

Comparación entre la selección directa y la selección asistida por marcadores de la resistencia a bacteriosis común en judía

S. Fernández*, A. Ibeas, C. Asensio y M.C. Asensio-S.-Manzanera
ITACyL Ctra. Burgos Km 119 Finca Zamadueñas 47071 Valladolid

* ferlobso@itacyl.es

Palabras clave: MAS, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Phaseolus vulgaris*, resistencia.

RESUMEN

En los programas de mejora para resistencia a bacteriosis común, el empleo de los marcadores moleculares SCAR, SAP6, SU91 y BC420 ligados a QTLs mayores de resistencia, representa una herramienta potencial que podría implementar la eficacia en estos programas. El presente estudio tiene como objetivo confirmar la utilidad de estos marcadores en nuestras poblaciones. Para ello se han empleado 279 plantas F₁ procedentes de dos cruzamientos distintos y sus recíprocos, entre germoplasma Andino susceptible y germoplasma resistente procedente de distintos programas de mejora. Analizando los datos obtenidos tras la inoculación en F₁ y F_{1:2} y el análisis de los marcadores presentes en las plantas F₁, se ha obtenido que el 15% de las plantas F₁ evaluadas como resistentes no tenían ninguno de estos marcadores, de la misma manera que el 9,3% de las familias F_{1:2}. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de los marcadores moleculares como herramienta de selección en los programas de mejora, no obstante, se hace necesario el desarrollo de nuevos marcadores para poblaciones Andinas.

INTRODUCCIÓN

La bacteriosis común, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, es una de las principales enfermedades que afectan el cultivo de judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.) provocando una importante disminución del rendimiento en todo el mundo. Con el fin de disminuir estos efectos se llevan a cabo diversos programas de mejora que incluyen la introgresión de genes de resistencia a este patógeno. Uno de estos programas se lleva a cabo en el ITACyL.

Las principales fuentes de resistencia a bacteriosis común utilizadas en el programa provienen de líneas obtenidas a través de cruzamientos ínterespecíficos de *P. vulgaris* con *P. acutifolius* y *P. coccineus*, realizados en los distintos programas que se llevan a cabo en diferentes países. El principal problema de la utilización de estos genotipos es la falta de adaptación a las condiciones particulares de cada zona y el tipo de grano.

Hasta la fecha se han descrito los siguientes marcadores ligados a la resistencia a bacteriosis común, SAP6 (Miklas et al., 2000), BAC6 (Jung et al., 1999), SU91 (Pedraza et al., 1999), BC420 (Yu et al., 2000), R7313 y R4865 (Bai et al., 1997). Cada uno de estos marcadores está ligado a un QTL mayor diferente, asociados todos ellos con la resistencia a bacteriosis común. Recientes investigaciones concluyen que la utilización de estos marcadores puede ser utilizada para conseguir la introgresión de resistencia a esta enfermedad fuera de las poblaciones originales de mapeo (Kelly et al. 2003).

La selección en nuestro programa se ha realizado, hasta el momento, mediante la evaluación de los distintos niveles de resistencia existente en las poblaciones tras la inoculación en campo y/o invernadero con el patógeno causante de esta enfermedad. Sin embargo, el riesgo de escapes de individuos susceptibles dentro de nuestras poblaciones seleccionadas, sobretodo en ambientes no controlados, existe en mayor o menor proporción.

La utilización de la selección asistida por marcadores, como herramienta en la selección de genotipos resistentes a enfermedades, es una posibilidad que podría reducir el riesgo de escapes en nuestras poblaciones, disminuyendo el volumen de trabajo y el empleo de recursos, y aumentando la efectividad dentro de los programas de mejora.

El objetivo de este estudio es confirmar la utilidad de los marcadores SCAR de resistencia a bacteriosis común, SAP6, SU91 y BC420, en nuestras poblaciones de mejora, con el fin de utilizar como herramienta de selección la selección asistida por marcadores y complementar los dos métodos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los cruzamientos utilizados fueron:

Cruce 1: Beluga/MCA-40-4// Tremaya/4D- 50 -1 (117 individuos)

Cruce 2: Tremaya//4D- 50 -1/ Beluga/MCA-40-4 (73 individuos)

Cruce 3: Cueto / MCA-82-3 // ZJ-1192 / SITA-485-1-22 (55 individuos)

Cruce 4: ZJ-1192 / SITA-485-1-22 // Cueto/ MCA-82-3 (52 individuos)

Como se puede observar, los cruces 1 y 3 son recíprocos de los cruces 2 y 4, respectivamente. Las características de los parentales utilizados en estos cruzamientos aparecen descritas en la Tabla 1.

Las inoculaciones en F₁ se realizaron en invernadero sobre trifolios expandidos según el método de agujas múltiples. La concentración del patógeno utilizada fue 5 x 10⁸ cfu/ml en cada una de las inoculaciones, utilizando el mismo aislado de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, #659, procedente de prospecciones de campo realizadas en nuestra comunidad. La evaluación se realizó de 14 a 21 días después de la inoculación y se evaluó usando una escala de 1 a 9, donde el valor 1 representa ausencia total de síntomas (Aggour et al., 1989).

La extracción de ADN genómico se realizó en hoja trifoliada joven. Se llevó a cabo una sola reacción para los tres marcadores SCAR (SAP6, SU91 y BC420) de resistencia a bacteriosis, para cada una de las plantas F₁.

Todas las semillas obtenidas de estas plantas se sembraron en la campaña siguiente en campo, sin selección previa, planta-surco y fueron inoculadas mediante atomizador con el mismo aislado utilizado en la generación anterior. La evaluación de las familias se realizó, tomando una nota general de cada parcela.

Se calcularon los promedios entre las plantas resistentes (Índice de Severidad, IS), intermedias y susceptibles y la correlación de Pearson entre los datos de evaluación de F₁ y F_{1:2}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Analizando los datos obtenidos de la selección fenotípica (Tabla 2), vemos que los cruzamientos 1 y 2, presentan un porcentaje menor de individuos susceptibles (32 y 35%, respectivamente) que los cruzamientos 3 y 4 (63 y 48%, respectivamente). Estas proporciones se mantienen en la evaluación de las familias F_{1:2}. Estas diferencias se deben al diferente nivel de resistencia de los parentales implicados en cada uno de los

cruzamientos. Las diferencias entre los cruces 3 y 4, podrían deberse al efecto materno de la variedad local Cueto, en comparación con el resto de genotipos, que son materiales mejorados. La prueba de progenie realizada resultó positiva, ya que todas las correlaciones fueron significativas (Tabla 4).

Comparando los resultados de la selección fenotípica con la presencia o ausencia de marcadores, se puede observar que los marcadores que aparecen con mayor frecuencia fueron SAP6 y SU91, y la combinación formada por esta pareja de marcadores es también la más representada. No se han encontrado en estas poblaciones, individuos en los que aparezcan los tres marcadores simultáneamente.

La presencia de estos marcadores, en la mayoría de los casos, iba asociada con valores menores de IS (Tabla 3). Esta diferencia es más evidente cuando combinamos los marcadores SAP6 y SU91, en todos los cruzamientos (datos no mostrados). Estos datos revelan la efectividad de la selección asistida por marcadores, sin embargo, el 15% de los individuos que no mostraron ningún marcador fueron resistentes en F₁, y el 9.3% de las familias F_{1:2} hubieran sido eliminadas en F₁ por no mostrar ningún marcador.

En conclusión, para nuestra población procedente de cruces de germoplasma andino por recombinante, la selección directa se muestra más eficaz permitiéndonos distinguir entre individuos resistentes, susceptibles e intermedios. Para poder emplear en nuestras poblaciones la selección asistida por marcadores necesitaríamos, el desarrollo de nuevos marcadores ligados a los caracteres de resistencia a bacteriosis común en nuestras poblaciones y seguir estudiando la herencia cuantitativa que presenta este carácter. Estos mismos resultados han sido obtenidos por otros autores (Duncan et al. 2006).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto PIREFI (Interreg IIIA Cooperación Transfronteriza España-Portugal).

REFERENCIAS

- Aggour A.R., Coyne, D.P., Vidaver, A.K. 1989. Heritability, phenotypic correlations, and associations of the common blight disease reactions in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated by different methods with strains of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) dye. *Euphytica* 43:143-152
- Bai, Y., Michaels T.E., Pauls K.P., 1997. Identification of RAPD markers linked to common bacterial blight resistance genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Genome* 40:544-551.
- Duncan, W.R., Terán, H., Singas.P., Gilbertson R.L. 2006. Comparison of marker-assisted and direct selection for introgression of common bacterial blight resistance in common bean *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 49:11-12
- Jung G., Skrich P.W., Nienhuis J., Coyne D.P., Arnaud-Santana E., Ariyathne, H.M., Marita, J.M. 1999. Confirmation of QTL associated with common bacterial blight resistance in four different genetic backgrounds in common bean. *Crop Sci.* 39, 1448-1455.
- Kelly, J.D., Gepts, P., Miklas, P.N., Coyne, D.P. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research.* 82:135-154
- Miklas P.N., Smith J.R., Grafton K.F., Singh S.P., Jung G., Coyne D.P., 2000a. Marker-assisted breeding for pyramided resistance to common bacterial blight in common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 43:39-40.
- Pedraza F., Gallego G., Beebe S., Thome J.1997. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis común. Taller de mejoramiento de Fríjol para el siglo XXI: bases para una estrategia para América Latina. (Eds. Singh S.P., Voysest O.) CIAT, Cali, Colombia, 559 pp.
- Yu K. y Poysa V. 2000b. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficiency and economics. *Plant Breed.* 119:411-416.

Tabla 1 Características de los parentales utilizados en los cruzamientos.

Nombre	Origen	Nivel de resistencia a bacteriosis común	Grupo genético
Beluga	Universidad Michigan	Susceptible	Andino
Tremaya	ITACyL Variedad registrada)	Intermedia	Recombinante
MCA-40-4	ITACyL(Línea de mejora)	Resistente	Recombinante
4D-50-1	ITACyL(Línea de mejora)	Resistente	Recombinante
Cueto	ITACyL(Variedad local)	Susceptible	Andino
ZJ-1192	Variedad comercial	Susceptible	Andino
MCA-82-3	ITACyL(Línea de mejora)	Resistente	Recombinante
SITA-485-1-22	ITACyL(Línea de mejora)	Resistente	Recombinante

Tabla 2 Número total de plantas F₁ y familias F_{1:2}, media del Índice de severidad de la enfermedad (IS) (Evaluación en invernadero⁽¹⁾)

	F ₁	R [1, 4]	I [4,7]	S[7,9]	Total	F _{2:1}	R [1, 4]	I [4,7]	S[7,9]	Total
CRUCE 1	N	64	12	36	113	N	40	36	41	117
	IS	1,75	5	8,53	4,27	IS	1,27	5,14	7,39	3,27
CRUCE 2	N	28	16	24	68	N	23	22	28	73
	IS	1,96	4,75	8,33	4,86	IS	1,26	5,54	7,5	4,94
CRUCE 3	N	9	9	31	49	N	2	21	32	55
	IS	2,11	5	8,48	6,67	IS	1,	5,33	7,28	6,30
CRUCE 4	N	15	11	24	50	N	5	31	16	52
	IS	2,06	4,63	8,5	5,72	IS	1,8	4,83	7,18	5,27
	IS	1,8	4,83	7,18	5,27					

(1) Escala de evaluación: 1=Muy resistente, 9=Muy susceptible.

Tabla 3 Número de plantas F₁ resistentes, intermedias, susceptibles e Índice de severidad (IS) para la presencia o ausencia de los marcadores SCAR de resistencia a bacteriosis común (SAP6, SU91, BC420).

	SAP6 +	SAP6 -	SU91 +	SU91 -	BC420+	BC420 -	
CRUCE 1	Resistentes ⁽¹⁾	43	21	21	44	1	66
	Intermedias	8	4	2	9	0	7
	Susceptibles	24	12	9	28	0	37
	TOTAL/IS	75/4,32	37/4,19	42/3,90	81/4,43	1/2	110/4,25
CRUCE 2	Resistentes	15	13	4	24	0	28
	Intermedias	8	8	3	13	1	13
	Susceptibles	7	17	2	22	0	24
	TOTAL/IS	30/3,97	38/5,58	9/3,77	59/5,05	1/4	65/5,20
CRUCE 3	Resistentes	3	6	1	8	3	6
	Intermedias	2	7	0	9	1	8
	Susceptibles	5	26	2	29	2	29
	TOTAL/IS	10/5,7	39/6,92	3/5,67	46/6,74	6/4,16	43/7,02
CRUCE 4	Resistentes	7	8	1	14	0	15
	Intermedias	4	7	0	11	1	10
	Susceptibles	5	19	0	24	1	23
	TOTAL/IS	16/4,56	34/6,26	1/3	49/5,77	2/6,5	48/5,68

(1) Escala de evaluación: 1=Muy resistente, 9=Muy susceptible.

Tabla 4 Coeficiente de correlación de Pearson entre las evaluaciones obtenidas en la F₁ y las familias derivadas F_{1:2}.

	Cruce 1	Cruce 2	Cruce 3	Cruce 4
R	0.6344	0.6865	0.5244	0.6889
Prob > /r/	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
N	112	68	49	50