

COMBINACIÓN DE GENES DE FRIJOL QUE LE CONFIEREN RESISTENCIA CONTRA *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger

BEAN GENES COMBINATION CONFERRING RESISTANCE TO *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger

Víctor Montero Tavera¹, Jorge A. Acosta Gallegos², Brenda Z. Guerrero García¹, Bertha M. Sánchez García² y Mario M. González Chavira^{1*}

¹Programa de Biotecnología y ²Programa de Frijol, Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 6.5 carretera Celaya-San Miguel de Allende. Apartado Postal 112. 38110, Celaya, Guanajuato, México. Tel. 01(461)6115323.

* Autor para correspondencia (gonzalez.mario@inifap.gob.mx)

RESUMEN

U. appendiculatus es el agente causal de la roya del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), enfermedad que limita su producción en climas templados y con periodos húmedos de al menos 10 h. En México la roya ha provocado disminuciones de hasta 80 % en el rendimiento. La resistencia del frijol a la infección por *U. appendiculatus* está regulada por al menos 11 genes denominados *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-5*, *Ur-6*, *Ur-7*, *Ur-9*, *Ur-11*, *Ur-12*, *Ur-Ouro Negro*, más otros dos aún no denominados, los cuales confieren resistencia a múltiples razas en función de la combinación presente, lo cual indica que están organizados en grupos y que el tipo de resistencia es específica de razas. En esta investigación se identificaron los genes de resistencia a *U. appendiculatus* en un genotipo de frijol resistente ('PTB 08005') y dos susceptibles ('Pinto Maverick' y 'Pinto Fresnillo') con el fin de determinar la combinación específica de genes que confiere resistencia a las razas de este hongo presentes en el Estado de Guanajuato, México. Los genes presentes en la variedad resistente, pero no en las susceptibles, fueron *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-7* y *Ur-11*. Adicionalmente se identificó la presencia de genes de resistencia en seis líneas experimentales de frijol Pinto con el fin de determinar su potencial de resistencia al patógeno. La línea 117 tuvo el mismo potencial de resistencia que el genotipo 'PTB 08005'.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, genes *Ur*, marcadores moleculares, resistencia genética a roya.

SUMMARY

The responsible agent of rust in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is *U. appendiculatus*, a pathogen that reduces bean production in temperate localities with humidity periods of 10 h at least. In México

rust causes yield losses up to 80 %. Resistance of common bean to *U. appendiculatus* is regulated by at least 11 genes, namely *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-5*, *Ur-7*, *Ur-9*, *Ur-11*, *Ur-12*, *Ur-Ouro Negro*, plus two more unnamed genes. These genes confer resistance to several rust races depending on the combination present, which provide evidence that genes are arranged into clusters and that resistance is race-specific. The aim of our research was to identify the rust resistance genes contained in a rust-resistant common bean genotype ('PTB 08005') and in two rust-susceptible varieties ('Pinto Maverick' and 'Pinto Fresnillo'), in order to determine the specific gene combination conferring resistance to the *U. appendiculatus* races prevalent in the state of Guanajuato, México. The genes identified in the resistant variety, but not in the susceptible ones, were *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-7* and *Ur-11*. In addition, six experimental lines of Pinto bean type were also tested to determine their potential resistance to the fungus. The experimental line 117 had the same resistance genes as genotype 'PTB 08005'.

Index words: *Phaseolus vulgaris*, *Ur* genes, molecular markers, rust disease resistance.

INTRODUCCIÓN

La roya del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es ocasionada por el hongo basidiomiceto *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger y se presenta en ambientes de clima templado a semicálidos con periodos húmedos de al menos 10 h continuas. Se presenta en ambientes donde se siembra frijol y se ha convertido en una limitante para la producción de esta leguminosa, al causar pérdidas variables de hasta 80 %.

U. appendiculatus es un hongo genéticamente variable con numerosas razas fisiológicas, motivo por el cual el frijol se ha adaptado mediante la utilización de aproximadamente 11 genes de resistencia conocidos genéricamente como *Ur*. Araya *et al.*, (2004) demostraron que en varios países de América Central y del Sur la diversidad de las razas de roya corresponde con los núcleos de domesticación del frijol, lo que sugiere la coevolución de ambas especies. Por otra parte se ha propuesto un sistema binario (Steadman *et al.*, 2002) de genotipos de frijol que incluye seis de raza mesoamericana y seis andinos como variedades diferenciales para identificar las razas de *U. appendiculatus*. Se ha comprobado que los genes de resistencia se encuentran formando grupos y la resistencia que confieren son raza-específica; por ello diversas combinaciones de genes podrían conferir resistencia a diferentes razas (Corrêa *et al.* 2000).

En el Estado de Guanajuato, México se han observado reducciones de hasta el 80 % en el rendimiento atribuibles a la infección del patógeno y disminución de 40 a 50 % en el peso seco de planta. Los principales daños ocurren en la etapa de prefloración y floración (SIAFEG, 2009). Recientemente se registró la variedad 'Negro Guanajuato' resistente a *U. appendiculatus* (Acosta *et al.* 2008).

Se han identificado marcadores moleculares de diversos tipos, como RAPD, SCAR y STS diseñados para amplificar fragmentos específicos, asociados a la mayoría de los genes de resistencia a roya conocidos hasta la fecha, lo cual es una herramienta que permite caracterizar genéticamente el germoplasma de frijol.

El objetivo del presente trabajo fue identificar la combinación de genes de resistencia presentes en un genotipo de frijol resistente y dos susceptibles, a las razas de *U. appendiculatus* prevalentes en el Estado de Guanajuato y clasificar seis líneas experimentales de frijol con base en los genes de resistencia que poseen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionó el genotipo de frijol 'PTB 08005' cuya genealogía es 'Pinto Durango'/'Pto. Villa/MAM 48' resistente a *U. appendiculatus* con una reacción promedio de 1.0 según la escala propuesta por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (Shoornhoven y Corrales, 1987). Como variedades susceptibles se seleccionaron a 'Pinto Maverick' (Grafton *et al.*, 1997) y a 'Pinto Fresnillo' (Rosales *et al.*, 2004) cuya reacción a la roya es de 7.0 y 8.0 en la misma escala, en la que valores de 1 a 3 se asocian con genotipos resistentes, de 4 a 6 con tolerantes, y de 7 a 9 con susceptibles. Adicionalmente se incluyeron seis líneas experimentales de frijol originadas de la cruce 'Pinto Durango' x 'Pinto Saltillo'. Estas líneas se están usando en el mejoramiento de la resistencia en otros tipos de frijol ya que 'Pinto Durango' es resistente a la roya en Guanajuato.

Los nueve genotipos se sembraron durante el ciclo Primavera-Verano 2009 en condiciones de temporal o secano, en Celaya, Guanajuato. Se permitió la infección aleatoria natural del hongo y se colectaron esporas de las primeras plantas con síntomas severos para inocular los nueve genotipos.

La reacción a la roya se midió mediante la escala de Shoornhoven y Corrales (1987). En la etapa de floración se colectaron dos hojas trifolioladas de 10 plantas por genotipo, los cuales se mezclaron uniformemente para formar una mezcla compuesta. A partir de cada muestra compuesta se purificó el ADN total por el método de Dellaporta *et al.* (1983). La calidad del ADN se determinó por electroforesis en gel neutral de agarosa a 1 % y su concentración se estandarizó a 100 ng μL^{-1} . La identificación de los genes de resistencia a *U. appendiculatus* presentes en cada genotipo se llevó a cabo con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), con iniciadores correspondientes a 22 marcadores moleculares de ADN

asociados con genes de resistencia previamente reportados en la literatura (Cuadro 1).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf® (New York, USA) y se preparó una solución de 25 μL con los siguientes componentes: dNTP's 160 μM , MgCl_2 2.0 mM, buffer de reacción 0.8X, iniciadores 5 μM , Taq polimerasa 1U y ADN 30 ng. El programa de amplificación que se usó para los marcadores tipo SCAR (región amplificada caracterizada por secuencia) constó de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, 34 ciclos compuestos por 10 s a 94 °C, 40 s a la temperatura de alineamiento que varió de acuerdo al número de bases y la secuencia de los iniciadores empleados (Cuadro 1) y 2 min a 72 °C; y una extensión final de 5 min a 72 °C. El programa de amplificación para los marcadores de tipo RAPD constó de tres ciclos compuestos por 1 min a 94 °C, 1 min a 35 °C y 2 min a 72 °C; 34 ciclos compuestos por 10 s a 94 °C, 20 s a 40 °C y 2 min a 72 °C; una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel neutral de agarosa a 1.5 % con voltaje de 3 V cm^{-1} y TBE 1X como amortiguador. Las bandas obtenidas se documentaron por fotografía sobre luz ultravioleta, previa tinción por 5 min con bromuro de etidio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En campo la reacción de los materiales de frijol a la roya se determinó en el ciclo de siembra Primavera-Verano bajo condiciones de temporal, evaluación en la que el genotipo 'PTB 08005' presentó un valor de 1.0, por lo cual se clasifica como resistente, 'Pinto Maverick' tuvo un valor de 7.0 y 'Pinto Fresnillo' de 8.0, valores que los ratifican como materiales susceptibles.

De los 22 marcadores estudiados, 20 amplificaron las bandas asociadas con el gen específico de resistencia; luego se seleccionaron los marcadores que permitieron identificar patrones diferentes de genes entre los materiales resistentes y susceptibles a roya, bajo la suposición de que estas diferencias son las responsables de la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. Se observó que cinco marcadores permitieron identificar genes diferentes en los genotipos estudiados, y éstos fueron los amplificados por los iniciadores OAC-20, OPK-14, OA-14, OPAD-12, OPAF-17, y OPU-1 (Cuadro 2), los cuales están ligados a los genes *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-7* y *Ur-11*. Estos genes ya han sido caracterizados, marcados y mapeados (Miklas *et al.*, 2006).

En la Figura 1 se observa que el genotipo 'PTB 08005' presentó los cuatro genes, 'Pinto Maverick' presentó tres y 'Pinto Fresnillo' solamente uno. Esto parece explicar

los resultados de la reacción a la roya en campo, y permite establecer la asociación entre los genes presentes en el material vegetal, la reacción a la roya y la identificación de genotipos resistentes. Las dos secuencias que identifican al gen *Ur-3* amplificaron el fragmento del tamaño esperado en todos los genotipos, excepto en 'Pinto Fresnillo'. Esto indica que la presencia del gen *Ur-3* no es suficiente para proporcionar resistencia a la roya en el Estado de Guanajuato, y tampoco da resistencia la combinación de los tres genes que posee 'Pinto Maverick' (*Ur-3*, *Ur-7* y *Ur-11*), ya que resultó susceptible.

Los marcadores definidos por los iniciadores OPA-12 y OPAF-17 se ligan al gen *Ur-7*; sin embargo presentan patrones de bandas diferentes entre sí, lo cual indica la posibilidad de identificar dos alelos diferentes del mismo gen, el marcador OPA-12 presentó solamente en la variedad resistente y en una línea experimental.

El patrón de bandas de la línea experimental 117 indicó un potencial de resistencia a la roya prevalente en Guanajuato, ya que su perfil fue idéntico al del genotipo 'PTB 08005'. La línea menos prometedora fue la 127 por presentar solamente dos bandas asociadas con genes de resistencia (*Ur-3* y *Ur-7*). Las líneas 108, 125, 130 y 145 presentaron un perfil de bandas que difiere únicamente en una, la definida por el marcador OPAD-12, por lo que su reacción a la roya podría ser intermedia entre las líneas 117 y 127. Estos resultados se deberán corroborar en plantas inoculadas establecidas en campo en diversas localidades o bajo inoculación artificial en invernadero. Dada la alta diversidad genética de *U. appendiculatus*, en las diversas regiones productoras ocurren diferentes razas en forma simultánea (Araya *et al.*, 2004); por tanto, para que un genotipo sea resistente debe poseer varios genes de resistencia.

Cuadro 1. Marcadores de ADN utilizados para determinar la presencia de genes de resistencia a roya en frijol.

Gen	Marcador	Nombre	Amplicón (pb)	Tm (°C)	Secuencia	Referencia
<i>Ur-11</i>	STS	GTO 2-F	450	50	CGCACTTAGGAGCACAAA	Boone <i>et al.</i> (1999)
		GTO 2-R			TGGTGGGTCCCATATTTTG	
<i>Ur-11</i>	RAPD	OPU 1	550	47	ACGGACGTCA	Boone <i>et al.</i> (1999)
<i>Ur-11</i>	STS	U1-F	550	47	ACGGACGTCACTGTGT	Boone <i>et al.</i> (1999)
		U1-R			ACGGACGTCAAGTAAAA	
<i>GB</i>	SCAR	SCARBA 08-F	530	60	CCACAGCCGACGGAGGAG	Corrêa <i>et al.</i> (2000)
		SCARBA 08-R			GCCATGTTTTTTGTCCCC	
<i>GB</i>	SCAR	SCARF 10-R	1072	60	GGAAGCTTGGTGAGCAAGGA	Corrêa <i>et al.</i> (2000)
		SCARF 10-F			GGAAGCTTGGCTATGATGGT	
<i>GB</i>	RAPD	OX 11	630	47	GGAGCCTCAG	Faleiro <i>et al.</i> (2000)
<i>GB</i>	RAPD	OI 19	970	40	AATGCGGGAG	Haley <i>et al.</i> (1993)
<i>Ur-7</i>	RAPD	OAI 12	1000	40	GACGCGAACC	Park <i>et al.</i> (1999)
<i>Ur-6</i>	STS	SB3-F	490	50	ATACTTCAATACATCAAATG	Rivkin <i>et al.</i> (1999)
		SB3-R			GTTTAAAGAAATCTCTCCTC	
<i>Ur-7</i>	RAPD	OPA 11	500	40	ACCCGACCTG	Alzate-Marin <i>et al.</i> (2001)
<i>Ur-7</i>	RAPD	OPAD 12	550	47	AAAAGGGCGT	Alzate-Marin <i>et al.</i> (2001)
<i>Ur-7</i>	RAPD	OPAF 17	900	47	TGAACCGAGG	Alzate-Marin <i>et al.</i> (2001)
<i>Ur-7</i>	RAPD	OPAB 16	850	47	CCCGGATGGT	Alzate-Marin <i>et al.</i> (2001)
<i>Ur-7</i>	RAPD	OPAD 09	550	40	TCGCTTCTCC	Alzate-Marin <i>et al.</i> (2001)
<i>Ur-3</i>	RAPD	OPK 14	620	40	CCCCTACAC	Alzate-Marin <i>et al.</i> (2001)
<i>Ur-3</i>	RAPD	OAC 20	490	47	ACGGAAAGTGG	Alzate-Marin <i>et al.</i> (2001)
<i>Ur-3</i>	RAPD	OG 15	1600	40	ACTGGGACTC	Kelly y Miklas (2009)
<i>Ur-3</i>	RAPD	OL 16	1000	40	AGGTTGCAGG	Kelly y Miklas (2009)
<i>Ur-6</i>	RAPD	OV 12	950	40	ACCCCCACT	Kelly y Miklas (2009)
<i>Ur-4</i>	RAPD	OA 14	100	40	TCTGTGCTGG	Kelly y Miklas (2009)
<i>Ur-5</i>	SCAR	SI 19-F	550	60	AATGCGGGAGATATTAAAAGGAAA	Mellotto y Kelly (1998)
		SI 19-R				
<i>Ur-9</i>	RAPD	OPJ13	1800	47	CCACACTACC	Alzate-Marin (2001)

Tm = Temperatura de alimento de los indicadores

Cuadro 2. Marcadores de ADN que definen la combinación de genes de resistencia a roya en variedades y líneas de frijol.

OLIGO	GEN	PTB 08005	Maverick	Fresnillo	117	108	125	145	130	127
OPK-14	<i>Ur-3</i>	P	P		P	P	P	P	P	P
OA-14	<i>Ur-4</i>	P		P	P	P	P	P	P	
OPAD-12	<i>Ur-7</i>	P			P					
OPAF-17	<i>Ur-7</i>	P	P		P	P	P	P	P	P
OPU-1	<i>Ur-11</i>	P	P		P	P	P	P	P	

P = Marcador presente.

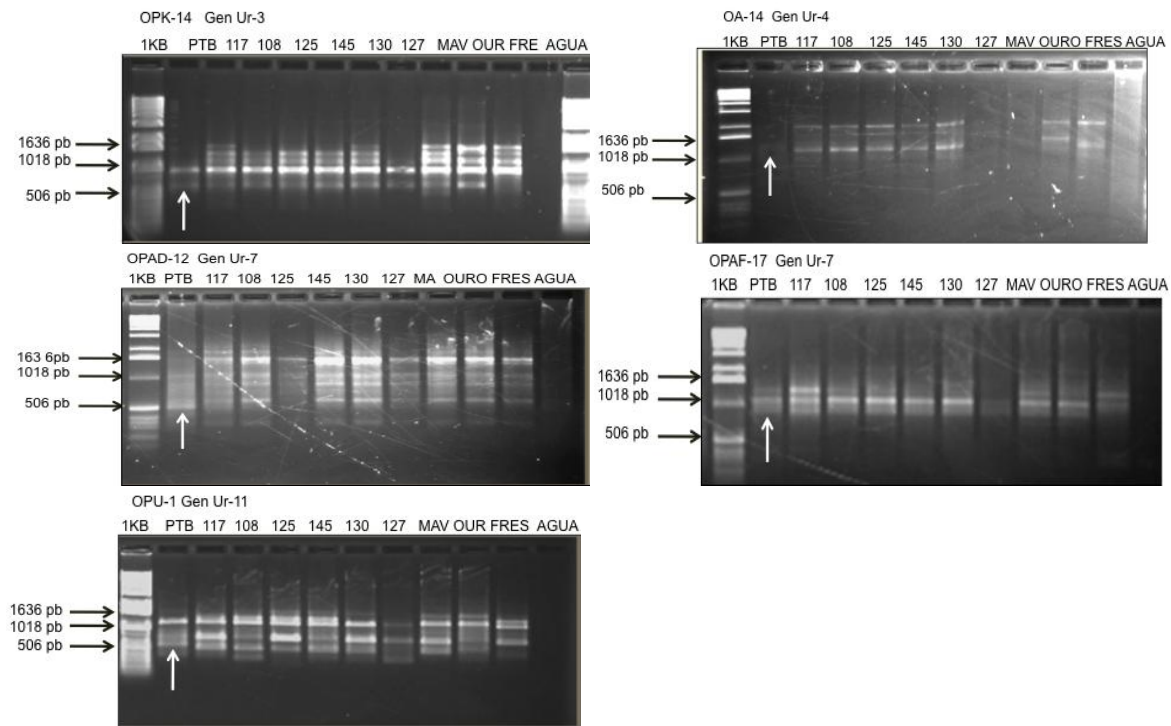


Figura 1. Geles de agarosa a 1.5 % que muestran los productos de PCR asociados con cada marcador. La flecha indica el fragmento específico asociado con cada gen de resistencia a roya. En la parte superior de cada gel se anota el marcador utilizado.

Los resultados obtenidos en la reacción a *U. appendiculatus* de los diferentes materiales y el perfil genético de cada uno, permite establecer la relación entre las combinaciones de genes de resistencia y la reacción a este hongo en condiciones de campo. Los dos genotipos resistentes poseen los genes *Ur-3*, *Ur-4*, *Ur-7* y *Ur-11*. El uso de sus marcadores asociados puede incrementar la eficiencia de los programas de mejoramiento de frijol para la obtención de nuevas variedades resistentes por medio de selección asistida por marcadores moleculares. Por otra parte, será posible aplicar este modelo para la identificación de genotipos resistentes para las razas de roya prevalentes en otras regiones del país.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta G J A, H F M Mendoza, G B Aguilar, E G Esquivel, G R Rodríguez, M H S Guzmán (2008) Negro Guanajuato, nueva variedad de frijol para el centro de México. *Agric. Téc. Méx.* 34:107-111.
- Alzate-Marin A L, M R Costa, A Sartorato, C A Rava, E Gonçalves de Barros and M M Alves (2001) Use of markers as a tool to investigate the presence of disease resistance genes in common bean cultivars. *Crop Breed. Appl. Biotech.* 1:125-133.
- Araya C M, T A Alleyne, J R Steadman, K M Eskridge, D P Coyne (2004) Phenotypic and genotypic characterization of *Uromyces appendiculatus* from *Phaseolus vulgaris* in the Americas. *Plant Dis.* 88:830-836.
- Boone W E, J R Stavely, N Weeden (1999) Development of a sequence-tagged site (STS) marker for *Ur-11*, a gene conferring resistance to the bean rust fungus, *Uromyces appendiculatus*. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 42:33-34.
- Corrêa R X, M R Costa, P I Good, V A Ragagnin, F G Faleiro, M A Moreira, E Gonçalves de Barros (2000) Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. *Crop Sci.* 40:804-807.
- Dellaporta S L, J Wood, J B Hicks (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Faleiro F G, V W Santos, V A Ragagnin, R X Corrêa, M M Alves, E Gonçalves de Barros (2000) RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. *Genet. Mol. Biol.* 23:399-402.
- Haley S D, P N Miklas, J R Stavely, J Byrum, J D Kelly (1993) Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor. Appl. Gen.* 86:505-512.
- Kelly J D, P N Miklas (2009) The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. MSU Dry Bean Breeding and Genetics Program. Michigan State University. East Lansing, MI. Disponible en: <http://www.css.msu.edu/bean/Markers.cfm>. (Enero 2010).
- Mellotto M, J Kelly (1998) SCAR markers linked to major disease resistant genes in common bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 41:64-65.
- Miklas P N, J Hu, N J Grünwald, K M Larsen (2006) Potential application of TRAP (Targeted region amplified polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. *Crop Sci.* 46:910-916.
- Park S O, D P Coyne, J Steadman (1999) Molecular markers linked to the *Ur-7* gene conferring specific resistance to rust in common bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 42:31-32.
- Rivkin M I, C E Vallejos, P E McClean (1999) Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome* 42: 41-47.

- Rosales S R, J A Acosta G, J S Muruaga M, J M Hernández C, G Esquivel E, P Pérez H (2004) Variedades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico Num. 6. Campo Experimental Valle de Mexico. SAGARPA-INIFAP-CIRCE, 148 p.
- Shoonhoven A van, M A Pastor-Corrales (1987) Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 57 p.
- Steadman J R, M A Pastor-Corrales, J S Beaver (2002) An overview of the 3rd bean rust and 2nd bean common bacterial blight International Workshops, March 4-8, 2002. Pietermaritzburg, South Africa. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 45: 120-124.
- SIAFEG Sistema de Alerta Fitosanitaria del Estado de Guanajuato (2009) Monitoreo de esporas de roya de frijol (*Uromyces phaseoli*). Sistema de Alerta Fitosanitaria del Estado de Guanajuato. Celaya, Gto. Disponible en: www.siafeg.com. (Enero 2010).