

Una Propuesta Genómica para el Fitomejoramiento de Frijol Común para Resistencia a Plagas, Enfermedades e Insectos

Matthew W. Blair¹, Luz Nayibe Garzon³, Gustavo
Ligaretto⁴, Oscar O. Oliveros⁴, Ramón Garza
Garcia⁵ y Cesar Cardona² (q.e.p.d.).

¹ Tennessee State University, Nashville TN, Estados Unidos, ² Univ. Nacional –
Palmira, Valle, Colombia, ³ Univ. Industrial de Santander, Bucaramanga,
Colombia ⁴ Univ. Nacional – Bogotá, DC, Colombia, ⁵ INIFAP, Texcoco, México.

20 de Mayo, 2015

Resumen



- Quien les habla?
- Las Plagas del Frijol
- El Genoma de Frijol y su ADN
- Multitud de Marcadores
- Diversidad de Frijol por SSR, SNP
- Selección asistida por marcadores
- Ejemplo de enfermedades
- Ejemplo de insectos
- Conclusiones



Quien Les Habla?



- Profesor Asociado / Tennessee State University, Nashville TN, USA
- Profesor Adjunto ; Cornell University y Universidad Nacional de Colombia.
- Fitomejorador de Frijol Andino, CIAT, con enfoque en tolerancia a estrés abiotico y resistencia a plagas y patógenos.
- Post-doctoral – Biotecnología de Arroz – resistencia a bacteriosis.
- Asistente de investigación, Asgrow con maiz, UPR con frijol, y Instituto Rodale con amaranto.



Laboratorio de marcadores (MAS)

- Ubicado de Nashville, Tennessee en la Univ. Estadual
 - Biotecnología de Animales, Plantas y Suelos



Desafios Mejoramiento en Frijol Comun: Mancha Angular y pudriciones radiculares

Patogenos:

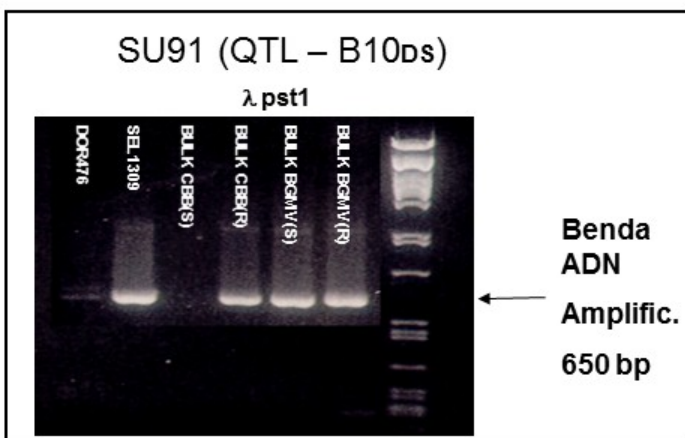
- *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris
- *Pythium* / *Fusarium* spp.
- Algunos genes de resistencia conocidos para mancha angular.
- Estudios de herencia de la resistencia a pudricion necesario.
- Algunos marcadores desarrolladas



Uso de marcadores: Bacteriosis

Patogeno: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

- Infección en hojas, vainas y semillas
- Resistencia cuantitativa – SCARs hechos para algunos de los QTLs mas importantes – algunos ya están siendo utilizados.



Genoma de Frijol 2014 / todo el ADN secuenciado en consorcio de G19833

ARTICLES

nature
genetics
OPEN

Grupo de Universidades Americanas:
Georgia, Michigan, Nebraska, North Dakota,
Tennessee mas la USDA y ayuda Francesa

A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications

Jeremy Schmutz^{1,2,17}, Phillip E McClean^{3,17}, Sujan Mamidi³, G Albert Wu¹, Steven B Cannon⁴, Jane Grimwood², Jerry Jenkins², Shengqiang Shu¹, Qijian Song⁵, Carolina Chavarro⁶, Mirayda Torres-Torres⁶, Valerie Geffroy^{7,8}, Samira Mafi Moghaddam³, Dongying Gao⁶, Brian Abernathy⁶, Kerrie Barry¹, Matthew Blair⁹, Mark A Brick¹⁰, Mansi Chovatia¹, Paul Gepts¹¹, David M Goodstein¹, Michael Gonzales⁶, Uffe Hellsten¹, David L Hyten^{5,16}, Gaofeng Jia⁵, James D Kelly¹², Dave Kudrna¹³, Rian Lee³, Manon M S Richard⁷, Phillip N Miklas¹⁴, Juan M Osorno³, Josiane Rodrigues^{5,16}, Vincent Thareau⁷, Carlos A Urrea¹⁵, Mei Wang¹, Yeisoo Yu¹³, Ming Zhang¹, Rod A Wing¹³, Perry B Cregan⁵, Daniel S Rokhsar¹ & Scott A Jackson⁶

Genoma de Frijol

Resumen:

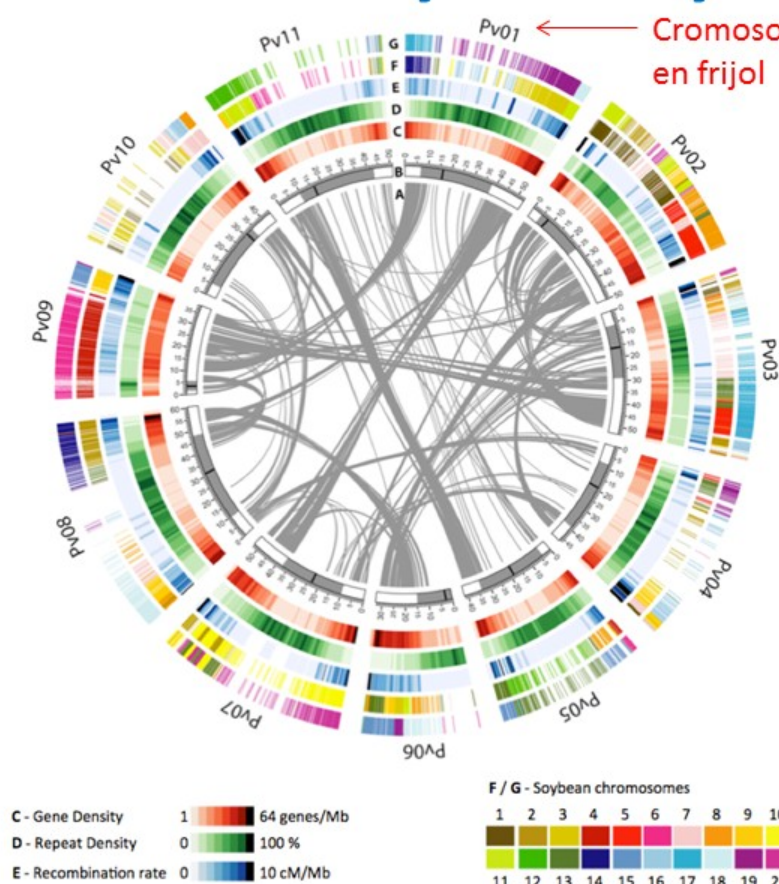
- G19833 (Andino) cultivar criollo del Perú como genotipo base
- Ensamblaje de 473 Mb de secuencias de próxima generación
- Representando 80% de la secuencia total del genoma de frijol estimado en 587 Mb
- En total 98% de las secuencias fueron anclados a 11 cromosomas del genoma haploide de frijol común
- Cada pseudo-molécula de frijol diploide duplicado por segmentos en el genoma de soya por este ser poliploide.
- En total 74 Mb de espacio génico fue importante en la domesticación del cual solo 10% fue compartido entre el acervo Andino y el acervo Mesoamericano
- Entender la resistencia a antracnosis (charla> L.N. Garzón

P. vulgaris – Recursos genómicas

Múltiples librerías - con secuenciación por tecnología de "next generation" 454 Flex

Librería	Plataforma de secuenciación	Tamaño promedio de lectura	Numero de lecturas	Cobertura del ensamblaje genómica
Linear	454 XLR & FLX+	362	38,107,155	18.64x
GPNB	454 XLR pares	2,798 ± 1,047	589,346	0.11x
GGAS	454 XLR pares	3,922 ± 643	1,940,576	0.41x
GXSf	454 XLR pares	3,991 ± 337	467,414	0.07x
HYFA	454 XLR pares	4,729 ± 497	1,648,022	0.25x
HYFC	454 XLR pares	4,736 ± 504	1,491,648	0.24x
HYFB	454 XLR pares	4,759 ± 528	1,196,104	0.17x
HXTI	454 XLR pares	8,022 ± 1,016	1,364,808	0.22x
GXNX	454 XLR pares	9,192 ± 1,058	878,832	0.16x
HXWF	454 XLR pares	11,903 ± 1,928	724,196	0.13x
HXWH	454 XLR pares	12,231 ± 1,902	413,396	0.08x
VUK	Sanger	34,956 ± 4,536	240,384	0.20x
VUL	Sanger	36,001 ± 4,632	88,320	0.08x
PVC	Sanger	121,960 ± 16,572	81,408	0.08x
PVA	Sanger	126,959 ± 25,658	89,017	0.09x
PVB	Sanger	135,292 ± 21,487	92,160	0.09x
Total		N/A	49,412,786	21.02x

Genoma de Frijol – Sintenia entre cromosomas y con Soya



1. Los enlaces entre sitios en los cromosomas en el círculo muestran que el frijol es resultado de un evento hace 56.5 M de años que lo volvió poliploide ancestral (igual que muchas leguminosas)
2. Sintenia entre frijol ($n=11$) y soya ($n=20$) muestra que para cada segmento cromosomal de frijol hay dos de soya, el resultado de un evento de tetra poliploidia hace 10 M de años.
3. Por ende, el frijol es un buen modelo $2n = 2x = 22$ (diploide) de la soya que es $2n = 4x = 40$ (de origen tetraploide).

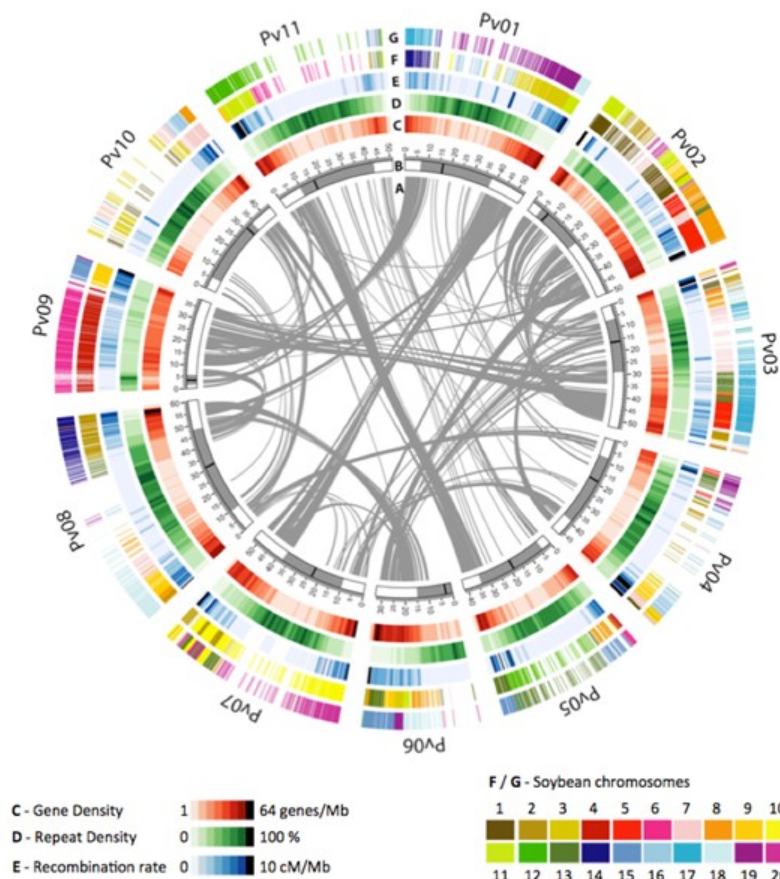
P. vulgaris – Recursos transcriptómicos

Múltiples librerías - con secuenciación por tecnología de "next generation" Illumina

Tipo de Recurso	Tipo de Tejido	Numero de lecturas
Sanger	Mescla	79,630
Illumina 2x150 bp	Raíces 10 DAP	65,429,570
Illumina 2x150 bp	Raíces 19 DAP	46,593,274
Illumina 2x150 bp	Nódulos 19 DAP	71,716,844
Illumina 2x150 bp	Tallo 10 DAP	40,933,844
Illumina 2x150 bp	Tallo 19 DAP	46,593,274
Illumina 2x150 bp	Hojas primarias 10 DAP	68,255,918
Illumina 2x150 bp	Trifolios jóvenes 19 DAP	66,127,642
Illumina 2x150 bp	Flores inmaduros	68,363,986
Illumina 2x150 bp	Flores enteras	66,112,818
Illumina 2x150 bp	Vainas jóvenes 1-5 cm sin semilla	66,133,582
Illumina 2x150 bp	Vainas verdes maduras 11.5-13.5 cm con semilla	120,724,870
Total RNA-Seq		726,985,622

ESTs

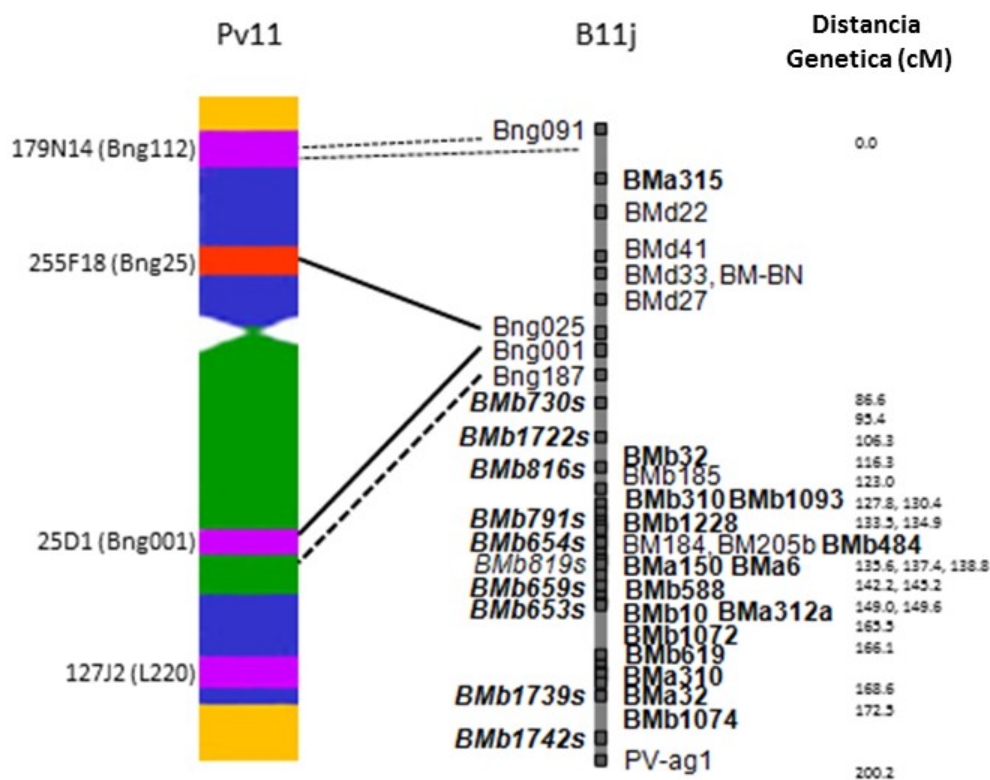
Genoma de Frijol – Ubicación de Genes



- Densidad de genes varia mucho (circulo rojo) pero por lo general están en zonas intersticiales de los cromosomas
- Los espacios sin muchos genes están llenos de elementos de ADN repetitivo (circulo verde) como retro-transposones
- La recombinación medida en una población F2 es limitada a las zonas terminales de cada cromosoma
- Entrecruzamiento de genes no son frecuentes en una gran zona central de cada cromosoma limitando el fitomejoramiento.

Blair et al. 2014 (PLOS One) muestra los mapas genéticos nuevos y viejos junto con los cariotipos de los cromosomas correspondientes del genoma de frijol común.

Cada Cromosoma saturado



Siguiendo el ejemplo de un solo cromosoma (B11j) el estudio demostró una riqueza de marcadores BMb (Bean microsatelites de BACs) en las regiones peri-centroméricas y intersticiales del cromosoma.

Todos estos marcadores son útiles para la selección de genes de resistencia (como Co-2 y Ur-11) ubicados en esta parte del genoma.

Diversidad de Frijol

❖ La secuenciación mostro mucha diversidad en frijol silvestre y una buena cantidad en frijol cultivado con domesticaciones en paralelo en los dos centros de origen

❖ **Mesoamericano**

❖ **Andino**

❖ Como puede distinguirse diferencias entre razas de frijol y sus relaciones con características morfológicas

❖ Para esto habíamos recurrido a varios marcadores moleculares (**SSR, SNP y Resecuenciacion**) en una evaluación de diversidad global en centros primarios (Colombia, Guatemala, México, Perú) y secundarios.

Estudio Global



Américas

Brasil
Bolivia
Chile

Colombia
Cuba
México

África

Etiopía
Kenia
Ruanda

Asia

China
Otro
FAO

Colecciones nacionales

China:

Colección nacional - CAAS = 6000

Colección FAO (var. criollos) = 190

Referencias

Zhang et al. 2009

Bolivia:

Colección nacional (var. criollos) CFP = 417

Colección FAO (var. criollos) = 447

Ávila et al. 2012

Blair et al. 2012

Colombia:

Colección nacional - CORPOICA = 343

Díaz et al. 2010

México:

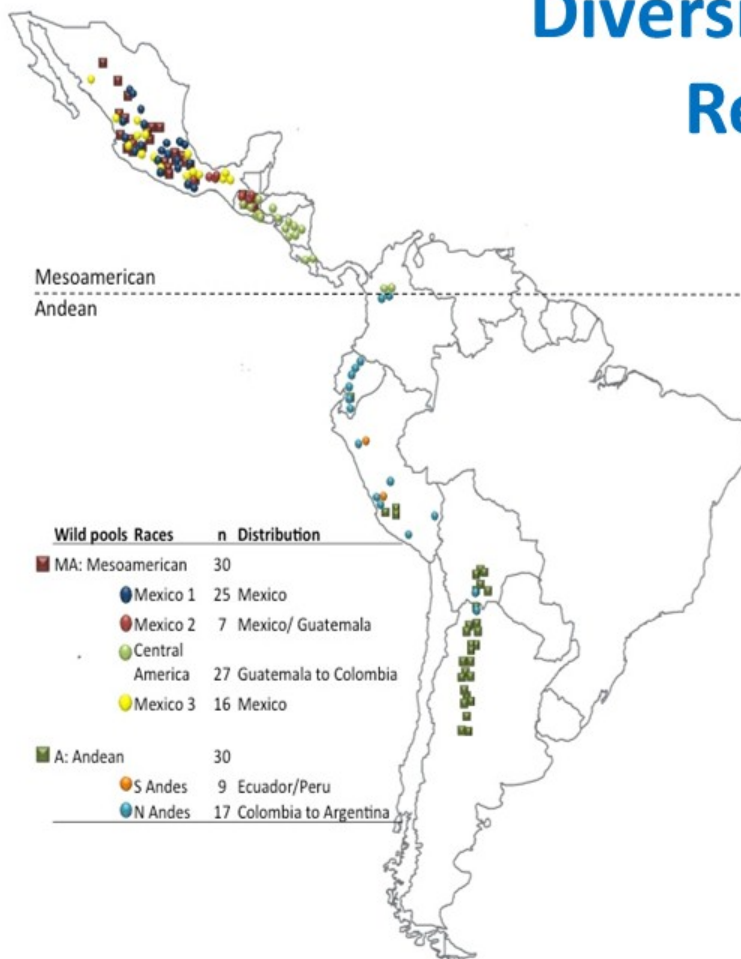
Colección varietal - INIFAP = 105

Colección núcleo – INIFAP = 158

Blair et al. 2011

Blair et al. 2013

Diversidad Genética – Re-secuenciación

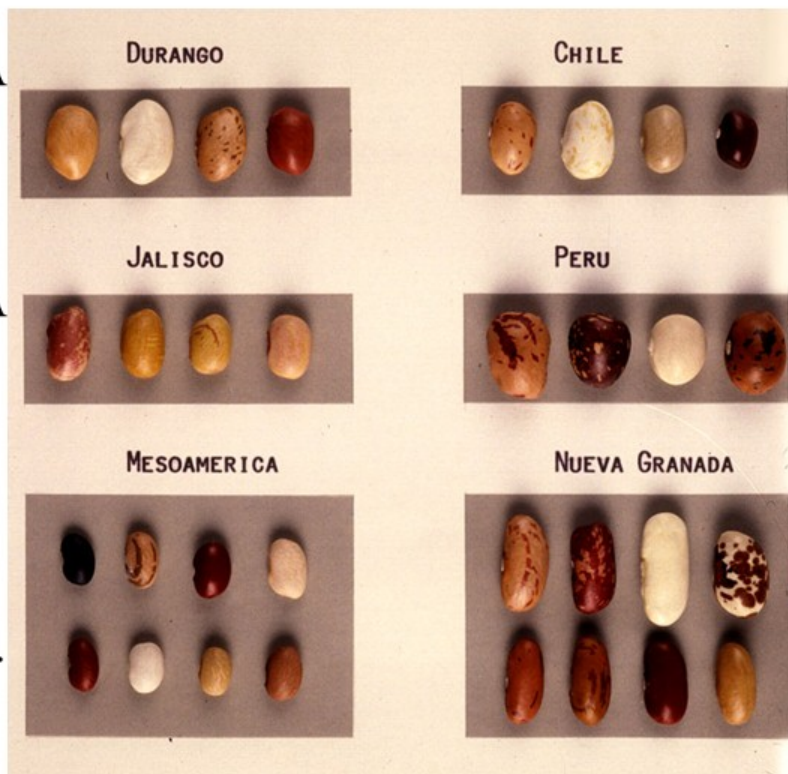


- Se tomo 30 individuos silvestres y 50 individuos cultivados de cada acervo (Andino y Mesoamericano) para resecuenciar en grupos
- Se evaluó la frecuencia de alelos para marcadores de tipo SNPs detectados
- Con esto se hizo una evaluación de diversidad alélica en silvestres y cultivados de cada zona
- Los resultados demostraron cuellos de botella en varias partes del genoma y en las poblaciones cultivadas comparadas con silvestres

Estructura de Razas

Las razas morfológicas si representan estructura genética?

Semilla MEDIA
Tipo III
Semi-prostrado



Semilla MEDIA
Tipo III
Semi-prostrado

Semilla MEDIA
Tipo IV
Voluble

Sem. GRANDE
Tipo IV
Voluble

Semilla PEQ.
Tipo II
Arbustivo Indet.

Sem. GRANDE
Tipo I
Arbustivo Det.

Fuente: Singh et al., (Econ Bot 1991)

Análisis de Razas Mesoamericanas por SSRs

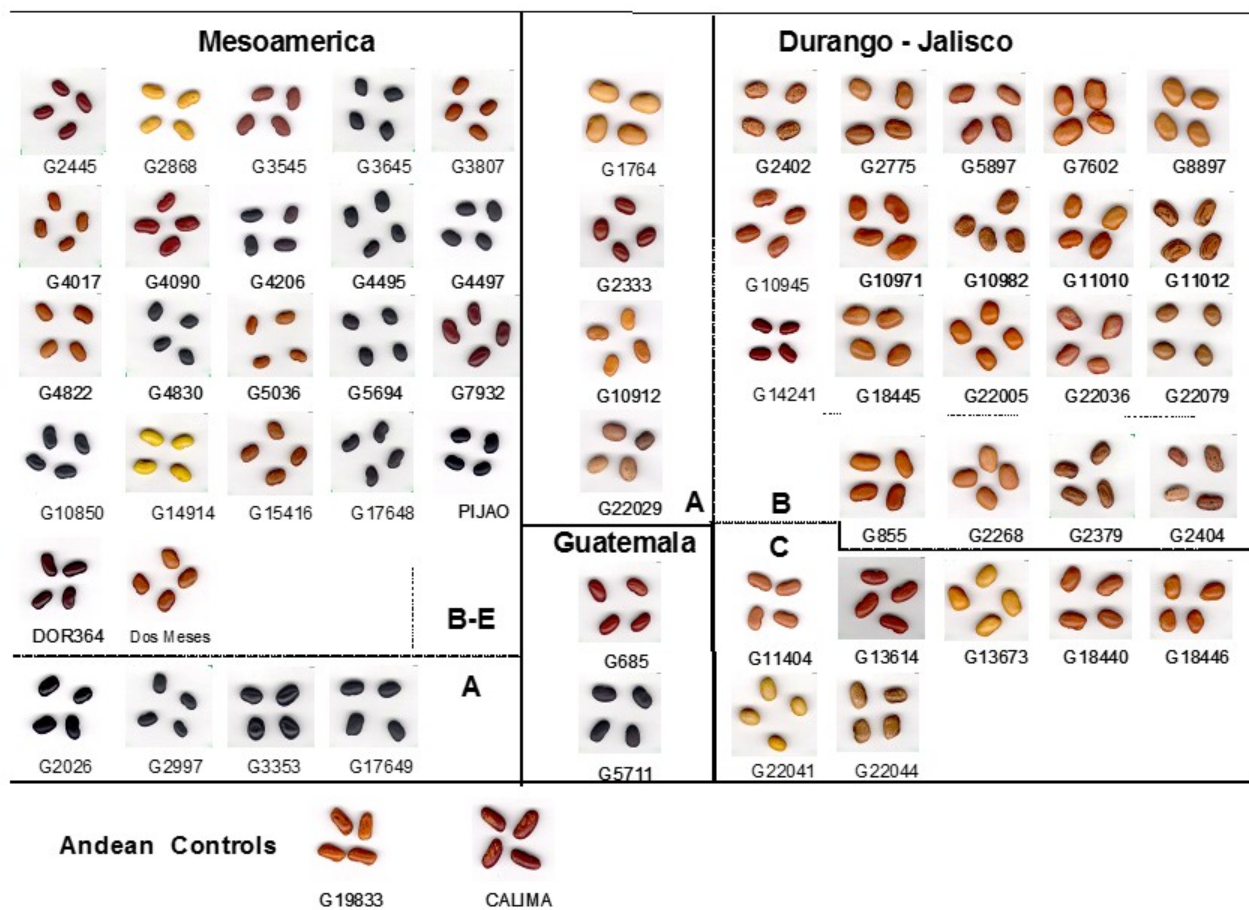
Theor Appl Genet (2006) 114:143–154
DOI 10.1007/s00122-006-0417-9

ORIGINAL PAPER

Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers

L. M. Díaz · M. W. Blair

Agrupamiento de Mesoamericanos /semilla



Análisis de Razas Andinas por SSRs

Theor Appl Genet (2007) 116:29–43
DOI 10.1007/s00122-007-0644-8

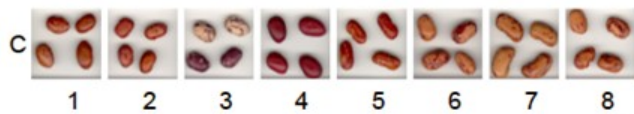
ORIGINAL PAPER

Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

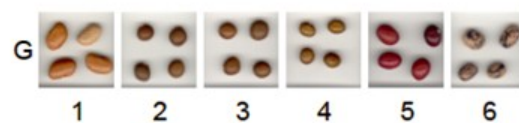
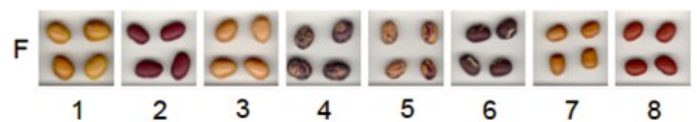
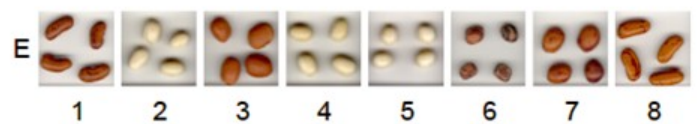
M. W. Blair · J. M. Díaz · R. Hidalgo · L. M. Díaz ·
M. C. Duque

Genotipos Andinos

diferencias de color / tamaño de semilla



← **Raza Nueva Granada**
(largo, moteado en patrón)



Raza Perú →
(redondo, color único)

Análisis de La Colección Núcleo (A y M) por SSRs

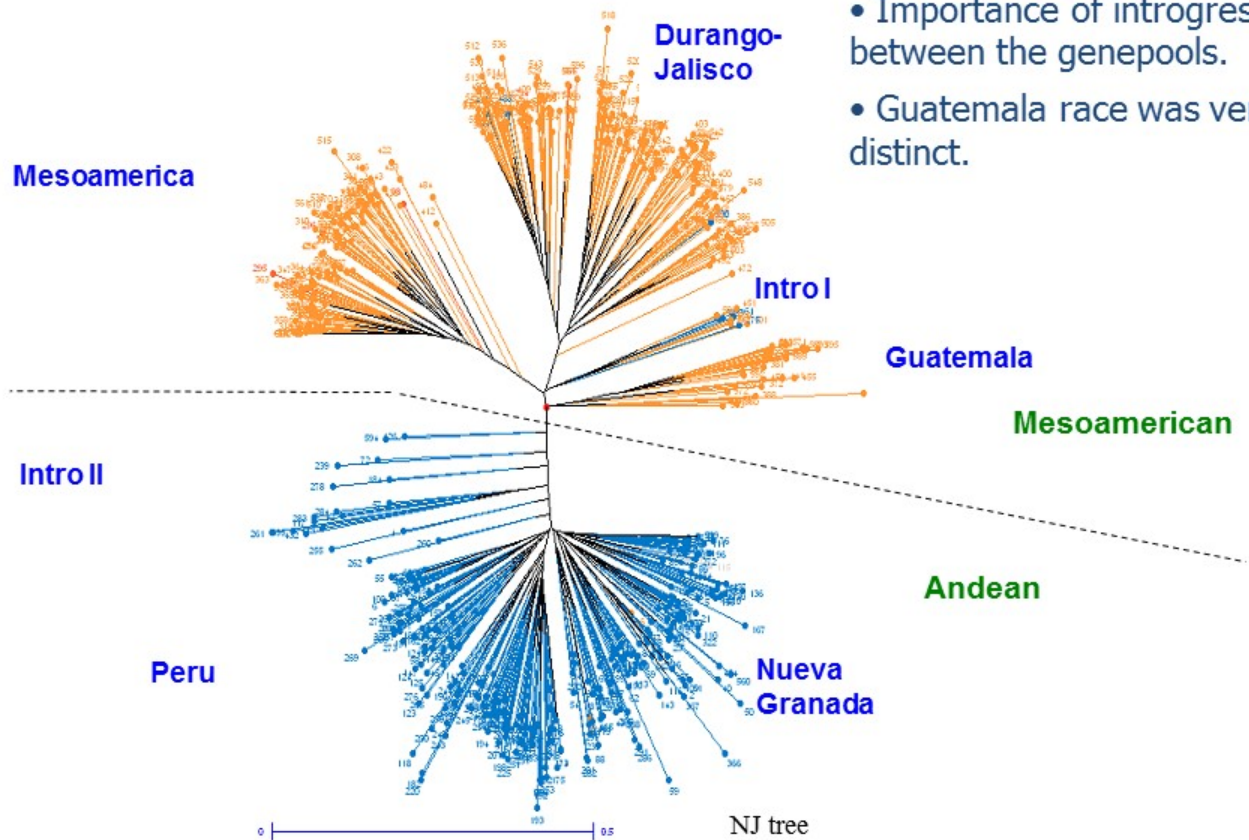
Theor Appl Genet
DOI 10.1007/s00122-009-1064-8

ORIGINAL PAPER

**Genetic diversity, seed size associations and population structure
of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Matthew W. Blair · Lucy M. Díaz · Hector F. Buendía · Myriam C. Duque

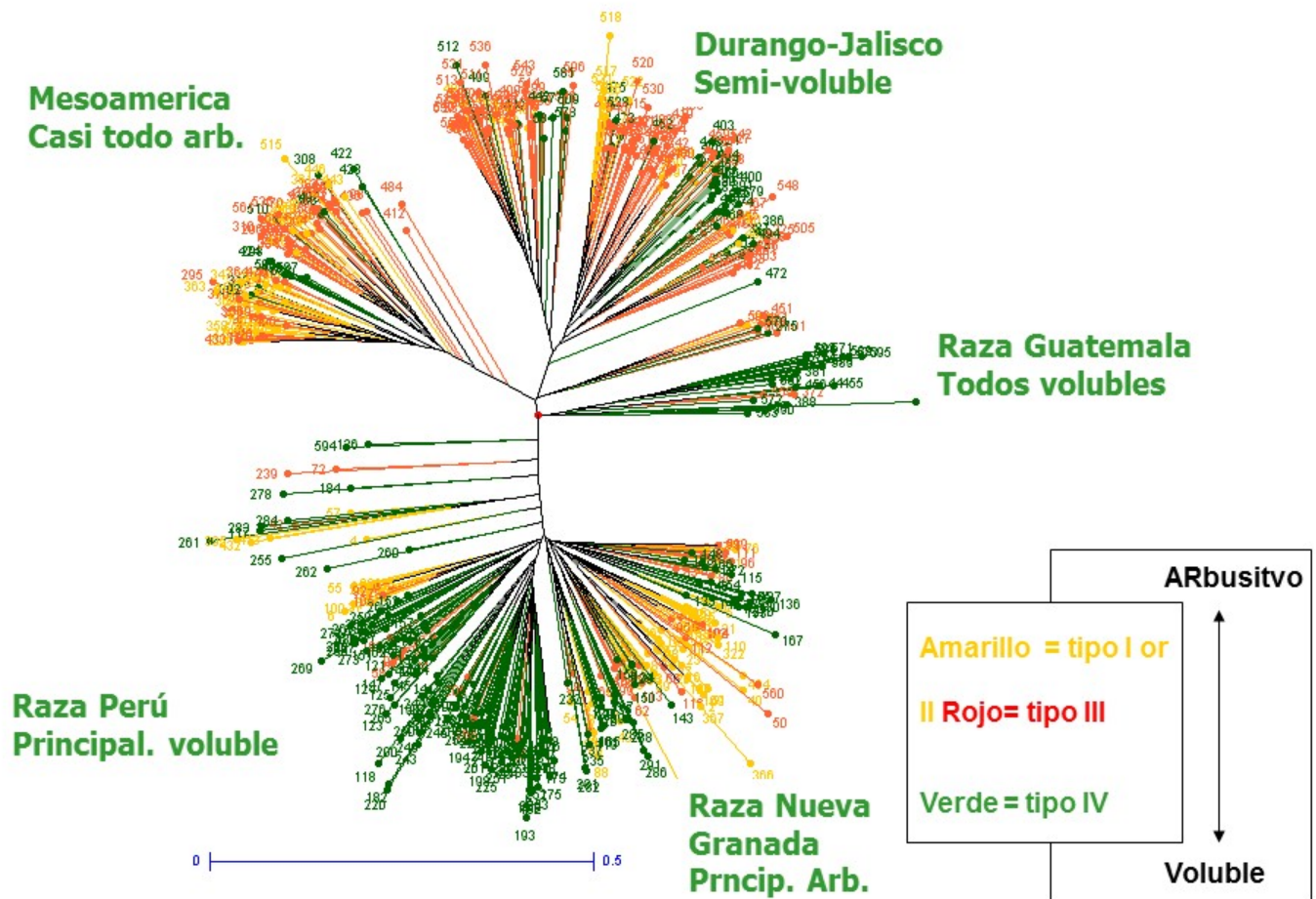
Dendograma de Razas



New findings:

- Slightly more diversity in the Mesoamerican genepool.
- Importance of introgression between the genepools.
- Guatemala race was very distinct.

Tipo de Crecimiento en la Colección



Diversidad medida por SNPs

Tecnología KASP

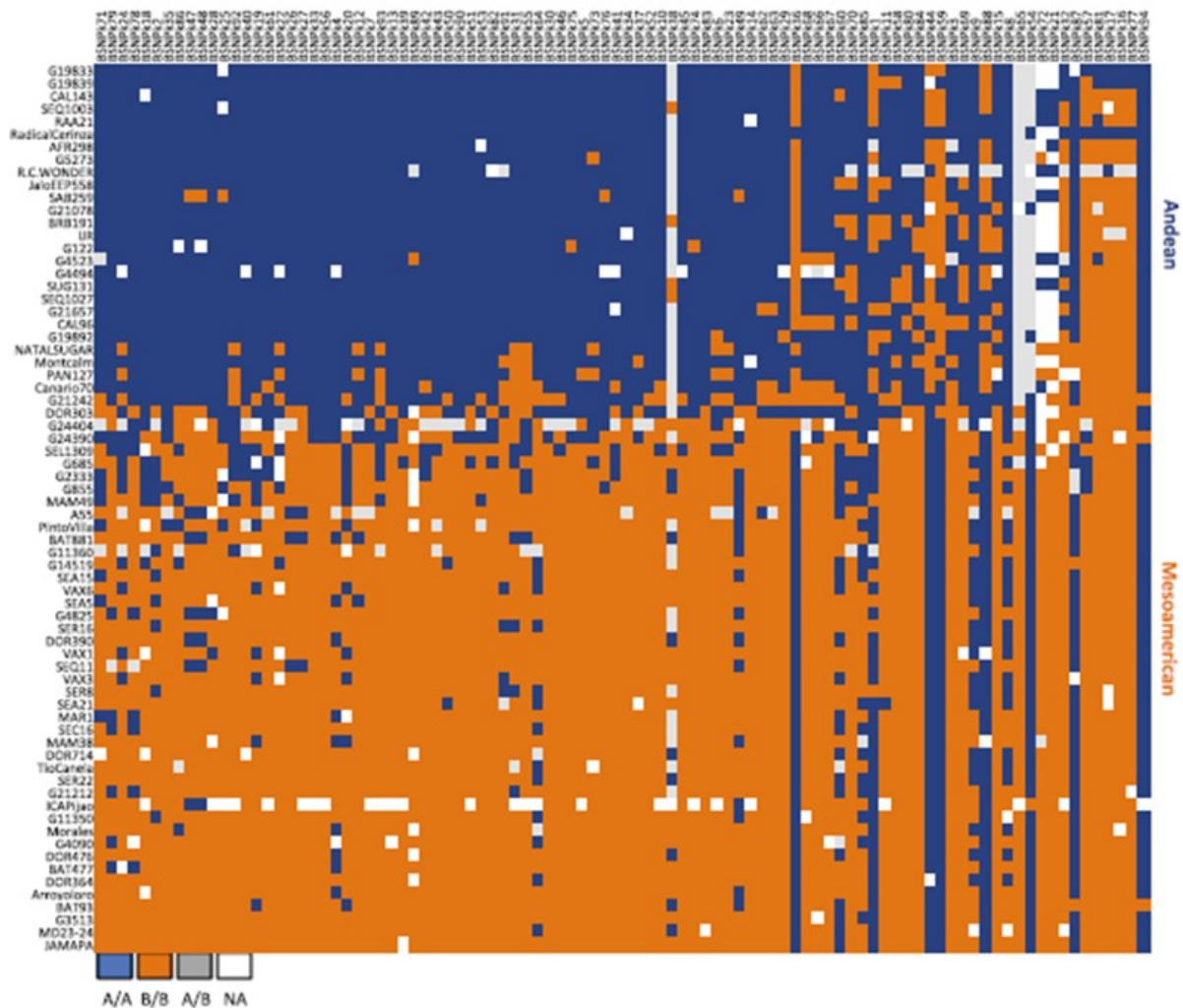
Theor Appl Genet
DOI 10.1007/s00122-011-1630-8

ORIGINAL PAPER

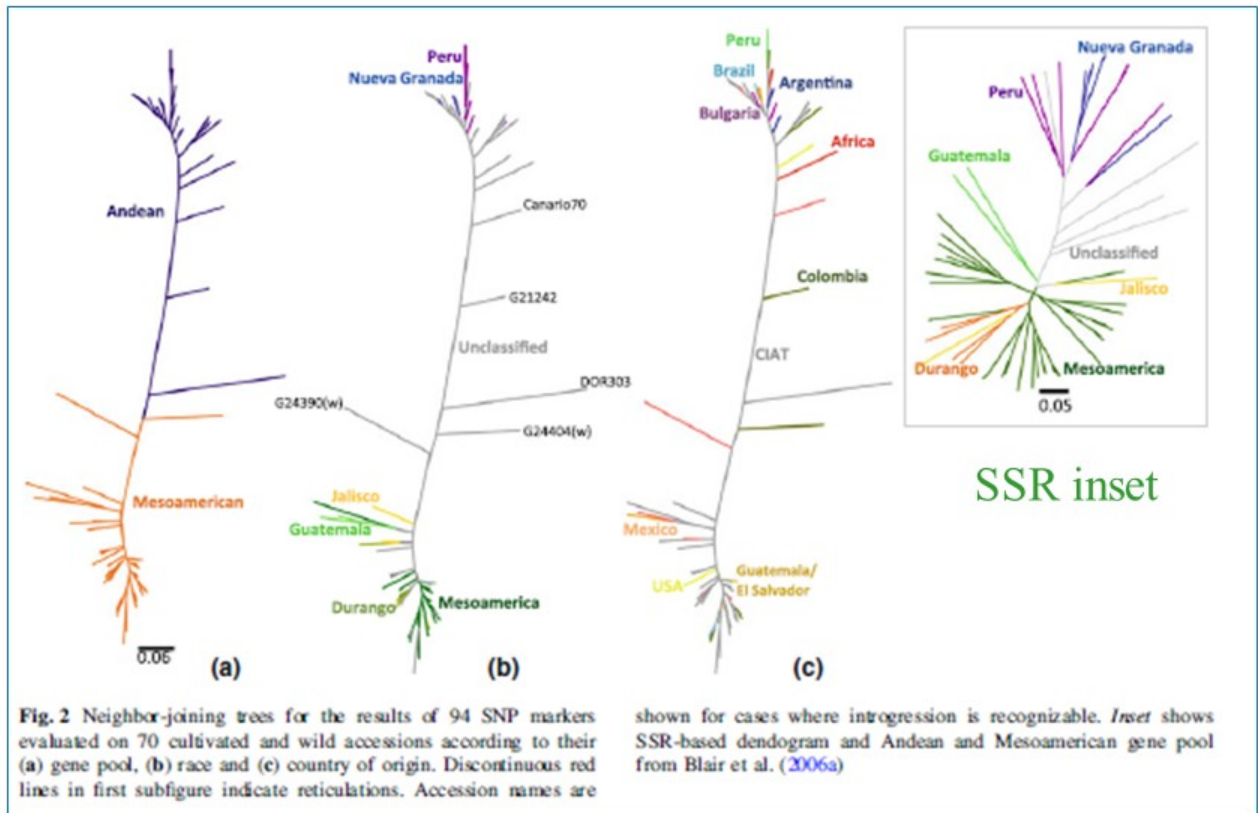
SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Andrés J. Cortés • Martha C. Chavarro •
Matthew W. Blair

Próxima diapositiva: **Bitmap de polimorfismo para 94 SNPs en panel de frijol cultivado con un silvestre.** SNPs se organizan por columnas de acuerdo al nivel de PIC y genotipos por el acervo basado en el análisis poblacional.



Pero los SNPs detectan menos polimorfismo que los SSRs en Frijol



Aplicaciones al Mejoramiento de Frijol Común (MAS)

1) BGYMV - VMDAF

(Virus del Mosaico Dorado Amarillo)

2) BCMV

(Mosaico Común)

3) Picudo de la Vaina

(*Apion godmani*)

4) Bruchidos y otros



Condiciones para Selección Asistida por marcadores : MAS

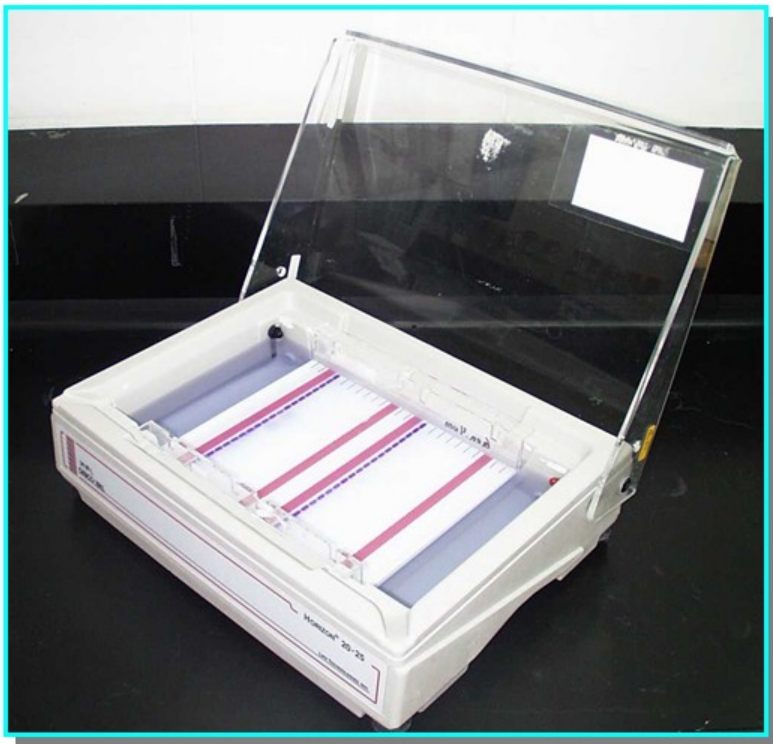
Disponibilidad de marcadores
moleculares ligados al carácter de interés

Ligamiento fuerte entre marcadores
moleculares y caracteres a mejorar.

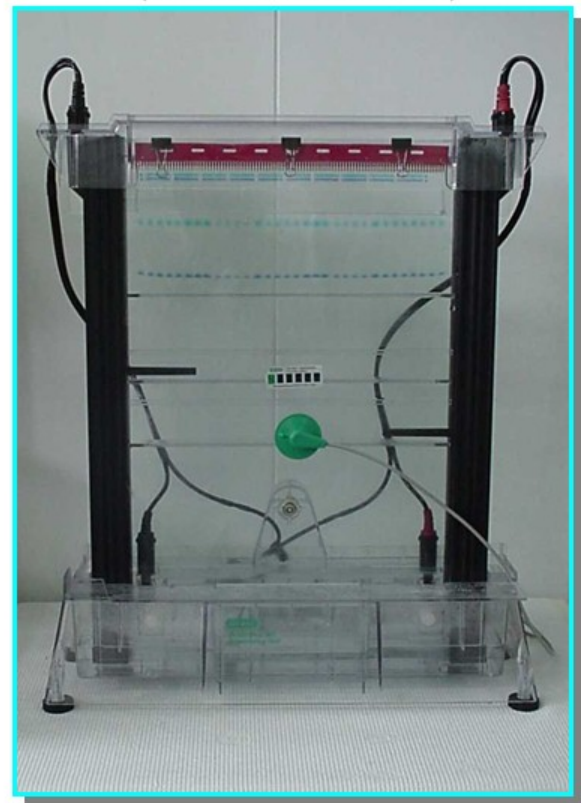
Metodologías eficientes y sencillas que
favorezcan la selección con el marcador.

Equipos para uso de los marcadores (MAS) geles

HORIZONTAL
(Agarosa)



VERTICAL
(Poliacrilamida)



Equipos para uso de los marcadores (MAS) Sin Geles

No. de pozos

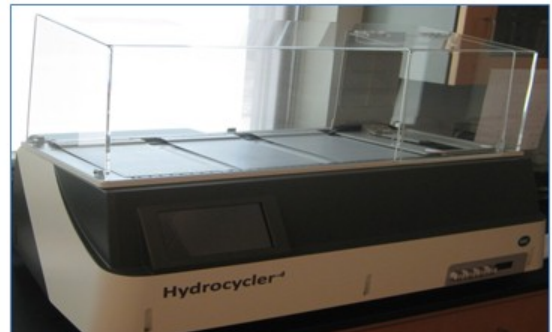
96

384

1536



Lectura
Automatizada
(96/384)



Reacciones
PCR (192/1536)

Aplicacion del marcador

Programas de
arbustivos y volubles



Generaciones tempranas



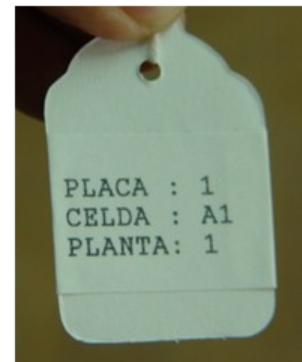
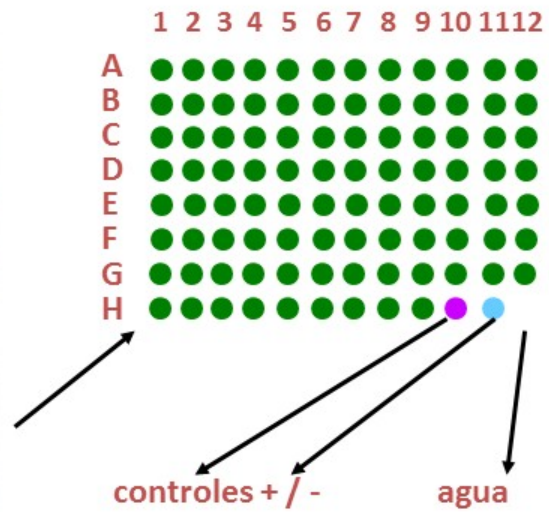
**Marbetear plantas si
son selecciones
individuales**





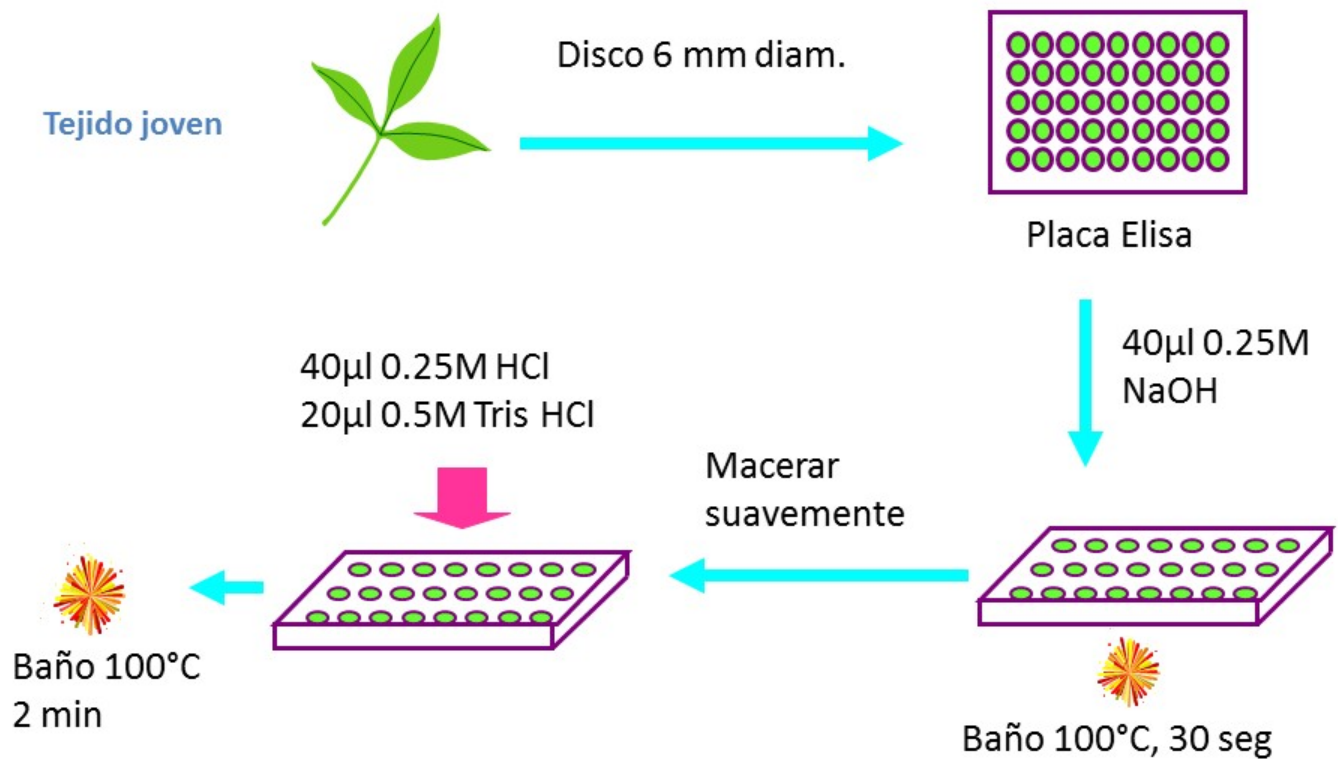
Poblaciones avanzadas

Las herramientas de trabajo



Extracción alcalina de ADN

rapida y sencilla



Ej. 1. Resistencia a BGYMV Virus del Mosaico Dorado



Patógeno: Begomoviridae
(Geminivirus)

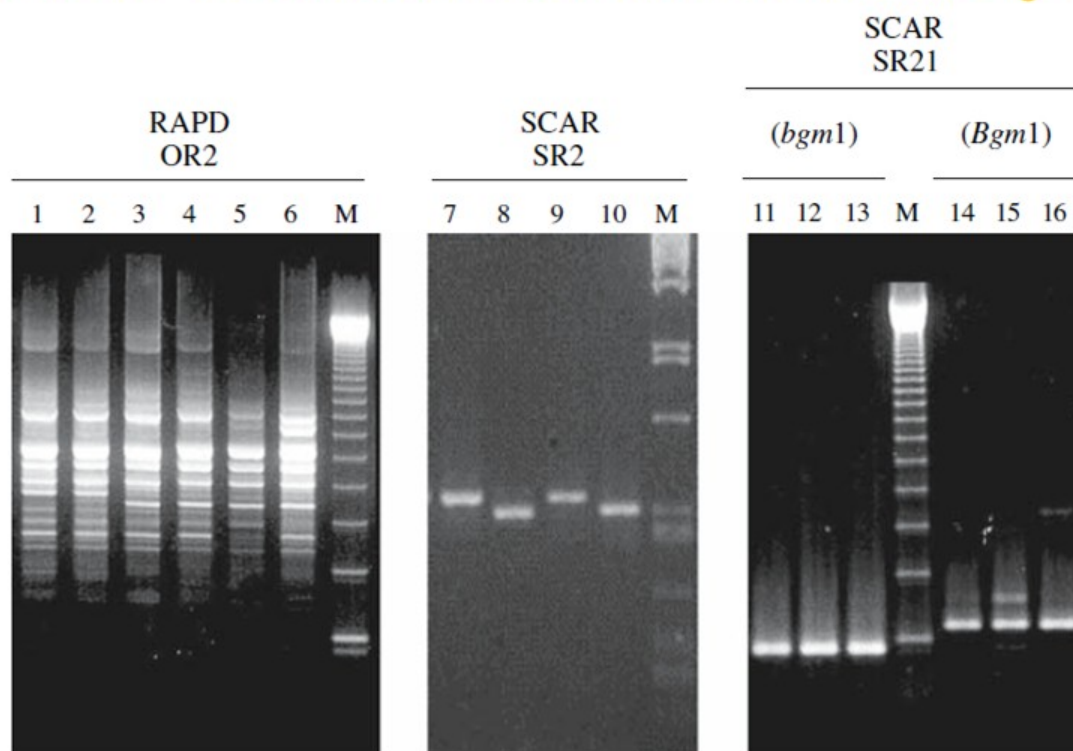
- Transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci=argentifolia*) genes de resistencia recesiva (*bgm-1*) y dominante (QTL'W12).

Theor Appl Genet (2007) 114:261–271
DOI 10.1007/s00122-006-0428-6

ORIGINAL PAPER

Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Conversion de banda RAPD a SCAR para Virus del Mosaico Dorado del Frijol



Fuente : Blair et al. (2007) Theor Appl Genet 114:261–271

Ej. 2: Virus del Mosaico Común de Fríjol Bean Common Mosaic Virus (BCMV)

Patógeno: virus Potyviridae :

- Evaluación de resistencia en invernadero o campo
- Selección asistida por marcado está bien desarrollada

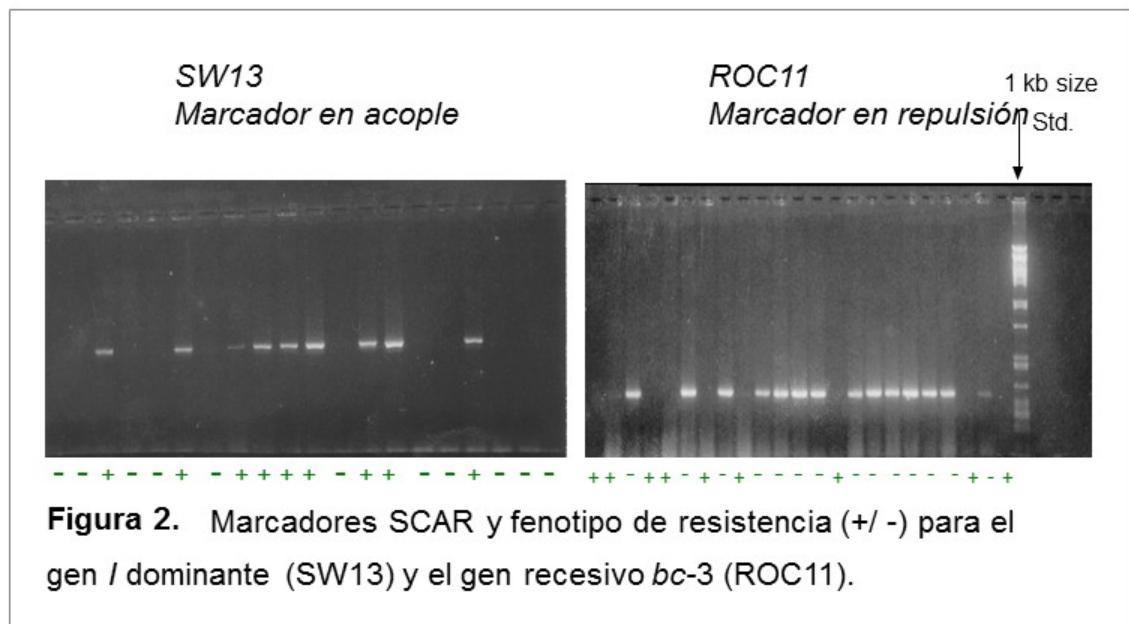


Figura 1. Síntomas de BCMV (cepas necróticas y no-necróticas)

Resistencia a BCMV

- Multigénica
- Gen dominante: *I*, reacción hipersensibilidad – depende de cepa virótica - sensibilidad a temperatura.
- Genes recesivos: *bc-3*, *bc-2*, *bc-1*²
- Johnson et.al. 1997. SCAR ROC11
- Específico para introducir *bc-3* en Andinos.
- Distancia entre marcador y gén?

Importancia de Evaluación Parental



Evaluación Gen/Fenotípica para BCMV

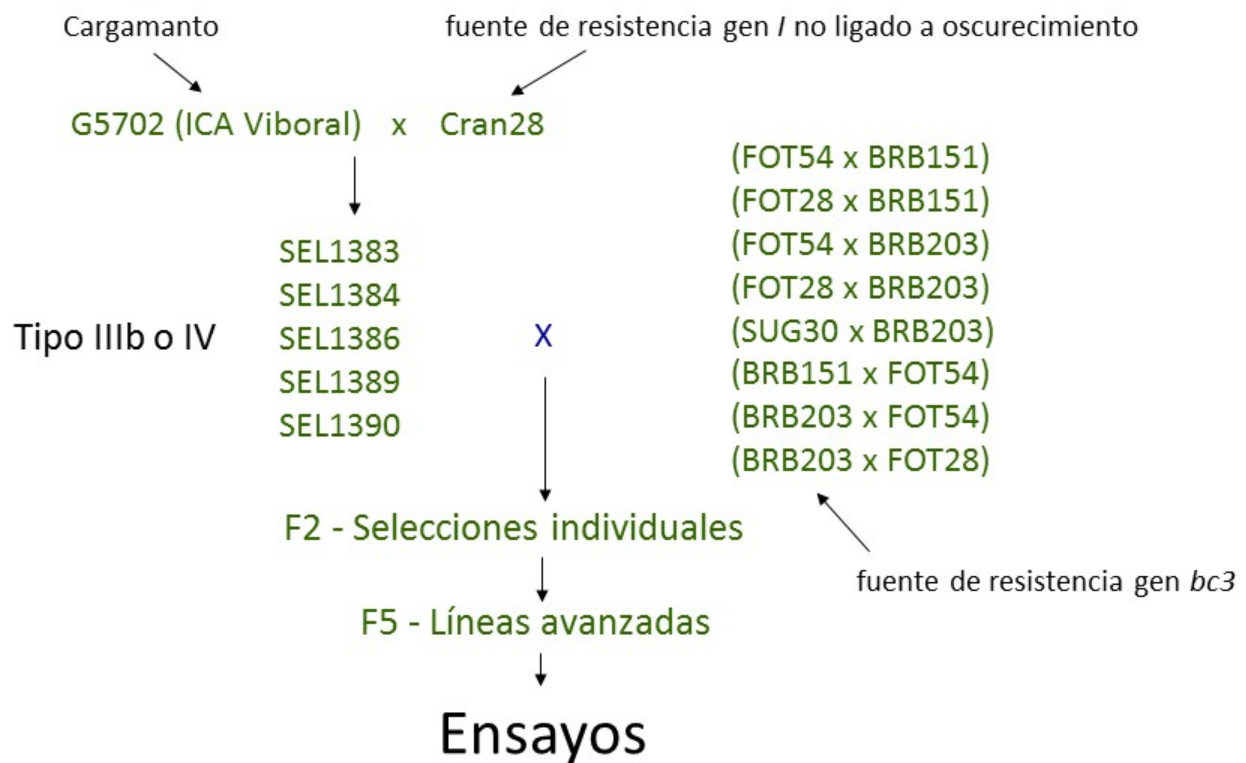
Tabla 1. Parentales evaluados para resistencia a BCMV en invernadero y para el marcador SCAR ligado al gén *bc-3*.

Parental SCAR ROC11		Virus response (Greenhouse) <i>bc-3</i>					Parental SCAR ROC11		Virus response (Greenhouse) <i>bc-3</i>				
		N = necrosis	M = mosaic symptoms	O = <i>bc-3</i> resistance					N = necrosis	M = mosaic symptoms	O = <i>bc-3</i> resistance		
AFR298	A	-	-	15	+	G12582	A	-	11	-	-		
BRB029	A	-	-	15	+	G12727	A	-	12	-	-		
BRB032	A	1	-	14	+	G19833	P	-	15	-	-		
BRB151	A	-	-	14	+	G2333	A	-	14	-	-		
BRB181	P	-	-	15	+	G23604	A	-	14	-	-		
BRB183	P	-	-	14	+	G23614	A	-	11	-	-		
BRB189	A	-	-	15	+	KABOON	A	-	10	-	-		
BRB197	A	-	-	14	+	MAM49	A	17	-	-	-		
BRB203	A	-	-	15	+	MDRK	A	-	14	-	-		
BRB204	A	-	-	15	+	MICHELITE	A	-	14	-	-		
BRB211	A	-	-	15	+	PVA773	P	-	15	-	-		
BRB217	A	-	-	15	+	S31465	A	-	15	-	-		
CAL96	A	-	12	-	-	SEL1445	P	-	15	-	-		
CAL143	P	-	12	-	-	SEL1446	P	-	15	-	-		
CALIMA	P	-	12	-	-	SEL1447	A	7	6	-	-		
COS16	P	14	-	-	-	SEL1448	P	12	-	-	-		
DOR476	P	15	-	-	-	SEL1449	P	-	14	-	-		
DOR482	P	10	-	-	-	SEL1450	A	-	14	-	-		
EMP122	P	-	14	-	-	SEL1451	P	-	15	-	-		
EMP250	P	14	-	-	-	SEL1452	A	-	15	-	-		
EMP320	A	-	15	-	-	SEL1453	A	-	11	-	-		
EMP364	P	14	-	-	-	SEL1454	A	-	15	-	-		
EMP496	P	14	-	-	-	SEQ1033	A	-	15	-	-		
G685	A	-	14	-	-	SEQ1040	A	15	-	-	-		

Evaluación Gen/Fenotípica de BCMV

- Inoculación artificial invernadero.
- 52 padres (Andino y Mesoamericano)
- 12 padres donantes de *bc-3* (BRB)
- No presentaron necrosis ni mosaico
- 10 BRB coincidieron con ausencia de ROC-11
- Selección cuidadosa de padres en cruza posteriores para SAM

Resistencia a Mosaico Común: Cargamantos volubles y arbustivos



Aumentar eficiencia – uso de multiplex

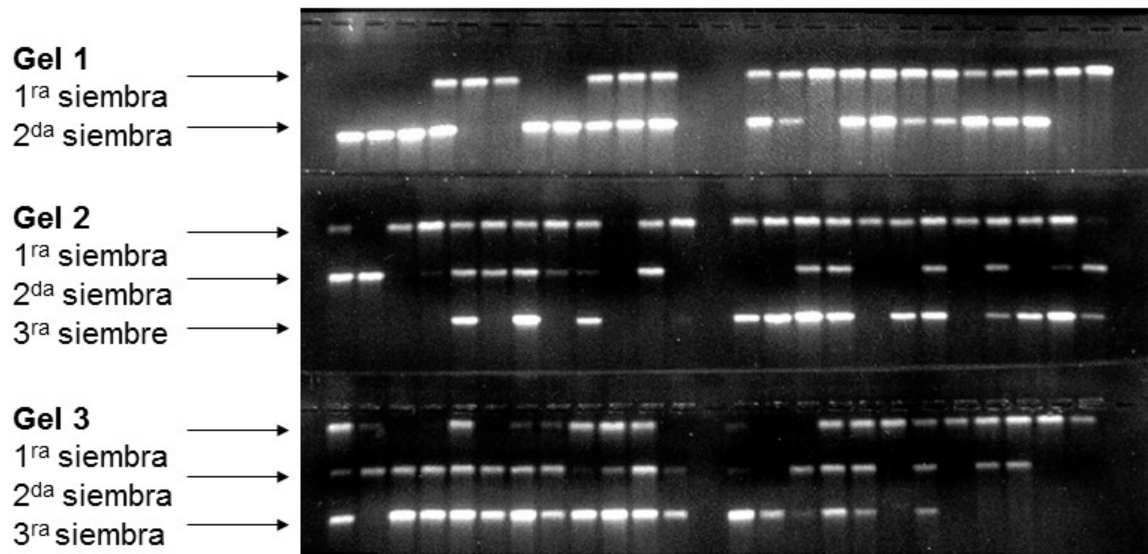
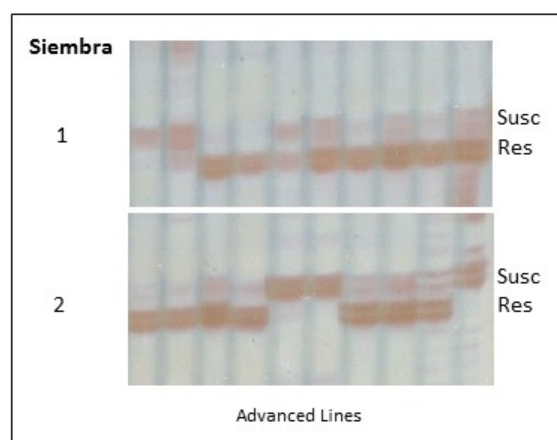
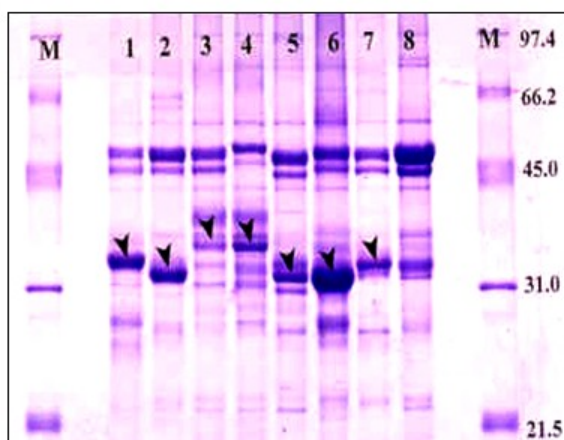
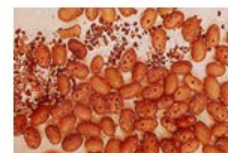


Figura 3. Uso del marcador ROC11 tipo SCAR para evaluar presencia del gen de resistencia de *bc-3* en un total de 378 progenie segregante. Geles de agarosa (1.5 %) sembrados consecutivamente.

Ej. 4: Resistencia a Bruchidos

Plaga: *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthoscelides*

- Arcelina: resistencia a gorgojo *Zabrotes*
- Líneas RAZ para varios colores de grano
- Prueba serológica bien desarrollada
- Estamos implementando MAS



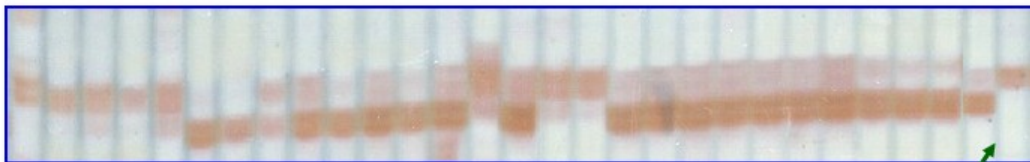
Gorgojo pintado *Zabrotes subfasciatus* (Boheman)



- 796: Líneas avanzadas
- Evaluación fenotípica y genotípica
- 9 Microsatélites: flanqueando gen de Arcelina
- Pv-ag004 y Pv-atct001

Desempeño de los marcadores

	Sensibilidad	Especificidad
Pv-ag004	60.2%	95.4%
Pv-atct001	62%	94.9%



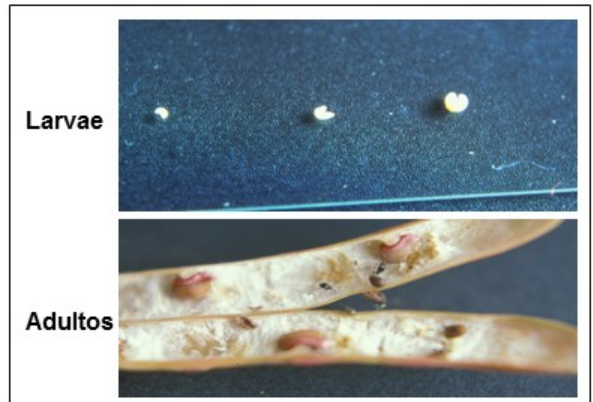
RAZ 44



Picudo de la Vaina

Insecto : Apion godmani
(Wagner)

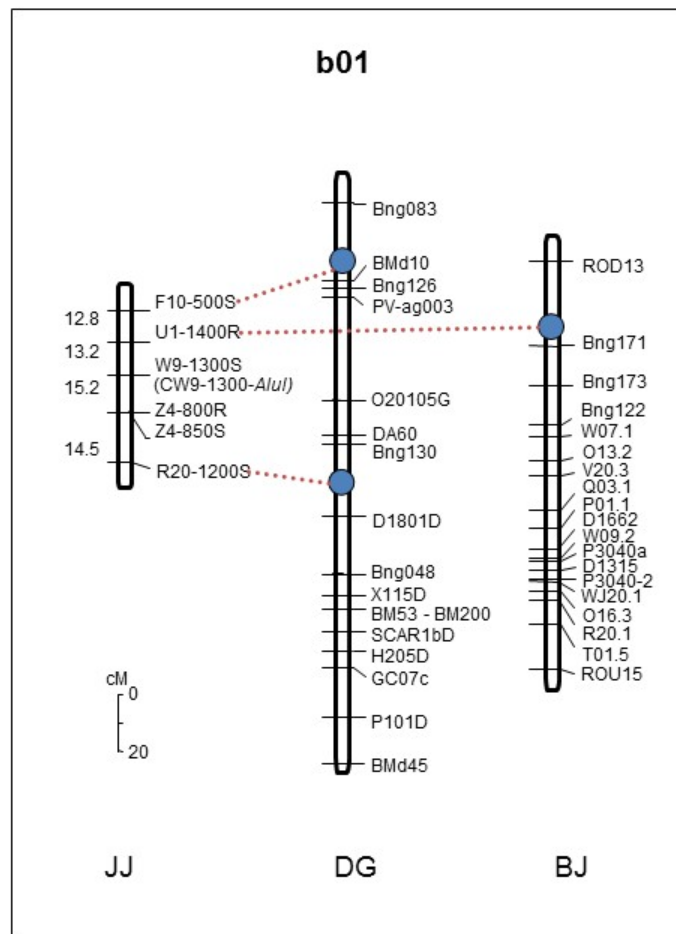
- Coleóptero (Curculionidae)
- La semilla es destruida por las larvas durante desarrollo.
- Distribuido en áreas altas de México y Centroamérica.
- Control por 2 genes de resistencia dominantes : *Agm* and *Agr* - Garza et al. (1996)
- Var. Criollo res. Jalisco117



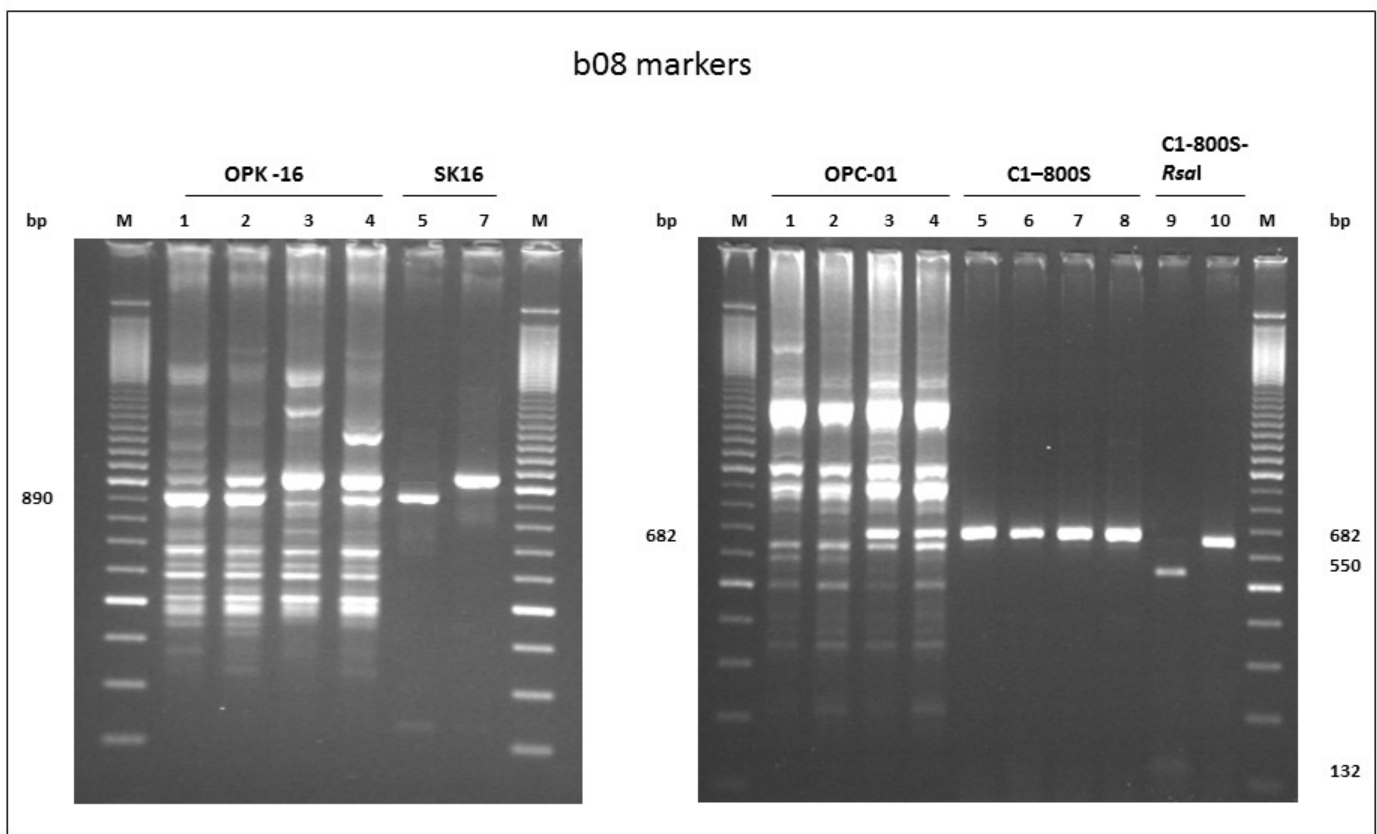
Mapeo Genetico Apion

Poblacion Jamapa x J117

Marcadores SCAR
nuevos indican gen
mayor en cromosoma
B01

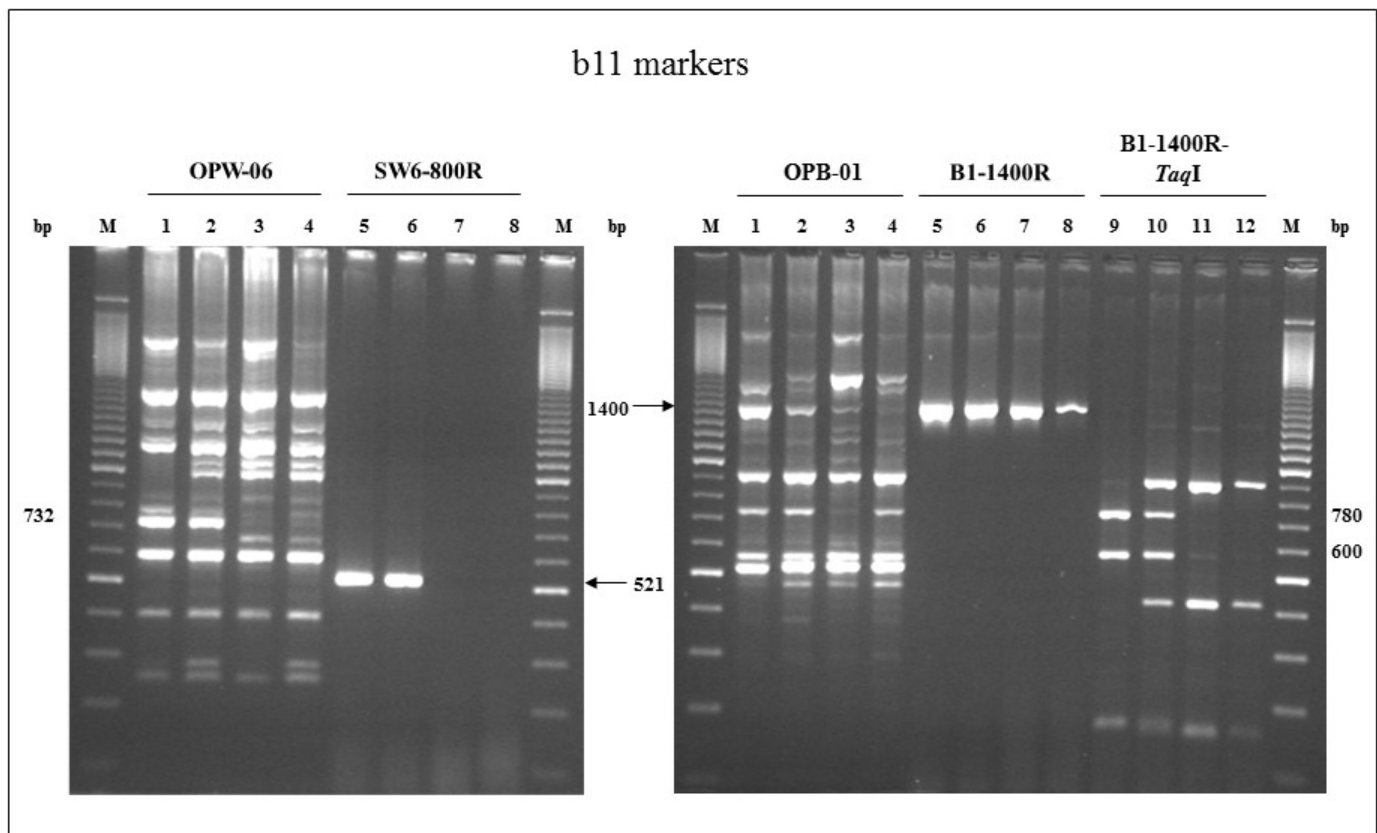


SCAR y CAPS Co-dominantes para Apion

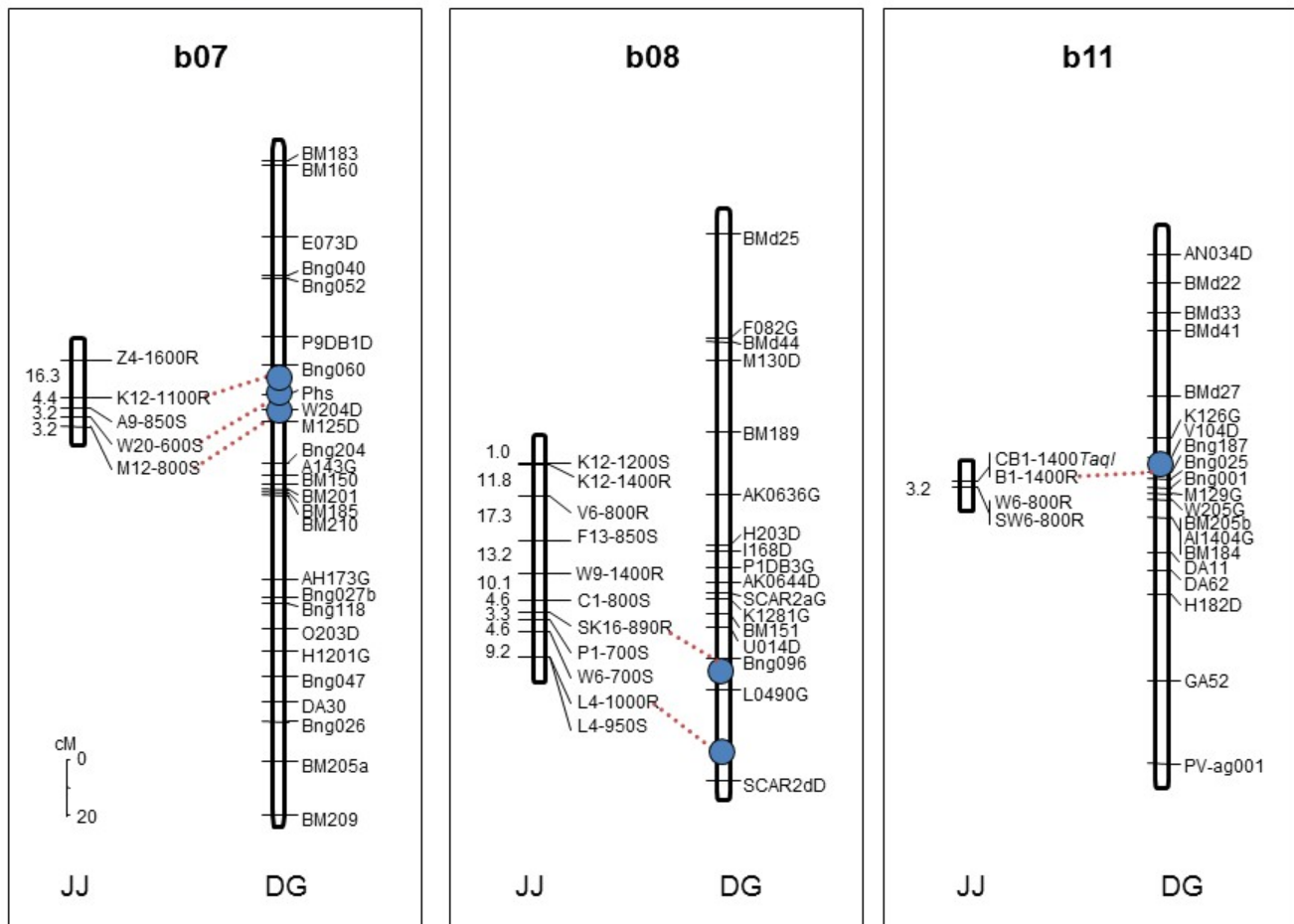


Fuente: Blair et al., (2006) Theor Appl Genet 112: 913–923

Crom. B11 marcadores SCAR y CAPS



Mapecto genetico / genes menores



Otro Ej.: Resistencia a Antracnosis (Garzón)

Patogeno: *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn).

- Diferenciales (12) con genes de resistencia
- Marcadores bien desarrollados pero poco usados

Figure 1. Sintomas de antracnosis en frijol susceptible: hoja, vaina, tallo y semilla.



Varios marcadores para varios genes abre el camino a la piramidización

piramidización: eg. Comercial x (BRB198 x (G19833 x G10909))

Vol

BCMV

Antr.

MA

Selección asistida marcadores:

Antracnosis (Co)

BCMV (ROC11, SW13)

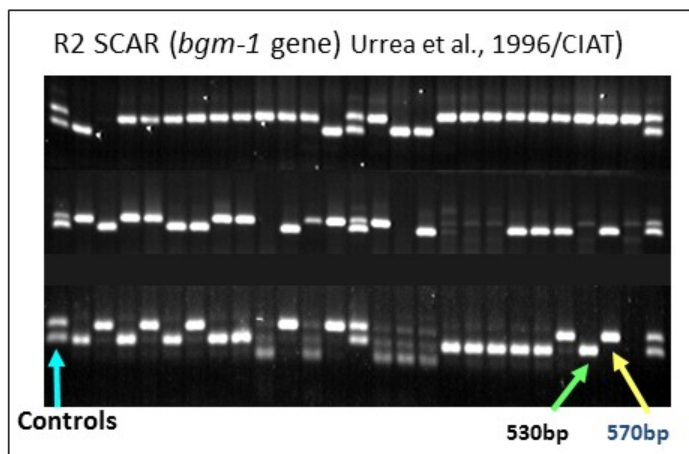
Bruchidos (Arc)

Bact. (SU91)

← Geminivirus (R2,W12)

MA (varios)

Roya (varios)



Combinar Selección Asistida con Marcadores y con Campo

- Siembra a cosecha – organización es la clave del éxito.



Ventajas de Selección Asistida

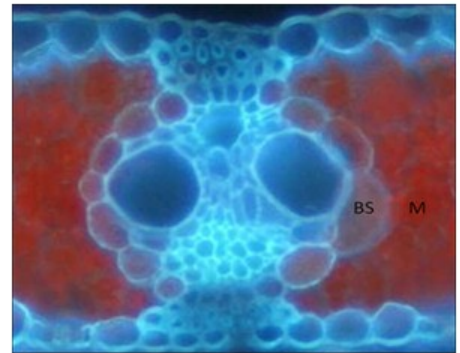
- Selección indirecta de caracteres de baja heredabilidad o donde hay peligro de escapes.
- Selección temprana y eficaz con posible disminución del número de generaciones o tamaño poblacional.
- Selección sin evaluación fenotípica evitando así el uso de inoculaciones o infestaciones con patógenos o insectos incompatibles con la observación de otros caracteres fenotípicos importantes o difíciles de eradicar.

Conclusiones

- MAS para resistencia a virus tanto BCMV como BGYMV está implementado.
- MAS para resistencia a otras enfermedades están siendo desarrollado *ej. MA y Antrac..
- MAS para transferir arcélina con microsatélites es comparable al uso del marcador bioquímico.
- MAS para picudo de la vaina también factible
- Selección asistida genera un ahorro en tiempo, espacio y dinero.

Desafíos del Futuro

- Clonaje de genes mayores para resistencia a enfermedades e insectos
- Entender la resistencia a punto celular y molecular con todo sus componentes
- Desarrollo de rasgos fotosintéticos mas eficaces asociados con metabolismo C4 que aun no existe en frijol pero si en algunos otros plantas
- Transformación genética temporal o estable para poder probar o usar genes nuevos

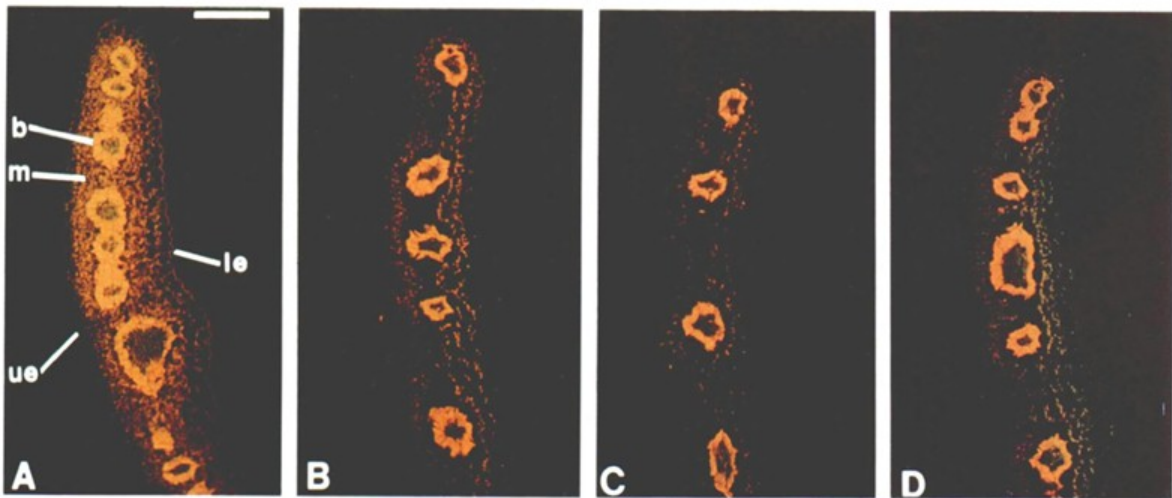


Gen Scarecrow.. Controla C4 en maiz

Interés en un Frijol C4

- Dentro de las familias de los amarantos y las quinoas están las pocas plantas con fotosíntesis C4 entre las dicotyledoneas

Amaranthus hypo. – seedlings large subunit of RuBPCarboxylase at 2, 3, 5, 7 d, respectively



Fuente: Wang et al (1993)

Amaranto : uno de los cultivos alimenticios básicos de América pre-colonial junto con maíz y frijol

Estoy estableciendo un programa de mejora en amaranto y me interesa mucho establecer nexos con grupos en México para desarrollo de unas herramientas genéticas para este cultivo.

Diversidad de granos y plantas



Muchas Gracias, Preguntas?



Matthew W. Blair

Research Associate Professor
Dept. of Agriculture and Environmental Sciences
Agricultural Biotechnology Building, 3500 John A. Merritt Blvd.
Nashville TN 37209 United States of America

mwbeans@gmail.com
mblair@tnstate.edu

Cosecha de frijol, San Juan de la Maguana,
Republica Dominicana