

2. López, S.E.; Rodríguez, R.R. Negro Cotaxtla-91 nueva variedad de frijol para las zonas tropicales de Veracruz. Folleto Técnico No. 1. CECOT. Veracruz, Ver. 8 pp.

3. Yoshii, O.K.; Rodríguez, R.J.R. 1982. Negro Huasteco-81 nueva variedad de frijol para el trópico de México (Descripción varietal). Folleto No. 1. CAECOT, Veracruz. Ver., 10 pp.

USO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO DEL FRIJOL

J. Kelly¹, S. Haley¹, L. Afanador¹, P. Miklas²

INTRODUCCION

Nuestro Programa de Mejoramiento y Genética del Frijol de la Universidad Estatal de Michigan (MSU) viene desarrollando marcadores moleculares que ayuden en la selección de características agronómicas deseables. Basset, en la Universidad de Florida, ha estado desarrollando marcadores morfológicos en frijol, encontrando éstos en un número limitado y con muchas características de la hoja presentando efectos pleiotrópicos indeseables. El trabajo de Koenig y Gepts (1989) y Sprecher (1988) sobre marcadores bioquímicos ha permitido la clasificación del frijol en dos acervos genéticos mayores, el Andino y el Mesoamericano. Sin embargo, la insuficiente variabilidad encontrada en cada acervo genético ha limitado la utilidad de las isoenzimas como marcadores. Dos grupos de investigadores trabajando en forma independiente han logrado desarrollar un mapa de genoma de frijol basado en el uso de marcadores del tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). En la selección del material genético, dos criterios fueron importantes: progenitores de origen evolutivo divergente y características agronómicas contrastantes, hecho que influyó en la selección de líneas provenientes de diferentes acervos

genéticos. Un primer grupo utilizó un tipo de *Phaseolus vulgaris* silvestre como progenitor, mientras que el otro grupo utilizó una línea mejorada con introgresión de *P. coccineus* (Vallejos et al, 1992). Nodari et al, (1992) encontraron un nivel de polimorfismo de 86% entre los acervos genéticos, siendo mucho más bajo dentro de cada acervo, correspondiendo al 49 y 62% para el andino y mesoamericano, respectivamente. Sin embargo, en un programa de mejoramiento genético aplicado, una gran proporción del germoplasma utilizado pertenece a una misma raza y, de este material afín, el nivel de polimorfismo es demasiado bajo como para ser usado en la selección dirigida por marcadores. Factores tales como, el nivel tecnológico, el tiempo, el costo y los riesgos asociados con el uso de marcadores del tipo RFLPs, limitan su uso como herramientas de fácil adopción en la selección rutinaria de características agronómicas útiles en un programa de mejoramiento.

MATERIALES Y METODOS

Recientemente se ha desarrollado un tipo nuevo de marcadores moleculares que usan la reacción en cadena de la enzima polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR), en coordinación con templates decámeros arbitrarios, generando un tipo diferente de polimorfismo dominante conocido con RAPD, por su designación en Inglés (Random Amplified Polymorphic DNA). La técnica de los RAPDs es más rápida, menos sofisticada y más apropiada para la filosofía de un programa de mejoramiento genético aplicado. Esta técnica está basada en la amplificación de segmentos arbitrarios de ADN, como resultado de la reacción en cadena de la enzima polimerasa, y un template

1 Associate Professor, Research Associate, Visiting Scientist, Crop and Soil Sciences, Mich. State Univ., E. Lansing, MI 48824.

2 Research Geneticist, Tropical Agricultural Research Station, P.O. Box 70, Mayagüez, PR 00681.

único de secuencia arbitraria (William et al, 1990). Las reacciones de PCR son ejecutadas con ADN genómico no digerido, un decámero de secuencia arbitraria (primer), NTPs, $MgCl_2$ y buffer, y la enzima TAC-polimerasa estable al calor. En nuestro laboratorio hemos modificado las condiciones del ciclo de amplificación para nuestro trabajo con ADN de frijol, utilizando 31 ciclos de 1 minuto a $94^\circ C$, 1 minuto a $35^\circ C$, 2 minutos a $72^\circ C$, y una extensión de un segundo adicional por ciclo. Los productos de la amplificación son visualizados por electroforesis, en geles de agarosa al 1.4% y conteniendo bromuro de etidio. Los marcadores RAPDs se presentan como diferencias en el patrón de bandas entre genotipos que se comportan como dominantes, a diferencia de los marcadores RFLPs que son diferencia de los marcadores RFLPs que con codominantes.

RESULTADOS Y DISCUSION

La técnica de PCR nos ha permitido estudiar dos tipos de características diferentes, siendo su uso más simple el poder "marcar" características monogénicas de resistencia a enfermedades. Líneas casi-isogénicas (NILs) desarrolladas para el gene Andino Up-2 de resistencia a roya y NILs para el bloque genético B-190 fueron seleccionadas y luego examinadas por 167 decámeros aleatorios.

Como estrategia principal para la identificación de RAPDs estrechamente ligados al locus UP-2 Miklas et al (1993) emplearon mezclas de ADN de frijol provenientes de individuos de la F_2 de la sexta retrocruza (RC_6F_2). Una mezcla de ADN consistió de tres individuos con el gen UP-2, y la otra de tres individuos sin el gen, considerándose éstas como líneas casi-isogénicas contrastantes. De un total de 931 fragmentos amplificados por 167 templetes, sólo uno fue polimórfico. Este fragmento correspondió al marcador RAPD OA14₁₁₀₀ (amplificado por el templete 5'-TCTGTGCTGG-3'). Ninguna recombinación fue observada entre OA14₁₁₀₀ y el alelo dominante Up-2 dentro de una población segregante de 84 individuos en RC_6F_2 . Este resultado sugiere un estrecho ligamiento entre el marcador RAPD OA14₁₁₀₀ y el gen de resistencia Up-2. Germoplasma de frijol de los acervos andino y mesoamericano, con y sin el alelo Up-2, fue evaluado para determinar la presencia del marcador OA14₁₁₀₀. Los resultados parecen indicar que el marcador es de origen andino, ya que todas las líneas andinas, con y sin el alelo Up-2, presentaron el marcador, mientras que éste estuvo ausente en todo el germoplasma mesoamericano, excepto en las líneas a las cuales el alelo Up-2 había sido incorporado. Estos resultados sugieren que el marcador OA141100 será más útil para piramidar el alelo Up-2 y otros genes de resistencia a la roya, en germoplasma de origen mesoamericano, donde tradicionalmente los marcadores no existen.

En un segundo experimento, y utilizando también mezclas compuestas de ADN de genotipos individuales pertenecientes a dos poblaciones segregantes, Haley et al (1993a) identificaron dos marcadores del tipo RAPDs, ambos ligados al bloque genético B-190 de resistencia a la roya. Un templete marcador RAPDs fue identificado como OF10₉₇₀ (generado por el decámero 5'-GGAAGCTTGG-3'), y se encontró estrechamente ligado (2.15 ± 1.5 cMorgans), y en fase de acoplamiento, con el bloque genético de resistencia.

El segundo marcador RAPD fue identificado como OI19₄₆₀ (generado por el decámero (5'-AATGCGGGAG-3')) y más estrechamente ligado (también en fase de acoplamiento) al bloque genético que el marcador OF10₉₇₀. Ningún recombinante fue detectado después de mapear una población de 97 individuos segregantes en la F_2 de la sexta retrocruza (RC_6F_2) con el marcador OI19₄₆₀. El análisis de una colección de genotipos de frijol resistentes y susceptibles, de los acervos genéticos andino y mesoamericano, reveló una recombinación entre el marcador OF10₉₇₀ y el bloque genético, hecho indicado por la presencia del RAPD en algunos genotipos susceptibles.

Nuestros resultados también indican una recombinación entre el marcador OI19₄₆₀ y el bloque genético, indicando que el marcador no se encuentra localizado dentro del bloque genético, sino que éste está situado entre el RAPD OF10₉₇₀ y el gen B-190. Con excepción del RAPD OA14₁₁₀₀, la piramidización basada en marcadores será posible en germoplasma andino y ciertas razas mesoamericanas de frijol, en las cuales este bloque genético de resistencia tradicionalmente no exista. El gen Ur-3 de resistencia a la roya del frijol ha sido recientemente mapeado en nuestro laboratorio (Haley et al, 1993b). Este gen fue originalmente encontrado en la variedad de frijol negro San Fernando, de origen centroamericano, y en su progenie de semilla blanca Nep-2. Selecciones avanzadas de individuos heterogéneos F_2 provenientes de una sola planta heterocigota en la F_2 conforman las líneas casi-isogénicas desarrolladas para el gen Ur-3. Mezclas de ADN extraído de plantas resistentes y susceptibles de estas líneas casi-isogénicas fueron probadas con 365 decámeros, resultando en la identificación de un marcador de tipo RAPD. El marcador encontrado fue luego identificado como OK14₆₂₀ (amplificado por el decámero 5'-CCCGCTACAC-3'), y se encuentra estrechamente ligado al gen de resistencia Ur-3. Ningún recombinante fue detectado dentro de una población F_2 de 70 individuos producto de la cruce entre las líneas casi-isogénicas antes mencionadas. Sin embargo, tres recombinantes fueron detectados entre 125 individuos de una población F_2 producto de la cruce entre dos frijoles pintos Olathe y Sierra, ubicándose el marcador a una distancia de 2.23 cM.

CONCLUSIONES

Mientras que el marcador OK 14₆₂₀ es útil para seleccionar por la presencia de genes de resistencia a la roya en los dos acervos genéticos, los marcadores OF 10₉₇₀ y OA 14₁₁₀₀ son útiles únicamente en un solo acervo genético. La selección obtenida con la ayuda de marcadores moleculares asegurará el mantener el gen Ur-3 en las líneas de cruzamiento, aunque se presente epistasis debida a la presencia de otros genes de resistencia de acción más amplia. Finalmente, la selección basada en marcadores moleculares se presenta como una alternativa a las cruces de prueba que son requeridas para piramidar genes de resistencia a la roya que exhiben epistasis. La combinación efectiva de genes de resistencia a la roya contra una raza simple, se hace difícil debido a las interacciones epistáticas que ocurren frecuentemente entre estos genes.

BIBLIOGRAFIA

1. Haley, S.D.; P.N. Miklas; J.R. Stavely; J. Byrum; J.D. Kelly. 1993a. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistant gene block in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85: (In Press).
2. -----; L.K. Afanador; P.N. Miklas; J.R. Stavely; J.D. Kelly. 1993b. Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. *Theor. Appl. Genet.* (submitted).
3. Koenig, R.; P. Gepts. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of diversity. *Theor. Appl. Genet.* 78:809-817.
4. Miklas, P.N.; J.R. Stavely; J.D. Kelly. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85: (In Press).
5. Nodari, R.O.; E.M.R. Koinange; J.D. Kelly; P. Gepts. 1992. Towards an integrated linkage map of common bean. I. Development of genomic DNA probes and levels of restriction fragment length polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 84:186-192.
6. Sprecher, S.L. 1988. Allozyme differentiation between gene pools in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with special reference to Malawian gemplasm. Ph. D. Thesis. Michigan State Univ.
7. Williams, J.G.K.; A.R. Kubelik; K.J. Livak; J.A. Rafalski; S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18:6531-6535.
8. Vallejos, C.E.; N.S. Sakiyama; C.D. Chase. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131:733-740.

ENSAYOS REGIONALES DE ADAPTACION Y RENDIMIENTO DE LINEAS DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris* L.) EN EL SALVADOR

J. Orozco¹

INTRODUCCION

La principal importancia del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) radica en constituirse en una fuente económica de proteína para la mayoría de la población salvado-

reña, tanto rural como urbana, no obstante existe escasez de variedades con una amplia adaptación y alto potencial de rendimiento, lo cual redundando en los bajos rendimientos a nivel nacional (11.5 qq/mz). En base a lo anteriormente planteado, en el presente proyecto se propuso los siguientes objetivos: Incrementar la producción de frijol en el país, evaluar el comportamiento de 12 líneas promisorias de frijol en diferentes zonas frijoleras, identificar y seleccionar líneas de frijol común con rendimientos altos y estables en los diversos ambientes de prueba.

2 Técnico Investigador, Programa de Frijol CENTA-MAG, El Salvador, C.A.