



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# Desarrollo de marcadores SNPs ligados a QTLs mayores para resistencia a bacteriosis común (*Xanthomonas axonopodis*) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Alvaro Soler Garzón

Universidad Nacional De Colombia  
Facultad De Ciencias Agropecuarias  
Palmira, Colombia

2014

# Desarrollo de marcadores SNPs ligados a QTLs mayores para resistencia a bacteriosis común (*Xanthomonas axonopodis*) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Alvaro Soler Garzón

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Magister en Ciencias Agrarias, Línea de Investigación Protección de cultivos

Dirigido por:

Ph.D, Bodo Raatz

Ph.D, Carlos Germán Muñoz

Universidad Nacional De Colombia  
Facultad De Ciencias Agropecuarias  
Palmira, Colombia

2014

*Dedico este trabajo a mis padres por sus buenos cuidados, consejos y todos sus sacrificios. Sin duda, ellos son los pilares de mi vida.*

*A mis hermanas Cris, Jaky y Mary por su compañía en la niñez y por todos los buenos momentos que vivimos y están por vivir.*

*A mi sobrina Isabella, que con su alegría y ganas de conocer el mundo me hacen no olvidar que aún siguen muchos sueños por vivir*

# Agradecimientos

El autor expresa sus agradecimientos a:

Bodo Raatz y Carlos German Muñoz, directores de mi trabajo de grado, por su compromiso y guía durante la realización en este trabajo.

Dr. Steve Beebe, por ser una inspiración y un modelo a seguir en mi vida profesional.

Ing. Carlos Jara y su equipo de trabajo por todo su apoyo y disposición para el desarrollo de este trabajo.

Mis compañeros del LGMF, Hector F. Buendia, Victor M. Mayor, Lucy Milena Díaz, Paulo Izquierdo, Federico Velásquez, Juanita Gil y Claritza Muñoz, por su colaboración y guía en el transcurso del desarrollo de este trabajo. A mis compañeros del Monasterio de Frijol, Agobardo Hoyos y Alcides Hincapié por su colaboración y paciencia.

## Resumen

Bacteriosis común de frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una de las mayores enfermedades que afectan la calidad y producción en el mundo. Resistencia a bacteriosis ha sido transferida de *Phaseolus acutifolius* a *Phaseolus vulgaris*. En estudios previos se han determinado dos marcadores SCAR asociados a dos QTLs mayores para resistencia a bacteriosis, sin embargo estos marcadores presentan dificultades en selección asistida. Para identificar marcadores estrechamente ligados a estas regiones y verificar su ubicación en los cromosomas, 38 marcadores SNPs y SSRs fueron mapeados en una población de 217 líneas híbridas recombinantes de una cruce de VAX6 x MAR1. QTL SU91 fue mapeado en el cromosoma 8 en una región de 12.72 cM y QTL SAP6 en el cromosoma 10 en una región de 34.46 cM. Para analizar en un sistema libre de electroforesis, 2 marcadores SNPs se identificaron con un total de 49.03% de variación fenotípica, ubicados a 115,905 pb del SCAR SU91 y otro a 81,252 pb del SCAR SAP6. Estos marcadores podrían ser usados en mapeo fino para búsqueda de genes o selección asistida por marcadores.

Palabras claves: *Phaseolus*, bacteriosis, SSR, SNP, QTL y resistencia.



## Abstract

Common bacterial blight (CBB) of common bean (*Phaseolus vulgaris*) is one of the major diseases that affect the quality and yield in the world. CBB resistance has been transferred from *Phaseolus acutifolius* to *Phaseolus vulgaris*. Previous studies have identified two SCAR markers associated with two major QTL for resistance to CBB, but these markers have had difficulties in assisted selection. To identify markers tightly linked to these regions and to verify the chromosome location, 38 SNPs and SSR markers were mapped in a population of 217 recombinant hybrid lines from a cross of VAX6 x MAR1. SU91 QTL was mapped on chromosome 8 in a region of 12.72 cM and SAP6 QTL on chromosome 10 in a region of 34.46 cM. To analyze by an electrophoresis-free system, two SNPs markers were identified with a total of 49.03 % of phenotypic variation. One SNP was located to 115.905 bp from SU91 QTL and the other one to 81.252 bp from SCAR SAP6. These markers could be used for fine mapping to find genes or for marker-assisted selection.

**Key Words:** *Phaseolus*, Common bacterial Blight, SSR, SNP, QTL and resistance.





# Contenido

Resumen.....	V
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	XI
INTRODUCCION.....	1
1. Revisión bibliográfica .....	3
1.1. Generalidades del cultivo de frijol.....	3
1.1.1. Descripción botánica.....	3
1.1.2. Origen, distribución y domesticación.....	5
1.1.3. Genética y Citogenética .....	7
1.1.4. Importancia del cultivo.....	8
1.1.5. Problemas de Producción .....	10
1.2. Bacteriosis Común .....	12
1.2.1. Generalidades de la enfermedad de la Bacteriosis común.....	12
1.2.2. Epidemiología .....	12
1.2.3. Sintomatología .....	13
1.3. Fuentes de resistencia genética a Bacteriosis.....	13
1.4. Marcadores Moleculares en la resistencia a Bacteriosis y su aplicación en el mejoramiento.....	14
1.4.1. SCARs .....	14
1.4.2. Microsatélites o SSRs (Simple sequence repeats) .....	16
1.4.3. SNPs.....	16
2. Objetivo.....	19
2.1. Objetivo General .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
3. Materiales y métodos .....	21

3.1.	Ubicación .....	21
3.2.	Material Vegetal .....	21
3.3.	Evaluación fenotípica .....	22
3.3.1.	Preparación del Inoculo. ....	22
3.3.2.	Inoculación de <i>Xanthomonas</i> .....	22
3.3.3.	Evaluación de la inoculación con <i>Xanthomonas</i> .....	23
3.4.	Extracción de ADN.....	25
3.5.	SCAR.....	25
3.6.	Microsatélites.....	26
3.7.	SNPs .....	28
3.8.	Mapeo genético .....	30
3.9.	Análisis de QTL .....	30
4.	Resultados y discusión .....	31
4.1.	Evaluación fenotípica de la resistencia a Bacteriosis .....	31
4.2.	Análisis de Marcadores Moleculares.....	32
4.2.1.	Marcadores SCAR.....	32
4.2.2.	Marcadores Microsatélites .....	34
4.2.3.	Análisis de marcadores SNPs.....	39
4.3.	Construcción del mapa genético .....	45
4.4.	Identificación de QTLs relacionados a resistencia a bacteriosis.....	50
4.5.	Marcadores SNPs ligados a QTLs para resistencia a bacteriosis .....	53
5.	Conclusiones .....	59
6.	Bibliografía.....	61

## Lista de Figuras

Figura 1. Hábitos de crecimiento de la planta de frijol (Debouck, D. G. y Hidalgo 1985) ..	5
Figura 2. Semilla de los parentales de la población RIL VAX6 x MAR1.....	21
Figura 3. Inoculación de material vegetal a través del método de agujas múltiples .....	23
Figura 4. Escala visual de síntomas producidos por <i>Xanthomonas</i> en frijol común. ....	24
Figura 5. Principio del método. ADN genómico es amplificado en una reacción multiplex con dos primers forward alelo específicos y un primer reverso común. ....	29
Figura 6. Distribución de frecuencia del grado de resistencia a Bacteriosis en una población RIL de la cruce de VAX6 x MAR1.....	32
Figura 7. Patrón de amplificación del marcador dominante SU91 en materiales de <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i> .....	32
Figura 8. Patrón de amplificación del marcador dominante SAP6 en materiales de <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i> .....	33
Figura 9. Patrones de segregación de algunos de los SSR mapeados en la población de RIL's VAX6 x MAR1 mostrando diferentes productos de amplificación analizados en geles teñidos en solución con plata.....	35
Figura 10. Búsqueda de BAC-SU91. A. Gm14 y BAC identificados. B. PCR con primers específicos en BACs. ....	36
Figura 11. Contig 441 del mapa físico de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	37
Figura 12. Curvas de disociación a través de la técnica de Tm-Shift. A la izquierda, el primer SC76559 y a la derecha el primer sc70203 ambos probados en los parentales VAX6 (línea azul) y MAR1 (línea Roja).....	45
Figura 13. Marcadores SSR y SNP mapeados en los GL 8 y 10 construidos a partir de Líneas Híbridas Recombinantes F9 derivadas de una cruce mesoamericana de VAX6 x MAR1.....	46
Figura 14. Segregación de los 38 marcadores moleculares polimórficos en los parentales VAX6 x MAR1. ....	47

Figura 15. Integración del mapa físico (Valores en cM) y mapa genético (Valores en cM) de los cromosomas 8 y 10 del genoma de frijol. Mapa físico basado en el genoma del genotipo G19833. ....	49
Figura 16. QTL identificados en la población RIL VAX6 x MAR1 asociados a resistencia a bacteriosis. En rojo región QTL asociada a resistencia a la cepa <i>X. fuscans</i> y en azul región QTL asociada a <i>X. axonopodis</i> . ....	51
En rojo se muestra alelos del genotipo resistente VAX6 y en azul alelos del genotipo susceptible MAR1, junto con sus respectivos valores de incidencia de la enfermedad por recombinante y por cepa.....	53
Figura 18. Genotipaje con cambio de Tm. A. Marcador SNP g91004686. B. Marcador SNP CBB8. En azul genotipo VAX6 y en Rojo genotipo MAR1.....	54
Figura 19. Comparación de tiempo de corrida de los métodos por genotipaje por SNPs y SCAR.....	56

## Lista de Tablas

Tabla 1. Acervo, raza, faseolina y haplotipo de ADN de cloroplasto, características de cada raza domesticada de <i>Phaseolus vulgaris</i> (Acosta-Gallegos et al. 2007) .....	7
Tabla 2. Problemas de producción del cultivo de frijol común, incidencia y porcentaje de perdida en rendimiento (Singh 1999).....	11
Tabla 3. Escala general para evaluar la reacción de germoplasma de frijol para patógenos fúngicos y bacterianas. Tomado de van Schoonhoven & Pastor-Corrales (1987).....	24
Tabla 4. Secuencias de primers de marcadores SCAR para detección de los QTL mayores SU91 y SAP6 para resistencia a Bacteriosis.....	26
Tabla 5. Segregación de los SCAR ligados a los QTLs mayores relacionados a la resistencia a Bacteriosis.....	33
Tabla 6. Marcadores Tipo SSR diseñados a partir de secuencias terminales de BAC en el cromosoma 8 de frijol en la región QTL SU91. ....	38
Tabla 7. Primers diseñados para secuenciación de ampliaciones ligados a las regiones QTL SU91 y SAP6. ....	40
Tabla 8. Marcadores Tipo SNPs diseñados a partir de ampliaciones secuenciados de las regiones QTL SU91 y SAP6 asociadas a resistencia a Bacteriosis. ....	41
Tabla 9. Marcadores Tipo SNPs diseñados a partir de secuencias del convenio GCP y TOG ligados a regiones QTL SU91 y SAP6 para resistencia a Bacteriosis. ....	42
Tabla 10. QTL asociados a resistencia a bacteriosis, mediante análisis de mapeo por intervalo compuesto en QTL-cartographer para la población RIL VAX6 x MAR1.....	50
Tabla 11. Respuesta de genotipos de frijol a bacteriosis y determinación de genotipo a través de marcadores SNP ligados a los QTL mayores SU91 y SAP6. ....	55



## Introducción

El frijol es una de las más importantes leguminosas para consumo humano en el mundo ya que provee entre 20 y 25% de proteína y es fuente primaria de carbohidratos, fibra, minerales y ciertas vitaminas (Gepts et al. 2008; W. J. Broughton et al. 2003). Muchas son las enfermedades que atacan y hacen ver disminuida la producción de frijol, como es el caso de Bacteriosis común, producida por *Xanthomonas axonopodis* pv. Faseoli, siendo esta una de las enfermedades bacterianas más destructivas del frijol en el mundo.

Los cultivos de frijol producidos por agricultores de bajos recursos son más vulnerables al ataque de enfermedades y plagas de insectos y estrés abióticos como la sequía y la baja fertilidad del suelo. Por lo anterior el estrés biótico y abiótico siguen representando las principales limitaciones en la producción de la subsistencia y el rendimiento económico de frijol común. El desarrollo de cultivares con resistencia a estos tipos de estrés es un objetivo principal en los programas de mejoramiento de frijol a través del mundo (Miklas y Sinhg, 2007).

Bacteriosis del frijol, causado por *Xanthomonas*, es una de las enfermedades más destructivas que causan pérdidas en más del 40% de la producción en frijol (Miklas et al. 2006). Tres regiones QTLs se han asociado con resistencia a dicha enfermedad (Pedraza et al. 1997; Yu et al. 1998; Miklas et al. 2003) y para validar la presencia de QTL en líneas seleccionadas resistentes por selección fenotípica.

Dos de estas regiones son los QTLs mayores SU91 y SAP6 las cuales han explicado entre el 30 y 45% de la variación fenotípica a esta enfermedad, a través de los marcadores SCARs SU91 mapeado en el cromosoma 8 y SAP6 mapeado en el cromosoma 10 de frijol (Miklas et al. 2003). Sin embargo, se ha observado en algunos estudios la falta de efecto de SAP6 hacia la resistencia a bacteriosis que podría ser

debido a la recombinación entre el marcador SAP6 y el QTL de resistencia y el bajo rendimiento de producción de materiales evaluados con el SCAR SU91 (Vandemark et al. 2009). Además de los errores que estos pueden generar en selecciones de recombinantes por ser marcadores dominantes.

El concepto de selección asistida por marcadores es atractivo para mejorar cultivares con resistencia a bacteriosis en donde se podría disminuir los costos y tiempos de selección. Muchos han sido los marcadores que se han usado para seleccionar materiales resistentes desde marcadores STS, SCAR y SSR, todos con métodos de visualización a través de geles y colorantes.

Actualmente con la liberación del genoma de frijol se abre una gran oportunidad para el aprovechamiento de secuencias que se encuentren en las regiones de resistencia a bacteriosis, adecuándose para la identificación de polimorfismos de nucleótidos que aporten información de la variación fenotípica del material. Es allí donde la eficiencia entra a jugar un papel fundamental para el desarrollo de nuevos marcadores que sean reproducibles y generen la menor cantidad de errores al momento de realizar selecciones de material en generaciones tempranas.

Los marcadores SNPs son versátiles en cuanto a métodos de identificación de polimorfismos y visualización en sistemas libres de electroforesis. Además, de su utilidad en mapeo fino, mapeo asociativo, análisis de loci de rasgos cuantitativos y selección asistida por marcadores.



# 1.Revision bibliografica

## 1.1. Generalidades del cultivo de frijol

### 1.1.1.Descripción botánica

El frijol pertenece a la familia Leguminosae, cuenta con 643 géneros (18000 especies) agrupados en 40 tribus (W J Broughton et al. 2003). El género *Phaseolus* está integrado por unas 70 especies que han contribuido al bienestar humano con cinco cultígenos domesticados en tiempos precolombinos: *P. vulgaris* L, *P. dumosus* Macfad., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray, y *P. lunatus* L. El género se originó en el continente americano y un gran número de sus especies se encuentra en Mesoamérica y en la parte Andina de Suramérica. Entre la cinco especies domesticadas, *P. vulgaris* aporta más del 90% de los cultivos en todo el mundo y es la leguminosa de grano más ampliamente consumida en el mundo (Acosta-Gallegos et al. 2007).

*Phaseolus vulgaris* L. es el prototipo del género *Phaseolus*, su nombre científico fue asignado por Lineo en 1753, pero además posee varios nombres vulgares como poroto, alubia, judía, Frixos, nuña, habichuela, vainita, caraota y Feijao (Debouck, D. G. y Hidalgo 1985).

La clasificación taxonómica del frijol común es la siguiente (Gepts 2001):

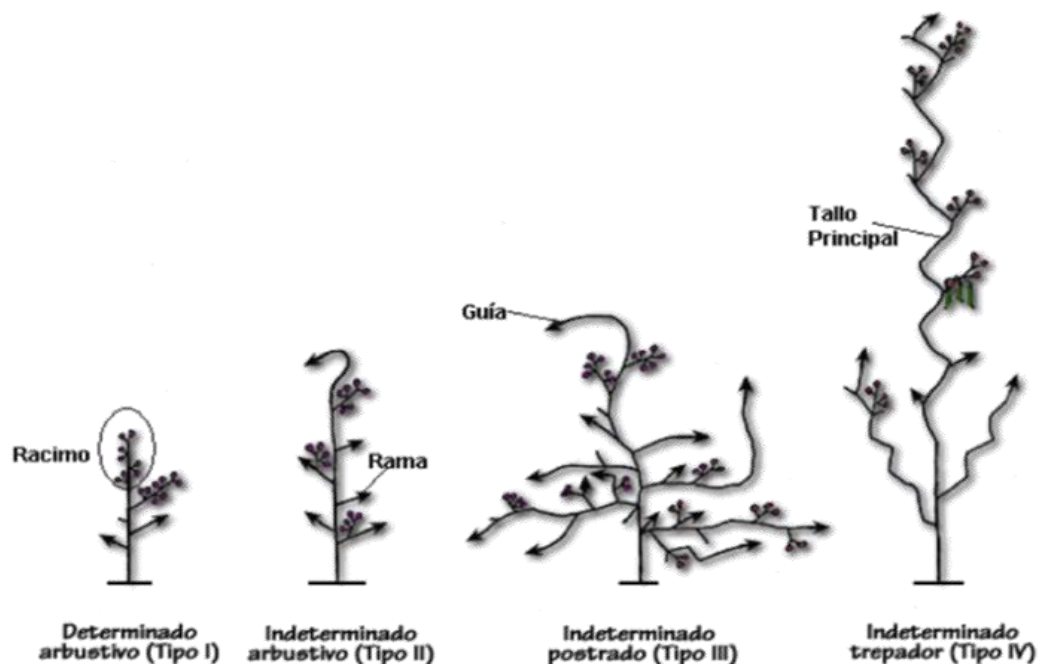
Orden	Rosales
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Papilionoideae
Tribu	Phaseolae
Subtribu	Phaseolinae
Genero	Phaseolus
Especie	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

El tallo es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular, debido a pequeñas corrugaciones de la epidermis. Las ramas se desarrollan a partir de un complejo axilar que generalmente está formado por tres yemas visibles desde el inicio de su desarrollo. En el frijol existen hojas simples, que aparecen en el segundo nudo del tallo y se forman en la semilla durante la embriogénesis, y hojas compuestas, siendo las que perduraran a lo largo del ciclo (Debouck, D. G. y Hidalgo 1985).

La inflorescencia es a menudo un pseudoracimo con varias flores de donde solamente algunas pocas producen vainas, una excepción es la habichuela que produce abundantes vainas. Las flores de Papilionáceas pueden ser rosas, purpúreas, blancas o bicolors con o sin rayas y en la base exterior lleva un estandarte muy pronunciado. Las bractéolas sésiles a menudo son más grandes en genotipos mesoamericanos que en andinos y pueden ser cordado, aovado, o lanceolado. El cáliz de bilabiado es pequeño (<5 mm) con los dos dientes superiores unidos. Las flores son cleistogamas y normalmente se autopolinizan (< 1% es por cruzamiento) (Miklas & Singh 2007).

Según el hábito de crecimiento, las plantas de frijol pueden ser de crecimiento determinado o indeterminado, de acuerdo con las características de la parte terminal del tallo y de las ramas. Si al inicio de la fase reproductiva el tallo y las ramas terminan en un racimo, la planta es de hábito determinado; si termina en un meristemo vegetativo, es de hábito indeterminado. Según estudios hechos por el programa de frijol en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, se consideró que los hábitos de crecimiento podrían ser agrupados en cuatro tipos principales: Tipo I, determinado arbustivo; Tipo II, indeterminado arbustivo; Tipo III, indeterminado postrado; Tipo IV, indeterminado trepador (Debouck, D. G. y Hidalgo 1985) (Figura 1).

Figura 1. Hábitos de crecimiento de la planta de frijol (Debouck, D. G. y Hidalgo 1985)



En el frijol las semillas se encuentran contenidas en la vainas o legumbres, las vainas son de diversos colores verde, amarillo, morado, blanco o plateado de acuerdo al estado de madurez de la misma y dependiendo de la variedad. La presencia de fibra en las suturas de las dos valvas determina la dehiscencia que pueden ser de tipo pergaminoso, coriáceo o carnosos. Las vainas maduras presentan generalmente de cinco a ocho semillas (Miklas & Singh 2007).

Las semillas presentan un alto contenido de proteínas, alrededor del 22% y además, presentan una amplia variación de color (blanco, rojo, crema, negro, café, etc.) y de forma (cilíndrica, de riñón, esférica, o redonda, elíptica u ovoide) y de brillo (brillante, semibrillante y opaco). La combinación de colores también es muy frecuente (jaspeado, moteado, punteado, rayado y venación). La variabilidad de los caracteres externos de la semilla se tienen en cuenta para la clasificación de las variedades de frijol (W J Broughton et al. 2003; Singh 2001; Vallejos et al. 1992)

### 1.1.2. Origen, distribución y domesticación

El frijol (*Phaseolus spp.* L.) es uno de los cultivos más antiguos del nuevo mundo, es diverso en términos de métodos de cultivo, usos, adaptación, y variabilidad

morfológica (W J Broughton et al. 2003). Desde sus regiones de origen y domesticación en los Andes suramericanos, América Central y México, el frijol común se ha extendido a otras partes de las Américas (de unos 35° a >50° latitud N y desde el nivel del mar a >3000 m de altitud). Posteriormente, se introdujo en África, Asia, Europa y Oceanía (Miklas & Singh 2007). El frijol común es un cultivo no céntrico que ha tenido múltiples domesticaciones de sus poblaciones silvestres (Chacón S et al. 2005; Chacón S. et al. 2007). Los híbridos entre frijoles silvestres y cultivados son plenamente fértiles y no existen barreras importantes para la introgresión y el intercambio de alelos y QTLs (de sus siglas en inglés, *Quantitative trait locus*) favorables (Miklas & Singh 2007)

Un centro de domesticación está situado en Mesoamérica, en hábitats méxicos, entre 700 y 2000 msnm, donde algunas poblaciones silvestres presentan semilla pequeña con faseolina tipo "S" y grandes bractéolas. Estas poblaciones dieron origen, a través de la domesticación, plantas con mayor tamaño de semilla que los silvestres y con el mismo tipo de faseolina y grandes bractéolas. El otro centro de domesticación se encuentra en la cordillera de los Andes, donde las poblaciones silvestres actuales presentan semillas más grandes, con predominio de faseolina tipo "T" y bractéolas pequeñas (Cruz et al. 2005).

La reserva genética de las especies parece estar organizada en cuatro razas Mesoamericanas y tres razas Andinas (Tabla 1) (Beebe et al. 2001; Blair et al. 2007; Díaz & Blair 2006).

Tabla 1. Acervo, raza, faseolina y haplotipo de ADN de cloroplasto, características de cada raza domesticada de *Phaseolus vulgaris* (Acosta-Gallegos et al. 2007)

ACERVO Y RAZA	FASEOLINA	HAPLOTIPO DE ADNcp	CULTIVARES CARACTERÍSTICAS
ANDINO			
Nueva Granada	T	C	Jalo EEP558, California Dark Red Kidney
Chile	C, H	C	Coscorrón, Blanco Español, Frutilla
Perú	T, C, H	C, K	Cargamanto, Bolón Bayo, Nuña Coneja
MESOAMERICANO			
Mesoamérica	S, Sb, B	K, L, I, J	Jamapa, ICA Pijao, Carioca, Black Turtle Soup, Vista, Tío Canela
Durango	S, Sd	K, L, J	Maverick, Sierra, Pinto Villa, Bayo Blanco
Jalisco	S	L, K	Garbancillo Zarco, Rosa de Castilla, Flor de Junio Marcela, Negro San Luís
Guatemala	S	I	Colorado de Teopisca, Bolonillo

### 1.1.3. Genética y Citogenética

*P. vulgaris* y una gran mayoría de otros cultivos y especies silvestres de *Phaseolus* son organismos diploides con 11 cromosomas ( $2n = 2X = 22$  cromosomas). Los cromosomas de *P. vulgaris* son extremadamente pequeños y de similar morfología (W J Broughton et al. 2003; Gepts et al. 2005; Fonsêca et al. 2010; Miklas & Singh 2007). Los cromosomas mitóticos y meióticos miden aproximadamente de  $1 \pm 3 \mu\text{m}$  y suelen ser metacéntricos y submetacéntricos (Gepts 2001). El frijol común posee uno de los genomas más pequeños de la familia Leguminosae con 588 Mb (Miklas and Singh 2007).

Con la liberación del genoma del genotipo Andino G19833 comparaciones de regiones genómicas son ahora posibles entre genotipos de *P. vulgaris*. Este genoma fue preliminarmente ensamblado usando la plataforma de Roche 454, combinado con Sanger y secuenciación de Cromosomas Artificiales de Bacteria de la librería de G19833. El genoma liberado tiene una obertura total de 521.1.Mb, arreglados en 708 scaffolds, y 41391 contigs, cubriendo los 11 cromosomas de frijol (Perry et al. 2013). La anotación de

genes *in silico* han resultado en 27197 loci, conteniendo 31638 genes presuntivos (McClellan et al., Resultados sin publicar). La secuencia genómica está disponible para descargarse en el sitio web <http://www.phytozome.net/commonbean>.

El frijol tiene un mapa genético bien desarrollado (Freyre et al. 1998; Córdoba, Chavarro, Schlueter, et al. 2010; Galeano et al. 2012; Galeano et al. 2011; Blair et al. 2003a; Blair, Hurtado, et al. 2012; Grisi et al. 2007; Larsen & Miklas 2004) y un gran número de marcadores moleculares que han sido usados para mostrar que *Phaseolus* y *Vigna*, ambos miembros de la subtribu *Phaseolinae*, están estrechamente relacionados, presentando amplia similaridad entre sus genomas (Yu et al. 1999; W J Broughton et al. 2003; Kelly et al. 2003) (Broughton, Hernandez et al. 2003).

En CIAT se ha desarrollado un mapa genético a partir de la cruce de DOR364XG19833, la cual fue desarrollada por Beebe et al. en 2006 para la identificación de QTL para tolerancia a deficiencia a fosforo, esta población ha sido saturada como gran diversidad de marcadores moleculares como RFLPs, RAPDs, AFLP, SSR (Córdoba, Chavarro, Rojas, et al. 2010; Blair et al. 2003a), EST (Blair, Hurtado, et al. 2011), SNPs (Galeano et al. 2012).

Ademas, existen diversos mapas genéticos provenientes de diferentes poblaciones, pero una de las más relevantes es BAT93 x Jalo EEP558, la cual es una población desarrollada en la Universidad de California, con el objetivo de identificar regiones a asociadas a resistencia a Virus del mosaico común, bacteriosis, Antracnosis, Mancha angular y roya a partir de análisis de generaciones F2 (Tsai et al. 1998) y líneas endogámicas RIL's (del inglés, *Recombinant Inbred Lines*). (Freyre et al. 1998).

#### 1.1.4. Importancia del cultivo

Producción y consumo. La producción mundial total de frijol supera los 23 millones de toneladas métricas (TM), de las cuales 7 millones de toneladas se producen en América Latina y África. Los factores sociales y ecológicos pueden determinar las limitaciones del cultivo de frijol en una región en particular. Una gran parte de la producción de frijol en América Latina se lleva a cabo en pequeñas granjas que van desde 1 hasta 10 hectáreas. Algunas estimaciones sugieren que hasta un 80% del área sembrada con frijol común en América Latina se encuentra en las laderas (W J Broughton et al. 2003).

Según FENALCE (<http://www.fenalce.org/nueva/index.php>), en el 2010, en Colombia el consumo de frijol por persona fue de 2.7 Kilos. Los cultivos de frijol, en el 2011A cubrieron un área de 50.7 hectáreas con una producción de 53.6 toneladas, para un rendimiento promedio de 0.96 Kg/Ha. La producción de frijol se centra en 6 departamentos así: Santander (29,0%), Tolima (21,0%), Huila (19,0%), Antioquia (17,0%), Nariño (7,0%), Cundinamarca (5%).y el 2% restante en Boyacá, Bolívar y Atlántico. Colombia actualmente solo representa el 0.8% de la producción mundial en frijol frente a países como India, Brasil, EEUU, Myanmar y México que representan el 66% total de la producción mundial.

Valor Nutritivo. Las semillas de frijol, de acuerdo a la variedad, presentan un promedio de contenido de proteína del 24%, desempeñando un papel esencial en la nutrición humana. La principal proteína del frijol es la faseolina siendo un factor determinante de la cantidad y calidad nutricional; sin embargo las proteínas de semilla son deficientes en aminoácidos esenciales como la lisina y metionina, pero combinado con otros cereales y leguminosas se pueden aliviar estas deficiencias garantizando una dieta balanceada (W J Broughton et al. 2003; Cichy et al. 2005; Bourdon et al. 2001). Además de proteínas en la semilla de frijol se encuentran glucósidos (55-65%), fibra (3-8%), lípidos (1-5%) y sustancias minerales (3-5 %), se destaca también su elevado contenido de Hierro, Calcio y vitaminas como tiamina (B) y ácido fólico (Blair, Medina, et al. 2010; Santalla et al. 1999).

Recientemente, se ha descubierto algunas propiedades de la semilla del frijol, demostrando que contribuye positivamente al mejoramiento de ciertos problemas de salud en humanos; como el control de la diabetes tipo II. También, el consumo de semillas de frijol ayuda a bajar los índices de glicemia y colesterol, y además disminuyen la incidencia de ciertos tipos de cánceres (Acosta-Gallegos et al. 2007).

Factores antinutricionales. Los factores antinutricionales y sustancias tóxicas están presentes en muchas de las semillas de las legumbres e incluso en diversas partes de la planta, reduciendo la palatabilidad y causando trastornos de diversa índole. Entre ellos están los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, argelinas, lectinas, fitatos, sustancias fenólicas y taninos. La cantidad de taninos cambia con el color de la semilla. Las propiedades

antinutritivas de fitatos se derivan de su capacidad de quelar calcio, hierro, Magnesio y Zinc. Sin embargo, las arcelinas e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa confieren a las semillas de frijol propiedades insecticidas. En lo posible se trata de reducir los compuestos antinutricionales, sin disminuir algunas de las funciones de protección, esto podría ser posible a través del análisis de la variabilidad genética (W J Broughton et al. 2003; Sparvoli & Bollini 1998; Osborni et al. 1988).

### 1.1.5. Problemas de Producción

Los frijoles producidos en pequeñas parcelas por granjeros con bajos recursos son más vulnerables a ser atacados por enfermedades y plagas, y por estreses abióticos incluyendo sequía y baja fertilidad del suelo. En contraste, los granjeros con altos capitales cuentan con los recursos para combatir estos factores a través del uso de pesticidas, fertilizantes, e irrigación (Miklas et al. 2006).

La producción de frijol común se ve afectada por factores abióticos y bióticos (Tabla 2).

- Factores abióticos: La resistencia a estrés abiótico es por naturaleza más complejo fisiológicamente, esta típicamente sujeto a grandes efectos medioambientales (Miklas et al. 2006). Entre estos se encuentra la baja fertilidad del suelo, que depende de la deficiencia de nitrógeno, fósforo, y zinc, además de la toxicidad con aluminio y manganeso. La sequía afecta la producción en muchas regiones del mundo, especialmente en el noroeste de Brasil, las tierras altas de centro y norte de México, los valles del este de África y las regiones intermontañas de Estados Unidos (Singh 2001). También las bajas temperaturas (inferiores a 10 °C) ocasionan daños durante el periodo de germinación de la planta.
- Factores bióticos: La resistencia o tolerancia a insectos en frijol común es un rasgo genético cuantitativo y poligénico (Miklas et al. 2006). Los problemas bióticos son causados principalmente por virus, hongos y bacterias, mientras que entre los causados por plagas se encuentran insectos y nematodos (Singh 2001; Blair et al. 2006; Terán et al. 2013; Mahuku et al. 2003).



Tabla 2. Problemas de producción del cultivo de frijol común, incidencia y porcentaje de pérdida en rendimiento (Singh 1999)

PROBLEMA DE PRODUCCIÓN	INCIDENCIA	PERDIDA EN RENDIMIENTO (%)
<b>ABIÓTICO</b>		
Sequía	Global	10 – 100
Baja fertilidad del suelo	Global	30 – 100
<b>BIÓTICO</b>		
<b>Enfermedades</b>		
Virus del mosaico común (BCMV)	Global	50 – 70
Virus del mosaico dorado (BMGV)	Argentina, Brasil, Caribe y América central	50 – 90
Bacteriosis Común ( <i>Xanthomonas axonopodis</i> )	Global	20 – 50
Bacteriosis de Halo ( <i>Pseudomonas phaseolica</i> )	Altiplano de África y Latinoamérica, Europa y América del Norte	20 – 50
Mancha angular ( <i>Phaseoisariopsis griseola</i> )	África y Latinoamérica	40 – 80
Antracnosis ( <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> )	Global	10 – 100
Hongos de la raíz	Global	10 – 90
Roya ( <i>Uromyces appendiculatus</i> )	Global	40 – 80
Moho blanco ( <i>Sclerotinia sclerotium</i> )	Brasil, Argentina y América del Norte	30 – 90
<b>Insectos</b>		
Mosca del frijol ( <i>Ophiomya spp.</i> )	África	30 – 100
Picudo de la vaina ( <i>Apion godmani</i> )	México y América central	10 – 80
Brúquidos o gorgojos ( <i>Zabrotes subfasciatus</i> )	Global	10 – 40
Salta hojas ( <i>Empoasca fabae</i> )	Global	10 – 100

## 1.2. Bacteriosis Común

### 1.2.1. Generalidades de la enfermedad de la Bacteriosis común

Bacteriosis común es una de las más importantes enfermedades bacterianas del frijol en muchas regiones del mundo. La enfermedad es causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* Smith (Dye) (synonym: *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al.) y *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Xanthomonas* es una bacteria gran negativa, aeróbica móvil gracias a que posee un flagelo polar. Su temperatura óptima de desarrollo está entre 28 y 30 °C. Los síntomas inducidos por *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* y *X. fuscans* subsp. *fuscans* son indistinguibles, y ambas bacterias pueden causar significativamente un impacto negativo en la producción y calidad de semilla, especialmente en cultivares altamente susceptibles. Sin embargo, *X. fuscans* se puede diferenciar de *X. axonopodis* por la producción de un pigmento café después de 24 horas en medios selectivos para *Xanthomonas* (Duncan et al. 2011; Castellanos et al. 2011).

Duncan et al. 2011 reporta que genotipos de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* del este de África genotipos son sustancialmente menos virulentos que las típicas cepas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, Sin embargo, resultados del análisis de la secuencia de la región espaciadora indican que cepas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* del este de África están más relacionadas a *X. fuscans* subsp. *fuscans* que *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Esto plantea la posibilidad que cepas de *X. fuscans* subsp. *fuscans* son originarias de África, y esto es consistente con la frecuente asociación de *X. fuscans* subsp. *fuscans* con CBB en el este de África.

### 1.2.2. Epidemiología

Ambas cepas de *Xanthomonas* producen síntomas en condiciones de humedad elevadas y temperaturas de climas tropicales, no superior a los 28 °C. Las bacterias *Xanthomonas* pueden sobrevivir por muchos años en semillas infectadas. También se pueden reproducir en plantas aparentemente sanas o sobre ellas y en hojas de cultivos no hospedantes como la soja, el maíz, remolacha, caupí y algunas malezas (Barnes 1979). Así, se ha concluido que la bacteria puede sobrevivir por varios meses en el suelo y en restos infectados de cosechas en condiciones templadas (Schwartz & Pastor-Corrales 1989). Este patógeno su dispersión puede verse favorecida por acción del viento y el

agua de lluvia y de riego, y los suelos llevados por los vientos. Estas bacterias pueden sobrevivir en algunos insectos que las transmiten a través de heridas o aperturas naturales de las plantas (Barnes 1979).

### 1.2.3. Sintomatología

Bacteriosis común infecta follaje, vainas, y semilla y la enfermedad es favorecida por el calor y la humedad (Mkandawire et al. 2004). En las hojas presenta síntomas iniciales de puntos acuosos en el envés, los cuales aumentan en tamaño y forma hasta desarrollar una lesión grande. En las vainas, aparecen síntomas de manchas húmedas pequeñas que cuando crecen de juntan cubriendo gran parte de la vaina, lo cual deforma e infecta las semillas que se están en su interior. Las áreas afectadas se observan flácidas y con un borde de color amarillo que después se torna café hasta cubrir una gran área de la hoja o vaina. La enfermedad se transmite a la planta por el uso de semillas infectadas o por malas prácticas en el manejo del cultivo (Castellanos et al. 2011). En las semillas los síntomas aparecen como manchas de color amarillo, fácilmente observables en semillas de color blanco o color claro y muy poco en tonalidades oscuras. Las plántulas infectadas a partir de semilla presentan daños en los ápices de crecimiento y enanismo (Schwartz & Pastor-Corrales 1989).

## 1.3. Fuentes de resistencia genética a Bacteriosis

Genotipos de *P. vulgaris* con resistencia a bacteriosis de alguna manera puede disminuir o detener el movimiento del patógeno Xap a través de los tejidos vasculares, lo que puede disminuir la acumulación de la población bacteriana en hojas o semillas y por ende no afectar la productividad (Yu et al. 2012). La resistencia genética a bacteriosis es relativamente baja en *P. vulgaris* en comparación con sus especies afines, *P. acutifolius* y *P. coccineus* (Singh & Muñoz 1996; Miklas & Singh 2007).

*P. acutifolius* posee altos niveles de resistencia a bacteriosis (Zapata et al. 1985; Singh & Muñoz 1996; Santana et al. 1993), se han realizado grandes esfuerzos para transferir los factores que controlan la Resistencia a bacteriosis desde *P. acutifolius* a *P. vulgaris* a través de hibridaciones inter específicas (Thomas & Waines 1984; Singh & Muñoz 1996; Scott & Michaels 1992). Las líneas XAN, XAN-159, XAN-160 y XAN-161 fueron desarrolladas en CIAT a través de cruces interespecíficas entre *P. vulgaris* y *P.*

*acutifolius* (Thomas & Waines 1984). Las líneas VAX, VAX1, VAX2, VAX3, VAX4, VAX5 y VAX6, fueron desarrolladas de cruces interespecíficos entre el cultivar ICA Pijao de frijol común y la accesión G40001 de frijol tépari en 1989 por rescate de embriones (Mejía-Jiménez et al. 1994; Singh et al. 2001). Por mucho tiempo, *P. acutifolius* PI319443, PI44079, y G40001 han sido fuentes de genes o QTL mayores de resistencia a bacteriosis que ha sido incorporado dentro de los programas de mejoramiento (Yu, Park & Poysa 2000; Yu et al. 2004; Singh et al. 2001; Pedraza et al. 1997; Liu et al. 2008; Jung et al. 1999; Shi et al. 2012; Perry et al. 2013).

## 1.4. Marcadores Moleculares en la resistencia a Bacteriosis y su aplicación en el mejoramiento

### 1.4.1. SCARs

Los SCARs (de sus siglas en inglés, *Sequence characterized amplified región*) han sido la base de la selección indirecta de varios de los rasgos agronómicos en frijol común especialmente en la resistencia a enfermedades [http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/3848/PDF/Miklas\\_2011/SCAR%20Markers%202010.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/3848/PDF/Miklas_2011/SCAR%20Markers%202010.pdf).

El posicionamiento de los marcadores moleculares ligados a Bacteriosis sobre los mapas genéticos de frijol han revolucionado el entendimiento de la resistencia a esta enfermedad. Numerosos QTLs para resistencia han sido identificados en frijol, en aproximadamente un total de 22 (Miklas et al. 2006; Yu et al. 2012), estos son derivados de *P. vulgaris* y *P. acutifolius*. En general, se aplicaron marcadores moleculares para un número reducido de estos QTL, sin embargo marcadores asociados a QTLs de menor efecto no han sido efectivos en selección asistida (Yu et al. 2012).

Jung et al. (1996) identificó 4 regiones genómicas en XAN159, una línea de frijol que fue desarrollada por cruces interespecíficos entre *P. acutifolius* PI319443 y *P. vulgaris* condicionado la resistencia a bacteriosis en las primeras hojas trifoliadas, vainas y semillas. Una región genómica en el cromosoma 6 fue definida por el marcador RAPD BC420.900 encontrándose un QTL mayor que confiere resistencia a bacteriosis en hoja (28% de la variación fenotípica), vaina (11%) y semilla (18%). El QTL de XAN159 ligado al marcador RAPD BC420.900 fue confirmado por Yu et al. (2000) en una población RIL

derivada de la cruce HR 67 x W1744D. Este QTL explico el 62% de la variación fenotípica en la prueba de reacción a Bacteriosis en invernadero. El marcador RAPD BC420.900 fue también convertido a marcador SCAR, el cual es uno de los marcadores más usados para mejoramiento por selección asistida por marcadores (Yu, Park & Poysa 2000; Liu et al. 2008; Kelly et al. 2003; Miklas et al. 2006; Yu et al. 2004). Un aspecto negativo de este QTL es su ligamiento con el gen V, el cual condiciona el color purpura de la flor y colores de semillas oscuros con lo que sería inútil para el mejoramiento de frijol de color comercial (Jung et al. 1996; Miklas et al. 2006; Kelly et al. 2003; Liu et al. 2008).

Pedraza et al. (1997) detecto una estrecha relación entre el marcador SCAR SU91.700 (derivado del marcador RAPD UO91) y un QTL mayor para resistencia a Bacteriosis en XAN159 el cual explica el 23.7% de la variación fenotípica de la resistencia a bacteriosis en hoja. Recientemente, se ha validado la asociación de SU91 en poblaciones RIL's de cruces de HR67 x OAC95-4 (Liu et al. 2008), OAC-Rex X Sanilac (Xie, et al., resultados sin publicar), y F2 HR45 x OAC Rex (Liu et al. 2010). El marcador SCAR SU91 frecuentemente ha sido el más utilizado para selección asistida por marcadores. Se han detectado interacciones de epítasis entre los QTLs BC420.900 y SU91 para resistencia a Bacteriosis, en donde Vandemark et al. (2008) detecto en genotipos con locus del QTL BC420.900 pero sin locus del QTL SU91 una disminución en el mecanismo de resistencia.

Usando genotipaje selectivo y análisis de Bulk segregante, Miklas et al. (1996) detectó 2 regiones genómicas que afectan la resistencia a Bacteriosis con una población RIL F5:7 derivada de la cruce de Dorado x Xan176 (Miklas & Delorme 2000). Una región genómica definida por el marcador RAPD AP6.820 sobre el cromosoma 10 explico el 60% de la variación fenotípica de hoja en invernadero, 10% de hoja en campo y 30% de vaina en invernadero. El marcador RAPD AP6.680 fue convertido al marcador SCAR SAP6.680 (Miklas et al. 2003). La ocurrencia de la región genómica común que afecta a la resistencia a bacteriosis en diferentes tejidos y condiciones ambientales indican que la expresión de la resistencia a Bacteriosis puede estar condicionada por más de un factor genético agrupados o por un factor genético con efectos pleiotrópicos (Yu et al. 2012). Vandemark et al. (2009) en su estudio no encontró una buena correlación del marcador SCAR SAP6 en los cruces F2 Othello x ABCP-8 y Red Hawk x USDK-CBB-15. La falta

de efecto de SAP6 hacia la resistencia a bacteriosis podría ser debido a la recombinación entre el marcador SAP6 y la resistencia condicionada por el QTL. El marcador SAP6 fue detectado anteriormente en los cultivares de frijol como Matterhorn, que es susceptible a bacteriosis (Miklas et al. 2003).

#### 1.4.2. Microsatélites o SSRs (Simple sequence repeats)

Uno de los marcadores más importantes basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son los microsatélites o SSRs (de sus siglas en inglés, simple sequence repeat). Los microsatélites consisten en unidades repetidas en tándem de motivos cortos de nucleótidos que son repeticiones de 1-6 pares de bases. Repeticiones di, tri y tetranucleótidas son las más comunes y ampliamente distribuida a través del genoma (Powell et al. 1996). En frijol se han usado para la caracterización genética entre especies (Blair et al. 2007; Díaz & Blair 2006; Gaitan-Solis et al. 2002; Blair, Soler, et al. 2012) y para construir mapas de ligamiento genético (Yu, Park, Poysa, et al. 2000; Blair et al. 2003a)

Un QTL mayor asociado con el marcador SSR *PHVPVPK-1* fue mapeado sobre el cromosoma 5, el cual explica más del 42% de la variación fenotípica. El marcador SSR *PHVPVPK-1* ligado a este locus mayor de resistencia a Bacteriosis en el estudio de Tarlan et al. (2001) es equivalente al Pv-ctt001 reportado por Yu, Park, Poysa, et al. (2000) que lo mapeo en el cromosoma 4 del mapa núcleo de BAT93 x Jalo EEP558. La diferencia en la posición del marcador dependería de su complicada ubicación en el extremo de un grupo de ligamiento en ambos mapas, más si son poblaciones pequeñas (Tarlan et al. 2001). Por otro lado, interacciones epistáticas no han sido observadas entre SU91 y Pv-ctt001 (Durham et al. 2013).

#### 1.4.3. SNPs

La identificación y desarrollo de marcadores SNPs (de sus siglas en inglés, *single nucleotide polymorphisms*) es la actual estrategia en las nuevas tecnologías de secuenciación lo que ha ganado un interés en la comunidad de mejoradores. Se producen en un número prácticamente ilimitado como diferencias de nucleótidos individuales entre individuos y todos los SNP en el ADN de copia única es un marcador potencialmente útil (Ganal et al. 2009; A. Rafalski 2002). Se ha estimado que frijol común

tiene un SNP cada 88 pares de bases (Gaitán-Solís et al. 2008). Con un estimado del tamaño del genoma de frijol de 588 Mb (Liu et al. 2010) se puede estimar más de 6 millones de SNPs que podrían estar presentes en el genoma completo de frijol (Yu et al. 2012). Recientemente se han empezado a utilizar estas variaciones genéticas como marcadores en la mejora del frijol común (Blair et al. 2013; Hyten et al. 2010; Galeano et al. 2009).

Los marcadores SNPs han comenzado a ser una herramienta esencial para la construcción de mapas genéticos, mapeo asociativo y selección asistida por marcadores (Kim et al. 2010; J. A. Rafalski 2002; A. Rafalski 2002; Hyten et al. 2010). En general, en la identificación de SNPs involucra amplificación de locus específicos y secuenciación de sitios blanco. Usando esta estrategia, secuencias de ADN de productos de PCR amplificadas con primers alelo específicos de diferentes genotipos pueden ser comparados para identificar polimorfismos de un solo nucleótido por alineamiento múltiple de secuencias (Chaisan et al. 2010).





## 2. Objetivo

### 2.1. Objetivo General

Desarrollo de marcadores SNPs para QTLs mayores asociados a resistencia a Bacteriosis Común (*Xanthomonas axonopodis*) para Frijol Común (*Phaseolus Vulgaris* L.)

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Construir un mapa genético de la población de Líneas Híbridas Recombinantes (RILs) de VAX6 x MAR1 a partir de marcadores moleculares.
- 2) Verificar QTLs para resistencia a Bacteriosis en una población de RILs del cruce VAX6 x MAR1 en frijol común.
- 3) Explorar el aprovechamiento de marcadores SNPs aplicados a selección asistida por marcadores en Programas de mejoramiento genético en frijol.



## 3. Materiales y metodos

### 3.1. Ubicación

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genética molecular de frijol (LGMF), ubicado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado en el municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca, Colombia (Latitud 3°30.26", Longitud 76°21.36", altitud 965 msnm).

### 3.2. Material Vegetal

En este estudio se utilizó una población de RILs generadas por el método de SSD (del inglés, *Single Seed Descent*) hasta F9, proveniente del cruce de VAX6 x MAR1 (Figura 2), con un total de 223 individuos, esta fue sembrada en Palmira (1000 msnm con temperatura creciente de 24°C y 1000 mm de lluvia anual). La semilla fue suministrada por el Programa de mejoramiento de Frijol del CIAT en donde se son almacenadas en cuarto de conservación de semillas.

Figura 2. Semilla de los parentales de la población RIL VAX6 x MAR1.



La Línea VAX6 es una línea mejorada con resistencia a Bacteriosis (*Xanthomonas*), fue desarrollada en el CIAT a través de la hibridación interespecífica de *P. vulgaris* y *P. acutifolius* (Singh & Muñoz, 1996). VAX6 es derivada de cruza multiparentales = A 769//A 775//ICA Pijao/G 40001////XAN 309. VAX 6 un frijol tipo Mesoamericano de la raza Mesoamérica tiene semilla pequeña roja con tipo de faseolina S, hábito de crecimiento indeterminado vertical Tipo II y altos niveles de resistencia piramidada a bacteriosis (Singh & Muñoz 1996; Singh et al. 2001).

MAR1 se desarrolló en el CIAT es Mesoamericana de raza Mesoamérica, tiene un hábito de crecimiento tipo III. MAR1 proviene de una crusa multiparental = BAT85//A83/XAN112"Catu"(W69626)//A442"Higuerillo"(PI197683). Además, MAR1 posee cierto grado de tolerancia a Mancha Angular (*Phaeoisariopsis griseola*) (Singh et al. 2003), pero es susceptible a bacteriosis.

### 3.3. Evaluación fenotípica

#### 3.3.1. Preparación del Inoculo.

En la Unidad de Patología de Frijol del CIAT, se conservan aislamientos de *X. axonopodis* y *X. fuscans* de diferentes lugares de Colombia. Para la inoculación artificial se usó inoculo fresco de bacteria, de los aislamientos *X. fuscans* (Xfp 631) y *X. axonopodis* (Xap 123) en una concentración de  $10^8$  CFU/ml (Castellanos et al. 2011). El incremento de la bacteria se realizó usando medio de cultivo YCDA (Yeast Carbonate Dextrose Agar), en cajas petri. La composición para un litro de medio fueron 10 g de extracto de levadura, 5 g de dextrosa, 20 g de agar, 20 g de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y 1 L de agua destilada. La siembra en el medio se realizó con la ayuda de asas estériles y posteriormente dejadas en incubadora entre 24- 48 h a una temperatura de 28 °C.

#### 3.3.2. Inoculación de *Xanthomonas*

Para la inoculación se utilizó el método de agujas múltiples ancladas a un corcho las cuales se sumergen en una espuma empapada del inoculo para perforar el tejido foliar de plantas con 17 días de germinación que presenten el primer trifolio bien desarrollado, como es mostrado en la Figura 3.

Figura 3. Inoculación de material vegetal a través del método de agujas múltiples

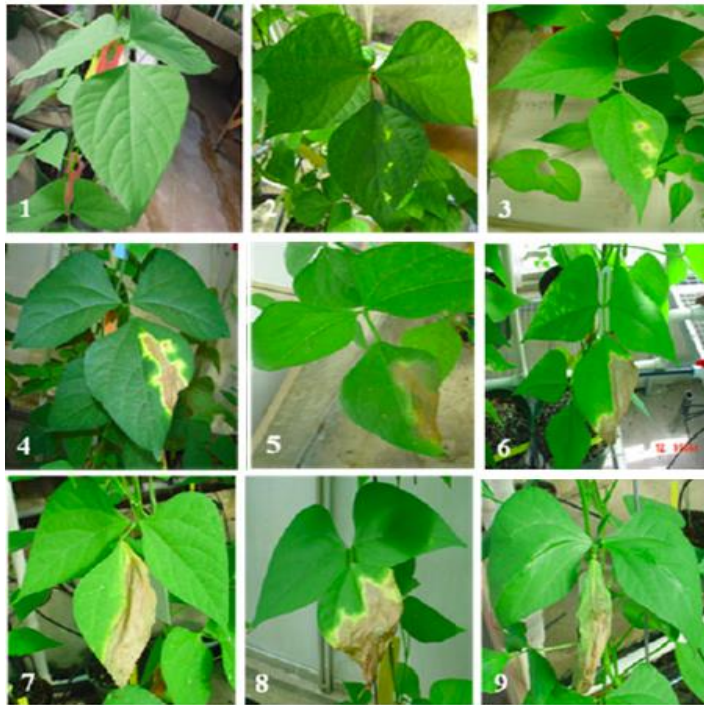


### 3.3.3. Evaluación de la inoculación con *Xanthomonas*

La evaluación de la población RIL VAX6 x MAR1 se llevó a cabo en los invernaderos del CIAT (Palmira, Colombia) a una temperatura entre 25 – 30°C en donde se realizaron dos evaluaciones a 14 días y 21 días después de la inoculación. El diseño experimental fue en bloque completos al azar con dos replicas. Los materiales resistentes VAX6 y VAX1, y los susceptibles MAR1 y AFR298 fueron incluidos en cada bloque como controles.

Para la evaluación de los síntomas producidos por *Xanthomonas* se usó la escala estándar del CIAT (Figura 4), cuyas categorías van del 1 al 9, donde de 1 a 3 = Plantas resistentes, 4 a 6 = planta de reacción intermedia, 7 a 9 = planta susceptible (van Schoonhoven & Pastor-Corrales 1987) (Tabla 3).

Figura 4. Escala visual de síntomas producidos por *Xanthomonas* en frijol común.



1-3: Resistentes, 4-6: Intermedios y 7-9: Susceptibles. Modificado de (Zapata et al. 2010)

Tabla 3. Escala general para evaluar la reacción de germoplasma de frijol para patógenos fúngicos y bacterianas.

Escala	Descripción	Comentario
1	Síntomas no visibles	Germoplasma útil como parentales o variedades comerciales
2	Síntomas muy tenues resultando en un pequeño o nulo daño económico	
3		
4	Síntomas visibles o conspicuos resultando solamente en un limitado daño económico	El germoplasma puede ser usado como variedades comerciales o como fuentes de resistencia a ciertas enfermedades
5		
6		
7	Síntomas severos o muy severos ocasionando graves pérdidas de producción o muerte de la planta	Germoplasma en muchos casos no es útil como variedad comercial o parentales
8		
9		

Tomado de van Schoonhoven & Pastor-Corrales (1987)

### 3.4. Extracción de ADN

Se tomó tejido joven de cada individuo (~100 mg) y se colectó en un tubo de microcentrifuga de 2.0 ml y se almacenó a -80 °C. El tejido se maceró con nitrógeno líquido para posteriormente ser tratado con el Kit de extracción de ADN de casa comercial Viogene®, Cat.: GPG1002.

Para la cuantificación de ADN se prepararon geles de agarosa al 1%, teñido con Gelred® (Biotium, Hayward, USA), se sembraron las muestras y se corrieron en Tris Borato EDTA 0.5X (TBE) a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente se llevó el gel a un transiluminador UV para evaluar la calidad de las bandas y descartar la presencia de posibles muestras degradadas. Se capturó la imagen del gel con la Cámara para Geles de Agarosa GelDoc 2000® de Bio-Rad y se procedió a la cuantificación de la concentración del ADN, con la ayuda del software Quantity One® v 4.0.3. Este programa calculó la cantidad de ADN en cada una de las bandas, de acuerdo a extrapolaciones realizadas con los patrones de concentración de ADN conocidos (en este caso se utilizaron diferentes concentraciones del  $\lambda$  estándar de ADN a 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ $\mu$ l).

### 3.5. SCAR

La población de RIL's y parentales de VAX6 x MAR1 fueron analizados a través de los marcadores SCAR SU91 (Pedraza et al. 1997) y SAP6 (Miklas et al. 2003) para corroborar su presencia y segregación en individuos resistentes.

Las amplificaciones para los SCARs se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ l, con 30 ng de ADN genómico, 0.2  $\mu$ M de la mezcla de ambos *primers* (*forward / reverse*) (Tabla 4), Buffer 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8.2, 50 mM KCl, Tritón 0.1%, BSA 1mg/ml), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de dNTPs y 1.5 U de Taq polimerasa.

Tabla 4. Secuencias de primers de marcadores SCAR para detección de los QTL mayores SU91 y SAP6 para resistencia a Bacteriosis.

SCAR	Genes de Resistencia	Tamaño del fragmento amplificado	Secuencia del primer 5' a 3'
SU91	QTL mayor	700	F: CCA CAT CGG TTA ACT TGA GT R: CCA CAT CGG TGT CAA CGT GA
SAP6	QTL mayor	830	F: GTC ACG TCT CCT TAA TAG TA R: GTC ACG TCT CAA TAG GCA AA

Se llevaron a cabo en termocicladores PTC 100TM (MJ Research) y Thermo TM (Thermo Electron Corporation). Para el marcador SCAR SU91 se utilizó el protocolo de amplificación, 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 34 ciclos de 10s a 94°C, 40s a 58°C, y 120s a 72°C; seguido por 1 ciclo de 5 minutos a 72°C, y para el marcador SCAR SAP6 se utilizó el siguiente protocolo: 94 °C por 3 minutos, 34 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 60°C por 30 segundos y 72 °C por 60 segundos, seguido de 5 minutos a 72 °C.

Para ambos marcadores los productos de PCR se llevaron a electroforesis en gel de agarosa a 2% de concentración, teñido con Gelred y corridos por 1 hora a 100V en TBE 0.5X.

### 3.6. Microsatélites

103 marcadores tipo SSR fueron evaluados en parentales de la población RIL VAX1 x MAR1 para determinar polimorfismos, se utilizaron los marcadores SSRs ubicados en los cromosomas 8 y 10 de frijol reportados por (Blair et al. 2008; Yu, Park, Poysa, et al. 2000; Blair, Hurtado, et al. 2011; Córdoba, Chavarro, Rojas, et al. 2010; Buso et al. 2006; Grisi et al. 2007; Benchimol et al. 2007; Métais et al. 2002; Blair, González, et al. 2010; Blair et al. 2003a; Hanai et al. 2007). Los anteriores han sido ligados en el mapa núcleo de DOR364 x G19833 e integrados con otros mapas genéticos reportado en Galeano et al. (2011).



A partir de un marcador STS (de sus siglas en inglés, *Sequence-Tagged Site*) denominado Pv-xa001 (datos sin publicar) y ligado al marcador SCAR SU91, se realizó una búsqueda *in silico* en la librería BAC de G19833 (Schlueter et al. 2008). Lo anterior, siendo posible gracias a la identificación de regiones sinténicas del genoma de *Glycine max* (Galeano et al. 2011), por lo que se determinaron algunos BAC candidatos que a través de la técnica de PCR con el marcador STS se les comprobó la presencia de la región QTL SU91. Con los BAC positivos de la anterior búsqueda se identificó un contig encontrado en la base de datos de Phaseolus WebFPC (<http://phaseolus.genomics.purdue.edu/>).

Por lo anterior se descargaron las secuencias BAC-ends contenidas en este contig y se buscaron secuencias repetidas SSR con el software Geneious 5.3 (Kearse et al. 2012), el cual posee un complemento de búsqueda de motivos repetitivos, denominado *Phobos* 3.3.11 (Mayer 2006). En *Phobos*, como criterio de selección se buscaron motivos SSR de 5 repeticiones para motivos dinucleótidos, 4 repeticiones para trinucleótidos y tres repeticiones para tetra o pentanucleótidos. Los primers se diseñaron a través del complemento de Geneious, *Primer3* desarrollado por Koressaar & Remm (2007), con las condiciones de longitud de 18-23 nt, temperatura de melting de 50-60°C y un tamaño de producto de PCR de 100 a 300 pares de bases.

Las amplificaciones para SSR se realizaron en un volumen de 12 µl, con 30 ng de ADN genómico, 0.16 µM de la mezcla de ambos *primers* (*forward / reverse*), Buffer 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8.2, 50 mM KCl, Tritón 0.1%, BSA 1mg/ml), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs y 1 U de Taq polimerasa.

Se llevaron a cabo en termocicladores PTC 100TM (MJ Research) y Thermo TM (Thermo Electron Corporation), con el programa básico consistente en una denaturación fuerte por 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de denaturación a 92°C por 30 seg, anillamiento a 45-65°C (dependiendo del primer), por 30 seg, extensión a 72°C por 45 seg y una extensión final a 72°C por 5 min (Blair et al. 2003a)

Después de la amplificación, se le adicionó a cada muestra 5 µl de Buffer de carga (5 ml de formamida, 0.4% p/v azul de bromofenol y xylene cyanol 0.25% p/v) y se denaturó la mezcla a 94°C por 5 min. Posteriormente se sembró 2.5 µl de muestra en geles de

acrilamida al 4% (29:1 acrilamida: bisacrilamida, urea 5 M, TBE0.5X), en cámaras de electroforesis vertical Owl T-Rex™ vertical S3S (ThermoFisher Scientific Inc, USA) a 120 W. El proceso de tinción se llevó a cabo siguiendo los protocolos de tinción con plata de Promega Inc. (Madison, Wisconsin., USA) y la lectura se realizó con marcadores de peso de 10 pb y de 25 pb.

### 3.7. SNPs

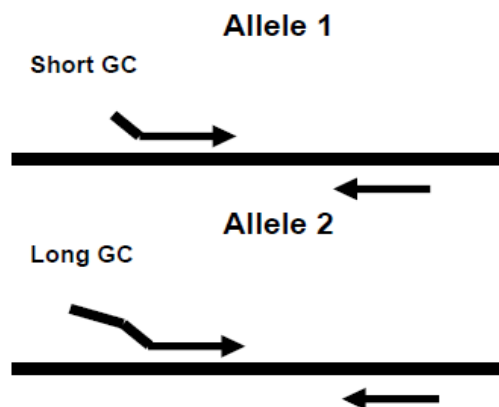
Para la detección de SNPs fueron amplificados y secuenciados con primers ligados a la región del QTL SU91 y SAP6, los cuales fueron diseñados a través del complemento Primer3 de Geneious con parámetros de longitud de primer de 18-23 nt, temperatura de melting de 50-60 °C y longitud de producto amplificado de 1500 pb. Estos marcadores fueron amplificados en genotipos con presencia de los marcadores SCAR SU91: G40001 y VAX6, y el marcador SCAR SAP6: VAX1 y VAX6 y dos genotipos susceptibles que no presentaran los marcadores SCAR: MAR1 y CAL96. Los amplicones fueron secuenciados a través del método de Sanger (Macrogen, Corea del Sur; <http://www.macrogen.com/>) con los mismos primers.

Las secuencias obtenidas a partir del producto de la PCR se compararon con las secuencias de ADN del genoma de G19833 almacenado en la base de datos de Phytozome (<http://www.phytozome.net/commonbean.php>) y también del genoma de BAT93 (<http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/cgi-bin/gb2/gbrowse/frijol/>) mediante el algoritmo Blastn a través del programa Geneious y también se realizaron alineamientos entre las secuencias de los amplicones anteriormente mencionados para la búsqueda de SNPs asociados a genotipos con resistencia a Bacteriosis. Además, se utilizaron secuencias de 8 SNPs desarrollados como parte de un proyecto de genómica comparativa de cultivos de leguminosas basados sobre grupos tentativos ortólogos (TOGs) (Penmetsa et al. en preparación; Blair et al. 2013) y 13 SNPs desarrollados para el convenio del *Generation Challenge Programme* (GCP) y BeanCAP (McConnell et al. 2010; Hyten et al. 2010) todos ubicados en la posición física de los QTL SU91 y SAP6, cromosoma 8 y 10, respectivamente del genoma de frijol.

Las amplificaciones se realizaron en PCR en tiempo real y se analizaron a través del método de cambio de Temperatura de melting (Tm-Shift) (Wang et al. 2005) por lo que

se diseñaron primers alelo específicos para detectar los SNPs identificados en parentales VAX6 y MAR1, para ello los primers se diseñaron a través del Programa Primer3 con parámetros de temperatura entre 59-62 °C y una longitud entre 15-22 pb. Los primers comunes se diseñaron con una Tm de 63°–70°C con una longitud de 22-27 pb. Para cada uno de los dos primers alelos específicos, se añadieron diferentes colas de GC. La cola larga de GC de 14 pb tiene la secuencia 5'-GCGGGCAGGGCGGC-3' y la cola corta de GC de 6 pb tiene la secuencia 5'-GCGGGC-3'. Según Wang et al. (2005) un buen porcentaje de éxito de detección del SNP, habitualmente se atribuye a la larga cola de un primer que está en las bases de Tm altas (G o C) en su extremo 3', y la cola corta al otro primer con bases de Tm bajas (A o T) (Figura 5).

Figura 5. Principio del método. ADN genómico es amplificado en una reacción multiplex con dos primers forward alelo específicos y un primer reverso común.



La PCR fue desarrollada con 25 ng de ADN genómico en 20 µl de volumen final, 0.16 µM de cada uno de los primers; 1 U de TAQ polimerasa, Buffer 1X (10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, pH 8.0, 1X BSA, 1X PVP); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM dNTPs; 0.6 X de Evagreen (Biotium Inc., Hayward, CA, USA). Todas las reacciones de amplificación fueron desarrolladas en el sistema Mx3000 Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, La Jolla, CA). Los resultados fueron analizados con el software Stratagene Mx3000. El perfil de amplificación utilizado fue 1 ciclo 93°C por 3 minutos, 35 ciclos a 93°C por 15 s, 55-65°C, (dependiendo de la especificidad del primer) por 15 s, 72°C por 15 s, y 1 ciclo de extensión final de 5 minutos.

### 3.8. Mapeo genético

El mapa de ligamiento se construyó con el software MapDisto<sup>®</sup> versión 1.7 (Lorieux 2008) para Excel con la función de mapeo kosambi, un LOD mínimo de 3.0 y una distancia máxima de 25 cM. De igual manera, se analizó la segregación de los marcadores con pruebas de chi-cuadrado (Prueba  $\chi^2$   $P < 0.05$ ), según las proporciones esperadas para RIL's (1:1= hipótesis nula), para detectar distorsiones en la segregación o predominio de alguno de los alelos parentales para cada marcador. Las gráficas de los grupos de ligamientos fueron construidas por medio del software Mapchart (Voorrips 2002).

### 3.9. Análisis de QTL

Para determinar y validar la correlación entre los datos fenotípicos colectados en invernadero y los marcadores moleculares obtenidos en el experimento se realizó un análisis de QTLs usando mapeo por intervalo compuesto con QTL-Cartographer versión 2.0 con el modelo 6 en el método forward y backward (Basten et al. 2003). Un umbral significativo fue determinado usando un test de 1000 permutaciones al nivel de significancia de 5%.

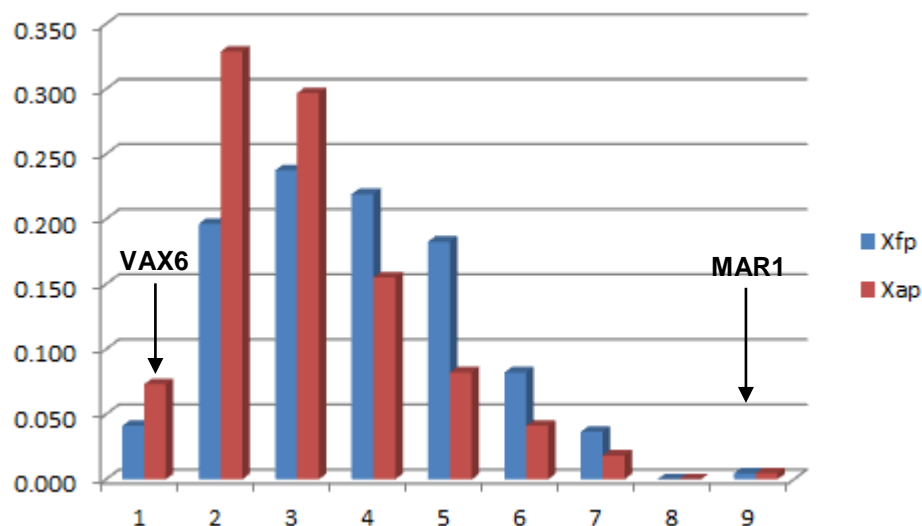
## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Evaluación fenotípica de la resistencia a Bacteriosis

De acuerdo a la escala de evaluación de resistencia a Bacteriosis generada en CIAT, en la evaluación fenotípica de la población RIL VAX6 x MAR1 con la cepa de *X. fuscans* (Xfp) se encontró 107 individuos con resistencia (Rango 1-3), 102 individuos con reacción intermedia (4-6) y 8 individuos con susceptibilidad (Rango 7-9). Además, con la cepa de *X. axonopodis* (Xap) se encontró 157 individuos resistentes, 56 individuos con reacción intermedia y 4 con susceptibilidad a la enfermedad. También los parentales fueron evaluados para ratificar su grado de resistencia a la enfermedad encontrándose en VAX6 una alta resistencia a ambas cepas de *Xanthomonas* (con un grado 1 de resistencia) y en MAR1 una alta susceptibilidad con un grado 9.

En la figura 6 se muestra la distribución de frecuencia del grado de la enfermedad en la población RIL VAX6 y MAR1 y sus parentales. La línea VAX6 en varios estudios con diferentes cepas de *Xanthomonas* ha tenido altos niveles de resistencia catalogándose como un buen parental para transferir resistencia a Bacteriosis en germoplasma de *P. vulgaris*, además de tener una resistencia piramidada con los QTL mayores SU91 y SAP6 (Duncan et al. 2011).

Figura 6. Distribución de frecuencia del grado de resistencia a Bacteriosis en una población RIL de la cruce de VAX6 x MAR1.

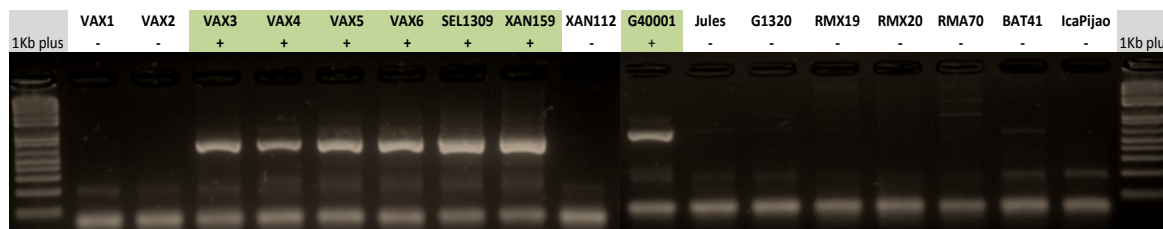


## 4.2. Análisis de Marcadores Moleculares

### 4.2.1. Marcadores SCAR

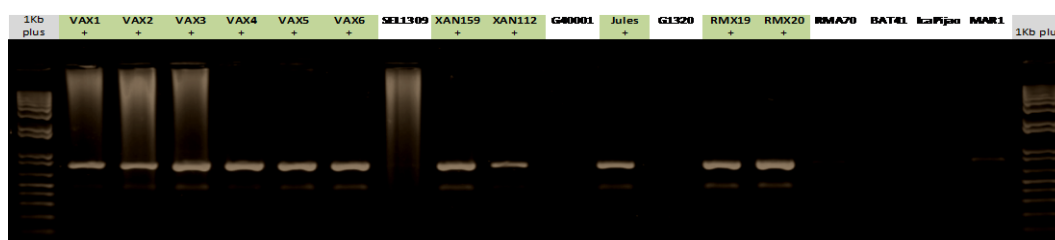
El marcador dominante SCAR SU91, que encuentra ligado un QTL mayor de resistencia a Bacteriosis ubicado en el cromosoma 8 del genoma de frijol, fue probado en diferentes materiales e incluso en los parentales de la población VAX6 x MAR1 (Figura 7), en donde se encontró que el marcador es dominante y tiene un fragmento amplificado de 700 pb como lo reportó Pedraza et al. (1997). Las líneas interespecíficas VAX 3, 4, 5, y 6, XAN159 y SEL1309 presentan el marcador y el *P. acutifolius* G40001, del cual proviene la resistencia a Bacteriosis.

Figura 7. Patrón de amplificación del marcador dominante SU91 en materiales de *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.



El marcador dominante SCAR SAP6 se encuentra ligado a un QTL mayor de resistencia a Bacteriosis en el cromosoma 10 de frijol. El SCAR SAP6 fue amplificado en diferentes materiales de frijol en donde se encontró un producto amplificado de 820 pb en todas las líneas VAX al igual que en las líneas XAN159, XAN112, Jules y en las líneas Andinas RMX19 y RMX20 las cuales fueron desarrolladas en el CIAT para resistencia Bacteriosis (Figura 8)

Figura 8. Patrón de amplificación del marcador dominante SAP6 en materiales de *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.



En la tabla 5 se resume los resultados de la evaluación de los parentales VAX6 y MAR1 y la segregación de su descendencia a través de los marcadores dominantes tipo SCAR SU91 y SAP6. Cada marcador presenta una segregación genotípica 1:1 en la población RIL.

Tabla 5. Segregación de los SCAR ligados a los QTLs mayores relacionados a la resistencia a Bacteriosis.

SCAR	Gen de Resistencia	VAX6	MAR1	Observación F9	
				Presencia/Ausencia	Proporción
SU91	QTL mayor	+	-	104/113	1:1
SAP6	QTL mayor	+	-	113/104	1:1

Comparando cada marcador con los datos colectados en la evaluación fenotípica se encontró en SU91 un 41,15% y 58% de correlación, con evaluaciones con cepas *X. axonopodis* y *X. fuscans*, respectivamente. En cambio, para el marcador SAP6 con evaluaciones con la cepa *X. axonopodis* hubo una correlación del 29,6%, caso contrario ocurrió con la cepa de *X. fuscans* donde no hubo correlación. Lo anterior se ha

documentado en el trabajo de Vandemark et al. (2009) en donde no encontró una buena correlación del marcador SCAR SAP6 en los cruces F2 Othello x ABCP-8 y Red Hawk x USDK-CBB-15 , además en otro estudio Duncan et al. (2011) encontró que algunos genotipos con presencia del marcador SAP6 eran susceptibles a ciertas cepas de *Xanthomonas* indicando que la asociación de resistencia con el marcador SAP6 no es relevante para el manejo efectivo de la Bacteriosis o que el marcador no está suficientemente ligado a la región de resistencia.

#### 4.2.2. Marcadores Microsatélites

Un total de 103 marcadores SSR fueron evaluados en los parentales de la población RIL VAX6 x MAR1, 31 SSRs se derivan de genes y 72 de regiones genómicas. En este estudio, los SSRs genómicos provenientes de regiones no codificantes han sido descritos anteriormente en los trabajos de Blair et al. (2003) con nomenclatura BM, BMd y GATs; Blair et al. (2008) con los BMa o ATA; Córdoba et al. (2010a) y Córdoba et al. (2010b) derivados de secuencias terminales de BAC y con nomenclatura BMb; Campos et al. (2007) y Hanai et al. (2007) con los FJ; Benchimol et al. (2007) con los IAC; y Buso et al. (2006) y Grisi et al. (2007) con los Pv-BR. En contraste los marcadores génicos provenientes de secuencias de genes o librerías de cDNA han sido derivados de los estudios de Blair, Fernandez, et al. (2011) y Blair et al. (2009) con SSRs de nomenclatura BMc; Blair et al. (2003) y Blair, Hurtado, et al. (2012) con los marcadores BMd y Hanai et al. (2007) con los marcadores Pv-M. Además, sin publicar están los marcadores BMb1595W, BMb1610W, BMb1654W, BMb167, BMb1710W, BMb718s, BMb734s, BMb871s, PVBR158, PVBR71, SU\_ag001.

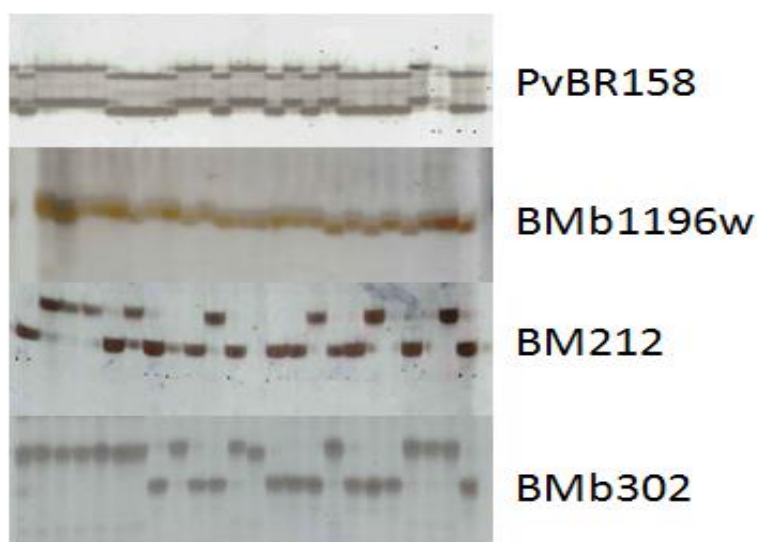
Según Meksem & Kahl (2005) al analizar parentales de cruces de interés agronómico para estudios de mejoramiento se puede identificar marcadores con un buen polimorfismo que estén ligados a características de resistencia o tolerancia a estrés biótico o abiótico. Además, se facilita en gran medida la identificación de rasgos monogénicos o poligénicos

Por consiguiente, se obtuvieron 22 marcadores SRR polimórficos, lo que representa un 21,36% del total de SSRs evaluados. En la Figura 9 se observa algunos de los polimorfismos obtenidos con los marcadores SSR evaluados en los parentales VAX6 y MAR1. En cruces intracervo los porcentajes de polimorfismos son bajos en comparación



con poblaciones de diferentes acervos, un caso similar sucede en la población Andina G21242 x G21078 en donde se encontró solamente un 10,6% de polimorfismo en 700 marcadores SSR (Blair, Astudillo, et al. 2011) y también en la población Mesoamericana DOR364 x BAT477 en donde 60 SSRs fueron polimórficos de 595 marcadores SSRs evaluados, representado solamente un 11% (Blair, Galeano, et al. 2012). En contraste en poblaciones interacervo se ha reportado un mayor polimorfismo como es el caso de las poblaciones RIL's DOR364 x G19833 y BAT93 x Jalo EEP558, en donde se obtuvo un 56% y 55% de polimorfismo, respectivamente.

Figura 9. Patrones de segregación de algunos de los SSR mapeados en la población de RIL's VAX6 x MAR1 mostrando diferentes productos de amplificación analizados en geles teñidos en solución con plata.

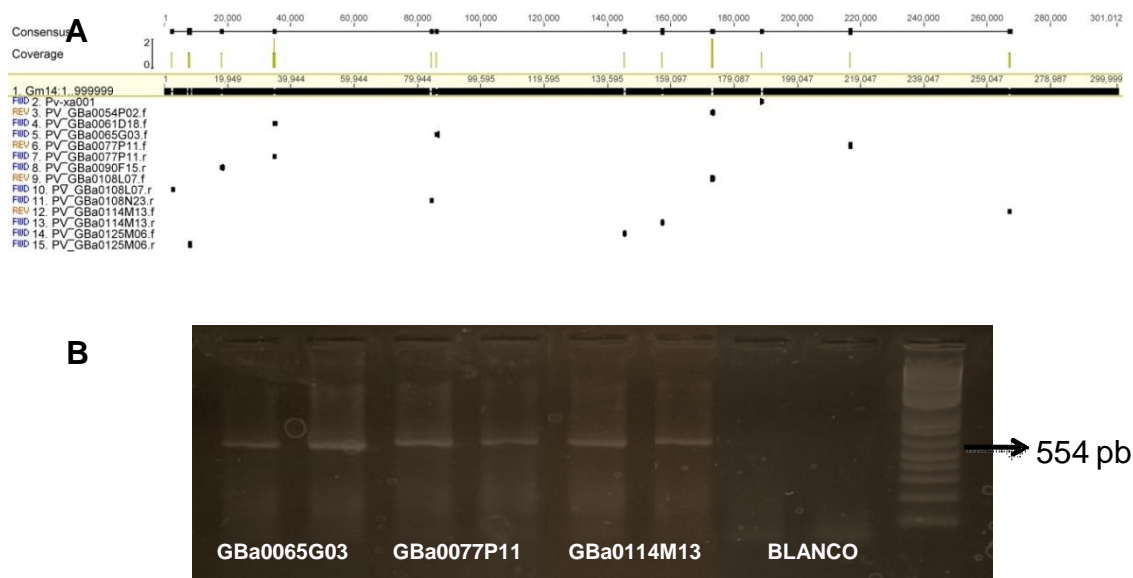


A causa del bajo polimorfismo encontrado en la cruce VAX6 x MAR1 se realizó una búsqueda de secuencias terminales de BACs relacionadas a los QTL mayores SU91 y SAP6 para el diseño de nuevos marcadores de Tipo SSR. Sin embargo a través del análisis *in silico* en el genoma de *Glycine max* (Schmutz et al. 2010) solo se encontró secuencias relacionadas al QTL SU91 que no habían sido analizadas en el estudio de Córdoba, Chavarro, Schlueter, et al. (2010); Córdoba, Chavarro, Rojas, et al. (2010).

Por medio del análisis de BLAST se determinó una región sinténica en el cromosoma 14 de *Glycine max* en donde se encontró una gran similitud con varias de las secuencias

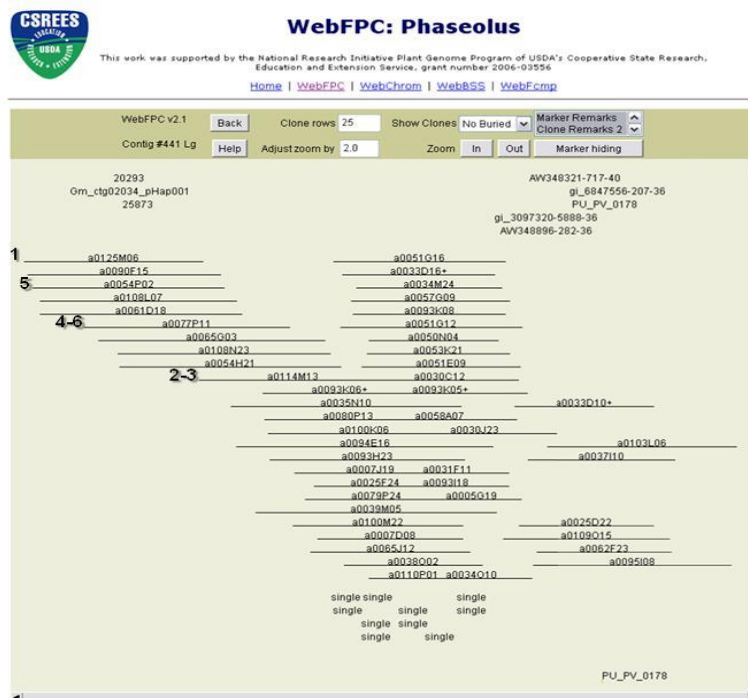
terminales BAC. En la figura 10A se muestran alineamientos de 13 secuencias terminales BAC en el cromosoma 14 de *Glycine max* con un e-value mayor a  $1 \times 10^{-100}$ , de los cuales 3 BACs fueron corroborados amplificando el marcador STS Pv-xa001 en la librería BAC G19833 obteniéndose como resultado un fragmento amplificado de 554 pb en los clones GBa0065G03, GBa0077P11 y GBa0114M13 (Figura 10B)

Figura 10. Búsqueda de BAC-SU91. A. Gm14 y BAC identificados. B. PCR con primers específicos en BACs.



Además, esta información fue fundamental para identificar en el mapa físico el contig donde estos BAC se integran, es por ello que se buscó en la página web de <http://phaseolus.genomics.purdue.edu/WebAGCoL/Phaseolus/WebFPC> (Schlueter et al. 2008) y se encontró en el contig 441 donde se acoplan los BACs identificados en el experimento *in silico* (Figura 11).

Figura 11. Contig 441 del mapa físico de Phaseolus vulgaris.



En total se obtuvieron 13 marcadores SSR a partir de 8 secuencias terminales BAC analizadas, estos se nombraron con la nomenclatura BMbS (Tabla 6). Entre los marcadores analizados se encontró un alto porcentaje de SSR con motivo di-nucleótido (46.15%), seguido de un 30.76% de trinucleótidos y el 23.07% restante de tetra, penta y hexanucleótidos.; los motivos dinucleótidos han sido más frecuente observándose en otros estudios como Blair et al. (2003b); Córdoba, Chavarro, Rojas, et al. (2010); Métais et al. (2002). También estos marcadores fueron probados en los parentales de la población RIL VAX6 X MAR1 por lo que se obtuvo 6 marcadores SSR que representan el 46,15% del polimorfismo, en comparación con el grupo de 103 SSRs anteriormente analizados por lo que es un alto porcentaje debiéndose posiblemente a la especificidad y cobertura que ellos poseen en la región QTL SU91.

Tabla 6. Marcadores Tipo SSR diseñados a partir de secuencias terminales de BAC en el cromosoma 8 de frijol en la región QTL SU91.

ID Marcador	ID BAC–end G19833	Tipo SSR	Motivo	Primer Forward	Primer Reverse	Tamaño Esperado (pb)	Ta (°C)	Polimorfismo VAX6 x MAR1
BMbS1	GBa0077P11r	Génico	(GA)4	GGATAACGAGTAAA TGAAATC	GAATCAGAGGTTA ATTGTTTAG	254	57	Monomórfico
BMbS2	GBa0077P11r	Génico	(GA)4	AAGAGTGTGTGAGA GAGATAGT	AAAGAGGGATGAT CTGTAATA	325	58	Monomórfico
BMbS4	GBa0077P11r	Génico	(TC)4	AAGAGTGTGTGAGA GAGATAGT	GGATGATCTGTAA TATTGTTGT	345	58	Polimórfico
BMbS5	GBa0077P11f	Genómico	(CTT)3	ATGTAATGATATCC TCTCTTG	AGATTACATCATC AATCATCTC	299	58	Polimórfico
BMbS6	GBa0065G03r	Genómico	(GGGGAG)2	TACAACTTTTGATCT CTCCTAC	CTCAGAGAGGTCA ACCTTA	291	58	Monomórfico
BMbS8	GBa0065G03f	Genómico	(TTCT)2	AGAAGTGCATTCTA TTTGTGT	GAGACAAGTACAC TTAGAACAA	311	58	Monomórfico
BMbS9	GBa0065G03f	Genómico	(ATAAA)2	GTAGTTTGCATGTTA GACTTTT	CTACATTCACACA ATGATAGAA	287	58	Monomórfico
BMbS10	GBa0054P02r	Génico	(TAT)9	GAGGATCAATGTTA ATGCAAG	GGGTTTCTGCTTT CACTGT	188	56	Polimórfico
BMbS11	GBa0114M13f	Genómico	(TA)8	CAACCTGACAAAGG AAAGG	GTTATTAATCCAA GGCACCAT	217	57	Monomórfico
BMbS12	GBa0114M13r	Génico	(GA)12	GATGCGTTGGATAG AATAGAA	TTTCCCTTTCTTT TCCTTAT	203	57	Polimórfico
BMbS13	GBa0114M13r	Génico	(CCT)9	TGCATCTAGAGTGT TTCCCTA	TAACACATCCAAA AACCCTAA	203	57	Polimórfico
BMbS14	GBa0114M13r	Génico	(GAA)24	GAGAGAAAGAAAGG TGAAAGG	TCAGATCTCGTAT CTCTCTGG	200	57	Monomórfico
BMbS15	GBa0125M06f	Génico	(TA)8	CGCATACTAAGTCA GGTTTTG	GGTTGAAACTATT TAAGGTCCA	226	57	Polimórfico

### 4.2.3. Análisis de marcadores SNPs

Un total de 9 pares de primers fueron diseñados flanqueando regiones ligadas a los marcadores SCAR SU91 y SAP6 (Tabla 7). Los amplicones de estos primers fueron secuenciados y sus secuencias depuradas con lo que se obtuvo más de un 90% de calidad y un promedio de secuencia de 1274 pb. Sumado a esto se realizaron alineamientos en diferentes genotipos con y sin resistencia a bacteriosis para encontrar variaciones o SNPs. Por lo anterior se obtuvieron 5 SNPs identificados en genotipos resistentes como VAX1, VAX6 y G40001, resultando en el diseño de 5 tripletes de primers (3 SNPs asociados a la región QTL SU91 y 2 SNPs a la región QTL SAP6). En el análisis de parentales de la población RIL VAX6 x MAR1 se obtuvieron solamente 3 SNPs polimórficos (2 SNPs asociados a la región QTL SU91 y 1 SNP a la región SAP6), 1 SNP monomórfico y un triplete de primers que en la prueba de PCR no generaron amplificación (Tabla 8).

De las 8 secuencias para SNPs desarrollados como parte de un proyecto de genómica comparativa de cultivos de leguminosas basados sobre grupos tentativos ortólogos (TOGs) (Penmetsa et al. en preparación; Blair et al. 2013) y de las 13 secuencias para SNPs desarrollados para el convenio del *Generation Challenge Programme* (GCP) (McConnell et al. 2010; Hyten et al. 2010) se diseñaron tripletes de primers específicos para detectar los SNPs encontrados en estas secuencias y después analizados en genotipos contrastantes a la resistencia a bacteriosis, encontrándose un total de 5 marcadores SNPs polimórficos (2 SNPs provenientes de los TOG y 3 SNPs del convenio GCP) para una representación del 4,76% de polimorfismo; y 16 SNPs monomórfico (6 SNPs de los TOG y 10 del convenio GCP). En cuanto al polimorfismo se considera que es bajo debido a la naturaleza de las secuencias analizadas puesto que provienen de genes putativos en frijol y también por el tipo de cruce analizado en este estudio (Tabla 9).

Tabla 7. Primers diseñados para secuenciación de ampliaciones ligados a las regiones QTL SU91 y SAP6.

ID primer	Primer Forward	Primer Reverse	Cromosoma	Mínimo Físico	Máximo Físico	Tamaño Secuenciado (pb)	Ta (°C)
Gvq_SU91_CBB3	AGTTGGCAAGAAACGT TCCTCCA	TCCGACGCCACAAC CGTCAC	8	59,361,169	59,361,571	402	53
BMb10_SU91_CBB4_CBB_5	TTCAACCTCACTTTTCT CCT	AGGAGCAGAATAAG CAAATG	8	59,426,900	59,428,305	1,405	51
BMb10_SU91_CBB3_CBB_4	GCTCATGACATTCCTT GATT	AGGAGAGAGACTAC CACTGCT	8	59,472,367	59,473,767	1,400	51
g91004686m_BMb10_CBB_1	GTGCAGCTTGCTATAG GTTC	GGCTTCAACTGAAGT TTCTC	8	59,473,793	59,475,196	1,403	54
BMb10_SU91_CBB1_CBB_2	TGAGCATCCATCAAGT GTTA	GATGAGTGGTCTCCA TGTTTC	8	59,496,533	59,497,939	1,406	52
SAP6_CBB5_CBB_6	GTTGGAGTTGACCTGA AAAA	TGATGAATGTGGTAC GAAGA	10	39,839,264	39,840,638	1,374	51
SAP6_CBB6_CBB_7	CTTGCATGCACCAAAT ACTA	GGTGGAGAAAAGAA CCCTAA	10	39,932,560	39,933,927	1,367	51
SAP6_CBB7_CBB_8	ATAGTGTCATGCACAT GGAG	AGGGTGTTATGTTTA TCAGGTC	10	39,938,213	39,939,547	1,334	52
SAP6_CBB8_CBB_9	GTTATAGCCAAAGGCA CAAT	GCATTTCAATCTAAC CAACC	10	40,019,886	40,021,262	1,376	51

Tabla 8. Marcadores Tipo SNPs diseñados a partir de ampliaciones secuenciados de las regiones QTL SU91 y SAP6 asociadas a resistencia a Bacteriosis.

ID Primer	ID SNPs	Crm	Ubicación Física (pb)	Primer Forward A	Primer Forward B	Primer Reverse	Alelo	Tamaño esperado	Ta (°C)	Polimorfismo VAX6 x MAR1
SUgVQ	Gvq_SU91_CBB3	8	59,361,372	gcgggcATACAC AGAAGGAGGA GACAAT	gcgggcagggcggc cATACACAGAA GGAGGAGACA AG	CCATGAAAA CCCCACCTC CA	T/A	83	63	Polimórfico
SUCBB4	BMb10_SU91_CBB4_CBB_5	8	59,473,164	gcgggcagggcgg ccCATGATGCA GTGCTCATT	gcgggcCATGAT GCAGTGCTCAT A	GAAAGCGTA TAATTTACAT GTGTAGTG	T/A	53	63	No amplifico
g91004686	g91004686m_BMb10_CBB_1	8	59,474,987	gcgggcCAGTG ATGTTAATGC GCAAt	gcgggcagggcggc cCAGTGATGTT AATGCGCAAa	TTTTGATGG AGGGAAGC AAC	T/A	53	60	Polimórfico
SAPCBB5	SAP6_CBB5_CBB_6	10	39,840,085	gcgggcTTTCAA TTCTTATTTAA CGAACTTTAt	gcgggcagggcggc cTTTCAATTCTT ATTAACGAAC TTTAc	CAAATAAG TATGCCAGA CTCAACA	T/C	100	63	Monomórfico
SAPCBB8	SAP6_CBB8_CBB_9	10	40,020,516	gcgggcCTTTAC CACATTTCCA CTATTTTTc	gcgggcagggcggc cTTTACCACATT TCCACTATTTTT g	AAACTTTTCG CACTTTCTC ATCA	C/G	71	57	Polimórfico

Tabla 9. Marcadores Tipo SNPs diseñados a partir de secuencias del convenio GCP y TOG ligados a regiones QTL SU91 y SAP6 para resistencia a Bacteriosis.

ID Primer	ID SNPs	Crn	Ubicación Física (pb)	Primer Forward A	Primer Forward B	Primer Reverse	Alelo	Ta (°C)	Polimorfismo VAX6 x MAR1
sc1523 84	sc00476ln2332 36_152384_G_ A_225	8	56,047,137	gcgggcagggcgcc ATACTTAGAGTC GCAGTCCCAa	gcgggcTACTTA GAGTCGAGTC CCAg	TGCATGGCACTC ATTTTTGT	G/A	63	Monomórfico
T89541 2	Pv_TOG89541 2_1_002_0000 1_Sep08_564	8	56,574,436	gcgggcagggcgcc CGCAAATGAG CATATCCa	gcgggcCGCAA ATGAGCATATC Ct	CCCGTGATTTTG CATCTCAG	A/T	63	Polimórfico
T90835 6_281	Pv_TOG90835 6_1_002_0000 1_Sep08_281	8	56,878,924	GAAACAAGCCT ATTTTGTCACTG G	gcgggcCTAAAA CCCAATCATAA CCCTCTa	gcgggcagggcgccA AAACCCAATCAT AACCTCTc	A/C	63	Polimórfico
T89755 8	Pv_TOG89755 8_1_002_0000 1_Sep08_103	8	57,793,531	gcgggcagggcgcc TCAACCTAAACC TAGGCGAAa	gcgggcTCAACC TAAACCTAGGC GAAg	TGAGTTGCCAC ATCTCCTT	A/G	63	Monomórfico
sc6670 26	sc00035ln8774 58_667026_A_ G_453	8	58,286,568	gcgggcagggcgcc TGATGAAACAGT TGTGCAACa	gcgggcGATGAA ACAGTTGTGCA ACg	GGATGTTGCCGA GGTACTT	A/G	63	Polimórfico
sc7655 9	sc00187ln4351 50_76559_G_ A_1352	8	59,421,333	gcgggcagggcgcc GGAAGCATGGA CTTAGTGACATa	gcgggcGAAGCA TGGACTTAGTG ACATg	TGGCATCTGATG TGAATTGC	G/A	61	Polimórfico
sc4507 53	sc00114ln5587 83_450753_G_ A_993	10	7,726,814	gcgggcagggcgcc TTTTGAAGTGGA TACATAATAGAC CTt	gcgggcTTTGAA GTGGATACATA ATAGACCTc	TTTATCGGCATTC TGTGCAA	G/A	63	Monomórfico
sc5798 4	sc00794ln1474 97_57984_G_ T_2837	10	8,246,146	gcgggcagggcgcc CCACATGCCAC TCTCTTACAt	gcgggcCCACAT GCCACTCTCTT ACAg	AACTCATGGATG CACAAACCA	G/T	63	Polimórfico



Continua Tabla 9.

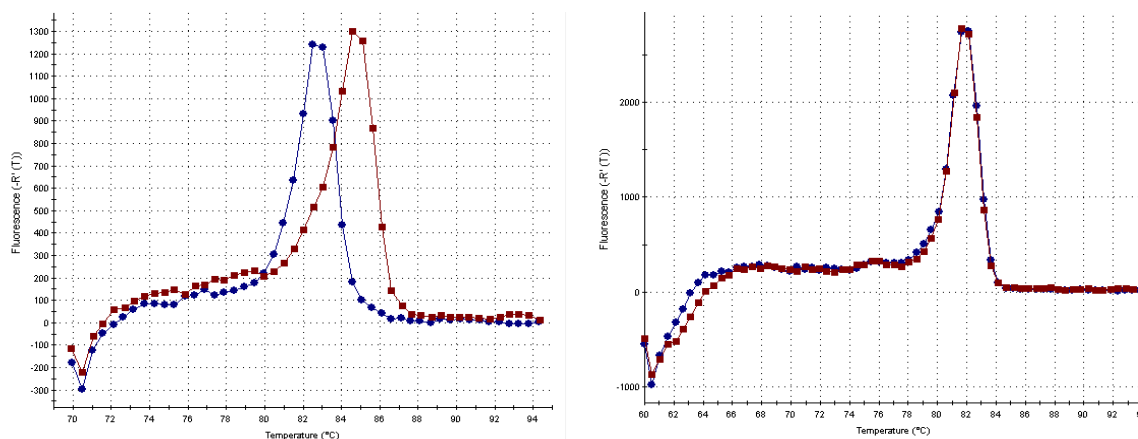
ID Primer	ID SNPs	Crn	Ubicación Física (pb)	Primer Forward A	Primer Forward B	Primer Reverse	Alelo	Ta (°C)	Polimorfismo VAX6 x MAR1
sc18225	sc01197ln96689_18225_C_T_33191	10	9,728,929	gcgggcTAATAGTTAGGACATTA TTGAAAGAAt	gcgggcagggcgccTAATAGTTA GGACATTATT GAAAGAAa	ACACACCCTCA TCCACTCC	C/T	63	Monomórfico
T898135	Pv_TOG898135_2_003_00001_Sep08_831	10	33,223,902	gcgggcagggcgccTAATGCAAT GTAAACTTATC CATCa	gcgggcATGCA ATGTAACTT ATCCATCg	TGTGACCACCC TAGTTTCACAA	A/G	63	Monomórfico
sc45578	sc01120ln103840_45578_G_A_3242	10	35,061,529	gcgggcTAATTT TGTAATGCATT GCTaTCAt	gcgggcagggcgccTAATTTTGT AATGCATTGC TaTCaC	CAGAGTCCTGA CCATGAAGGA	G/A	63	Monomórfico
T905494	Pv_TOG905494_1_002_00001_Sep08_1168	10	35,943,830	gcgggcACACAA CCATCTTCGT GAACTAt	gcgggcagggcgccCACAACCA TCTTCGTGAA CTAg	CAACAATCCAA AATGCACCA	T/G	63	Monomórfico
sc47410	sc00119ln552178_474103_A_C_102	10	37,909,445	gcgggcCTTTGT ATGCTTATAAT GCATGTt	gcgggcagggcgccCTTTGTATG CTTATAATGC ATGTg	TTGACTAGTGC ATATGTCCAAAc AC	A/C	63	Monomórfico
sc28293	sc00156ln490745_282933_C_T_120	10	38,712,918	gcgggcCACCAc ACCCATATTA GGTAga	gcgggcagggcgccACCACACC CATATTAAGG TAGg	AGTCATCCATC TCCTTTTTGGA A	C/T	63	Monomórfico
T907046	Pv_TOG907046_1_002_00001_Sep08_267	10	39,190,476	gcgggcagggcgccAGAACTGCA CATAAAATCCA AAa	gcgggcAGAAC TGCACATAAA ATCCAAAg	CTTGTCAGTTG GAACAGTCAAC A	A/G	63	Monomórfico

Continua Tabla 9.

ID Primer	ID SNPs	Crn	Ubicación Física (pb)	Primer Forward A	Primer Forward B	Primer Reverse	Alelo	Ta (°C)	Polimorfismo VAX6 x MAR1
sc70203	sc00051ln745799_70203_A_G_5766	10	39,512,308	gcgggcGCCCAT AATATAACTAC AAAGCACTg	gcgggcagggcgg ccTGCCCATATA ATATAACTAC AAAGCACTa	TCCGATCATGT AAAATTTCTGA GTGT	A/G	63	Monomórfico
sc18480	sc00309ln320131_184806_A_G_180	10	40,587,840	gcgggcagggcgg ccTGTTGATGG AGGGTATGCA Ta	gcgggcGTTGA TGGAGGGTAT GCATg	TTCTCTGGGAA ATAAAAGTTGT GG	A/G	63	Monomórfico
T900848	Pv_TOG900848_1_002_0001_Sep08_206	10	40,941,288	gcgggcTCCATAC CATAAAATTTAA TTAATCAa	gcgggcagggcggc cTCCATACCAT AAAATTTAAATTA ATCAg	ATTGAGAAGGGT GTGCCTGT	A/G	63	Monomórfico
sc387343	sc00006ln1798808_387343_G_A_10	10	41,120,498	gcgggcATAAGaT CATATTTGGGCT CTATt	gcgggcagggcggc cATAAGaTCATA TTTGGGCTCTA Tc	TTAAATTCCAGA GAAGCAGGTATA C	G/A	63	Monomórfico
T898468	Pv_TOG898468_1_002_0001_Sep08_779	10	42,310,795	gcgggcCAAACAA ATTTAACCCAAT TTTt	gcgggcagggcggc cCAAACAAATTT AACCCAATTTc	GTTTCACACCTT GCTAAAGTCCT	T/C	63	Monomórfico
sc9186	sc00006ln1798808_9186_C_T_1024	10	45,017,072	gcgggcCAAACAA ATTTAACCCAAT TTTt	gcgggcagggcggc cCAAACAAATTT AACCCAATTTc	GTTTCACACCTT GCTAAAGTCCT	C/T	63	Monomórfico

Los marcadores SNPs diseñados fueron evaluados en los parentales VAX6 y MAR1 a través de la técnica de cambio de Temperatura de melting ( $T_m$ -Shift) (Wang et al. 2005). En análisis con el equipo y software de PCR en tiempo Real se obtuvieron graficas de disociación de los productos amplificados encontrándose en algunos una diferencia en la temperatura de melting. En total se obtuvo 8 SNPs polimórficos, en donde 3 de los cuales se encontró el alelo A/T y en dos SNPs el alelo G/A, también se encontraron los alelos A/C, G/T y G/C. En las Figura 12, se observa un triplete de primers para detección de SNP en donde se logran identificar dos picos bien diferenciados en 2 °C de sus  $T_m$ s (izquierda) y un triplete en donde no hubo polimorfismo entre los genotipos estudiados (derecha).

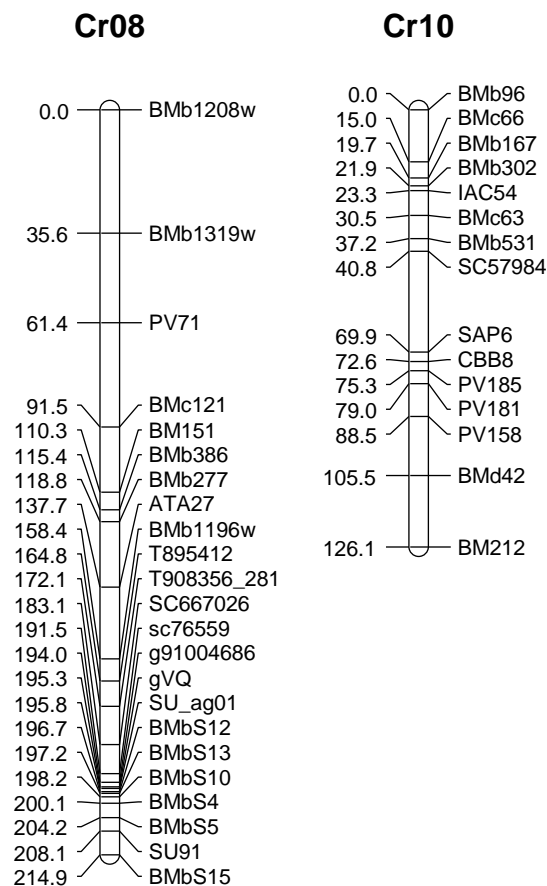
Figura 12. Curvas de disociación a través de la técnica de  $T_m$ -Shift. A la izquierda, el primer SC76559 y a la derecha el primer sc70203 ambos probados en los parentales VAX6 (línea azul) y MAR1 (línea Roja).



### 4.3. Construcción del mapa genético

En total 38 marcadores polimórficos fueron mapeados en una población RIL de 217 individuos de la cruz VAX6 x MAR1. De los cuales 28 marcadores fueron SSR, 8 marcadores SNPs y 2 marcadores SCAR. Por lo anterior se obtuvieron dos grupos de ligamientos consistentes con los cromosomas 8 y 10 de frijol, cada uno con un tamaño de 214,9 cM y 126.1 cM respectivamente. En el cromosoma 8 se mapearon 23 marcadores y en el cromosoma 10 se mapearon 15 marcadores para un promedio de cubrimiento por marcador de 8.9 cM (Figura 13).

Figura 13. Marcadores SSR y SNP mapeados en los GL 8 y 10 construidos a partir de Líneas Híbridas Recombinantes F9 derivadas de una cruce mesoamericana de VAX6 x MAR1.

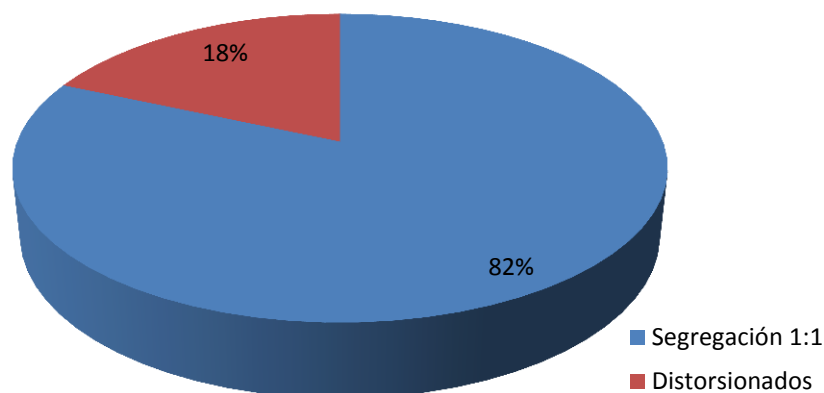


El tamaño de los cromosomas fueron consistentes con lo reportado por Galeano et al. (2011) en su estudio de saturación del mapa genético de una población intra-acervo DOR364 x BAT447 (ambos del acervo Mesoamericano) por medio de mapas consenso, sintenia y mapeo fino en donde obtuvo un total de 205.49 cM para el cromosoma 8 y 131.88 cM para el cromosoma 10.

El 82% de los marcadores presentaron una segregación esperada 1:1, y un 18% presentaron distorsión (Prueba  $\chi^2 P < 0.05$ ) al segregar en la población VAX6 x MAR1 (Figura 14). Marcadores distorsionados se presentaron en el GL8: BM151, BMb386,

ATA27, BMb1196w y BMbS15, y en el GL10 BMb167 y BM212, todos marcadores SSR y segados hacia el parental VAX6. Para cualquier cruce, de tipo domesticada o silvestre, la distorsión en la segregación es debida a diversos factores relacionados con gametos, embriones o plántulas no viables y este hecho se puede explicar por aborto selectivo de gametos o por fertilización selectiva de genotipos gameticos particulares. El tamaño de las zonas con distorsión está determinado por el nivel de recombinación (Blair et al. 2003b).

Figura 14. Segregación de los 38 marcadores moleculares polimórficos en los parentales VAX6 x MAR1.



Los marcadores mapeados fueron ubicados en su posición física en el genoma referencia del genotipo G19833 para validar su correcta ubicación en los cromosomas 8 y 10 de frijol y así descartar cualquier error en el genotipaje de los individuos RILs. Para hacer la comparación entre el mapa genético y físico de frijol se tomaron los datos promedios de la ubicación física de los marcadores y estas distancias fueron convertidas a centimorgan (cM) a través del programa *cMconvert* diseñado por Mathias Lorieux (sin publicar), se organizaron las matrices de datos en el programa MapDisto y se obtuvo una gráfica comparativa de ambos mapas.

En la figura 15, según el mapa físico el GL 8 del mapa genético presenta una cobertura entre 462,287 y 59,474,987 pb (4.62 cM – 141.29 cM) y el GL 10 presenta una cobertura desde 2,085,164 hasta 43,203,925 pb (8,61 cM – 123,55 cM). En el GL8 difiere la longitud física con respecto a la genética posiblemente debido al efecto de regiones no secuenciadas o huecos a través de algunas regiones del genoma lo que dificulta el

cálculo exacto de las posiciones físicas de bases a cM. Es de reportar inversiones significativas de los marcadores Pv71 (GL8) y BMb96 (GL10) posiblemente por efectos de recombinación únicos en estas regiones del genoma o simplemente por errores de análisis de estos marcadores en el genotipaje.

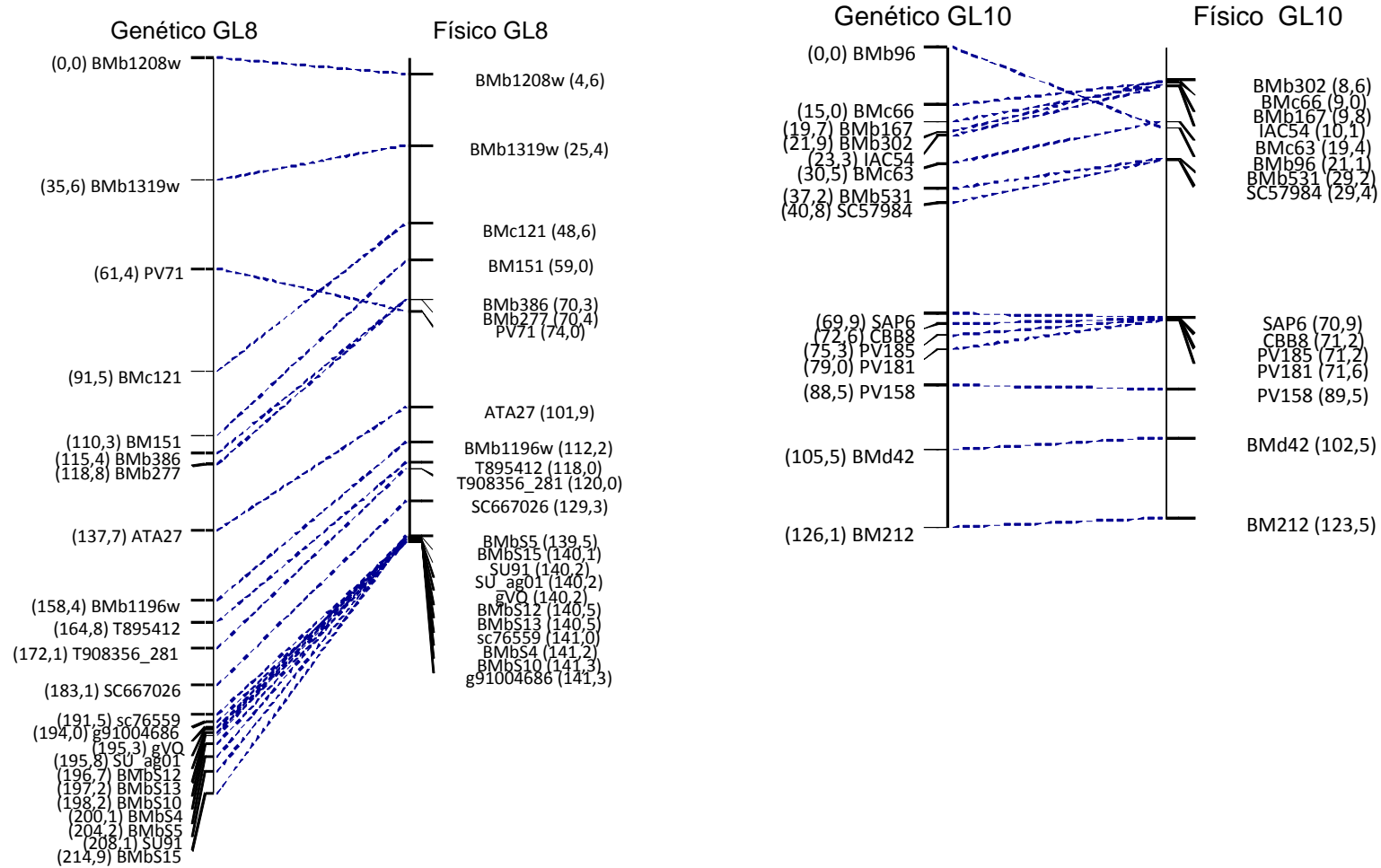


Figura 15. Integración del mapa físico (Valores en cM) y mapa genético (Valore en cM) de los cromosomas 8 y 10 del genoma de frijol. Mapa físico basado en el genoma del genotipo G19833.

#### 4.4. Identificación de QTLs relacionados a resistencia a bacteriosis

Se identificaron 7 QTLs asociados a resistencia para Bacteriosis, 5 QTLs en el GL8 (2 QTL asociados a la resistencia a la cepa de *X. axonopodis* y 3 QTL asociados a la cepa de *X. fuscans*) y 2 QTL en el GL 10 asociados a la cepa de *X. axonopodis*. Los QTLs se nombraron de acuerdo a lo planteado por Tar'an et al. (2002) en donde se enuncia el nombre de la característica, el grupo de ligamiento en donde se encontró y el número consecutivo del QTL (Tabla 10).

Tabla 10. QTL asociados a resistencia a bacteriosis, mediante análisis de mapeo por intervalo compuesto en QTL-cartographer para la población RIL VAX6 x MAR1.

ID QTL	Crm	Marcador cercano	Físico (pb)	LOD	Efecto de Incremento	Fuente	Valor significancia		
							%R <sub>2</sub>	TR <sub>2</sub>	LR
CBBXap08.1	8	BMbS12	59,387,356	196	-0.6217	MAR1	21.69	0.3316	19.826
CBBXap08.2	8	BMbS4	59,462,515	202	-0.6235	MAR1	21.70	0.3317	23.795
CBBXap10.3	10	SC57984	8,246,243	63	-0.5769	MAR1	19.00	0.3963	18.0407
CBBXap10.4	10	CBB8	40,020,516	72	-0.4386	MAR1	9.62	0.3476	16.6584
CBBXfp08.5	8	BMbS4	59,462,515	202.5	-0.9032	MAR1	38.86	0.3932	21.0484
CBBXfp08.6	8	BMbS10	59,473,844	198.5	-0.8487	MAR1	34.3	0.3476	29.8651
CBBXfp08.7	8	g91004686	59,474,987	194.5	-0.9096	MAR1	39.41	0.3987	22.7277

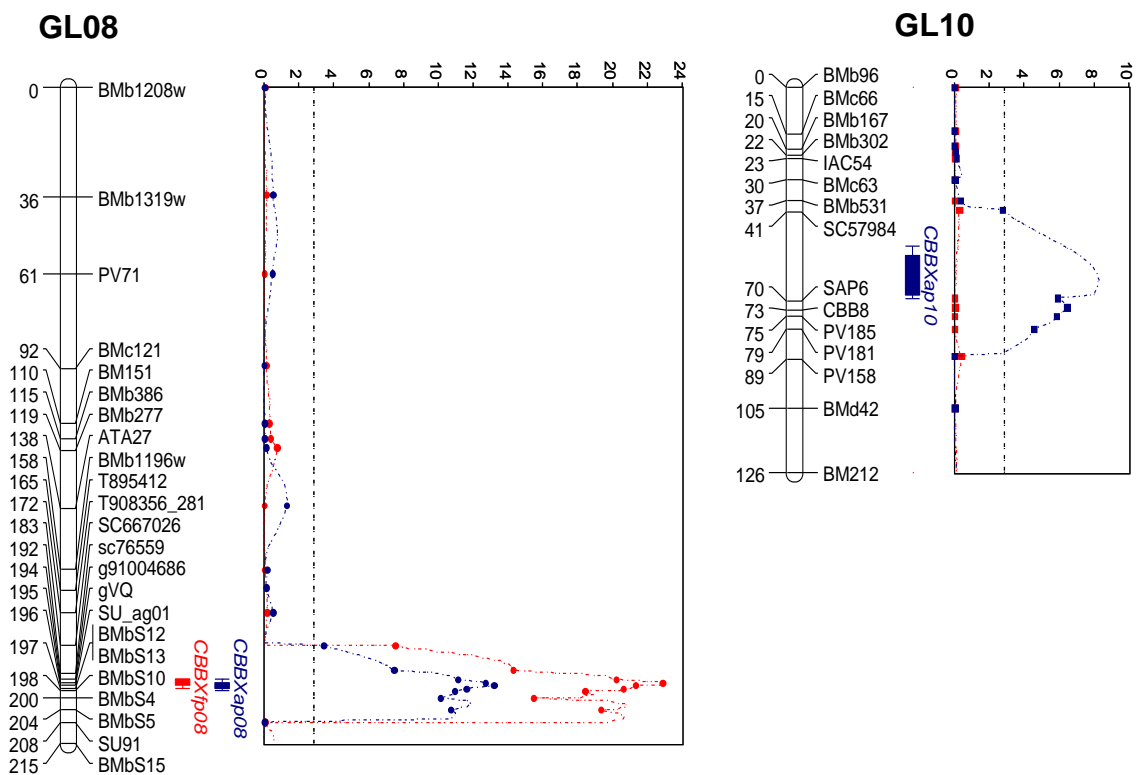
CBB: Common Bacterial Blight (Bacteriosis). <sub>1</sub> Valores de significancia, %R<sub>2</sub>: porcentaje de variación fenotípica que explica el QTL encontrado, TR<sub>2</sub>: variación fenotípica que explica el QTL, teniendo en cuenta el efecto de los demás QTLs, LR: razón de verosimilitud entre la hipótesis nula (L0) y la alternativa (L1).

En el GL8, los marcadores cercanos que presentaron un mayor porcentaje de variación fueron BMb12 (21.7%) y g91004686 (39.41%), estos asociados con resistencia a *X. axonopodis* y *X. fuscans*, respectivamente (Figura 16). En el GL10, asociados a la cepa de *X. axonopodis* se encontraron dos marcadores SNPs cercanos, SC757984 con porcentaje de variación del 19% y un efecto de incremento de -0.5769 y CBB8 con un 9.62% de variación fenotípica y un efecto de incremento de -0.9096. Según Kangfu Yu (2012) un buen QTL mayor debe estar entre el 20 y 40% de la variación de la resistencia permitiendo que más loci con un efecto de incremento pequeño contribuya a la total resistencia en genotipos. El efecto de incremento es el resultado que un marcador pueda



disminuir el rango de bacteriosis si está presente en una línea (ligado en acoplamiento) o ausente en una línea (ligado en repulsión) (Liu et al. 2008).

Figura 16. QTL identificados en la población RIL VAX6 x MAR1 asociados a resistencia a bacteriosis. En rojo región QTL asociada a resistencia a la cepa *X. fuscans* y en azul región QTL asociada a *X. axonopodis*.



En el análisis de QTL se observa que en datos tomados de resistencia a inoculaciones con la cepa *X. axonopodis* existe una variación fenotípica relacionada con las regiones QTLs SU91 y SAP6. En contraste con datos tomados de inoculaciones con *X. fuscans* solo existe una correlación con la región QTL SU91. Según lo encontrado se puede suponer una especificidad de SAP6 relacionada al tipo de raza o cepa de *Xanthomonas* que influencia la severidad de la reacción a bacteriosis. En otros estudios como en Duncan et al. (2012) se observó en algunos genotipos, con presencia del marcador SAP6, resistencia a cepas de *X. axonopodis* pero susceptibilidad a la cepa Xap25. Por lo anterior es conveniente en programas de mejoramiento tener en cuenta el uso de la cepa correcta para evaluar severidad de la reacción a bacteriosis.

En estudios como Vandemark et al. (2008) sugieren una epistasis recesiva entre los QTLs mayores BC420 y SU91 observándose que SU91 es esencial para la expresión efectiva de los mecanismos de resistencia, a diferencia de individuos que solo pueden tener solamente SAP6. Sin embargo, en este estudio se observó altos niveles de resistencia asociados con individuos que presentaban pirimidación de las regiones QTL SU91 y SAP6 con la cepa de *X. axonopodis*, indicando que una combinación a apropiada de la resistencia a bacteriosis, por medio de la selección asistida por marcadores, puede resultar en genotipos con un amplio rango de resistencia a diversidad de cepas del patógeno.

De los 217 individuos RILs estudiados de la población VAX6 x MAR1 se encontraron 8 individuos recombinantes para las regiones QTL SU91 y SAP6. Validando lo encontrado en el análisis de QTLs para el cromosoma 8 se sugiere la región ubicada entre 59,315,904 pb y 59,475,092 pb, para una longitud de cubrimiento de 159.19 Kpb, como la región en donde posiblemente se encuentra el gen o los genes que condicionan la resistencia a bacteriosis en el cromosoma 8 de frijol. Esta situación no es muy clara en el cromosoma 10 debido a la poca saturación de la región ligada al QTL SAP6, posiblemente, debido a la cercanía con el centrómero del cromosoma. Sin embargo por el estrecho ligamiento del marcador SCAR SAP6, el cual ha sido estudiado en varios estudios para búsqueda de genes de resistencia a bacteriosis (Miklas et al. 2003; Zapata et al. 2010) se ha calculado que la región asociada al QTL SAP6 podría encontrarse entre 39,938,699 y 40,193,539 pb, para una cobertura de 254.84 Kpb (Figura 17).

Lo anterior es congruente con el estudio reciente de Perry et al. (2013) en donde con base en estimaciones de distancias recombinadas de marcadores y comparaciones de genes potenciales de resistencia en el genoma del genotipo resistente Oac-Rex, identificaron para el QTL SU91 una región de 668 Kpb entre las distancia físicas 59.0 Mpb y 59.6 Mpb en el cromosoma 8 y para el QTL SAP6 una región de 1.1 Mpb entre las distancias 39.7 y 40.5 Mpb en el cromosoma 10. Además, ellos encontraron asociados 107 genes en la región QTL SU91 y 157 genes en la región QTL SAP6.

Figura 17. Análisis de regiones candidatas asociadas a resistencia para bacteriosis y recombinantes con base al genotipo y fenotipo.

Marcador/RIL	19	10	24	220	156	21	28	91	Crn	Fisico (pb)
BMb1208w									8	462,287
BMb1319w									8	3,156,948
BMc121									8	7,059,557
BM151									8	10,385,993
BMb386									8	41,127,188
BMb277									8	41,872,085
PV71									8	48,440,243
ATA27									8	53,695,612
BMb1196w									8	55,617,034
T895412									8	56,574,436
T908356_281									8	56,878,924
SC667026									8	58,286,568
BMbS5									8	59,316,138
BMbS15									8	59,349,569
SU91									8	59,359,082
SU_ag01									8	59,359,616
gVQ									8	59,361,377
BMbS12									8	59,387,356
BMbS13									8	59,387,783
sc76559									8	59,421,333
BMbS4									8	59,462,515
BMbS10									8	59,473,844
g91004686									8	59,474,987
BMb302									10	2,085,164
BMc66									10	2,269,277
BMb167									10	3,030,703
IAC54									10	3,276,893
BMc63									10	6,523,173
BMb96									10	6,642,120
BMb531									10	8,062,631
SC57984									10	8,246,243
SAP6									10	39,939,264
CBB8									10	40,020,516
PV185									10	40,020,580
PV181									10	40,193,397
PV158									10	41,174,050
BMd42									10	41,937,191
BM212									10	43,203,925
Xap	2.63	1.33	2.17	5.33	6.67	2.33	1.5	5		
Xpf	1.89	2.5	2.22	6.44	4.56	5.67	3.78	5.78		

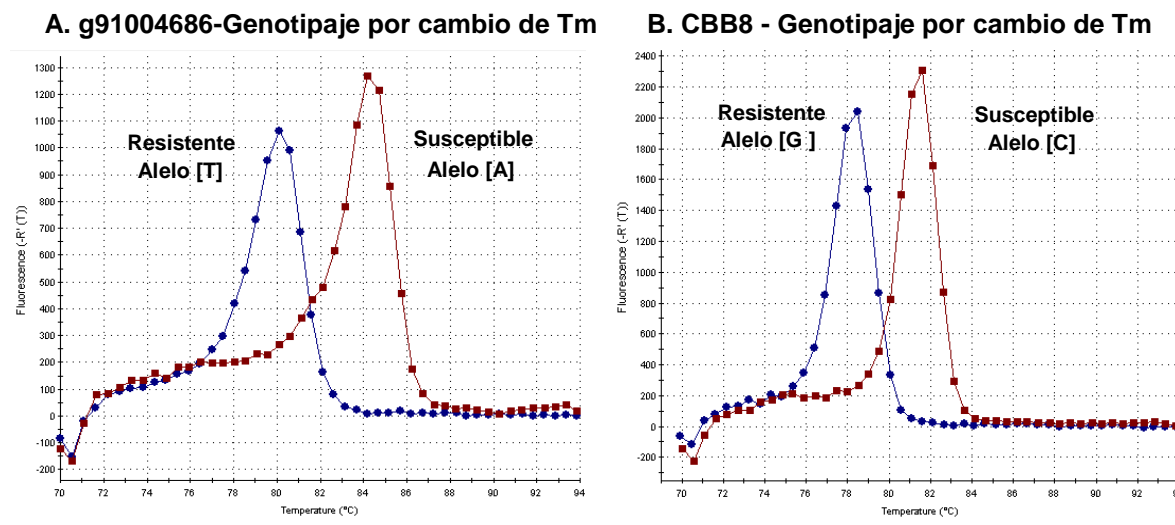
En rojo se muestra alelos del genotipo resistente VAX6 y en azul alelos del genotipo susceptible MAR1, junto con sus respectivos valores de incidencia de la enfermedad por recombinante y por cepa.

#### 4.5. Marcadores SNPs ligados a QTLs para resistencia a bacteriosis

En la amplificación en PCR en tiempo real por discriminación de cambio de Temperatura de melting para el marcador g91004686 los genotipos resistentes presentan el alelo SNP [ T ] con una Tm promedio de 80.7 °C y lo genotipos susceptibles presentan el alelo SNP [ A ] con una Tm promedio de 84.3 °C entre los dos con una diferencia de Tm de 3.6 °C

en promedio. En el marcador CBB8 los resistentes son discriminados con el alelo SNP [ G ] y los susceptibles con el alelo SNP [ C ] con una  $T_m$  promedio de 78.9 °C y 81.4 °C, respectivamente, diferenciándose en 2.5 °C (Figura 18).

Figura 18. Genotipaje con cambio de  $T_m$ . A. Marcador SNP g91004686. B. Marcador SNP CBB8. En azul genotipo VAX6 y en Rojo genotipo MAR1.



De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron varios genotipos con resistencia y susceptibilidad a bacteriosis, a los cuales se evaluó su resistencia a la cepa de *X. axonopodis* Xap 123 en condiciones de invernadero y se genotiparon con los marcadores SNPs g91004686 (QTL SU91) y CBB8 (QTL SAP6), los cuales tuvieron un porcentaje de variación fenotípica del 39.41% y 9,6%. El marcador CBB8 aunque presenta un bajo porcentaje de variación fenotípica con respecto al marcador SC57984 (19%) fue escogido por su estrecho ligamiento al marcador SCAR SAP6 a 2.7 cM (Tabla 11)

Tabla 11. Respuesta de genotipos de frijol a bacteriosis y determinación de genotipo a través de marcadores SNP ligados a los QTL mayores SU91 y SAP6.

Genotipo	g91004686		CBB8		Fuente <sup>a</sup>	Reacción a Bacteriosis	SCAR <sup>c</sup>
	Tm (°C)	Alelo	Tm (°C)	Alelo			
BAT441	84.1	A	81.4	C	M	7.6	Ninguno
CAL96	84.1	A	81.3	C	A	8.3	Ninguno
G19833	84.6	A	81.5	C	A	7.9	Ninguno
MAR1	84.2	A	81.5	C	M	8.1	Ninguno
VAX1	84.2	A	78.7	G	Pa	2.8	SAP6
VAX3	81	T	78.7	G	Piram	2.5	SU91+SAP6
VAX6	80.5	T	78.7	G	Piram	1.9	SU91+SAP6
XAN159	80.5	T	81.3	C	Pa	2	BC420+SU91
G40001	81	T	79.3	G	Pa	1.8	SU91
SEL1309	80.58	T	81.3	C	Pa	2.3	SU91

<sup>a</sup> M: Acervo Mesoamericano, A: Acervo Andino, Pa: *Phaseolus acutifolius*, Piram: Resistencia piramidada.

<sup>b</sup> Datos basados en la escala de reacción 1-9, donde 1-2-3 = resistente (R), 4-5-6 = intermedio (I), y 7-8-9 = susceptible (S).

<sup>c</sup> Presencia de SCAR BC420, SU91 y/o SAP6

En los genotipos resistentes VAX3, VAX6, XAN159, SEL1309 y la fuente original de resistencia G40001 se detectó el alelo resistente del marcador SNP g91004686 que se encuentra ligado al QTL SU91 lo cual es consistente con el dato de evaluación fenotípica y lo reportado por varios estudios (Singh & Muñoz 1996; Duncan et al. 2011; Vandemark et al. 2009; Perry et al. 2013). Así mismo con el marcador SNP CBB8, ligado al QTL SAP6, se encontró el alelo resistente en los genotipos VAX1, VAX3, VAX6 y sorpresivamente en el *P. acutifolius* G40001. Aunque se ha reportado la ausencia del marcador SCAR SAP6 en el genotipo G40001 en estudios recientes (Perry et al. 2013) se evaluó la homología de esta región en el genoma de G19833 (material sin amplificación el SCAR SAP6) encontrándose una alta significancia en la similitud con secuencias de genotipos con presencia del SCAR SAP6 y un completo acoplamiento del forward de dicho marcador. Este mismo hecho no sucede con el SCAR SU91 suponiendo que es una región única en individuos resistentes. En contexto, es necesario basar más estudios en el análisis de toda la región QTL SAP6 para determinar el origen de la resistencia.

En cuanto a ventajas en el uso del método de detección de SNPs con cambio de  $T_m$  se tiene una considerable reducción de costos y tiempo para la obtención de genotipaje a casi a la mitad. Lo anterior siendo útil en selección asistida por marcadores en ensayos en donde solo se necesita analizar pocos marcadores SNPs en miles de individuos. En la figura 19, se calcula el tiempo que se gasta en analizar 96 muestras con 1 marcador SNPs.

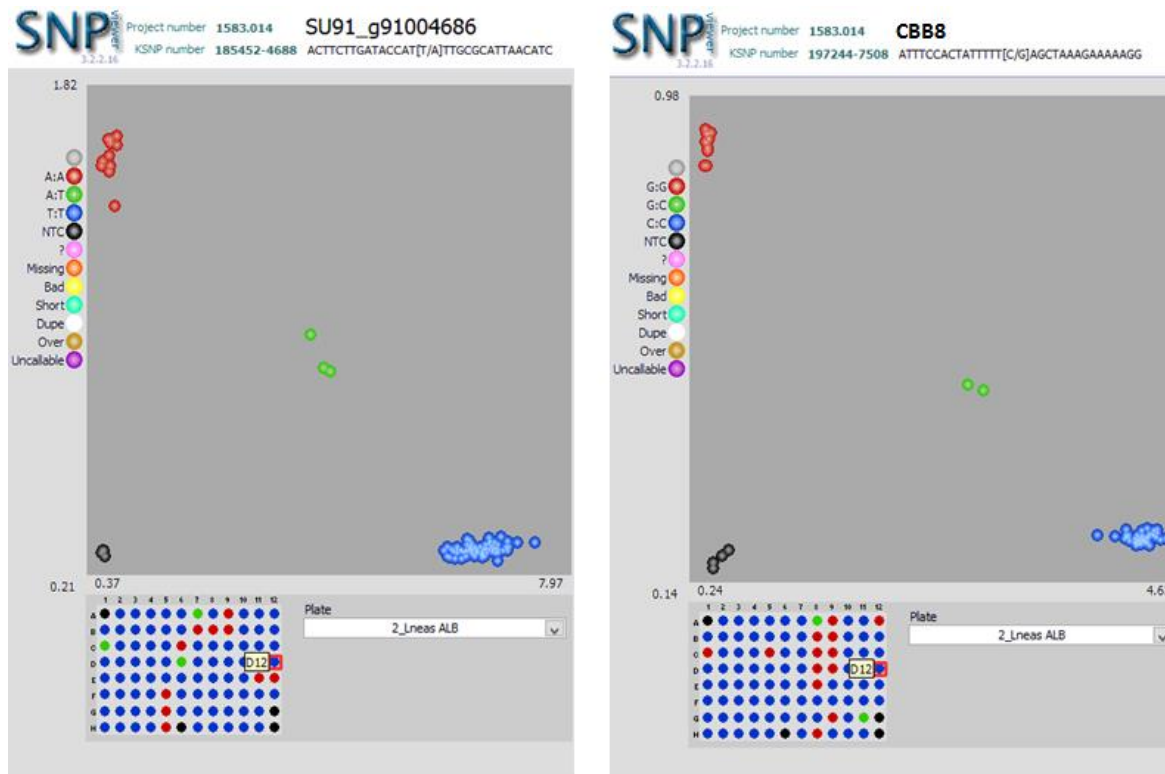
Figura 19. Comparación de tiempo de corrida de los métodos por genotipaje por SNPs y SCAR.

SNPs	Diseño PCR	Curvas de disociación/PCR				
SCARs	Diseño PCR	PCR			Gel	Electroforesis
Duración en Horas	1/2	2	3	3 1/2	4	4 1/2

Determinación de alelos en color amarillo.

Para determinar la versatilidad los marcadores SNPs asociados a resistencia a bacteriosis, estos se convirtieron a la tecnología KASPar de kbiosciences (<http://www.kbioscience.co.uk>), la cual se basa en una PCR específica de alelos competitivos. Con el objetivo de facilitar a otros investigadores una fácil forma de compartir los marcadores SNPs reportados en este trabajo (Figura 20). En frijol esta tecnología ya ha sido utilizada para análisis de diversidad en germoplasma y mapeo genético de poblaciones contrastantes de frijol (Cortés et al. 2011; Blair, Galeano, et al. 2012), en los últimos años esto se ha venido incrementando por la liberación del genoma de frijol y la ubicación de SNPs ligados a características agronómicas.

Figura 20. Marcadores g91004686 (izquierda) y CBB8 (derecha) con arreglos KASPar analizados a través de una plataforma automatizada de SNPs-Kbiosciences en líneas de frijol con herencia de resistencia a bacteriosis por *P. acutifolius* (Datos sin publicar).



Puntos azules representan individuos homocigotos recesivos, puntos rojos homocigotos dominantes y puntos verdes individuos heterocigotos. Datos de baja calidad o perdidos representado en puntos negros.

El genotipaje por la tecnología KASPar está disponible en una gran variedad de especies silvestres y domesticadas de animales y plantas. En un programa de Mejoramiento genético este tipo de tecnologías permite la detección y pirimidación de cientos de genes de interés agronómico en un sin número de muestras en poco tiempo, con gran flexibilidad y calidad.





## 5. Conclusiones

En la población VAX6 x MAR1 se validó la presencia de los dos QTLs mayores SU91 y SAP6 relacionados a la resistencia a bacteriosis, y la expresión genética de ambos QTLs de acuerdo al tipo de cepa de *Xanthomonas*, soportando una interacción planta-patógeno condicionada a la variabilidad genética del patógeno que hay que tener en cuenta en programas de mejoramiento.

El QTL mayor SU91 presenta una gran importancia en cuanto a la piramidación de genes ya que en presencia de otros QTLs BC420 y SAP6 incrementa la frecuencia de resistencia en el germoplasma de frijol, aun así como QTL mayor SU91 representa el mayor porcentaje de la variación fenotípica relacionada a resistencia a bacteriosis. Esto en gran medida es un factor clave para el desarrollo de cultivares resistentes a bacteriosis con valor comercial.

El uso de marcadores SNPs ligados a características de interés agronómico es una herramienta útil en programas de mejoramiento genético que puede ser aplicado en Selección asistida por Marcadores para el desarrollo de nuevas cultivares mejoradas. Por lo anterior, en sección de material con resistencia a bacteriosis, los marcadores SNPs obtenidos en este estudio son más dinámicos que los SCAR usados tradicionalmente, puesto que los SNPs son bialélicos y codominantes en comparación a los SCAR que son dominantes y con los que se podría errar en análisis de material segregante.

El método de cambio de Tm para análisis de SNPs es una técnica rápida y efectiva sin el uso de geles, además que en el análisis de muchas muestras con unos pocos SNPs es una alternativa de bajo costo para desarrollo local y no en plataformas externas automatizadas en donde es necesario enviar el ADN y contar con un gran número de SNPs para disminuir costos.



## 6. Bibliografia

- Acosta-Gallegos, J. a., Kelly, J.D. & Gepts, P., 2007. Prebreeding in Common Bean and Use of Genetic Diversity from Wild Germplasm. *Crop Science*, 47(Supplement\_3), pp.S44–S59. Available at: [https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/47/Supplement\\_3/S-44](https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/47/Supplement_3/S-44) [Accessed July 12, 2012].
- Barnes, E.H., 1979. Common Bacterial Blight of Bean. In E. H. Barnes, ed. *Atlas and Manual of Plant Pathology*. Boston, MA: Springer US, pp. 60–63. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4684-3495-8> [Accessed November 11, 2013].
- Basten, C.J., Weir, B.S. & Zeng, Z.-B., 2003. QTL Cartographer Version 1.17.
- Beebe, S. et al., 2001. Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. *Crops*, 862(May 2000), pp.854–862.
- Benchimol, L.L. et al., 2007. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(8), pp.1747–1762. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10722-006-9184-3> [Accessed July 17, 2012].
- Blair, M.W. et al., 2013. A high-throughput SNP marker system for parental polymorphism screening, and diversity analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 126(2), pp.535–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23124389> [Accessed November 12, 2013].

- Blair, M.W. et al., 2008. Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 118(1), pp.91–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784914> [Accessed July 17, 2012].
- Blair, M.W., Fernandez, A.C., et al., 2011. Construction and EST sequencing of full-length, drought stress cDNA libraries for common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC plant biology*, 11, p.171. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3240127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 17, 2012].
- Blair, M.W. et al., 2009. Development and diversity of Andean-derived, gene-based microsatellites for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC plant biology*, 9(1), p.100. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/9/100> [Accessed November 19, 2013].
- Blair, M.W. et al., 2003a. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 107(8), pp.1362–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504741> [Accessed July 17, 2012].
- Blair, M.W. et al., 2003b. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 107(8), pp.1362–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504741> [Accessed July 17, 2012].
- Blair, M.W., Galeano, C.H., et al., 2012. Development of a Mesoamerican intra-genepool genetic map for quantitative trait loci detection in a drought tolerant x susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Molecular breeding : new strategies in plant improvement*, 29(1), pp.71–88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3253996&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 17, 2012].
- Blair, M.W., Hurtado, N., et al., 2011. Gene-based SSR markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) derived from root and leaf tissue ESTs: an integration of the BMC series. *BMC plant biology*, 11, p.50. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3068092&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 30, 2012].
- Blair, M.W., González, L.F., et al., 2010. Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 121(2), pp.237–48. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886139&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 22, 2012].
- Blair, M.W. et al., 2007. Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 116(1), pp.29–43. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17924092> [Accessed July 17, 2012].
- Blair, M.W. et al., 2006. Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common bean. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 112(5), pp.913–23. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397789> [Accessed August 13, 2012].
- Blair, M.W., Astudillo, C., et al., 2011. QTL analyses for seed iron and zinc concentrations in an intra-genepool population of Andean common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik*, 122(3), pp.511–521. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21113704>.
- Blair, M.W., Medina, J.I., et al., 2010. QTL for seed iron and zinc concentration and content in a Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population. *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik*, 121(7), pp.1367–1380. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532862>.
- Blair, M.W., Hurtado, N. & Sharma, P., 2012. New gene-derived simple sequence repeat markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular ecology resources*, 12(4), pp.661–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22540633> [Accessed August 9, 2012].

- Blair, M.W., Soler, A. & Cortés, A.J., 2012. Diversification and population structure in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). J. P. Hart, ed. *PloS one*, 7(11), p.e49488. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0049488> [Accessed November 12, 2013].
- Bourdon, I. et al., 2001. Human Nutrition and Metabolism Beans , as a Source of Dietary Fiber , Increase Cholecystokinin and Apolipoprotein B48 Response to Test Meals in Men 1. , (February), pp.1485–1490.
- Broughton, W J et al., 2003. Beans ( *Phaseolus* spp .) – model food legumes. , pp.55–128.
- Broughton, W. J. et al., 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), pp.55–128. Available at: <http://www.springerlink.com/content/p120w04500473418/> [Accessed September 18, 2012].
- Buso, G.S.C. et al., 2006. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), pp.252–254. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-8286.2006.01210.x> [Accessed September 18, 2012].
- Campos, T. De et al., 2007. Notas Científicas Microsatellites for genetic studies and breeding programs in common bean. *Reactions*, (1994), pp.589–592.
- Castellanos, G., Jara, C. & Mosquera, G., 2011. Manejo de la bacteria en el laboratorio, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.
- Chacón S, M.I., Pickersgill, B. & Debouck, D.G., 2005. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 110(3), pp.432–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655667> [Accessed July 17, 2012].
- Chacón S., M.I. et al., 2007. Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematics and*

- Evolution*, 266(3-4), pp.175–195. Available at:  
<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00606-007-0536-z> [Accessed July 17, 2012].
- Chaisan, T. et al., 2010. In silico single nucleotide polymorphism discovery and application to marker-assisted selection in soybean. *Molecular Breeding*, 29(1), pp.221–233. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11032-010-9541-y> [Accessed November 12, 2013].
- Cichy, K. a. et al., 2005. Inheritance of Seed Zinc Accumulation in Navy Bean. *Crop Science*, 45(3), p.864. Available at:  
<https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/45/3/0864> [Accessed September 20, 2012].
- Córdoba, J.M., Chavarro, C., Rojas, F., et al., 2010. Identification and Mapping of Simple Sequence Repeat Markers from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Bacterial Artificial Chromosome End Sequences for Genome Characterization and Genetic–Physical Map Integration. *The Plant Genome Journal*, 3(3), p.154. Available at:  
<https://www.crops.org/publications/tpg/abstracts/3/3/154>.
- Córdoba, J.M., Chavarro, C., Schlueter, J. a, et al., 2010. Integration of physical and genetic maps of common bean through BAC-derived microsatellite markers. *BMC genomics*, 11, p.436. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3091635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cortés, A.J., Chavarro, M.C. & Blair, M.W., 2011. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Tag Theoretical And Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik*, 123(5), pp.827–845. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785951>.
- Cruz, E.P. et al., 2005. Spatial Distribution of Genetic Diversity in Wild Populations of *Phaseolus vulgaris*L. from Guanajuato and Michoacán, Méexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(5), pp.589–599. Available at:  
<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10722-004-6125-x> [Accessed July 25, 2012].

- Debouck, D. G. y Hidalgo, R., 1985. Morfología de la planta de frijol común. In: Frijol: Investigación y Producción. *CIAT-PNUD*.
- Díaz, L.M. & Blair, M.W., 2006. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 114(1), pp.143–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17047911> [Accessed September 18, 2012].
- Duncan, R.W., Gilbertson, R.L. & Singh, S.P., 2012. Direct and Marker-Assisted Selection for Resistance to Common Bacterial Blight in Common Bean. *Crop Science*, 52(4), p.1511. Available at: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/52/4/1511> [Accessed October 22, 2013].
- Duncan, R.W., Singh, S.P. & Gilbertson, R.L., 2011. Interaction of common bacterial blight bacteria with disease resistance quantitative trait loci in common bean. *Phytopathology*, 101(4), pp.425–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21391823>.
- Durham, K.M. et al., 2013. Interaction of common bacterial blight quantitative trait loci in a resistant inter-cross population of common bean W. Link, ed. *Plant Breeding*, 45(2001), p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/pbr.12103> [Accessed November 12, 2013].
- Fonsêca, A. et al., 2010. Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 18(4), pp.487–502. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886897&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 17, 2012].
- Freyre, R. et al., 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 97(5-6), pp.847–856. Available at: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s001220050964>.



- Gaitan-Solis, E. et al., 2002. Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus ssp.* *Crop Science*, 42(6), pp.2128–2136. Available at: <http://crop.scijournal.org/cgi/content/abstract/42/6/2128>.
- Gaitán-Solís, E. et al., 2008. Single nucleotide polymorphisms in common bean: their discovery and genotyping using a multiplex detection system. *Plant Gen*, 1, pp.125–134. Available at: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/tpg/abstracts/1/2/125> [Accessed November 12, 2013].
- Galeano, C.H. et al., 2009. CEL I Nuclease Digestion for SNP Discovery and Marker Development in Common Bean ( *L.*). *Crop Science*, 49(2), p.381. Available at: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/49/2/381> [Accessed July 16, 2012].
- Galeano, C.H. et al., 2012. Gene-Based Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic and Association Mapping in Common Bean. *BMC genetics*, 13(1), p.48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22734675> [Accessed July 17, 2012].
- Galeano, C.H. et al., 2011. Saturation of an intra-gene pool linkage map: towards a unified consensus linkage map for fine mapping and synteny analysis in common bean. *PloS one*, 6(12), p.e28135. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3234260&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 16, 2012].
- Ganal, M.W., Altmann, T. & Röder, M.S., 2009. SNP identification in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 12(2), pp.211–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19186095> [Accessed November 11, 2013].
- Gepts, P. et al., 2008. Genomics of *Phaseolus* Beans , a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. *In Genomics of Tropical Crop Plants*, Moore, P.H., & Ming, R., pp.113–143.
- Gepts, P. et al., 2005. Legumes as a Model Plant Family . Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference 1. , 137(April), pp.1228–1235.

- Gepts, P., 2001. *Phaseolus vulgaris* ( Beans ). *Encyclopedia of Genetic*, pp.1444–1445.
- Grisi, M.C.M. et al., 2007. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. *Genetics and molecular research : GMR*, 6(3), pp.691–706. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050090>.
- Hanai, L.R. et al., 2007. Development , characterization , and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. *Biosystems*, 277, pp.266–277.
- Hyten, D.L. et al., 2010. High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC genomics*, 11(1), p.475. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/475> [Accessed November 12, 2013].
- Jung, G. et al., 1999. Confirmation of QTL Associated with Common Bacterial Blight Resistance in Four Different Genetic Backgrounds in Common Bean. , 1455, pp.1448–1455.
- Jung, G. et al., 1996. Molecular Markers Associated with Plant Architecture and Resistance to Common Blight, Web Blight, and Rust in Common Beans. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121(5), pp.794–803. Available at: <http://journal.ashspublications.org/content/121/5/794.abstract> [Accessed November 12, 2013].
- Kangfu Yu, C.S. and B.Z., 2012. *Applied Photosynthesis* M. Najafpour, ed., InTech. Available at: <http://www.intechopen.com/books/applied-photosynthesis/development-and-application-of-molecular-markers-to-breed-common-bean-phaseolus-vulgaris-l-for-resis> [Accessed November 11, 2013].
- Kearse, M. et al., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12), pp.1647–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3371832&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 7, 2013].

- Kelly, J.D. et al., 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(2-3), pp.135–154. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378429003000340> [Accessed July 22, 2012].
- Kim, K.-S. et al., 2010. Fine mapping the soybean aphid resistance gene Rag1 in soybean. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 120(5), pp.1063–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035316> [Accessed July 26, 2012].
- Koressaar, T. & Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(10), pp.1289–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379693> [Accessed November 8, 2013].
- Larsen, R.C. & Miklas, P.N., 2004. Generation and Molecular Mapping of a Sequence Characterized Amplified Region Marker Linked with the Bct Gene for Resistance to Beet curly top virus in Common Bean. *Phytopathology*, 94(4), pp.320–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944106>.
- Liu, S., Yu, K. & Park, S.J., 2008. Development of STS markers and QTL validation for common bacterial blight resistance in common bean. *Plant Breeding*, 127, pp.62–68. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0523.2007.01423.x> [Accessed August 13, 2012].
- Liu, S.Y. et al., 2010. Construction of a BAC library and a physical map of a major QTL for CBB resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genetica*, 138(7), pp.709–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20419470> [Accessed July 17, 2012].
- Lorieux, M., 2008. MapDisto version 1.7. *Methods*, (September).
- Mahuku, G.S., Jara, C. & Beebe, S., 2003. Sources of resistance to angular leaf spot ( *Phaeoisariopsis griseola* ) in common bean core collection , wild *Phaseolus vulgaris* and secondary gene pool. *Small*, pp.303–313.

- Mayer, C., 2006. Phobos 3.3.11. Available at:  
[http://www.rub.de/spezzoo/cm/cm\\_phobos.htm](http://www.rub.de/spezzoo/cm/cm_phobos.htm).
- McConnell, M. et al., 2010. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 121(6), pp.1103–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20607211> [Accessed July 17, 2012].
- Mejía-Jiménez, A. et al., 1994. Interspecific hybridization between common and tepary beans: increased hybrid embryo growth, fertility, and efficiency of hybridization through recurrent and congruity backcrossing. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 88(3-4), pp.324–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186014> [Accessed November 11, 2013].
- Meksem, K. & Kahl, G. eds., 2005. *The Handbook of Plant Genome Mapping*, Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Available at:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/3527603514> [Accessed November 20, 2013].
- Métais, I. et al., 2002. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 104(8), pp.1346–1352. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582590> [Accessed July 31, 2012].
- Miklas, P. & Delorme, R., 2000. Bacterial, Fungal, and Viral Disease Resistance Loci Mapped in a Recombinant Inbred Common Bean Population (Dorado'/XAN 176). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(4), pp.476–481. Available at: <http://journal.ashspublications.org/content/125/4/476.short> [Accessed November 12, 2013].
- Miklas, P., Johnson, E. & Stone, V., 1996. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. *Crop* .... Available at:  
<https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/36/5/CS0360051344> [Accessed November 12, 2013].

- Miklas, P.N. et al., 2003. A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No . 5. , (5), pp.137–146.
- Miklas, P.N. et al., 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica*, 147(1-2), pp.105–131. Available at: <http://www.springerlink.com/content/u6w235m7337n477/> [Accessed August 15, 2012].
- Miklas, P.N. et al., 1996. Selective Mapping of QTL Conditioning Disease Resistance in Common Bean. *Crop Science*, 36, pp.1344–1351.
- Miklas, P.N. & Singh, S.P., 2007. Common Bean. In C. Kole, ed. *Pulses, Sugar and Tuber Crops*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–31.
- Mkandawire, A.B.C. et al., 2004. Genetic Diversity and Pathogenic Variation of Common Blight Bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) Suggests Pathogen Coevolution with the Common Bean. *Phytopathology*, 94(6), pp.593–603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943484> [Accessed September 18, 2012].
- Osborni, T.C. et al., 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4849), pp.207–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17800917>.
- Pedraza, F. et al., 1997. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis comun (CBB). In S. . Singh & O. Voysest, eds. *Taller de mejoramiento de frijol para el siglo XXI: Bases para una estrategia para America Latina (In Spanish)*. CIAT, Cali, Colombia, pp. 130–134.
- Perry, G. et al., 2013. A comparison of the molecular organization of genomic regions associated with resistance to common bacterial blight in two *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Frontiers in plant science*, 4(August), p.318. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3756299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 22, 2013].

- Powell, W. et al., 1996. The comparison of RFLP , RAPD , AFLP and SSR ( microsatellite ) markers for germplasm analysis. *Crop Research*, pp.225–238.
- Rafalski, A., 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current opinion in plant biology*, 5(2), pp.94–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856602>.
- Rafalski, J.A., 2002. Novel genetic mapping tools in plants : SNPs and LD-based approaches. *Plant and Soil*, 162, pp.329–333.
- Santalla, M. et al., 1999. Breeding for culinary and nutritional quality of common bean ( *Phaseolus vulgaris* L .) in intercropping systems with maize ( *Zea mays* L .). *Euphytica*, 3(4), pp.225–229.
- Santana, E.A., Beaver, D.P.C.J.S. & Zaiter, H.Z., 1993. common beans ( *Phaseolus vulgaris* L .). , (10093), pp.211–216.
- Schlueter, J. a. et al., 2008. BAC-end Sequence Analysis and a Draft Physical Map of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genome. *Tropical Plant Biology*, 1(1), pp.40–48. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12042-007-9003-9> [Accessed August 9, 2012].
- Schmutz, J. et al., 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463, pp.178–83.
- Van Schoonhoven, A. & Pastor-Corrales, M. a., 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. , pp.1–11.
- Schwartz, H.F. & Pastor-Corrales, M.A., 1989. *Bean Production Problems in the Tropics*, CIAT. Available at: <http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=jz76qSE1CL4C&pgis=1> [Accessed November 11, 2013].
- Scott, M.E. & Michaels, T.E., 1992. Xanthomonas Resistance of Phaseolus Interspecific Cross Selections Confirmed by Field Performance. *HortScience*, 27(4), pp.348–350.

- Available at: <http://hortsci.ashspublications.org/content/27/4/348.abstract> [Accessed November 11, 2013].
- Shi, C. et al., 2012. Development of candidate gene markers associated to common bacterial blight resistance in common bean. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 125(7), pp.1525–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22798059> [Accessed October 24, 2012].
- Singh, S.P., 2001. Broadening the Genetic Base of Common Bean Cultivars : A Review. *Crop Science*, 41, pp.1659–1675.
- Singh, S.P. ed., 1999. *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*, Dordrecht: Springer Netherlands. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-015-9211-6> [Accessed November 11, 2013].
- Singh, S.P. et al., 2003. Registration of A 339, MAR 1, MAR 2, and MAR 3 angular-leaf-spot-and anthracnose-resistant common bean germplasm. Available at: <http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/xmlui/handle/123456789/4448> [Accessed November 12, 2013].
- Singh, S.P. & Muñoz, C.G., 1996. Resistance to Common Bacterial Blight among Phaseolus Species and Common Bean Improvement. *Tara*, 39(1), pp.80–89.
- Singh, S.P., Munoz, C.G. & Teran, H., 2001. Registration of Common Bacterial Blight Resistant Dry Bean Germplasm VAX 1, VAX 3, and VAX 4. *Crop Science*. Available at: <http://www.highbeam.com/doc/1G1-71190528.html> [Accessed November 11, 2013].
- Sparvoli, F. & Bollini, R., 1998. Arcelin in wild bean ( Phaseolus vulgaris L .) seeds : sequence of arcelin 6 shows it is a member of the arcelins 1 and 2 subfamily. *Genetic Resources and Crop Evolution*, pp.383–388.
- Tar, B., Michaels, T.E. & Pauls, K.P., 2002. Genetic Mapping of Agronomic Traits in Common Bean. *Genetics*, 42(April), pp.544–556.

- 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 / National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada*, 44(6), pp.1046–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11768208> [Accessed November 12, 2013].
- Terán, H. et al., 2013. Simultaneous selection for resistance to five bacterial, fungal, and viral diseases in three Andean × Middle American inter-gene pool common bean populations. *Euphytica*, 189(2), pp.283–292. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10681-012-0803-0> [Accessed October 26, 2012].
- Thomas, C. V. & Waines, J.G., 1984. Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. *J. Hered.*, 75(2), pp.93–98. Available at: <http://jhered.oxfordjournals.org/content/75/2/93.short> [Accessed November 11, 2013].
- Tsai, S.M.M. et al., 1998. QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 204(1), pp.135–145. Available at: <http://www.springerlink.com/content/nrh0327r6pp1ww23/> [Accessed September 18, 2012].
- Vallejos, C.E., Sakiyama, N.S. & Chase, C.D., 1992. *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 131, pp.733–740.
- Vandemark, G.J. et al., 2009. Interactions between QTL SAP6 and SU91 on resistance to common bacterial blight in red kidney bean and pinto bean populations. *Euphytica*, 170(3), pp.371–381. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10681-009-0013-6> [Accessed September 18, 2012].
- Vandemark, G.J., Fourie, D. & Miklas, P.N., 2008. Genotyping with real-time PCR reveals recessive epistasis between independent QTL conferring resistance to common bacterial blight in dry bean. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 117(4), pp.513–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512042> [Accessed September 11, 2012].



- Voorrips, R.E., 2002. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1), pp.77–78. Available at: <http://jhered.oxfordjournals.org/content/93/1/77.full> [Accessed November 13, 2013].
- Wang, J. et al., 2005. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. *BioTechniques*, 39(6), pp.885–893. Available at: <http://www.biotechniques.com/article/05396RR01> [Accessed October 29, 2012].
- Yu, K. et al., 2004. An SSR marker in the nitrate reductase gene of common bean is tightly linked to a major gene conferring resistance to common bacterial blight. *Euphytica*, 138(1), pp.89–95. Available at: <http://www.springerlink.com/content/r766407282nv1207/> [Accessed September 18, 2012].
- Yu, K., Park, S.J., Poysa, V., et al., 2000. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The Journal of heredity*, 91(6), pp.429–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11218079>.
- Yu, K., Park, S.J. & Poysa, V., 1999. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42(1), pp.27–34. Available at: [http://www.nrc.ca/cgi-bin/cisti/journals/rp/rp2\\_abst\\_e?gen\\_g98-100\\_42\\_ns\\_nf\\_gen42-99](http://www.nrc.ca/cgi-bin/cisti/journals/rp/rp2_abst_e?gen_g98-100_42_ns_nf_gen42-99).
- Yu, K., Park, S.J. & Poysa, V., 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breeding*, 119(5), pp.411–415. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00514.x>.
- Yu, K., Shi, C. & Zhang, B., 2012. Development and Application of Molecular Markers to Breed Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for Resistance to Common Bacterial Blight (CBB) – Current Status and Future Directions. In M. M. Najafpour, ed. *Applied Photosynthesis Edited*. pp. 365–388. Available at: [www.intechopen.com/books/applied-photosynthesis/development-and-application-of-molecular-markers-to-breed-common-bean-phaseolus-vulgaris-l-for-resis](http://www.intechopen.com/books/applied-photosynthesis/development-and-application-of-molecular-markers-to-breed-common-bean-phaseolus-vulgaris-l-for-resis).

- Yu, Z.H., Stall, R.E. & Vallejos, C.E., 1998. Detection of Genes for Resistance to Common Bacterial Blight of Beans. *Crop Science*, 38(5), p.1290. Available at: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/38/5/CS0380051290>.
- Zapata, M., Beaver, J.S. & Porch, T.G., 2010. Dominant gene for common bean resistance to common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Euphytica*, 179(3), pp.373–382. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10681-010-0313-x> [Accessed August 8, 2012].
- Zapata, M., Freytag, F. & Wilkinson, R., 1985. Evaluation for bacterial blight resistance in beans. *Phytopathology*, 75(9), pp.1032–1039. Available at: [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n09\\_1032.PDF](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n09_1032.PDF) [Accessed November 11, 2013].