

POTENCIAL DE LA BIOTECNOLOGIA EN EL MEJORAMIENTO
DE FRIJOL Phaseolus

W.M. Roca, H. Ramírez, P. Chavarriaga, L.C. Muñoz*

Introducción

Entre los cultivos de leguminosas, el frijol Phaseolus es el más importante considerando la producción y el consumo mundiales. El frijol común (Phaseolus vulgaris) es una fuente importante de proteínas alimenticias y calorías en América Latina y Africa (Laing et al., 1984). Los rendimientos obtenidos por los agricultores en América Latina y Africa son bajos, promediando 500-600 kg/ha, aún cuando se ha demostrado que el frijol tiene un rendimiento potencial de 2000 - 3000 kg/ha. Una gran porción de este diferencial se puede atribuir a numerosos factores bióticos y edafo-climáticos que limitan la producción de frijol en países en desarrollo. El mejoramiento de frijol ha progresado en el desarrollo de variedades resistentes a varias enfermedades y plagas? además, con una mayor tolerancia a los suelos ácidos, una mejor capacidad para la fijación simbiótica de nitrógeno y con mejor arquitectura (CIAT, 1987). Hay sin embargo limitaciones en la velocidad y precisión con las cuales muchos caracteres útiles pueden ser identificados, seleccionados y utilizados en el proceso de mejoramiento. Por otro lado, la variabilidad genética para algunos caracteres importantes no está presente u ocurre con una frecuencia muy baja en los bancos de germoplasma mundiales de P. vulgaris (Cardona y Posso, 1987). Hay también grados variables de incompatibilidad entre los acervos genéticos de P. vulgaris así como entre P. vulgaris y otras especies cultivadas de Phaseolus. es decir P. acutifolius, P. coccineus y

* Unidad de Investigación en Biotecnología, CIAT, A.A. 6713, Cali, Colombia.

P. lunatus (Gepts, 1984; Singh y Gutiérrez, 1984). El mejoramiento genético del frijol común se beneficiaría enormemente de la disponibilidad de información sobre la herencia de caracteres importantes, su localización precisa en los cromosomas y su distribución entre los materiales genéticos.

El rápido progreso logrado por las ciencias biológicas en años recientes está proporcionando nuevas herramientas para el estudio de las plantas y su mejoramiento genético. Algunas de estas técnicas ya permiten usar atajos para la producción de líneas genéticamente puras y ayudan en la identificación y localización física de caracteres importantes en los cromosomas. Los futuros avances harán posible la inhibición o la activación selectiva de genes y la introducción y expresión de secuencias de ADN en acervos genéticos seleccionados. Estos enfoques nuevos han sido denominados "biotecnología". En un sentido más restringido, la biotecnología se puede definir como la aplicación de enfoques no-tradicionales, con base en el conocimiento al nivel celular, y genético molecular a la resolución de problemas que no se pueden resolver fácilmente a través de las metodologías tradicionales.

En este documento tratamos, en forma resumida, el estado actual y las perspectivas de la biotecnología en el frijol Phaseolus, con énfasis en las aplicaciones a la evaluación de germoplasma y al mejoramiento genético.

Estado Actual de la Biotecnología en Frijol

Estas técnicas se pueden agrupar en dos áreas principales: a) técnicas de cultivo in vitro y b) técnicas para análisis del genoma. Estas incluyen investigación a nivel celular y molecular, el desarrollo de las cuales dictará en gran medida el progreso en otras áreas de la biotecnología de frijol común.

Técnicas para el análisis del genoma

El análisis del genoma, es el área de biotecnología que actualmente recibe mayor atención. El análisis del genoma se basa en el uso de marcadores moleculares a tres niveles: proteínas (análisis de polipéptidos), enzimas (patrones en la actividad de isozimas), y ADN (polimorfismos de longitud de fragmento de restricción = RFLP). Estos marcadores, asociados con los marcadores morfológicos, se pueden usar en el frijol Phaseolus para: a) establecer relaciones biosistemáticas entre especies y sub-especies del género Phaseolus; b) evaluar la variabilidad genética del germoplasma de P. vulgaris; c) estudiar la dispersión evolutiva del germoplasma; d) caracterización de los acervos genéticos de P. vulgaris y evaluación de las compatibilidades intra e inter-específicas; e) desarrollo de mapas de ligamiento genético de P. vulgaris y f) identificación genética para monitorear el flujo dentro de programas de mejoramiento, como en la introgresión de caracteres de otras especies de Phaseolus y de germoplasma silvestre.

Los marcadores bioquímicos y moleculares, tienen características especiales que los hacen muy útiles para el mejoramiento genético del frijol Phaseolus. Ocurren naturalmente, por lo tanto no es necesaria la inducción artificial; su expresión (isozimas) o presencia (RFLP) está libre de efectos ambientales y epistáticos, en consecuencia un carácter se puede identificar en una población de plantas aunque no se exprese visualmente (Tanskley y Orton, 1983).

El análisis de isozimas permite el análisis de los productos genéticos aún antes de la expresión de los fenotipos. Es relativamente rápido, entre las técnicas de análisis de genomas. El nivel de variabilidad del patrón de isozima (polimorfismo) en P. vulgaris varía con el genotipo. En trabajos recientes efectuados en CIAT sobre la caracterización de razas nativas de P. vulgaris de México, Perú, y Colombia, el polimorfismo más alto correspondió a la diaforasa en germoplasma mesoamericano y a la esterasa en

materiales del sur de los Andes. La diaforasa, la epoxidasa, la esterasa y la fosfatasa ácida mostraron variabilidad entre acervos genéticos (Vargas, 1988). En trabajos realizados en la Universidad de Florida (comunicación personal de E. Vallejos) se halló un alto polimorfismo de isozima en dos líneas de frijol común, una que portaba la resistencia de P. coccineus a la bacteriosis común y la otra una variedad colombiana susceptible.

Análisis de proteínas. La variabilidad en el patrón electroforático de la proteína de la semilla de frijol, faseolina, ha proporcionado una herramienta útil para estudiar la domesticación y la dispersión de germoplasma del frijol común (Gepts y Bliss, 1985). Se han identificado varios tipos electroforáticos de faseolina, por ejemplo S, T, y C; éstos son altamente polimorfos y son específicos para los principales acervos genéticos del frijol. Se están encontrando algunos tipos adicionales de faseolina en poblaciones silvestres de P. vulgaris de meso-América y los Andes. Esta técnica se ha usado en CIAT para rastrear la dispersión de P. vulgaris en Africa Oriental (Triana, 1988) y para caracterizar nuevas colecciones de P. vulgaris silvestre del sur de los Andes. Hay dos carteles en este taller sobre la utilización de tipos de faseolina en estudios sobre la domesticación y dispersión de germoplasma.

Análisis de polipéptidos. A través de electroforesis bidimensional se pueden analizar numerosos polipéptidos simultáneamente. La expresión de algunos polipéptidos se afecta por el ambiente, en consecuencia este análisis puede proporcionar indicios para la asociación de proteínas específicas con ciertos caracteres. El desarrollo de estos métodos en el frijol Phaseolus puede facilitar la identificación de fracciones de polipéptidos que se amplifican en condiciones de estrés, y por lo tanto preparan las condiciones para el aislamiento y la caracterización de las secuencias nucleótidas responsables.

Análisis de RFLP. El análisis de RFLP es un análisis directo del ADN, por lo tanto los RFLP son verdaderos marcadores moleculares genéticos: no

están sujetos a las influencias ambientales; son abundantes y muchos no se expresan en diferencias morfológicas al nivel de la planta, tienen alelos co-dominantes y se pueden registrar a nivel de plántula o de tejido. Usando enzimas de restricción, se corta en pedazos el ADN vegetal. Ya que las enzimas de restricción cortan el ADN en sitios (secuencias) específicas, las diferencias del ADN entre dos variedades dan lugar a fragmentos de diferentes tamaños. Los fragmentos se separan por electroforesis de acuerdo a su tamaño los que se hibridan con sondas (clones cADN o clones genómicos de bajo número de copia, frecuentemente marcados con P32. Diferencias en longitud de los fragmentos de ADN entre dos variedades, a los cuales la sonda se hibrida, producen un patrón en el gel: un marcador de RFLP. Los marcadores de RFLP pueden ser ligados a caracteres heredables específicos y ser usados, por lo tanto, para evaluaciones en generaciones tempranas, otorgando mayor rapidez a un programa de mejoramiento. Las diferencias de RFLPs entre líneas o variedades se pueden atribuir a cambios en los pares de bases únicas o a cambios de inserción, delección, translocación o inversiones (Helentjaris, T. et al., 1985). Es necesario hallar sondas que darán polimorfismos en P. vulgare para desarrollar y aplicar los RFLP. Deben probarse sondas de cloroplasto (cpDNA), ribosomales (rDNA) así como las secuencias de copia repetitiva y única obtenidas al azar, de especies relacionadas, por ejemplo soya, frijol mungo, etc.

Los caracteres importantes controlados por un solo gen pueden proyectarse fácilmente en un mapa, usando RFLPs, sin embargo, el trabajo futuro debe recalcar los caracteres cuantitativos que son más relevantes al mejoramiento genético de Phaseolus. Ya que el análisis de genomas por RFLP es lento y costoso, se necesita un esfuerzo concertado por parte de muchos científicos para lograr la meta de proyectar en un mapa los caracteres importantes del frijol Phaseolus.

El desarrollo sostenido de mapas altamente saturados de RFLPs en P. vulgare proporcionará información sobre la presencia de genes y su localización en los cromosomas. Se espera que esta investigación acelere la

manipulación genética mediante técnicas de ingeniería genética.

Transferencia y expresión de genes

P. vulgaris es susceptible a la transformación por vectores de Agrobacterium (CIAT, 1986). Sin embargo, será necesario regenerar plantas de tejidos transformados para estudiar la expresión de genes extraños en plantas transgénicas enteras y su progenie. También será necesario probar otros medios genéticos de transferencia en el frijol Phaseolus: es decir la técnica de disparo de partículas.

Redes Colaborativas para la Investigación Biotecnológica en Phaseolus

La investigación de biotecnología debe concentrarse en áreas donde:
a) las metodologías tradicionales han mostrado promesa limitada para la solución de problemas; y b) cuando hay razón a creer que investigaciones a nivel celular y molecular pueden ayudar en resolver el problema.

La identificación de los problemas principales de la producción de frijol, seguido por una evaluación de las estrategias específicas de investigación que se podrían implementar para resolver dichas limitaciones, facilitará el establecimiento de una red de investigación multi-institucional avanzada para la biotecnología de Phaseolus. Un enfoque de red permitirá usar más racionalmente los recursos, y facilitará el progreso más rápido de la investigación.

La caracterización de cada problema debe incluir: a) una identificación clara de los objetivos de la investigación; b) la justificación biológica y económica para trabajar en la limitación específica; c) las estrategias de investigación propuestas para enfocar el problema; d) las principales áreas de impacto; e) plazo estimado para lograr los resultados y el impacto; f) los vínculos entre la investigación avanzada y la investigación aplicada.

Bibliografía

- Andrade-Aguilar, J.A. 1987. Interspecific hybridization between Phaseolus vulgaris L. (common bean) and Phaseolus acutifolius A.Gray (tepary bean) by means of embryo culture. Thesis, Dept. Plant Biology, Univ. of Birmingham, 37 p.
- Allavena, A. 1984. Beans (Phaseolus). In: W.K.Sharp, D.A.Evans, P.V. Annirot, Y. Yamada (eds.) Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 2. Crop Species, Macmillan, New York, p.137-168.
- Allavena, A., AngeliniRota, R. Rossetti, L. Mazzola. 1987. Morphogenesis from iranature cotyledos of P. coccineus and P. vulgaris cultured in vitro. Abstract. Internat. Congress Plant Tissue Culture of Tropical Species (A. Angarita, ed.) Bogotá - Colombia, p.15.
- Cardona, C. and C.E. Posso. 1987. Resistancia de variedades de frijol a los gorgojos del grano almacenado. Fuentes, mecanismos y factores responsables. Hojas de Frijol ISSN 0120-2480, Vol 9:1-4.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1986. Biotechnology Research Unit, Annual Report 1985, Cali-Colombia. 66 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1987. Bean Program In CIAT Report 1987, Cali-Colombia. pp. 39-55.
- Gepts, P.L. 1984. Nutritional and evolutionary implications of phaseolin seed protein variability in common bean (Phaseolus vulgaris L.) Ph.D. Thesis, Univ. Wisconsin, Madison, USA. p. 228.
- Gepts, P. and F.A. Bliss. 1985. Usefulness of phaseolin as an evolutionary marker. Bean Improvement Cooperative Ann. Report 28: 60-61.
- Helentjaris, T., G. King, M. Slocun, Ch. Siedenstrang and S. Wegman. 1985. Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied breeding. Plant Molecular Biol. 5: 109-118.
- Kumar, A.S., O.L. Gamborg and N.W. Nabor. 1988. Regeneration from long-term cell suspensión cultures of tepary bean (Phaseolus acutifolius). Plant Cell Reports 7: 322-325.

- laing, D.R., P.R. Jones and J.H.C.Davis. 1984. Common bean. In: P.R. Goldsworthy, N.M. Fisher (eds.), *The Physiology of Tropical Field Crops*. Wiley, New York. pp. 305-351.
- Mulcahy D.L. and G.B. Mulcahy. 1987. The effects of pollen competition. *American Scientist*. Vol. 75: 44-50.
- Muñoz, L.C., A. Laignelet, R. Hoyos and W.M. Roca. 1987. Differentiation of erribryo- like structures from immature sexual embryos and in vitro micropropagation of Fhaseolus vulgaris and Fhaseolus lunatus. Abstract. Intemat. Congress Plant Tissue Culture of Tropical Species (A. Angarita, ed.), Bogotá-Colombia p.58-59.
- Singh, S.P. and J.A. Gutiérrez. 1984. Geographical distribution of the DLI and DL2 genes causing hybrid dwarfism in Fhaseolus vulgaris L., their association with seed size, and their significance to breeding. *Euphytica*, 33: 337-345.
- Triana, M. 1988. Estudio electroforetico de germoplasma de frijol (Fhaseolus vulgaris L.) en centros secundarios de diversidad genética: el caso de Africa suroriental. Tesis, Univ. Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira. 92 p.
- Vargas, J. 1988. Caracterización de los acervos genéticos de Fhaseolus vulgaris L. por medio de electroforesis de isoenzimas. Tesis, Univ. del Valle, Cali-Colombia. 72 p.