

EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Phaseolus* spp. COMO FUENTE DE RESISTENCIA A *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop)

J. C. Jiménez-Galindo¹; E. Valadez-Moctezuma²†; N. Marbán-Mendoza³.

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Sierra de Chihuahua, Avenida Hidalgo Núm. 1213. Colonia Centro, Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua. C. P. 31500. MÉXICO.

²Posgrado en Biotecnología Agrícola, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.
Correo-e: evaladez@correo.chapingo.mx (†Autor responsable).

³Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. MÉXICO.

RESUMEN

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar con marcadores de DNA, plantas de frijol Tepary (*Phaseolus acutifolius*) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con distinto nivel de resistencia a *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop) y rastrear la herencia de los marcadores de DNA asociados. Se realizaron cruza de Tepary Pinto x Pinto Americano y Pinto Americano x Bayo Blanco con niveles contrastantes de resistencia al hongo para obtener progenies segregantes F₁ y F₂. Para la búsqueda de los marcadores asociados se inocularon plántulas progenitoras y F₂ con una suspensión de 2.5 x 10⁵ conidios·mL⁻¹ del hongo. DNA de plantas susceptibles y resistentes seleccionadas con base en la presencia de síntomas de marchitamiento u hojas cloróticas y plantas sin síntomas de marchitez, respectivamente, se utilizaron para rastrear los marcadores de DNA asociados a los fenotipos contrastantes de resistencia y susceptibilidad. El análisis molecular se hizo con la técnica DAF-PCR con los iniciadores aleatorios A-01, A-04 y A-13. Se observaron polimorfismos de DNA en las poblaciones F₁, lo que indicó la conformación de híbridos entre *P. acutifolius* y *P. vulgaris*. En F₂ se detectaron marcadores dominantes de *P. acutifolius* asociados con la resistencia a Fop.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Cruzas inter e intraespecíficas, frijol Tepary, frijol común, pudrición de raíz y marchitamiento, perfiles genómicos.

EVALUATION AND CHARACTERIZATION OF *Phaseolus* spp. AS A SOURCE OF RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop)

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with different levels of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop), using DNA markers, and to trace the inheritance of DNA associated markers. Crosses were made between Tepary Pinto x Pinto Americano and Pinto Americano x Bayo Blanco contrasting levels of resistance to the fungus to obtain F₁ and F₂ segregating progenies. To search for the DNA associated markers, seedlings from parents and F₂ were inoculated with a suspension of 2.5 x 10⁵ fungus conidia·mL⁻¹. DNA from selected susceptible and resistant plants based on the presence of symptoms of wilting or chlorotic leaves and plants without wilting symptoms, respectively, were used to track DNA markers associated with contrasting phenotypes of resistance and susceptibility. Molecular analysis was done with DAF-PCR technique using the random primers A-01, A-04 and A-13. DNA polymorphisms were observed in F₁ populations indicating the formation of hybrids between *P. acutifolius* and *P. vulgaris*. In F₂ dominant markers were detected in *P. acutifolius* associated with resistance to Fop.

ADDITIONAL KEY WORDS: Inter- and intra-specific crosses, Tepary bean, common bean, root-rot and wilting, genomic profiles.

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es de las leguminosas de grano más importantes del mundo; su cultivo está extendido en los cinco continentes y es uno de los alimentos básicos en África, América Latina y el Caribe (Lépiz, 2000). Para México es un cultivo estratégico, ya que ocupa el segundo lugar en superficie a escala nacional, con un promedio de 1.688 millones de hectáreas. Su producción es de casi un millón de toneladas con un valor de 6.94 mil millones de pesos (SIAP, 2009). La gama de frijoles bayos y pintos ocupan el segundo y tercer lugar de consumo en México, aunque se muestra una tendencia al alza debido al precio, sabor y calidad culinaria (Plan Rector Sistema Nacional Frijol, 2009).

Durante el periodo de cultivo, el frijol puede ser afectado por múltiples factores adversos que reducen el rendimiento; algunos son las enfermedades causadas por patógenos de la raíz y foliares que lo afectan hasta un 50 %; esto ha obligado a investigadores a desarrollar nuevas estrategias que permitan estabilizar la producción y contribuir a la competitividad del frijol con otros cultivos (Van Bruggen *et al.*, 1986).

En los programas de mejoramiento genético, el investigador considera genotipos contrastantes respecto al carácter de interés; sin embargo, la segregación de genes puede reflejarse en la variedad mejorada, ya que no todos los individuos presentan el carácter deseado absoluto. Esto dependerá de la base genética y del nivel de recombinación (Staub *et al.*, 1996).

La resistencia genética mediante la incorporación de genes que ayuden a contrarrestar los efectos causados por los patógenos, ha sido una herramienta importante no sólo para la incorporación de caracteres de calidad, sino también para el manejo de enfermedades en muchos cultivos, entre ellos el frijol. Las técnicas tradicionales y moleculares se han utilizado en los programas de mejoramiento para transferir a los genotipos mejorados, genes de resistencia procedentes de variedades silvestres o de especies cultivadas no comerciales (Geffroy *et al.*, 1997). También se utilizan métodos para la identificación de marcadores potenciales de DNA asociados a resistencia o susceptibilidad a patógenos, para posteriormente realizar selecciones apropiadas durante el proceso de obtención de nuevas variedades comerciales (Tarlan *et al.*, 2001).

Para la búsqueda de marcadores de DNA se utilizan los RFLP (polimorfismo de fragmentos de restricción), la electroforesis de campos pulsantes o PFGE y el complejo de amplicones múltiples aleatorios (MAAP) (Tenover *et al.*, 1997). De estas herramientas, la más utilizada es la caracterización con MAAP (terminología propuesta por Caetano *et al.*, 1992), que comprende tres técnicas basadas en PCR: el polimorfismo de DNA amplificado al azar (RAPD), la amplificación de huellas de DNA (DAF) y la reacción en cadena de la polimerasa con el uso de iniciadores arbitrarios (AP-PCR).

La PCR es una técnica que se utiliza en variados campos científicos, y su éxito se debe a la capacidad para producir literalmente millones de copias de fragmentos de DNA con alta fidelidad (Tenover *et al.*, 1997). Particularmente la técnica DAF presenta ventajas respecto a otras técnicas de PCR: por ejemplo, la obtención de alto número de fragmentos discriminativos; el diseño de iniciadores no requiere de información genética previa; las cantidades del DNA molde son mínimas; la reproducibilidad de resultados es mayor que RAPD y los costos unitarios por ensayo son bajos; pero también tienen el inconveniente de seguir una herencia dominante y la falta de conocimiento de la identidad de los productos amplificados que se obtienen (Struelens, 1998). Hoy en día, esta técnica y RAPD son consideradas las más adecuadas para realizar una genotipificación comparativa rápida (Williams *et al.*, 1990; Welsh *et al.*, 1990). Con base en la utilidad que ofrecen las técnicas de PCR, en el presente estudio se utilizaron marcadores de DNA de plantas de frijol Tepary (*Phaseolus acutifolius*) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con distinto nivel de resistencia a *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop), y se rastreó la herencia de los marcadores de DNA asociados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variedades evaluadas

Se utilizaron seis materiales genéticos de *Phaseolus acutifolius* (Tepary Marrón, Tepary Negro Chico, Tepary Negro Grande, Tepary 60 Blanco, Tepary 70 Blanco y Tepary Pinto) y seis variedades comerciales de *Phaseolus vulgaris* L. (Rayado Rojo, Negro San Luis, Bayo Blanco, Cuarentero Rojo, Canario y Pinto Americano). Se inocularon 20 semillas de cada variedad con una suspensión de 2.5×10^5 conidios·mL⁻¹ de *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop) para conocer sus niveles intrínsecos de

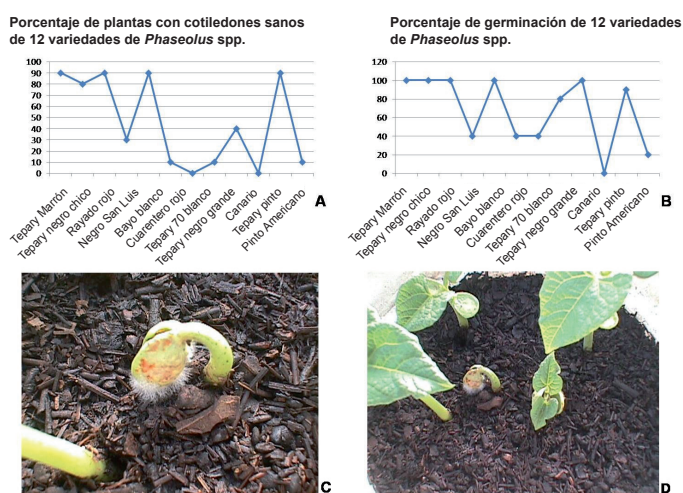


FIGURA 1. Evaluación de variedades de *Phaseolus* spp., según la respuesta de susceptibilidad y resistencia a *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop). Las Gráficas A y B muestran el porcentaje de cotiledones sanos y el porcentaje de germinación de 12 diferentes variedades de frijol; C muestra el aspecto de cotiledones afectados por Fop; y en D se contrasta la diferencia entre plantas sanas y dañadas por Fop.

resistencia y susceptibilidad al hongo fitopatógeno. Antes de la inoculación, las semillas se desinfectaron con una solución de Extrán 10 % durante 10 minutos, se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril y se sumergieron en la suspensión de conidios durante cinco minutos. En seguida se sembraron en macetas con suelo de monte esterilizado con bromuro de metilo a cuatro cm de profundidad y se evaluaron los porcentajes de germinación y de cotiledones sanos (Figura 1). Se seleccionaron las variedades Tepary Pinto, Pinto Americano y Bayo Blanco por presentar porcentajes contrastantes de resistencia y susceptibilidad a *Fop*.

CRUZAS INTRA E INTERESPECÍFICAS

Con la finalidad de rastrear las huellas de DNA asociadas a resistencia y susceptibilidad a *Fop*, se realizaron dos cruzamientos, uno de Tepary Pinto (T) x Pinto Americano (P) y otro de Pinto Americano (P) x Bayo Blanco (B). Las variedades Tepary Pinto y Bayo Blanco se consideraron como resistentes y Pinto Americano como susceptible, con base en las respuestas que mostraron en la evaluación indicada en la Figura 1. En los progenitores y las progenies F_2 de las cruzas, se analizó la herencia del marcador de DNA asociado al nivel de resistencia. Las cruzas se representan en el esquema siguiente:

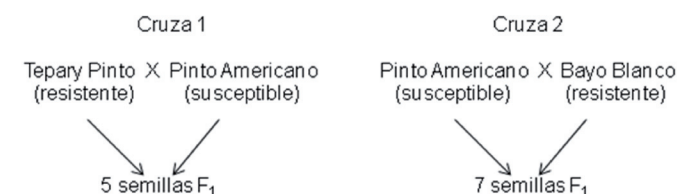


FIGURA 2. Cruzas de *Phaseolus* spp., realizadas para rastrear la herencia de marcadores de DNA asociados a resistencia y susceptibilidad a *Fop*.

Las semillas de la progenie F_1 se sembraron en invernadero en macetas de 10 kg de sustrato de tierra de monte desinfectada con bromuro de metilo para la obtención de la generación F_2 .

Inoculación con *Fop* de progenitores y progenies segregantes F_2

Para detectar los marcadores moleculares asociados a resistencia y/o susceptibilidad a *Fop* en los progenitores y en las progenies segregantes F_2 de frijol, se inocularon 10 semillas de cada progenitor y 10 semillas de las progenies F_2 por inmersión durante cinco minutos en una suspensión de 2.5×10^5 conidios·mL⁻¹ de *Fop*. Después se sembraron en macetas de un kilogramo bajo condiciones de invernadero con temperatura de 20-23 °C. La selección de muestras de plantas susceptibles y resistentes se realizó 25 días después de la inoculación, con base en la presencia de síntomas de marchitamiento u hojas simples cloróticas y plantas sin síntomas de marchitez, respectivamente; su DNA se analizó de acuerdo a su polimorfismo mediante la técnica DAF-PCR.

Estimación de la variabilidad genética y detección de marcadores DAF

Para la estimación inicial de la variabilidad genética de los progenitores, el DNA de las 10 plantas utilizadas se caracterizó finalmente con los iniciadores aleatorios A-01 (5'-CAGGCCCTTC-3') y A-04 (5'-AATCGGGCTG-3') de Carl Roth GmbH (Germany) (Figura 3). Para detectar la presencia de DNA de los progenitores en la progenie F_1 , se conformaron muestras compuestas de hojas de todas las plantas resultantes (cinco plantas en la cruza 1 y siete plantas en la cruza 2), y el análisis del DNA conjunto se hizo con los iniciadores A-01 y A-04, además del iniciador A-13 (5'-CAGCACCCAC-3') (Figura 4). Los marcadores de DNA asociados a la resistencia y susceptibilidad en F_2 fueron rastreados en plántulas de los tres progenitores y de la descendencia F_2 inoculadas, utilizando los mismos tres iniciadores aleatorios A-01, A-04 y A-13 (Figura 5). Las plantas susceptibles seleccionadas, mostraron síntomas severos o muerte post emergente a los 25 días después de la inoculación. Para la búsqueda de los marcadores de DNA se consideraron una planta con fenotipo susceptible y otra con fenotipo resistente de cada progenitor (dada la variabilidad intrínseca de respuesta frente a *Fop*) y ocho plantas F_2 de cada cruzamiento, cuatro susceptibles y cuatro resistentes para cada cruza, conformando dos repeticiones con plantas diferentes en cada caso (TxP a; TxP b; Px B a y Px B b) (Figura 5, Cuadro 1).

CUADRO 1. Características de las plantas de frijol utilizadas para el análisis de perfiles genómicos y segregación de los marcadores asociados a la respuesta contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Planta	Genotipo/Cruza	Identificación de la planta	Reacción a <i>Fop</i>
1	Bayo Blanco P	rogenitor	susceptible
2	Bayo Blanco P	rogenitor	resistente
3	Tepary Pinto	Progenitor s	susceptible
4	Tepary Pinto	Progenitor r	resistente
5	Pinto Americano P	rogenitor	susceptible
6	Pinto Americano P	rogenitor	resistente
7	Tepary Pinto x Pinto Americano	F_2 s	susceptible
8	Tepary Pinto x Pinto Americano	F_2	resistente
9	Tepary Pinto x Pinto Americano	F_2	susceptible
10	Tepary Pinto x Pinto Americano	F_2	resistente
11	Tepary Pinto x Pinto Americano	F_2	susceptible
12	Tepary Pinto x Pinto Americano	F_2	resistente
13	Tepary Pinto x Pinto Americano	F_2	susceptible
14	Tepary Pinto x Pinto Americano	F_2	resistente
15	Pinto Americano x Bayo Blanco F	2	susceptible
16	Pinto Americano x Bayo Blanco F	2	resistente
17	Pinto Americano x Bayo Blanco F	2	susceptible
20 P	Pinto Americano x Bayo Blanco F	2	resistente
21 P	Pinto Americano x Bayo Blanco F	2	susceptible
22	Pinto Americano x Bayo Blanco F	2	resistente
23	Pinto Americano x Bayo Blanco F	2	susceptible
24	Pinto Americano x Bayo Blanco F	2	resistente

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983) utilizando hojas jóvenes de cada uno de los progenitores y progenies segregantes F_1 y

F₂. Para el caso de F₁ se consideraron muestras compuestas por hojas de toda la progenie y se utilizaron 1.4 g de hojas que se molieron con nitrógeno líquido en un mortero. El tejido pulverizado se transfirió a un tubo que contenía 15 mL de amortiguador de extracción precalentado a 65 °C (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol y SDS 1.3 %), se mezcló el contenido y se incubó a 65 °C en baño de agua por 10 min; luego se añadieron a la mezcla 5 mL de acetato de potasio 5 M y posteriormente se dejó enfriar durante 30 min. Después, los tubos de las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm durante 20 min a 4 °C, y el sobrenadante se transfirió a otro que contenía un volumen de isopropanol frío; el contenido se mezcló lentamente por inversión y los tubos se mantuvieron por 30 min a -20 °C. Posteriormente, el DNA (en forma de hilos) se transfirió a un nuevo tubo que contenía 700 µL de amortiguador TE (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 10 mM de EDTA, pH 8.0); se agregaron 4 µL de RNasa (10 mg·mL⁻¹) para eliminar el RNA mediante incubación a 37 °C por una hora. En seguida se adicionaron 50 µL de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 500 µL de isopropanol frío para precipitar el DNA; los tubos se mezclaron nuevamente y se mantuvieron a -20 °C por 2 h. Para recuperar el DNA, los muestras se centrifugaron a 15,000 rpm por 5 min; se eliminó el sobrenadante y la pastilla resultante se lavó con etanol 70 % y posteriormente se disolvió en 100 µL de amortiguador TE.

Técnica DAF-PCR

Antes de la amplificación con PCR, el DNA de las plantas inoculadas F₁ y F₂ fue digerido con la enzima de restricción Eco RI. La mezcla de reacción para PCR contenía: 200 µM de dNTPs, 1X de amortiguador Taq, 2 mM de MgCl₂, 20 pmol del iniciador respectivo (A-01, A-04, A-13), 1 U de enzima Taq DNA polimerasa y 25 ng del DNA digerido correspondiente. El programa de amplificación fue: 1 ciclo a 94 °C, 1 min; 38 ciclos [94 °C, 20 s; 40 °C, 15 s; 72 °C, 1 min] y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 2 min.

Separación de productos amplificados DAF-PCR

Para el análisis de la variabilidad de los progenitores, los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1.2 %, utilizando el amortiguador TAE 1X (40 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM acetato de sodio y 2 mM de EDTA). Para esto se colocaron 10 µL del producto de PCR mezclado con 0.1 volumen del amortiguador de carga 10X (0.1 % azul de bromofenol p/v, 0.1 % de xileno cianol p/v, 40 % de glicerol y 60 mM de EDTA, pH 8.0). El DNA se corrió a 80 V durante 1.5 h; posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas se documentaron con el sistema Kodak Digital Science 1D v. 2.0.

Los productos de PCR para la F₁ y plantas resistentes y susceptibles a *Fop* de progenitores y progenies F₂, fueron separados en geles de acrilamida 5 % (acrilamida-bisacrilamida 29:1, agua deionizada, TBE 5X, persulfato de

amonio 10%, TEMED 0.5 %) de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989). Se cargaron 10 µL de las muestras amplificadas de DNA con 0.1 de volumen del amortiguador de carga en cada uno de los pozos del gel y se corrieron a 70 V para la electroforesis respectiva. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y se documentó con el sistema Kodak. En cada corrida se incluyó el marcador de peso molecular de 1 kb (Gibco-BRL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estimación de la variabilidad de perfiles genómicos de los progenitores

Los perfiles de DNA observados en las plantas representantes de los progenitores Pinto Americano y Bayo Blanco a través de las huellas DAF, indicaron que el grado de variación intrapoblacional fue bastante estable en comparación con el progenitor Tepary Pinto, que presentó perfiles heterogéneos entre las plantas analizadas. Este comportamiento en las variedades probablemente se debe, en primer lugar, al alto nivel de endogamia característica del género *Phaseolus*, y en segundo lugar, lo que era de esperarse, a que son variedades comerciales cuyo origen se remonta a una sola planta obtenida después de muchas generaciones mediante autofecundación (líneas puras). El frijol Tepary a diferencia de las variedades comerciales, en México se considera como silvestre, por lo que es muy variable. En la Figura 3 se muestran perfiles DAF obtenidos con los iniciadores utilizados A-01 y el A-04. Nótese que las variedades Bayo Blanco y Pinto Americano presentan bandas de DNA comunes con ambos iniciadores (elipses), mientras que los representantes de Tepary Pinto exhiben mayor variación en los perfiles (flechas).

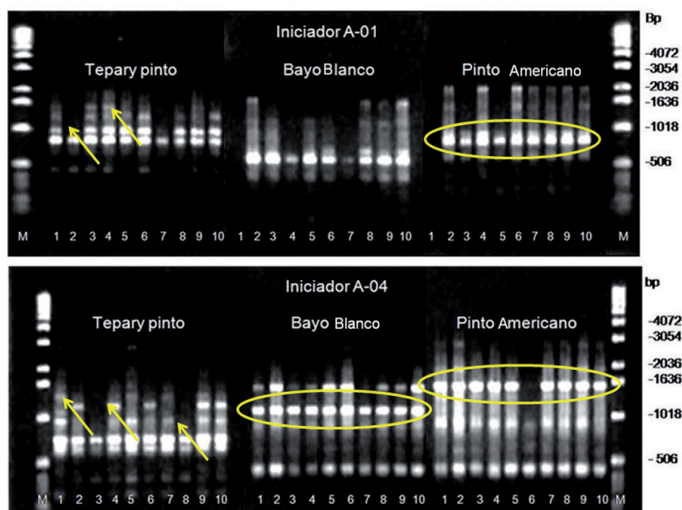


FIGURA 3. Variabilidad intrapoblacional de 10 plantas de Tepary Pinto (*Phaseolus acutifolius*) y 10 plantas de las variedades Bayo Blanco y Pinto Americano (*Phaseolus vulgaris*) estimada (DAF) con los iniciadores A-01 y A-04 en gel de agarosa 1.2%. El marcador de peso molecular (M) es de 1 kb. Nótese la uniformidad de huellas de DNA en variedades comerciales respecto al frijol Tepary.

Análisis de perfiles genéticos en la progenie F₁

Los perfiles genómicos tipo DAF demostraron que las progenies F₁ contenían material genético de los progenitores utilizados en las cruzas respectivas, tal como se observa en la Figura 4. Para la evaluación de las progenies se utilizó la mezcla de DNA de todas las plantas F₁ obtenidas en cada cruzamiento. En la cruz de Tepary Pinto x Pinto Americano (panel A, carril 5) se aprecia un fragmento de DNA de alrededor de 1,010 bp señalado con una flecha, que posiblemente se deba a una nueva recombinación genética ocurrida en la cruz. En los carriles 6 y 7 del panel A correspondientes a la cruz Pinto Americano x Bayo Blanco, existe una banda de aproximadamente 1,220 bp perfectamente definida (señalada con una flecha) heredada del progenitor Bayo Blanco (carril 2). En el panel B no se observaron fragmentos nuevos heredados a la progenie F₁. Con el iniciador A-13 (panel C) se observaron dos bandas de alrededor de 490 bp y 520 bp en los carriles 4 y 5 (señalados con flechas) en la cruz T x P claramente heredadas del progenitor Tepary.

Análisis de perfiles genómicos en la progenie F₂

Al analizar los perfiles DAF de las plantas inoculadas con el patógeno (progenitores y progenie F₂) mostrados en la Figura 5, el iniciador A-01 detectó un polimorfismo de alrededor de 1,020 bp en el carril 4 (indicado con una flecha), el cual está presente en el progenitor resistente Tepary Pinto. En los carriles 15, 16, 17 y 18, que corresponden a plantas

resistentes y susceptibles de la cruz de Pinto Americano x Bayo Blanco, se detectaron dos fragmentos polimórficos, en los carriles 16 y 18, de alrededor de 2,500 pb y 500 pb (marcados con flechas) que no están presentes en los progenitores y que están asociados a plantas resistentes. En los carriles 15 y 17, que corresponden a plantas susceptibles, se detectó un polimorfismo de alrededor de 1,300 pb asociado a susceptibilidad que también está presente en los progenitores Pinto y Bayo. Fue posible apreciar que las plantas que mostraron fragmentos de DNA asociados a este carácter procedentes de la variedad Pinto Americano, desarrollaron síntomas de pudrición de raíz y marchitez. Al realizar cortes longitudinales en el tallo de estas plantas, se observó oscurecimiento del sistema vascular y coloración marrón rojiza, característica de las infecciones obstructivas causadas por *Fop* (datos no mostrados).

Con relación al iniciador A-04, no se detectaron datos informativos; de hecho, se obtuvieron pocos fragmentos de DNA. El iniciador A-13 logró detectar un polimorfismo de alrededor de 520 pb (indicado con una flecha) en el progenitor Tepary Pinto del carril 4 que corresponde a una planta resistente a *Fop*. Este marcador también está presente en las plantas de los carriles 10 y 14, que corresponden a plantas resistentes al hongo en las cruzas de TxP. En el carril 6, que corresponde a una planta resistente del progenitor Pinto Americano, se aprecia una banda de DNA de alrededor de 1,200 pb (señalada con flecha) también presente en las muestras de los carriles 16 y 18 correspondientes a

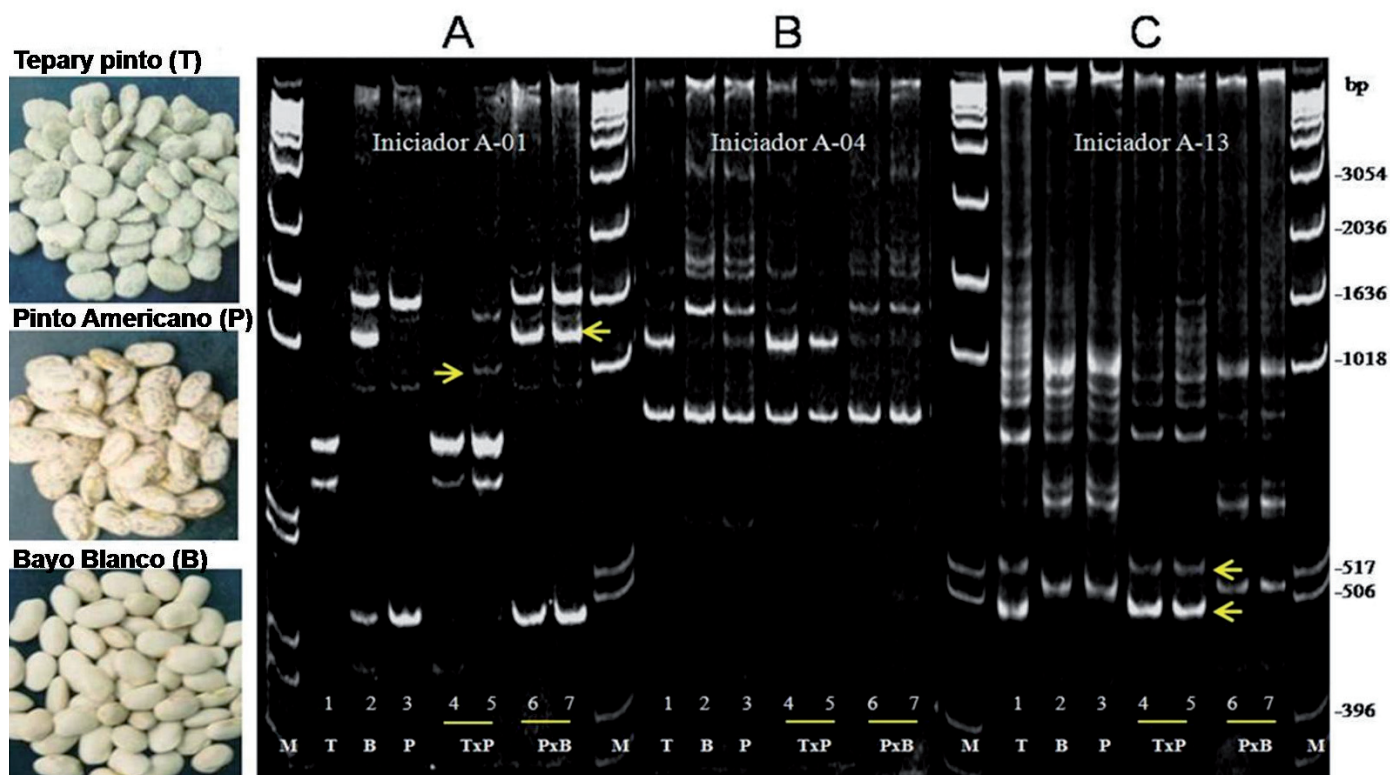


FIGURA 4. Perfiles DAF obtenidos con tres iniciadores aleatorios separados en acrilamida (panel A, B y C) y utilizados para el análisis de progenitores y plantas F₁. Progenitores Tepary Pinto (T) carril 1; Bayo Blanco (B) carril 2; Pinto Americano (P) carril 3; cruz Tepary Pinto x Pinto Americano (TxP, carriles 4 y 5); cruz Pinto Americano x Bayo Blanco (PxP, carriles 6 y 7). El marcador de peso molecular (M) es de 1 kb. En el extremo izquierdo se muestran semillas de los tres progenitores utilizados.

plantas resistentes de la cruz PxB; lo que sugiere que este marcador posiblemente también esté asociado al carácter de resistencia al hongo.

Además de la detección de fragmentos de DNA asociados a resistencia o susceptibilidad en los progenitores y progenie F_1 , fue posible detectar polimorfismos nuevos en la progenie F_1 de la cruz Tepary Pinto x Pinto Americano que no estaban presentes en los padres, y polimorfismos heredados de la variedad Bayo Blanco a la progenie de Pinto Americano x Bayo Blanco; lo que sugiere la transferencia de información genética a través de las cruza inter e intraespecíficas. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Michelmore *et al.* (1991), quienes señalan que una población F_2 provee mayor amplitud genética de la región a ser detectada, que una población derivada de una retrocruza, y que todos los ligamientos así detectados deberían ser confirmados por el análisis de poblaciones segregantes.

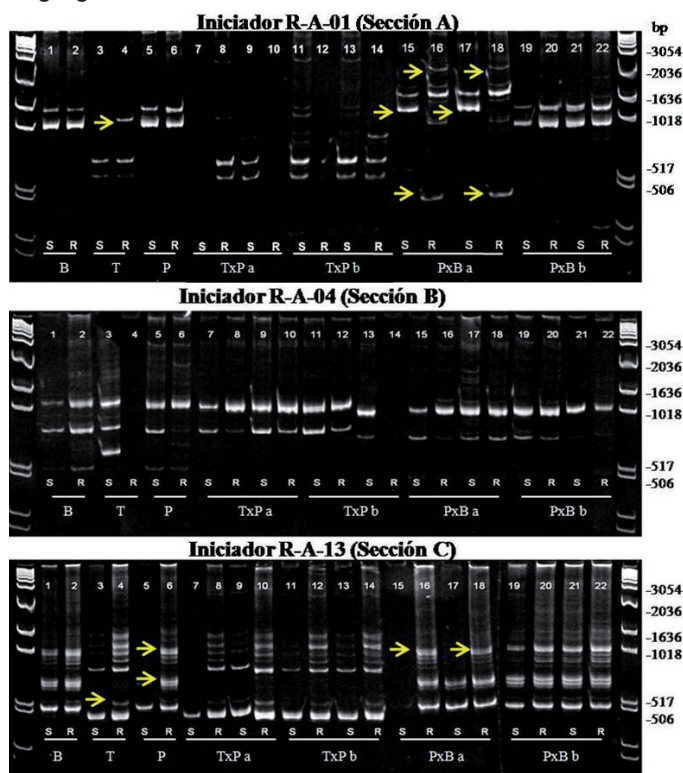


FIGURA 5. Marcadores tipo DAF de plantas susceptibles (S) y resistentes (R) a *Fop* obtenidos con los iniciadores A-01, A-04 y A-13. Progenitores: Bayo Blanco (B), carriles 1 y 2; Tepary Pinto (T), carriles 3 y 4; Pinto Americano (P), carriles 5 y 6. Plantas F_2 de Tepary Pinto x Pinto Americano (TxP, repeticiones a y b) en los carriles 7 a 14; y Pinto Americano x Bayo Blanco (PxB, repeticiones a y b) en los carriles 15 a 22. El marcador de peso molecular de 1 kb se ubica en los extremos.

Lépiz (2000) señala al frijol como un cultivo atractivo para marcar genes de resistencia, porque existen polimorfismos que permiten asociar caracteres genotípicos con respuestas fenotípicas que no están influidas por el ambiente. En la actualidad, la identificación de marcadores asociados a un carácter fenotípico se considera una herramienta fundamental para el desarrollo de la selección asistida por marcadores (MAS), debido a que pueden ser

secuencias de un gen o de una porción de DNA cuya herencia es factible de detección en la progenie. Dependiendo de la técnica empleada para su detección, los marcadores pueden ser dominantes o codominantes (Staub y Serquen, 1996); asimismo, además de carecer de efectos pleiotrópicos, son estables y no están sujetos al ambiente en donde se desarrollan las plantas. Estas propiedades hacen que estos marcadores sean extremadamente útiles comparados con los marcadores morfológicos o bioquímicos (Valadez y Kahl, 2000).

Al analizar estadísticamente los datos genómicos con los programas *NTSYS-pc*: Numerical Taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, se obtuvo el dendrograma de la Figura 6, donde se aprecian dos grupos principales; el primero comprende a todas las plantas relacionadas con las variedades comerciales Pinto, Bayo y cruza respectivas, mientras que el segundo contiene a las relacionadas con el frijol Tepary y cruza respectivas. Al interior de ambos grupos se conformaron subgrupos que representan a plantas que se comportaron como resistentes o susceptibles a *Fop*; esto sugiere que los polimorfismos asociados a estos fenotipos fueron detectados y heredados a las progenies evaluadas.

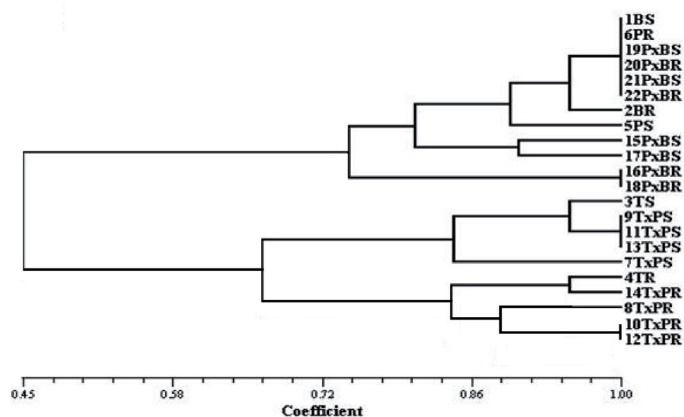


FIGURA 6. Relación genómica con huellas tipo DAF de plantas susceptibles y resistentes a *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli*. B, P y T refieren a plantas progenitoras; R y S indican plantas susceptibles o resistentes. Los individuos 1, 6, 2, 5, 3 y 4 corresponden a plantas progenitoras; 19, 20, 21, 22, 15, 17, 16 y 18 representan a los individuos analizados de las cruza Tepary pinto x Bayo Blanco; 9, 11, 13, 7, 14, 8, 10 y 12 son individuos de las cruza Tepary pinto x Pinto Americano.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que existe la posibilidad de transferir caracteres genéticos asociados a caracteres de resistencia de *Phaseolus acutifolius* a *Phaseolus vulgaris* contra la infección de *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli*, agente causal de la pudrición de raíz y marchitamiento del frijol. Con el análisis de perfiles genómicos de los progenitores y progenie segregante F_1 , se apreció la recombinación genética ocurrida a través de las cruza realizadas. La presencia de bandas de DNA específicas de los progenitores y progenie F_2 de plantas resistentes al hongo patógeno, refiere polimorfismos asociados a ambos caracteres respecto a *Fop* que fueron heredados por

los progenitores. Las plantas resistentes al patógeno en la progenie F_2 exhibieron polimorfismos nuevos como producto de la recombinación genética ocurrida. La incorporación de caracteres de resistencia a plantas susceptibles mediante el esquema desarrollado en el presente trabajo, es aplicable no sólo a la búsqueda de marcadores asociados a resistencia de fitopatógenos, sino que puede ser de utilidad para rastrear marcadores relacionados, por ejemplo, a condiciones de estrés en plantas o cultivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al M en C. Jaime B. Díaz de la Cruz y al Ing. Juan Aguilar Moreno por sus valiosas sugerencias en el escrito.

El primer autor expresa su agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) por financiar sus estudios de maestría en la especialidad de Protección Vegetal en la Universidad Autónoma Chapingo.

LITERATURA CITADA

- CAETANO A. G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. 1992. DNA fingerprinting: MAAPing out a RAPD redefinition. *BioTechnology* 10:937.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. 1983. A plant DNA miniprep version II. *Plant. Mol. Bio. Rep.* 1:19-21.
- GEFFROY, V.; CREUSOT, F.; FALQUET, J.; and SEVIGANAC, M. 1997. A family of LRR sequences in the vicinity of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*. 96: 3-4, 494-502.
- LÉPIZ I. R. 2000. Simposio: Contribución de la fitopatología al mejoramiento de los cultivos agrícolas. El caso del frijol. *Rev. Mex. Fitopatol.* 17: 54-72.
- MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSEL, R. V. 1991. Identification of marker linked to disease genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:9828-9832.
- PLAN RECTOR SISTEMA NACIONAL FRIJOL. 2009. Segunda fase: diagnóstico inicial, base de referencia, estructura estratégica. SAGARPA, Tecnológico de Monterrey, INCA Rural.
- SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Second edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, USA. 18.51-18.57 pp.
- SIAP. 2009. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola. Producción agrícola del frijol. En: http://reportes.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp Último acceso disponible: 20-junio-2009.
- STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C.; GUPTA, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* Vol. 31(5):729-741.
- STRUELENS, M. 1998. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: Current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93:581-5.
- TARLAN, B.; MICHAELS, T. E.; PAULS, K. P. 2001. Mapping genetic factors affecting the reaction to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* L. under field conditions. *Genome* 44:1046-56.
- TENOVER, F. C.; ROBERT D. A.; GOERING, R. V. 1997. The Molecular Typing Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. Vol. 18 (6): 426-439.
- VALADEZ M. E.; KAHL, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundi-Prensa México, S. A. 147 pp.
- VAN BRUGGEN, A. H. C.; WHALEN, C. H.; and ARNESON, P. A. 1986. Emergence, growth, and development of dry bean seedlings in response to temperature, soil moisture, and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76:568-572.
- WARBURTON, M. L.; CROSSA, J. 2000. Data analysis in the CIMMYT, Applied Biotechnology Center for fingerprint and Genetic Diversity Studies. CIMMYT, México, D.F. 30 pp.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- WILLIAMS, G. K.; KUBELIK, A. R.; RAFALSKI, J.; TINGEY, V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.