del Ejército. Quito-Ecuador.

ERNEST, E. 2004, The Mesoamerican Anthracnose Resistance Gene, *Co-4²*, does confer Resistance in Certain Andean genetic backgrounds. Magister of Sciences. Michigan, Michigan State University, Estados Unidos, pp: 10, 11, 14-20, 77-80.

MIKLAS, P., 2005, DNA markers (SCARS linked with disease resistance traits in bean (*Phaseolus vulgaris*) Updated: 8/30/05 by Phil Miklas. www.css.msu.edu/bic/PDF/SCAR%20Markers.pdf

TEBALDI, V., C. Severiano, T. Pessoa. D. Arruda, V. Ragagnin, E. Gongalves y M. Alves, 2004, Development of SCAR markers linked to the common bean rust resistance gene *Ur 11* In BIC pp: 271-272

Área: GENÉTICA Y MEJORAMIENTO