

Marcadores moleculares SCAR para identificar fuentes de resistencia a enfermedades en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)

SCAR molecular markers to identify disease resistance sources in ayocote beans (*Phaseolus coccineus*)

Ruíz-Salazar R¹, JS Muruaga-Martínez², MLP Vargas-Vázquez², G Alejandre-Iturbide⁴, G Castañón-Nájera³, S Hernández-Delgado¹, N Almaraz-Abarca⁴, N Mayek-Pérez^{1,5}

Resumen. Se identificaron fuentes de resistencia a las enfermedades Tizón común (TC), Virus del Mosaico Común del Frijol (BCMV), Virus del Mosaico Dorado del Frijol (BGMV) y Mancha angular (MA) que afectan al frijol (*Phaseolus*). Con este propósito, se usaron nueve marcadores moleculares que detectan SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions). Del total de marcadores, cuatro fueron para TC, dos para BCMV, dos para BGMV y uno para MA. El material genético fueron 16 poblaciones de frijol ayocote (*P. coccineus*) colectadas en diferentes localidades de Veracruz y Puebla, México. Las poblaciones de Veracruz mostraron mayores frecuencias de SCAR para BGMV, BCMV, TC y MA que las de Puebla. Las mejores poblaciones pertenecientes a *P. coccineus* fueron Jalapa, Veracruz y Aculzingo (Veracruz); Nauzontla y Zacapoaxtla (Puebla). El análisis de conglomerados separó a las poblaciones de frijol evaluadas según la procedencia así como por la presencia de dos de los nueve marcadores amplificados (SU91 y LG5). Las poblaciones estudiadas, principalmente las de Veracruz, pueden utilizarse en programas de mejoramiento genético para generar poblaciones segregantes con genes de resistencia a las enfermedades que más afectan al frijol en México, ya que presentaron mayor frecuencia de SCARs.

Palabras clave: Especies de Frijol; Marcadores moleculares; Resistencia a enfermedades; Tizón común; Virus del mosaico común del frijol; Virus del Mosaico Dorado del Frijol; Mancha Angular del frijol.

Abstract. In order to identify genes of resistance to four diseases that affect *Phaseolus* sp. [i.e., Common Bacterial Blight (CBB), Bean Common Mosaic Virus (BCMV), Bean Golden Mosaic Virus (BGMV) and angular leaf spot (ALS)], we amplified nine SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) markers: four linked to resistance to common blight, two for BCMV, two for BGMV and one for ALS. The genetic material included 16 ayocote bean (*P. coccineus*) populations collected from different locations at Veracruz and Puebla, Mexico. Populations from Veracruz showed greater number of SCARs for BGMV and ALS compared with populations from Puebla. The best *P. coccineus* populations were Jalapa, Veracruz and Aculzingo (Veracruz); Nauzontla, and Zacapoaxtla (Puebla). Cluster analysis separated the bean populations evaluated by geographical origin, but mainly by the presence of two of the nine amplified markers (SU91 and LG5). The study populations, mainly those of Veracruz, should be used in breeding programs to generate segregating populations with genetic resistance to the major diseases of beans in Mexico, since they showed high frequencies of SCARs.

Keywords: Species Bean; Molecular Markers; Disease resistance; Common Bacterial Blight; Bean Common Mosaic Virus; Bean Golden Mosaic Virus; Angular Leaf Spot.

¹ Centro de Biotecnología Genómica Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN); Boulevard del Maestro, Esq. Elias Piña s/n Reynosa, Tamaulipas, C.P 88710, México.

² Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias; Programa de Recursos Genéticos. Campo Experimental Valle de México. INIFAP. Carretera Los Reyes-Texcoco, km 13.5. A.P. 307. C.P. 56250. Coatlincán, Texcoco, Estado de México. México.

³ División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; Carretera Villahermosa-Cárdenas, entronque Bosques de Saloya, kilómetro 0.5, Villahermosa, Tabasco, C.P. 86040, tel. 993-3-54-43-08. México.

⁴ Centro Interdisciplinario De Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-Durango); Calle Sigma #119, Fracc. 20 de Noviembre II, Durango Dgo., C.P. 34220, México.

⁵ Universidad México Americana del Norte AC. Primera s/n El Círculo, 88640, Reynosa, México.

Address correspondence to: M.C. Régulo Ruíz-Salazar, e-mail: rruiz0700@alumno.ipn.mx

Received 09.III.2015. Accepted 31.V.2015.

INTRODUCCIÓN

Una fuente de proteína para las poblaciones de bajos recursos y rurales es el frijol (*Phaseolus* sp.). La semilla de esta leguminosa contiene entre 20% y 28% de proteína, y sobresale por su abundancia la faseolina, que posee un alto contenido de lisina (1,69% a 2,44%), metionina (0,17% a 0,53%) y triptófano (14,00% a 0,22%). Además, son importantes los contenidos de vitaminas, minerales y fibra. Esta leguminosa se consume en países desarrollados y subdesarrollados; la faseolina se encuentra en mayor cantidad en el frijol que en los cereales (Barrios, 2011; Treviño y Rosas, 2013).

El género *Phaseolus* se conforma por 150 especies, de las cuales muchas se encuentran en áreas tropicales del continente americano (Giurcă, 2009). En México se han identificado alrededor de 50 especies, y de éstas sólo 5 son cultivadas para consumo: el frijol común (*P. vulgaris* L.), el frijol ayocote o frijol patol (*P. coccineus* L.), el frijol lima (*P. lunatus* L.), el frijol anual (*P. polyanthus* Greenm) y el frijol tépari (*P. acutifolius* Gray) (Debouck, 1991; Méndez-Águilar et al., 2013; Treviño y Rosas, 2013). Después de *P. vulgaris* y *P. lunatus*, *P. coccineus* es la tercera especie cultivada de frijol económicamente importante cultivada en todo el mundo (Spataro et al., 2011; Porch et al., 2013).

Restos arqueológicos de la forma cultivada de frijol ayocote se han encontrado en Mesoamérica y particularmente en México (Vargas et al., 2102). En la República Mexicana el ayocote se cultiva como una planta anual o bianual, en monocultivo, o en superficie de 10 a 20 surcos por parcela junto al maíz o al frijol común (Vargas-Vázquez et al., 2011). En México se conserva en condiciones de banco de germoplasma una colección de frijol ayocote compuesta por 800 accesiones, que se clasificaron según las sub-provincias fisiográficas de origen (Vargas-Vázquez et al., 2007).

El frijol se destaca en el mundo por su importancia socio-económica, la superficie destinada para la siembra y la producción en grano (Porch et al., 2013). Según el Comercio Internacional de Alimentos (IFT, 2014) la superficie sembrada y cosechada en primavera-verano 2013 y 2014 en la República Mexicana, incluyendo el área irrigada y de secano fue de 1.587.813 ha (2013) y 1.484.959 ha (2014), con rendimientos de 0,68 y 0,67 t/ha, respectivamente. El consumo per cápita en México se ubica en 11 kg (García, 2014). El frijol es un alimento importante para las zonas rurales y poblaciones urbanas de América Latina y África oriental y está ganando importancia en la población de los países desarrollados donde se busca mantener dietas saludables (Acosta-Gallegos et al., 2007).

Esta leguminosa es importante en México, donde se registran 570 mil productores, de los cuales 65% cultiva frijol para autoconsumo y el 35% lo comercializa (García, 2014). La producción por hectárea en la República Mexicana es baja y se debe a que el 87% de la superficie de frijol se cultiva en condi-

ciones de secano (IFT, 2014). Como resultado, la planta se encuentra expuesta durante su ciclo vital a factores abióticos como la sequía y bióticos como enfermedades.

La detección de genes que confieren resistencia a enfermedades puede realizarse mediante el uso de marcadores moleculares del ADN (Mienie et al., 2005). De éstos, cabe señalar los SCARs ("Sequence-Characterized Amplified Regions"). Este tipo de marcadores amplifica secuencias ligadas a genes de resistencia y que por lo general co-segrega junto al gen de interés, ya que la distancia genética entre la secuencia SCAR y la secuencia del gen de resistencia generalmente no sobrepasa los 5cM (centi Morgan) (Kelly et al., 2003).

De las enfermedades virales que afectan al frijol, dos son transmitidas por áfidos: el virus del mosaico común del frijol (BCMV) y el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV). El BCMV disminuye el rendimiento hasta en 80% dependiendo de la variedad, del estado de desarrollo en que se encuentren las plantas y las condiciones ambientales al momento de la infección (Castro et al., 2001). El BGMV afecta significativamente la producción de frijol convirtiéndose, en la última década, en la mayor limitante para su cultivo en zonas bajas e intermedias de las regiones tropicales y subtropicales de América (Rosas, 1998). Rodríguez et al. (2007) identificaron el marcador *bgm-1* que confiere resistencia al BGMV en líneas y variedades seleccionadas con buen comportamiento en campo. Por otro lado, Garrido et al. (2000) estudiaron la composición nucleotídica del BGMV y, además, detectaron germoplasma originario de Mesoamérica resistente al virus. Para el caso de Mancha Angular (MA) [*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.], Mahuku et al. (2004) señalan que provoca pérdidas del 50 al 80% en rendimiento de frijol al sembrar variedades susceptibles. Por su parte, la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin, que provoca el tizón común (TC), reduce el rendimiento del frijol del 22 al 45% (Fourie et al., 2011).

La presente investigación tuvo como objetivo identificar la presencia de marcadores tipo SCAR ligados a genes de resistencia a las enfermedades del frijol (ej., tizón común, BCMV, BGMV y mancha angular) en poblaciones silvestres y cultivadas de *P. coccineus* de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se estudió germoplasma de frijol ayocote colectado en los estados de Veracruz y Puebla, México (Tabla 1). El mismo incluyó 152 accesiones de *P. coccineus* (137 cultivadas y 15 silvestres), así como siete accesiones de *P. vulgaris* cultivadas, tres variedades de *P. vulgaris* (Pinto Villa, BAT 477 y Pinto UI-114); una accesión de *P. glabellus* y una de *P. lunatus* (Tabla 1; Fig. 1).

Extracción de ADN. Tres semillas de cada accesión se sembraron en bandejas para germinación llenadas con

Tabla 1. Origen, población, especie y número de accesiones de *Phaseolus* sp., usadas en el análisis genético con nueve marcadores moleculares SCAR.

Table 1. Origin, population, species and number of accessions of *Phaseolus* sp., used in the genetic analysis with nine SCAR molecular markers.

Estado	Población	Especie	Nº accesiones
Veracruz	Acultzingo	<i>Phaseolus coccineus</i>	20
	Altotonga	"	15
	Jalapa	"	29
	Ciudad Mendoza	"	6
	Jalacingo	"	3
	Perote	"	5
	Veracruz	"	29
	Veracruz Pv	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7
	Subtotal		114
Puebla	Carso Huasteco	<i>Phaseolus coccineus</i>	3
	Mercado Serdán	"	3
	Mercado Zacapoaxtla	"	6
	Nauzontla	"	3
	Banco Germoplasma	<i>Phaseolus coccineus</i> (Silvestre)	15
	Tlatlauquitepec	<i>Phaseolus coccineus</i>	5
	Zacapoaxtla	"	10
	Puebla Comerciales	<i>Phaseolus vulgaris</i> (BAT477, UI114 y <i>Phaseolus Villa</i>), <i>Phaseolus glabellus</i> , <i>Phaseolus lunatus</i>	5
	Subtotal		50
	Total		164

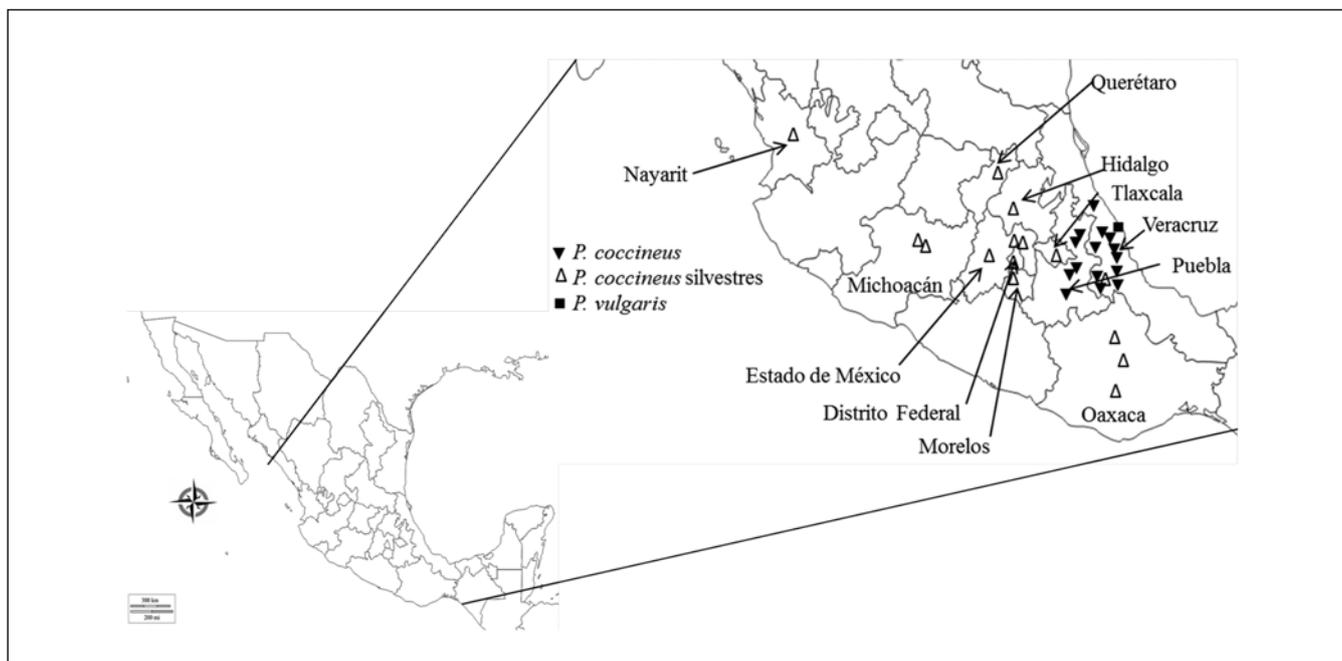


Fig. 1. Distribución geográfica de los sitios de colecta de las accesiones silvestres y cultivadas de *Phaseolus* spp. de Puebla y Veracruz.
Fig. 1. Geographical distribution of collection sites of wild and cultivated accessions of *Phaseolus* spp. from Puebla and Veracruz.

Peatmoss (Premier®) y Perlita (Termolita®) en proporción 60:40, respectivamente. A los seis días después de la siembra se colectaron 40 mg de tejido fresco a partir de folíolos de las tres plantas de cada accesión. La extracción del ADN genómico se realizó con la solución comercial A1120 de Promega (Madison, WI, EEUU). Por último, las muestras se visualizaron en gel de agarosa al 1% con foto

documentador Gel Doc™ XR modelo Universal Hood II de BIO-RAD (Hércules, CA, EEUU). Después, el ADN se cuantificó con el software Quantity One™ en foto documentador Gel Doc™. Los marcadores SCAR empleados, sus secuencias y genes a los que están ligados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de iniciadores SCAR usados en *Phaseolus* sp. para identificar los genes que confieren resistencia a Tizón común, Virus del mosaico común del frijol, Virus del mosaico dorado y Mancha angular.

Table 2. Sequences of SCAR primers used in *Phaseolus* sp. to identify genes that confer resistance to Common Bacterial Blight, Bean Common Mosaic Virus, Golden Mosaic Virus and Angular Leaf Spot.

SCAR	Secuencia	Patógeno
SAP 6	F - GTC ACG TCT CCT TAA TAG TA R - GTC ACG TCT CAA TAG GCA AA	Tizón común
BAC6	F - TAG GCG GCG GCG CAC GTT TTG R - TAG GCG GCG GAA GTG GCG GTG	Tizón común
SU91	F - CCA CAT CGG TTA ACA TGA GT R - CCA CAT CGG TGT CAA CGT GA	Tizón común
LG5	F - GCA GGG TTC GAA GAC ACA CTG G R - GCA GGG TTC GCC CAA TAA CG	Tizón común
ROC11	F - CCA ATT CTC TTT CAC TTG TAA CC R - GCA TGT TCC AGC AAA CC	Virus del mosaico común del frijol
SBD5	F - GTG CGG AGA GGC CAT CCA TTG GTG R - GTG CGG AGA GTT TCA GTG TTG ACA	Virus del mosaico común del frijol
SR2	F - CAC AGC TGC CCT AAC AAA AT R - CAC AGC TGC CAC AGG TGG GA	Virus del mosaico dorado
SW12	F - TGG GCA GAA GTT CTA GCA TGT GGC R - TGG GCA GAA GCA CAG TAT GAT TTG	Virus del mosaico dorado
SN02	F - ACC AGG GGC ATT ATG AAC AG R - ACC AGG GGC AAC ATA CTA TG	Mancha angular

Condiciones de la PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo GeneAmp 9800 Fast (Applied Biosystem®) en un volumen de reacción de 15 µL. Las condiciones de la PCR (Tabla 3) se ajustaron de acuerdo a las indicaciones sugeridas por el Bean Improvement Cooperative (BIC,2010). Los productos de cada amplificación se revelaron en gel de agarosa al 1% preparado con TAE 1X (Tris acetato 40 mM; EDTA 1 mM) y se corrieron a 85 V con 180 mA por 45 min. Después, el gel se visualizó en luz UV con el software Quantity One™ y el fotodocumentador Gel Doc™ XR.

Análisis estadístico. Al final de la corrida se tomó una fotografía de cada gel para registrar los productos amplificados y construir una matriz binaria para cada SCAR, donde

cero representó la ausencia del producto de amplificación y uno la presencia del producto de amplificación. Para la estimación de las distancias genéticas se usó el método de Dice (Nei y Li, 1979), el que se estima como:

$$\frac{2a}{(2a+b+c)}$$

Donde:

a= número total de bandas que son comunes en los individuos i y j (1,1)

b= número total de bandas que están presentes en el individuo i pero no en el j (1,0)

c= número total de bandas presentes en el individuo j pero no en el i (0,1).

Tabla 3. Programa de PCR para la amplificación de los marcadores moleculares SCAR.**Table 3.** PCR amplification program for SCAR molecular markers.

Condición	Temperatura	Tiempo	Ciclos	SCAR
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min		Todos
	94 °C	10 seg		SAP6,SU91,ROC11,SBD5, SR2
Desnaturalización	92 °C	30 seg		BAC6
	94 °C	30 seg		LG5
	94 °C	30 seg		SW12,SNO2
	70 °C	30 seg		BAC6, SW12
Alineamiento	55 °C	40 seg	34*	SAP6,ROC11
	60 °C	40 seg		SR2
	56 °C	40 seg		SU91
	50 °C	30 seg		LG5
	65 °C	40 seg		SBD5
	65 °C	60 seg		SNO2
	72 °C	2 min		SAP6,SU91, ROC11, SBD5, SR2
Extensión	72 °C	1 min		BAC6,LG5,SW12
	72 °C	90 seg		SNO2
	72 °C	5 min	1	Todos
Extensión Final	72 °C	5 min	1	Todos

* Número de ciclos para desnaturalización, alineamiento y extensión.

Con la información del total de bandas de todas las poblaciones, se construyó una matriz de distancias genéticas con 5000 permutaciones. Luego se generó un dendrograma por el método UPGMA y distancias genéticas de Dice con el apoyo de los paquetes estadísticos Freetree y Treeview (Page, 1996).

RESULTADOS

Los marcadores SR2, SW12 para BGMV y SNO2 para MA identificaron 9,04 y 8,5 bandas en promedio en las poblaciones de *Phaseolus* de Veracruz y Puebla, respectivamente (Tabla 4), lo que indica alta frecuencia de resistencia a BGMV y MA. Las poblaciones Veracruzanas presentaron mayores frecuencias de marcadores SCAR (Tabla 4), pues por ejemplo para TC y BCMV se observó un rango de 5,97 y 13,25 bandas amplificadas, respectivamente. Por el contrario en Puebla se presentó el promedio menor de SCARs asociados a TC (1,75) pero el mayor para BGMV (4,82).

De las poblaciones de Veracruz, las de Jalapa tuvieron el promedio de bandas mayor (21,20) para los nueve SCAR, y el menor se observó en Jalacingo (2,00). De las poblaciones de Puebla, los menores promedios se observaron en el Carso Huasteco (1,11) y los mayores en Nauzontla y Zacapoaxtla (7,78 y 6,11 bandas, respectivamente). El resto de las poblaciones de Puebla mostraron promedios bajos de SCARs amplificadas en comparación con los observados en las poblaciones de Veracruz.

El promedio de SCAR por especie y por estado también fue mayor en las poblaciones colectadas en Veracruz, con 9,96 SCARs para *P. coccineus* y 4,33 para *P. vulgaris*. En contraste, para Puebla se detectaron 3,79 SCARs en *P. coccineus* cultivado, 2,00 SCARs en *P. coccineus* silvestre de Banco de germoplasma y 2,44 en las poblaciones comerciales de Puebla.

El análisis de conglomerados (Fig. 2) separó al germoplasma en cuatro grupos de accesiones. El primero incluyó poblaciones de Tlatlauquitepec, Nauzontla, Mercado Zacapoaxtla, Mercado Serdán, Carso Huasteco y Perote, que pertenecen a *P. coccineus*. El segundo grupo se constituyó con poblaciones de Veracruz (Veracruz, Ciudad Mendoza y Jalacingo). El tercer grupo exhibió poblaciones comerciales de Puebla y los testigos *P. vulgaris*, *P. glabellus* y *P. lunatus* y poblaciones de Jalapa, Acultzingo y Altotonga (*P. coccineus*). Finalmente, el cuarto grupo presentó poblaciones de Zacapoaxtla (*P. coccineus* cultivados), *P. coccineus* silvestre de Banco de Germoplasma y *P. vulgaris* de Veracruz. La formación de los grupos no se asoció en la especie o el sitio de colecta de cada accesión sino que, principalmente, dependió de las frecuencias de presencia de SCARs tales como SU91 y LG5, que identifican la resistencia al TC.

DISCUSIÓN

La incorporación de resistencia genética simple y/o múltiple a las enfermedades de importancia económica en

Tabla 4. Frecuencias de amplificación de bandas SCAR en frijol (*Phaseolus* sp.).Table 4. SCAR amplification frequencies bands in bean (*Phaseolus* sp.).

Población	TC				BCMV		BGMV		MA	Promedio
	SAP6	BAC6	SU91	LG5	ROC11	SBD5	SR2	SW12	SN02	
Acultzingo	11	14	5	1	20	7	20	20	20	13,11
Altotonga	12	12	11	1	15	11	14	15	15	11,77
Jalapa	16	25	13	6	28	19	29	27	28	21,20
Cd. Mendoza	3	1	3	0	6	3	6	6	6	3,78
Jalacingo	1	3	1	0	3	1	3	3	3	2,00
Perote	4	4	0	0	5	2	5	5	5	3,33
Veracruz	17	10	2	0	24	11	25	20	22	14,56
Veracruz Pv	6	5	0	4	7	2	7	7	1	4,33
Promedio Veracruz	5,97				10,25		13,25		12,50	
Carso Huasteco	2	1	0	0	1	1	2	1	2	1,11
M. Serdán	1	1	0	0	2	1	2	2	2	1,22
M. Zacapoxtla	2	3	0	0	6	4	5	5	5	3,33
Banco germoplasma	2	1	0	0	3	3	3	3	3	2,00
Nauzontla	9	2	0	1	13	11	14	9	11	7,78
Tlatlauquitepec	4	2	0	0	5	5	5	4	4	3,22
Zacapoxtla	6	8	0	1	8	8	9	7	8	6,11
P. Comerciales	3	3	2	2	1	4	4	2	1	2,44
Promedio Puebla	1,75				4,75		4,82		4,5	

TC= Tizón Común (Bacterial common blight); BCMV= Virus del Mosaico Común del Frijol (Bean Common Mosaic Virus); BGMV= Virus del mosaico dorado (Bean Golden Mosaic Virus); MA= Mancha angular (Angular Leaf Spot); Promedio Veracruz= Promedio de frecuencias de bandas encontradas en las poblaciones de Veracruz; Promedio Puebla= Promedio de frecuencias de bandas encontradas en las poblaciones de Puebla; M = Mercado; Cd = Ciudad.

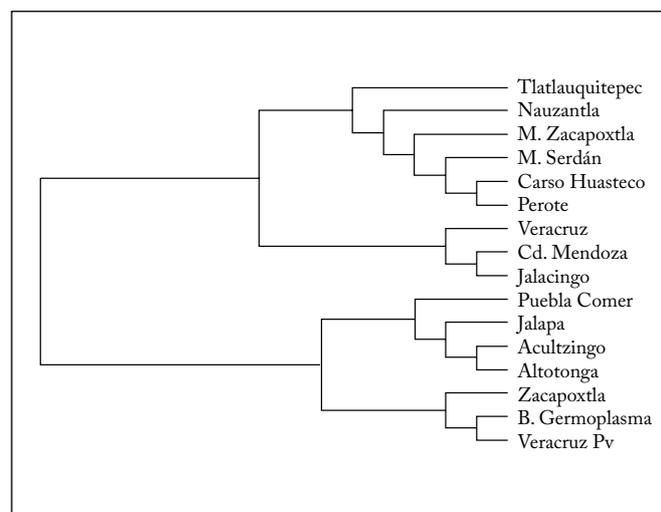


Fig. 2. Dendrograma de 16 poblaciones de frijol de los estados de Veracruz y Puebla, México basado en marcadores SCAR.

Fig. 2. Distance dendrogram of 16 bean populations of the states of Puebla and Veracruz, México based on SCAR markers.

cada región agroecológica donde se produce frijol se basa en la búsqueda constante de nuevas fuentes de resistencia y su incorporación a los programas de cruzamiento, evaluación y selección de germoplasma segregante en condiciones de campo y/o controladas. Todo ello con el objetivo fundamental de obtener germoplasma con resistencia a dicho factor adverso, rendimientos altos y estables y, si es posible, con características de calidad superiores (Acosta-Gallegos et al., 2007; Anaya-López et al., 2015a). Por añadidura se esperan otros efectos positivos, tales como la reducción de la contaminación del ambiente al reducir el uso de agroquímicos y garantizar los rendimientos en diversos sistemas de producción, sobre todo en los de subsistencia (López-Salinas et al., 2002).

El empleo de selección asistida por marcadores moleculares es una herramienta eficaz ante la selección tradicional en donde el rendimiento puede no ser notorio, pues en ello influyen diversos factores por tratarse de rasgos complejos y depender de varios componentes. Por lo tanto, la comprensión de la asociación de características deseables son cruciales en el desarrollo de un programa de mejoramiento vegetal eficiente,

cuyo objetivo es desarrollar variedades estables y de alto rendimiento (Anaya-López et al., 2015b; Kiryowaet al., 2015).

En países como Estados Unidos la SAMM se usa recurrentemente para incorporar genes y acelerar la obtención de germoplasma con resistencia genética (Miklas et al., 2006). En México, sin embargo, la SAMM en frijol recién comienza, pues a la fecha sólo se ha producido una variedad liberada bajo dicho esquema ('Dalia') (Acosta-Gallegos et al., 2014), con resistencia a BCMV y BMCNV (virus del mosaico común del frijol y raíz negra o necrosis). Sin embargo, Duncan et al. (2012), después de utilizar el SCAR SU91 para detectar resistencia a TC, mencionaron que un solo SCAR no es suficiente para proveer suficiente resistencia a determinado patógeno. Estos autores sugirieron que por lo menos se deben manejar dos SCARs a la vez, o mejor aún, la pirimidación de genes de resistencia (Anaya-López et al., 2015a, b).

Las diferencias encontradas en cuanto a cuáles genes de resistencia se presentan, en qué poblaciones de Veracruz y Puebla y en qué proporciones, son similares a lo indicado por Acosta y Navarrete (1996) y Cruz et al. (2004). Estos autores afirman que algunos genotipos pueden mostrarse como resistentes en una región o país, y susceptibles en otras. También, la resistencia que presentan genotipos clasificados como resistentes puede ser inestable; esto confirma que existe una alta especificidad de la interacción entre los genotipos del patógeno y del hospedante (Cruz et al., 2004; Rodríguez-Miranda y Rosas-Sotomayor, 2010). En general, mayores frecuencias de SCARs de resistencia a TC, BCMV y MA se observaron en germoplasma de Veracruz. Diversos trabajos han enfatizado mayores incidencias y daños por las tres enfermedades en frijol cultivado en Veracruz en comparación con Puebla. Las mayores presiones de selección por las condiciones ambientales favorables para la mayor incidencia de enfermedades y de inóculo primario y mayor patogenicidad en los aislamientos de Veracruz (Mahuku et al., 2002; Lepe-Soltero et al., 2012; Francisco-Francisco et al., 2013; Anaya-López et al., 2015a), posiblemente han llevado a los agricultores de dicho estado a seleccionar empíricamente por mayor resistencia a enfermedades y, por consiguiente, el incremento de la frecuencia de genes de resistencia en las mismas.

El marcador SR2 detecta al gen *bgm-1* y el marcador SW12 está asociado con el gen *I*, ambos confieren resistencia al BGMV (Blair et al., 2007; Singh et al., 2000). En el presente trabajo se obtuvo un promedio para ambos marcadores de 13,25 para Veracruz y sólo 4,82 para Puebla. Por su parte Osorno et al. (2007) indicaron que la resistencia al BGMV en *P. coccineus* es controlada por los genes *bgm-3* (recesivo) y *Bgp-2* (dominante) y ambos son detectados mediante el SCAR SR2.

En cuanto a detección de resistencia a TC, Durham et al. (2013) y Muhamba et al. (2014) establecen que el SCAR SU91 está ligado únicamente a un QTL de resistencia a TC. Fourie & Herselman (2011) informan que los marcadores SCAR usados en su investigación, SU91 y SAP6, tienen

uso potencial en el programa de mejoramiento de frijol en Sudáfrica. Así mismo el SCAR BAC6 ha demostrado ser un marcador confiable en la identificación de resistencia (QTL BC409) a TC. En el presente estudio se encontró que dicho marcador se encontró con mayor frecuencia en las poblaciones de Veracruz que en las de Puebla (4,37 contra 0,25).

Por otro lado, López et al. (2006) en la variedad de *P. vulgaris* ICTA Ju 97-1 detectaron resistencia al BCMV. Sin embargo a la fecha no existen reportes de este tipo de ensayos en accesiones de *P. coccineus*. Para el caso de las accesiones de ayocote de Veracruz y Puebla los valores promedio de amplificación de SCAR para detectar resistencia al BCMV fueron de 10,25 y 4,75 respectivamente.

Por último en México se ha detectado resistencia a MA en condiciones de campo en un ensayo de rendimiento y reacción a enfermedades con cultivares de frijol común (Acosta et al., 2010) pero no en accesiones de ayocote. Busogoro et al. (1999), sin embargo, inocularon con 54 aislamientos de *P. griseola* (MA) 29 genotipos tanto silvestres como cultivados de *P. vulgaris*, *P. coccineus* y *P. polyanthus*. Sus resultados indican que la accesión NI666 de *P. coccineus* fue resistente al total de los aislados de MA probados lo que concuerda con los resultados encontrados en el presente trabajo. Esto es debido a que el SCAR SN02 se encontró en promedio 12,5 veces para las accesiones de *P. coccineus* de Veracruz y 4,5 para las de Puebla.

Los patrones de agrupamiento del germoplasma se basaron en la presencia de SCARs SU91y LG5 para TC en las poblaciones evaluadas. Así, por ejemplo, las poblaciones que formaron el grupo de Tlatlauquitepec, Mercado Zacapoaxtla, Mercado Serdán, Carso Huasteco y Perote, no presentan ninguno de los dos SCAR mencionado. Sólo *Nauzontla*, que también es de este grupo presentó amplificación de banda para el SCAR LG5. En cambio, en las poblaciones Veracruz, Ciudad Mendoza y Jalacingo, se pudo detectar el SCAR SU91. Por otro lado, SU91 y LG5, fueron identificados en las cuatro poblaciones, Puebla Comerciales, Jalapa, Acultzingo y Altotonga. En las poblaciones Zacapoaxtla, VeracruzPv y Banco de Germoplasma no está presente SU91, pero sí LG5, aunque en la última población de este grupo, no se detectó ninguno de los SCAR referidos.

El mejoramiento genético tradicional se basa en la identificación, selección con base en fenotipos y la posterior introgresión de los caracteres deseados para el desarrollo de germoplasma superior. Esto se ha hecho recurrentemente por ejemplo para mejorar los rasgos agronómicos importantes como rendimiento de grano, fenología o calidad, así como para la obtención de resistencia a enfermedades, plagas, sequía o salinidad. Este proceso dura usualmente entre 5 y 8 años, o incluso más. Los tiempos y los costos se pueden reducir con la utilización de la selección asistida por marcadores moleculares de ADN (Bernardo, 2008; Collard & Mackill, 2008; Xu & Crouch, 2008).

A la fecha es evidente (1) el uso de estrategias de marcadores moleculares 'tradicionales' tales como los RFLPs, RAPDs,

AFLPs o SSRs en frijol y casi en cualquier especie vegetal cultivada para la caracterización de la diversidad genética, (2) la estructuración de mapas de ligamiento y el mapeo de genes 'mayores' o de QTLs asociados con la resistencia a factores adversos y (3) el apoyo en la SAMM. Fue frecuente obtener, en el caso del mapeo, mapas genéticos a partir de cruzamientos amplios y que no fueron lo suficientemente densos o bien, que no fueran consistentes entre poblaciones o acervos genéticos (Kelly et al., 2003; Miklas et al., 2006). Una alternativa a ello fue el uso de diferentes tipos de poblaciones segregantes adicionales a la F_2 , tales como las líneas casi isogénicas, líneas endogámicas retrocruzadas o las líneas endogámicas recombinantes, y la combinación con análisis de segregantes en grupos (Miklas et al., 1996). La conversión de un marcador molecular a SCAR facilita la SAMM (Miklas et al., 2006) pero su eficiencia en el mejoramiento genético se reduce dada la condición dominante del marcador, (2) la presencia de ligamiento en fase de repulsión entre los marcadores y los rasgos dominantes, (3) la necesidad de las pruebas de progenie o (4) los cambios en la especificidad de los marcadores a grupos de ligamiento, tipos comerciales de grano y/o acervos genéticos (Bello et al., 2014).

Los resultados de este trabajo alientan la continuación del mismo, en el sentido del manejo genético correspondiente que apoye el uso de las posibles fuentes de resistencia en el mejoramiento genético de *Phaseolus*, particularmente para las regiones tropicales y sub-tropicales de México. A la par de ello, es indispensable saber que continúa el desarrollo de estrategias de marcadores moleculares y cada nueva opción debe evaluarse y probarse. Este es el caso de la secuenciación de nueva generación (Bolger et al., 2014) que aprovecha polimorfismos derivados de secuencias simples repetidas (SSRs), inserciones-extracciones (InDels) o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) con la base de secuencias genómicas de referencia recién liberadas (Schmutz et al., 2014) para asignar las posiciones genómicas físicas e identificar genes candidatos. Otra estrategia se fundamenta en combinar el análisis de segregantes en grupos y el de perfiles transcripcionales de datos RNA-secuenciación en el mapeo de QTLs y de mutantes (Viteri et al., 2014). Lo anterior ha obligado a generar plataformas de alto rendimiento para el análisis genómico integral (BeanCAP, Langebio) (Saburido-Álvarez y Herrera-Estrella, 2015; Mukeshimana et al., 2014). Finalmente, se propone el análisis de segregantes en grupo 'in silico' que en esencia consiste en detectar variaciones de SNPs entre individuos con fenotipo y genotipo definido en regiones genómicas específicas. Así se podría sortear la necesidad de desarrollar poblaciones de mapeo o analizar genéticamente la población original en la que el gen o el QTL se identificó (Bello et al., 2014).

CONCLUSIONES

Los SCAR usados en el estudio fueron efectivos para ampliarla secuencia ligada al gen de resistencia a las enfermedades que identifica cada uno de ellos.

Las poblaciones evaluadas de *P. coccineus* son reservorio de genes valiosos de resistencia a las cuatro enfermedades que identifican los SCAR usados en esta investigación.

Las poblaciones de Veracruz poseen en promedio ocho SCAR más que las de Puebla, principalmente para resistencia al Virus del mosaico dorado (BGMV) y la Mancha angular (MA).

El germoplasma evaluado puede ser usado en programas de mejoramiento genético, para incorporar resistencia genética en genotipos de interés.

AGRADECIMIENTOS

RRS agradece al CONACYT de México la beca doctoral N° 210061 así como el apoyo a ayudante de investigador nacional N° 11002. También, agradece al Gobierno del estado de Tamaulipas, al programa PIFI del IPN y al Programa Santander ECOES por las becas otorgadas para llevar a cabo sus estudios doctorales. Los autores agradecen las becas institucionales con las que fueron honrados (SNI, COFAA-IPN, EDI-IPN, Desempeño Académico-UJAT). Este trabajo fue financiado por los apoyos de CONACYT-Ciencia Básica (clave 181756); FOMIX-Gobierno del Estado de Veracruz (no. 94070) y Multidisciplinario IPN 2014-2015 (no. 1636).

REFERENCIAS

- Acosta, G.J.A. y R. Navarrete M (1996). Search for multiple disease resistance common bean. *Bean Improvement Cooperative* 39: 47-59.
- Acosta-Gallegos, J.A., J.D. Kelly y P. Gepts (2007). Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Science* 47: 44-59.
- Acosta, G.J.A., B.M. Sánchez G, F.M. Mendoza H, Y. Jiménez H, R. Salinas P, R. Rosales S, R. Navarrete M, R. Zandate H, S. Alvarado M y J.S. Padilla (2010). Rendimiento y reacción a enfermedades en frijol tipo Flor de Mayo en riego y temporal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1: 65-75.
- Acosta-Gallegos, J.A., V. Montero-Tavera, Y. Jiménez-Hernández, J.L. Anaya-López y M.M. González-Chavira (2014). 'Dalia', a new variety of bean grain, Flor de Junio type for the central region of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 331-336.
- Anaya-López, J.L., L. Silva-Rosales, V. Montero-Tavera, F. Espejel y J.A. Acosta-Gallegos (2015a). Retos y oportunidades en la selección asistida de frijol resistente a BCMV y BCMNV en México. I. Dimensión del problema. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 453-465.
- Anaya-López, J.L., F. Espejel, V. Montero-Tavera, J.A. Acosta-Gallegos y L. Silva-Rosales (2015b). Retos y oportunidades en la selección asistida de frijol resistente a BCMV y BCMNV en México. II. Oportunidades para la selección asistida. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 495-507.
- Barrios, M.R.P. (2011). Identificación de QTLs asociados a características agronómicas de interés, en una retrocruza avanzada de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Bióloga. Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias, Programa de Biología, Ibagué-Tolima, 128 p.

- BIC (2010). SCAR markers linked with disease resistance traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). Bean Improvement Cooperative. Disponible en: http://bic.css.msu.edu/_pdf/SCAR_Markers_2010.pdf [Fecha de consulta: 11 de febrero de 2015].
- Bello, M.H., S.M. Moghaddam, M. Massoudi, P.E. McClean, P.B. Cregan y P.N. Miklas (2014). Application of *in silico* bulked segregant analysis for rapid development of markers linked to Bean common mosaic virus resistance in common beans. *BMC Genomics* 15: 903.
- Bernardo, R. (2008). Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Science* 48: 1649-1664.
- Blair, M.W., L. M. Rodriguez, F. Pedraza y S. Beebe (2007). Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 114: 261-271.
- Bolger, M.E., B. Weisshaar, U. Scholz, N. Stein, B. Usadel y F.X. Mayer (2014). Plant genome sequencing – applications for crop improvement. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 31-37.
- Busogoro, J.P., M.H. Jijakli y P. Lepoivre (1999). Identification of a novel source of resistance to angular leaf spot disease of common bean within the secondary gene pool. *Plant Breeding* 118: 417-423.
- Castro, A., J.C. Rosas y L. Aranda (2001). Aplicación de los marcadores moleculares para la caracterización de la biodiversidad y el mejoramiento genético de plantas. (intranet). Zamorano, HN. Zamorano. Disponible en <http://clases/bin/frame.pl?/> Consultado 18 de Diciembre de 2014.
- Collard, B.C.Y. y D.J. Mackill (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biological Sciences* 363: 557-572.
- Cruz, I.C., P. Ramírez, R. García, F. Castilloy J.S. Sandoval (2004). Selección para resistencia a tizón común en frijol. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 144-147.
- Debouck, D.G. (1991). Systematics and morphology. En: A. van Schoonhoven and O. Voyset (ed.), pp. 55-118. Common beans: Research for crop improvement. C.A.B. Intl., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia.
- Duncan, R.W., R.L. Gilbertson y S.P. Singh (2012). Direct and marker-assisted selection for resistance to common bacterial blight in common bean. *Crop Science* 52: 1511-1521.
- Durham, K.M., W. Xie, K. Yu, K. Peterpauls, E. Lee & L. Navabi (2013). Interaction of common bacterial blight quantitative trait loci in a resistant inter-cross population of common bean. *Plant Breeding* 132: 658-666.
- Fourie, D. & L. Herselman (2011). Application of molecular markers in breeding for bean common blight resistance in South Africa. *African Crop Science Journal* 19: 369-376.
- Fourie, D., L. Herselman & C. Mienie (2011). Improvement of common bacterial blight resistance in southafrican dry bean cultivar teebus. *African Crop Science Journal* 19: 377-386.
- Francisco-Francisco, N., G. Gallegos-Morales, Y.M. Ochoa-Fuentes, F.D. Hernández-Castillo, A. Benavides-Mendoza, F. Castillo-Reyes (2013). Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31:147-160.
- García, S.A. (2014). Insuficiente en México la producción de frijol. Disponible en: <http://www.eldiariodecoahuila.com.mx/notas/2013/10/30/insuficiente-mexico-produccion-frijol-395641.asp> Fecha de consulta 14/12/2014.
- Garrido-Ramírez, E.R., M.R. Sudarshana y R.L. Gilbertson (2000). Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico: Characterization, Pseudorecombination with Other Bean-Infecting Geminiviruses and Germ Plasm Screening. *Phytopathology* 90: 1224-1232.
- Giurcă, D.M. (2009). Morphological and phenological differences between the two species of the *Phaseolus* genus (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*). *Cercetări Agronomice în Moldova* 42: 39-45.
- IFT (2014). México: cosecha de frijoles primavera-verano 2014. International Food Trader Disponible en: <https://www.goift.com/translations/141006-espanol-mexico-cosecha-de-frijoles-primavera-verano-2014-kutnowski/> Fecha de consulta 14/12/2014.
- Kelly, J.D., P. Gepts, P.N. Miklas y D.P. Coyne (2003). Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research* 82: 135-154.
- Kiryowa, M., S.T. Nkalubo, C. Mukankusi, H. Talwana, P. Gibson y P. Tukamuhabwa (2015). Effect of marked aided pyramiding of anthracnose and *Phytophthora* root rot resistance genes on plant agronomic characters among advanced common bean genotypes. *Journal of Agricultural Sciences* 7: 98-104.
- Lepe-Soltero, D., B.M. Sánchez-García, Y. Jiménez-Hernández, R.A. Salinas-Pérez, M.A. García-Neria, D. González—De León, E.N. Becerra-Leor, J.A. Acosta-Gallegos y L. Silva-Rosales (2012). Presence of BCMV and BCMNV in five drybean-producing states in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15: 313-321.
- López, S.E., O.H. Tosquy V, B. Villar S, E. N. Becerra L, F.J. Ugalde A y J. Cumpián G (2006). Adaptabilidad de genotipos de frijol resistentes a enfermedades y a suelos ácidos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29: 33-39.
- López-Salinas, E., E.N. Becerra-Leor, O. Cano-Reyes y V. O. López-Galván (2002). Detección de Líneas y Variedades de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con Resistencia Múltiple a Enfermedades en el Trópico Húmedo de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 193-199.
- Mahuku, G., C. Jara, J.B. Cuasquer y G. Castellanos (2002). Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implications for resistance breeding in common bean. *Plant Pathology* 51: 594-604.
- Mahuku, G., C. Montoya, M.A. Henríquez, C. Jara, H. Terany S. Beebe (2004). Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. *Crop Science* 44: 817-824.
- Méndez-Aguilar, R., M.H. Reyes V y N. Mayek (2013). Avances y perspectivas sobre el mapeo genético de la resistencia a las pudriciones de raíz en frijol común. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 82: 215-226.
- Mienie, C.M.S., M.M. Liebenberg, Z.A. Pretorius y P.N. Miklas (2005). SCAR markers linked to the common bean rust resistance gene Ur-13. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 972-979.
- Miklas, P.N., E. Johnson, V. Stone, J.S. Beaver, C. Montoya y M. Zapata (1996). Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. *Crop Science* 36: 1344-1351.

- Miklas, P.N., J.D. Kelly, S.E. Beebe y M.W. Blair (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105-131.
- Muhamba, T.G., L. Amos Ch, D. Protas, P. Mbogo K y S. Nchimbi-Msolla (2014). Marker Assisted Selection for Common Bean Diseases Improvements in Tanzania: Prospects and Future Needs. Ch. 5, p. 121-147. <http://dx.doi.org/10.5772/52823> Fecha de consulta 13/12/2014.
- Mukeshimana, G., I. Butare, P.B. Cregan, M.W. Blair y J.D. Kelly (2014). Quantitative trait loci associated with drought tolerance in common bean. *Crop Science* 54: 923-938.
- Nei, M. y W.H. Li (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76: 5269-5273.
- Osorno, J.M., C.G. Muñoz, J.S. Beaver, F.H. Ferwerda, M.J. Bassett, P.N. Miklas, T. Olczyk y B. Bussey (2007). Two Genes from *Phaseolus coccineus* Confer Resistance to Bean Golden Yellow Mosaic Virus in Common Bean. *Journal of American Society of Horticultural Sciences* 132: 530-533.
- Page, R.D.M. (1996). Freetree, TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Appl Biosci.* 12: 357-358.
- Porch, T.G., J.S. Beaver, D.G. Debouck, S.A. Jackson, J.D. Kelly y H. Dempewolf (2013). Use of Wild Relatives and Closely Related Species to Adapt Common Bean to Climate Change. *Agronomy* 3: 433-461.
- Rodríguez-Miranda, O. y J.C. Rosas-Sotomayor (2010). Selección de genotipos de frijol común por su resistencia al tizón bacteriano. *Agronomía Mesoamericana* 21: 275-280.
- Rodríguez, M.O., B. Faure, Á.R. Benítez y S.E. Beebe (2007). Identificación de genotipos resistentes al virus de mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) mediante el uso del marcador molecular *bgm-1*. *Temas de Ciencia y Tecnología* 11: 57-63.
- Rosas, J.C. (1998). El cultivo del frijol común en América Tropical. Zamorano, HN, Zamorano. *Academic Press*. 52 p.
- Saburido-Álvarez, M.S. y A. Herrera-Estrella (2015). El frijol en la era genómica. *Revista Digital Universitaria*. 16: 1-16.
- Schmutz, J., P.E. McClean, S. Mamidi, G.A. Wu, S.B. Cannon, J. Grimwood, J. Jenkins, S. Shu, Q. Song, C. Chavarro, M. Torres-Torres, V. Geffroy, S.M. Moghaddam, D. Gao, B. Abernathy, K. Barry, M. Blair, M.A. Brick, M. Chovatia, P. Gepts, D.M. Goodstein, M. Gonzales, U. Hellsten, D.L. Hyten, G. Jia, J.D. Kelly, D. Kudrna, R. Lee, M.M.S. Richard, P.N. Miklas, et al. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* 46: 707-713.
- Spataro, G., B. Tiranti, P. Arcaleni, E. Bellucci, G. Attene, R. Papa, P. Spagnoletti y V. Negri (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 122: 1281-1291.
- Singh, S.P., F.J. Morales, P.N. Miklas y H. Terán (2000). Selection for Bean Golden Mosaic Resistance in Intra- and Interracial Bean Populations. *Crop Science* 40: 1565-1572.
- Treviño, Q.C. y R. Rosas (2013). El frijol común: factores que merman su producción. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Volumen XXVI Número 1. Disponible en: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol26num1/articulos/el-frijol.html> Fecha de consulta 13/12/2014.
- Vargas V, M.L.P., J.S. Muruaga, R. Lépiz y A. Pérez (2012). La colección INIFAP de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) I. Distribución geográfica de sitios de colecta. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 1247-1259.
- Vargas-Vázquez, M.L.P., J.S. Muruaga-Martínez, J.M. Hernández-Casillas y J. Díaz-De la Cruz (2007). Diagnóstico de la forma cultivada del frijol ayocote *Phaseolus coccineus* L. e información geográfica de los sitios de colecta. Campo Experimental Valle de México, INIFAP, Chapingo, Estado de México. 18 p.
- Vargas-Vázquez, M.L.P., J.S. Muruaga-Martínez, S.E. Martínez-Villarreal, R. Ruiz-Salazar, S. Hernández-Delgado y N. Mayek-Pérez (2011). Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 767-775.
- Viteri, D., P. Cregan, J. Trapp, P. Miklas y S. Shree (2014). A new common bacterial blight resistance QTL in VAX 1 common bean and interaction of the new QTL, SAP6, and SU91 with bacterial strains. *Crop Science* 54: 1598-1608. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2014.01.0008>
- Xu, Y. y J.H. Crouch (2008). Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science* 48: 391-407.