

Herencia de la Resistencia de Campo a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en Líneas Endogámicas Recombinantes de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Netzahualcoyotl Mayek-Pérez, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Blvd. del Maestro s/n esquina Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, México CP 88710; Ernesto López-Salinas, Javier Cumpián-Gutiérrez y Jorge Alberto Acosta-Gallegos, INIFAP, Campo Experimental Bajío, km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Guanajuato, México CP 38010. Correspondencia: nmayek@ipn.mx

(Recibido: Mayo 14, 2008 Aceptado: Diciembre 18, 2008)

Mayek-Pérez, N., López-Salinas, E., Cumpián-Gutiérrez, J. y Acosta-Gallegos, J.A. 2009. Herencia de la resistencia de campo a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en líneas endogámicas recombinantes de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 27:1-10.

Resumen. Los genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) BAT 477, resistente al hongo *Macrophomina phaseolina*, y Pinto UI-114 (susceptible) se cruzaron manualmente en Chapingo, México y se avanzaron por autofecundación hasta la F₈. Las 137 líneas endogámicas recombinantes F₈ más los dos progenitores y cinco testigos (SEQ 12, Pinto Zapata, Negro Altiplano, Azufrado Tapatío, Pinto Villa) se evaluaron durante 2004-2005 en Cotaxtla e Isla, Veracruz, México, en diseños experimentales de látice simple 12 x 12 con cuatro repeticiones, y condiciones de infestación natural del hongo. Dos repeticiones se condujeron en condiciones de riego y las otras dos en seco (suspensión del riego al inicio de la floración). Los resultados indicaron que la resistencia de campo a *M. phaseolina* en BAT 477 en Cotaxtla e Isla es controlada por dos y nueve genes, respectivamente. Cuando la reacción a la pudrición carbonosa de las líneas endogámicas recombinantes se reclasificó en dos categorías (resistentes, susceptibles), la resistencia de campo en Cotaxtla fue controlada por dos genes dominantes, con efectos de epistasis doble recesiva.

Palabras clave adicionales: Pudrición carbonosa.

El hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causa la pudrición carbonosa en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y otros cultivos de importancia económica en México y el mundo tales como soya [*Glycine max* (L.) Merr], sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], maíz (*Zea mays* L.), ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) (Dhingra y Sinclair, 1978). Los daños que se reportan por pudrición carbonosa son variables y generalmente fluctúan entre el 10 y 60% en pérdidas del rendimiento de grano, así como incidencias de hasta del 100% en países como Estados Unidos

Abstract. Common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes BAT 477, resistant to the fungus *Macrophomina phaseolina*, and Pinto UI-114 (susceptible), were manually crossed in Chapingo, Mexico, and then advanced by self-fertilization to the F₈ generation. The 137 F₈ recombinant inbred lines, the two parents and five checks (SEQ 12, Pinto Zapata, Negro Altiplano, Azufrado Tapatío, Pinto Villa) were evaluated during 2004-2005 in Cotaxtla and Isla, Veracruz, Mexico, using lattice 12 x 12 experimental designs with four replications under natural fungal infection. Two replications were conducted under irrigation and the other two under rainfed conditions (irrigation was suspended at flowering initiation). Results indicated that field resistance to *M. phaseolina* in BAT 477 in Cotaxtla and Isla, is controlled by two and nine genes, respectively. When recombinant inbred line reactions were classified in two classes (resistant, susceptible), field resistance in Cotaxtla was controlled by two dominant genes with double recessive epistasis.

Additional keywords: Charcoal rot.

Abbreviated article.

The fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causes charcoal rot in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in other crops of economic importance in Mexico and the world, such as soybean [*Glycine max* (L.) Merr], sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], maize (*Zea mays* L.), sesame (*Sesamum indicum* L.), and sunflower (*Helianthus annuus* L.) (Dhingra and Sinclair, 1978). Grain yield losses range from 10 to 60% and disease incidence may reach 100% in countries like the United States, Mexico, Venezuela, and Brazil (Abawi and Pastor-Corrales, 1990; Montes-García and Díaz-Franco, 2006). The development of common bean germplasm with durable and stable resistance to diseases like charcoal rot, is an effective alternative for production of new cultivars adapted to arid or rainfed conditions in Mexico (Mayek-Pérez *et al.*, 2001b) as well as for other regions of the world (Songa *et al.*, 1997). A limiting factor is the few studies on inheritance of

de América, México, Venezuela y Brasil (Abawi y Pastor-Corrales, 1990; Montes-García y Díaz-Franco, 2006). El desarrollo de germoplasma de frijol común con resistencia estable y durable a enfermedades, tales como la pudrición carbonosa es una alternativa eficaz para la obtención de nuevas variedades comerciales para áreas de secano o temporal en México (Mayek-Pérez *et al.*, 2001b) y otras regiones productoras en el mundo (Songa *et al.*, 1997). Un factor limitante para la obtención de germoplasma resistente a la pudrición carbonosa es los pocos estudios relativos al análisis de la herencia de la resistencia genética a dicho fitopatógeno. Esto ha sido difícil, debido a que los procedimientos tradicionales de inoculación utilizados, y el efecto de diversos factores ambientales durante el desarrollo de la enfermedad han enmascarado la respuesta de la planta al patógeno; situación que ha conducido a errores en la caracterización de germoplasma segregante (Mayek-Pérez *et al.*, 1997; Olaya *et al.*, 1996). En estudios previos de la reacción de germoplasma de *Phaseolus* a *M. phaseolina* (Mayek-Pérez *et al.*, 1996, 2001b; Pastor-Corrales y Abawi, 1988) se han identificado genotipos resistentes de frijol a la pudrición carbonosa; sin embargo, se desconoce la base genética de la resistencia al hongo en variedades y líneas experimentales promisorias como fuentes de resistencia genética a la enfermedad. Olaya *et al.* (1996) y Mayek-Pérez *et al.* (2001a) indicaron que la resistencia a *M. phaseolina* en la línea BAT 477 es gobernada por un par de genes dominantes con efectos complementarios, en condiciones de evaluación de invernadero y de invernadero y campo, respectivamente. Miklas y Beaver (1994) determinaron que la resistencia de campo a *M. phaseolina* es de naturaleza poligénica, mientras que Miklas *et al.* (1998) identificaron en líneas endogámicas recombinantes derivadas de la cruce XAN-176 (resistente) x Dorado (susceptible), un número variable de loci de caracteres cuantitativos (LCCs) asociados con la resistencia a la pudrición carbonosa en campo, los cuales a su vez explicaron del 12 al 19% de la variación fenotípica observada para la reacción a *M. phaseolina*. La caracterización de la base genética de la resistencia a *M. phaseolina* en germoplasma de frijol, facilitará la incorporación efectiva de la resistencia genética a este patógeno en materiales comerciales susceptibles, ampliamente cultivados y aceptados en México. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la base genética de la resistencia a la pudrición carbonosa en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma. Las variedades de frijol BAT 477 (resistente a *M. phaseolina*) y Pinto UI-114 (susceptible), se cruzaron manualmente en invernadero en Montecillo (19° 29' LN, 98° 53' LO, 2250 msnm) y Chapingo, Estado de México (19° 27' LN, 98° 51' LO, 2240 msnm). BAT 477 pertenece a la raza genética Mesoamérica, tiene grano pequeño color beige y es una línea mejorada originaria de Colombia con hábito de crecimiento tipo III; mientras que Pinto UI-114 pertenece a la

resistencia, which are difficult to undertake because of the traditional inoculation procedures used, and to the adverse effects of some environmental factors which mask plant response to the pathogen (Mayek-Pérez *et al.*, 1997; Olaya *et al.*, 1996). Olaya *et al.* (1996) and Mayek-Pérez *et al.* (2001a) reported that resistance of line BAT 477 to *M. phaseolina* is governed by a pair of dominant genes with complementary effects in the greenhouse and in the greenhouse and field, respectively. Miklas and Beaver (1994) determined that field resistance to *M. phaseolina* is polygenic, while Miklas *et al.* (1998) identified in recombinant endogamic lines derived from the cross XAN-176 (resistant) x Dorado (susceptible), a variable number of loci of quantitative characters associated with resistance, which explained 12 to 19% of the phenotypic variation observed for the reaction to *M. phaseolina*. The objective of this work was to characterize the genetic base of resistance to charcoal rot under field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Germplasm. Bean cultivars BAT 477 (resistant to *M. phaseolina*) and Pinto UI-114 (susceptible), were crossed manually in the greenhouse in Montecillo (19° 29' LN, 98° 53' LW, 2250 masl) and Chapingo, state of Mexico (19° 27' LN, 98° 51' LO, 2240 masl). BAT 477 belongs to the Mesoamerican genetic race, it has small, beige grain and it is an improved line from Colombia with type III growth habit; while Pinto UI-114 belongs to the Durango race whose grain is large, beige with brown spots, it is an improved cultivar from the United States with type III growth habit (CIAT, 1987; Singh, 1982; Singh *et al.*, 1991). F₁ and F₂ seed was obtained in Montecillo. F₃ to F₈ families were produced by successive plantings of germplasm in Cotaxtla, Veracruz (18° 44' LN, 95° 58' LW, 16 masl). Discrimination between autofertilizations and hybridizations considered as morphological markers seed testa color and hypocotil color in seedlings. One hundred and thirty seven F₈ recombinant endogamic lines (RELs) were produced.

Field experiments. The 137 RELs F₈, both progenitors and five checks were established during the winter 2004-2005 in Cotaxtla and Isla (18° 06' LN, 95° 32' LW, 65 masl), Veracruz, Mexico, under lattice 12 x 12 experimental design with four replication in each location. The checks had an intermediate biological cycle, from 40 to 50 days to flowering and from 90 to 110 days to physiological maturity; undetermined type III growth habit. SEQ 12 and BAT 477 (resistant to *M. phaseolina*) belong to the Mesoamerican genetic race and have beige grain; Azufrado Tapatío has yellow grain and belongs to the Jalisco race; Pinto Villa, Pinto UI-114 (susceptible to *M. phaseolina*) and Pinto Zapata (unknown reaction) have beige grain with brown spots, they belong to the Durango race; Negro Altiplano (unknown reaction) has opaque black grain and belongs to a combination of races Durango/Mesoamerica (Rosales-Serna *et al.*, 2004). In each testing site, two replications were conducted under irrigation and the other two under reduced irrigation (no irrigation was provided from

raza Durango cuyo grano es grande color beige con manchas color café; es una variedad mejorada originaria de Estados Unidos con hábito de crecimiento tipo III (CIAT, 1987; Singh, 1982; Singh *et al.*, 1991). La semilla de la F_1 y F_2 se obtuvo en Montecillo, Edo. de México. Las familias F_3 a F_8 se produjeron con siembras sucesivas del germoplasma en Cotaxtla, Veracruz (18° 44' LN, 95° 58' LO, 16 msnm). La discriminación entre autofecundaciones e hibridaciones, consideró como marcadores morfológicos el color de la testa de la semilla y el color del hipocótilo de las plántulas. Se produjeron 137 líneas endogámicas recombinantes (LERs) F_8 .

Experimentos de campo. Las 137 LERs F_8 más los dos progenitores y cinco testigos se establecieron durante el invierno de 2004-2005 en Cotaxtla e Isla (18° 06' LN, 95° 32' LO, 65 msnm), Veracruz, México, en un diseño experimental de látice 12 x 12 con cuatro repeticiones en cada localidad. Los testigos se caracterizan por tener ciclo biológico intermedio, de 40 a 50 días a floración y de 90 a 110 días a madurez fisiológica; hábito de crecimiento indeterminado tipo III. SEQ 12 y BAT 477 (resistentes a *M. phaseolina*) pertenecen a la raza genética Mesoamérica y tienen grano color beige; Azufrado Tapatío tiene grano amarillo y pertenece a la raza Jalisco; Pinto Villa, Pinto UI-114 (susceptibles a *M. phaseolina*) y Pinto Zapata (reacción desconocida) tienen grano beige con manchas café y pertenecen a la raza Durango; Negro Altiplano (reacción desconocida) tiene grano color negro opaco y es una combinación de razas Durango/Mesoamérica (Rosales-Serna *et al.*, 2004). En cada sitio de prueba, dos repeticiones se condujeron bajo riego, mientras que las dos repeticiones restantes se mantuvieron en condiciones de secano (suspensión del riego a partir del inicio de floración en al menos 50% del germoplasma y hasta la cosecha). La unidad experimental fue un surco de 3 m de largo con 30 semillas del genotipo respectivo. Los experimentos se desarrollaron en suelos natural y altamente infestados con *M. phaseolina* (Mayek-Pérez *et al.*, 2004). Las temperaturas promedio máxima/mínima fueron de 29.1/18.7°C y de 31.2/21.1°C en Cotaxtla e Isla, mientras que se registró una precipitación total de 365 y 198 mm en cada localidad, respectivamente.

VARIABLES MEDIDAS. En ambos experimentos se determinó la severidad de la pudrición carbonosa en cinco plantas de cada unidad experimental extraídas del suelo a los 56 días después de la siembra. La severidad se evaluó mediante la escala descrita por el Abawi y Pastor-Corrales (1990) (1 a 9), donde 1 = síntomas no visibles, 5 = hasta 25% de los tejidos de la raíz con lesiones necróticas o lesiones extendidas de los cotiledones hasta 2 cm a lo largo del tallo, y 9 = 75% o más de los tejidos de la raíz con lesiones necróticas o la mayor parte de tallo, pecíolos y puntos de crecimiento infectados y muerte de la planta. Las plantas con valores de severidad 1 a 3 se consideran resistentes y los valores de 4 a 9 se clasifican como susceptibles. También a los 56 días después de la siembra se estimó visualmente el aspecto del follaje en cada parcela, utilizando una escala visual arbitraria con nueve

flowering initiation onwards, in at least 50% of the germplasm). The experimental unit consisted of one row 3 m long with 30 seeds. Experiments were conducted in natural, highly infested soil with *M. phaseolina* (Mayek-Pérez *et al.*, 2004). Average maximum and minimum temperatures were 29.1/18.7°C and 31.2/21.1°C in Cotaxtla and Isla; total rainfall recorded was 365 and 198 mm in each location, respectively.

VARIABLES MEASURED. Charcoal rot severity was recorded in five plants in each experimental unit 56 days after sowing, following the rating scale described by Abawi and Pastor-Corrales (1990) (1 to 9), where 1 = no visible symptoms, 5 = up to 25% of root tissue with necrotic lesions, or lesions extended to cotyledons up to 2 cm along the stem, and 9 = 75% or more of root tissues with necrotic lesions or most of the stem, petioles and growing points infected, and plant death. Severity values 1-3 are considered resistant and 4-9 susceptible. A visual evaluation of the foliage condition in each plot was carried out 56 days after sowing, an arbitrary rating scale with nine values was used (1 to 9), where 1 = green foliage, 5 = up to 25% of the foliage yellow and/or dried, and 9 = 75% or more of the foliage yellow and/or dried. Days to flowering, maturity, and grain yield were recorded for each experimental unit.

STATISTICAL ANALYSIS. Data from each experiment were analyzed separately. Frequency histograms of germplasm were generated for each variable and experiment. Normality distribution for frequency of F_8 lines was determined for each variable with the W test of Shapiro-Wilk. A probability smaller than 0.05 was used to indicate absence of adjustment for a normal distribution (Ramírez and López, 1993), then data were subject to an individual analysis of variance. Narrow sense heritability of resistance to *M. phaseolina*, and grain yield, were estimated from the expected square means of the analysis of variance, and according to the equations described by Molina-Galán (1992). The number of genes implicated with resistance to charcoal rot was calculated according to the equation described by Wright (1968): $n = (GR)^2 / 4.27(\pi^2G)$, where: n = Number of genes, $(GR)^2$ = Phenotypic amplitude between lines, π^2G = Genetic variance of the generation analyzed. Data on reaction to *M. phaseolina* were re-classified according to a bimodal (resistant, susceptible) segregation pattern of resistance. The new frequencies of reaction were subjected to the goodness of fit chi-square test, considering a theoretical relationships of segregation of resistance genes to charcoal rot, due to two dominant genes with double recessive epistasis (9/16 resistant: 7/16 susceptible) (Mayek-Pérez *et al.*, 2001a; Olaya *et al.*, 1996). The hypothetical segregation relationship was accepted when adjustment was detected between the observed and expected proportions at $P < 0.05$.

RESULTS

Frequency distributions of RELs were normal for days to flowering, foliage condition, and charcoal severity in Isla and Cotaxtla; as well as for days to physiological maturity and

valores (1 a 9) y donde 1 = follaje verde, 5 = hasta 25% del follaje amarillo y/o seco, y 9 = 75% o más del follaje amarillo y/o seco. Finalmente, se registraron los días a floración y a madurez fisiológica en cada unidad experimental, así como el rendimiento de grano a la cosecha.

Análisis estadístico. La información de cada experimento se analizó por separado. Se generaron histogramas de frecuencias del germoplasma para cada variable medida y experimento. Se determinó la normalidad de las distribuciones de frecuencias de las líneas F_8 para cada variable medida, con el estadístico W de la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó una probabilidad menor a 0.05 para indicar la ausencia de ajuste a una distribución normal (Ramírez y López, 1993). Luego, los datos se sometieron al análisis de varianza (ANVA) individual. La heredabilidad, en sentido estricto, de la resistencia a *M. phaseolina* y del rendimiento de grano se estimó a partir de de los cuadrados medios esperados del ANVA y de acuerdo con las ecuaciones descritas por Molina-Galán (1992). El número de genes implicados en la resistencia a la pudrición carbonosa se calculó de acuerdo con la ecuación descrita por Wright (1968): $n = (GR)^2 / 4.27(\pi^2G)$ donde: n = Número de genes, $(GR)^2$ = Amplitud fenotípica entre líneas, π^2G = Varianza genética en la generación analizada. Los datos de reacción a *M. phaseolina* se re-clasificaron de acuerdo con un patrón de segregación de la resistencia bimodal (resistentes, susceptibles). Las nuevas frecuencias de reacción se sometieron a la prueba de bondad de ajuste de ji-cuadrada, considerando una relación teórica de segregación de genes de resistencia a la pudrición carbonosa, debida a dos genes dominantes con epistasis doble recesiva (9/16 resistentes: 7/16 susceptibles) (Mayek-Pérez *et al.*, 2001a; Olaya *et al.*, 1996). Se aceptó la relación de segregación hipotética al detectar ajuste entre las proporciones esperadas y las observadas con $P < 0.05$.

grain yield in Cotaxtla (Figs. 1 to 5). Significant differences ($p < 0.05$) were detected between humidity levels and RELs in both experiments, with the exception of days to physiological maturity in Isla. The interaction humidity levels x RELs was significant for days to physiological maturity, disease severity, and grain yield in both experiments in Isla. Significant differences were detected between replications for all variables in Isla, as well as the highest coefficients of variation, in general (Table 1). The hydric deficit during the reproductive stage accelerated physiological maturity of germplasm, reduced grain yield, increased disease severity as well as yellowing and wilting of foliage in both testing sites (Table 2). Narrow sense heritability for grain yield was 0.62 in Cotaxtla and 0.20 in Isla, while heritability values for reaction to charcoal rot were 0.35 and 0.09 in each site, respectively. There were two genes involved in the genetic resistance to *M. phaseolina* in Cotaxtla and nine in Isla. Re-classification of reaction of the RELs to the fungus in a Mendelian genetic action (resistant: susceptible), and with a theoretical expected segregation 9/16:7/16 (two dominant genes with double recessive epistasis), showed fitness to such a model in the experiment carried out in Cotaxtla (Table 3).

DISCUSSION

In most cases, frequency distribution of reaction of RELs did not show levels of resistance similar to progenitors; this phenomenon had already been observed in BAT 477 by Olaya *et al.* (1996) in the cross BAT 477 x A 70 and in BAT 477 x Pinto UI-114 by Mayek-Pérez *et al.* (2001a) in F_2 and F_3 plants. Data obtained showed a normal frequency distribution which fitted a resistance conferred by a pair of dominant genes with double recessive epistatic effects, when reactions of resistance and susceptibility were classified with the rating scale described by Abawi and Pastor-Corrales (1990). The

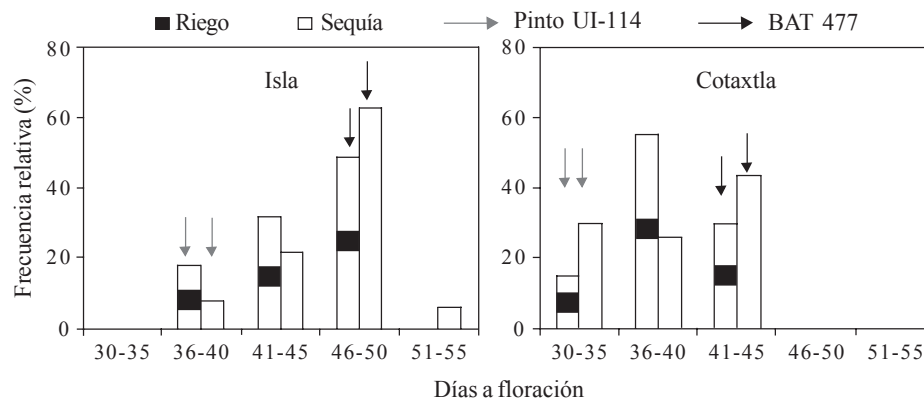


Fig. 1. Distribución de frecuencias de los días a floración, en líneas endogámicas recombinantes F_8 , derivadas de la cruce entre BAT 477 x Pinto UI-114, en Isla y Cotaxtla, Veracruz, México (pruebas de W de Shapiro-Wilk para normalidad, $p > 0.05$).

Fig. 1. Frequency distribution of days to flowering, in recombinant endogamic F_8 lines, derived from the cross BAT 477 x Pinto UI-114, in Isla and Cotaxtla, Veracruz, Mexico (W test of Shapiro-Wilk for normality, $p > 0.05$).

RESULTADOS

En Isla y Cotaxtla, las distribuciones de frecuencias de las LERs fueron normales para los días a floración, aspecto del follaje y severidad de la pudrición carbonosa; así como para días a madurez fisiológica y rendimiento de grano en Cotaxtla (Figs. 1 a 5). El ANVA detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre niveles de humedad y LERs en ambos experimentos, con excepción de días a madurez fisiológica en Isla. En Isla, la interacción niveles de humedad x LERs fue significativa para días a madurez fisiológica y severidad de la pudrición carbonosa en ambas localidades, así como para rendimiento de grano. Sólo en Isla se detectaron diferencias significativas entre repeticiones para todas las variables medidas, así como los mayores coeficientes de variación en general (Cuadro 1).

definition of resistance and susceptibility categories to charcoal rot is not critical for evaluation of bean segregating material, the problem is to define objectively the intermediate damage levels which include values 4 to 6 of the rating scale. Frequencies of reaction to *M. phaseolina* fitted to a normal distribution of probabilities. Miklas *et al.* (1998) reported that frequencies of reaction which show a normal distribution, indicate that resistance is polygenic to charcoal rot in bean; however, our results suggest that two loci which explained most of the response observed, are involved in resistance to *M. phaseolina*. It is possible that the amplitude of reaction frequency was influenced by the inoculation method in our work. Olaya *et al.* (1996) inoculated the soil artificially under controlled conditions to avoid escape to the pathogen, while

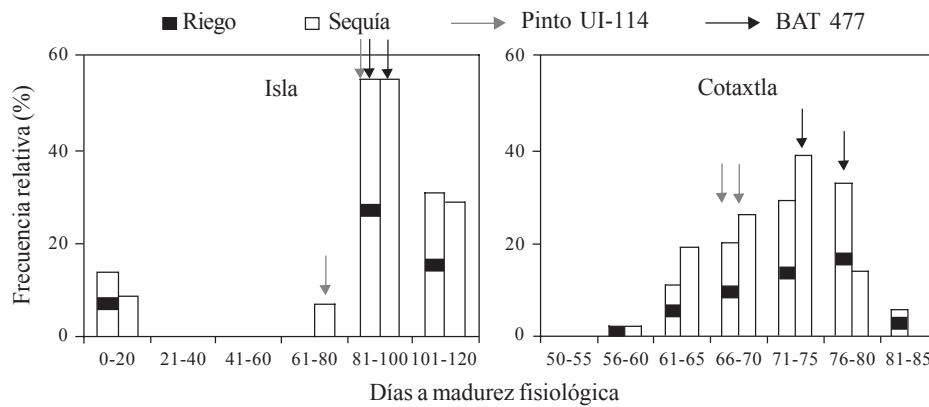


Fig. 2. Distribución de frecuencias de los días a madurez fisiológica, en líneas endogámicas recombinantes F_8 , derivadas de la cruce entre BAT 477 x Pinto UI-114, en Isla y Cotaxtla, Veracruz, México (pruebas de W de Shapiro-Wilk para normalidad, $p > 0.05$).

Fig. 2. Frequency distribution of days to physiological maturity, in recombinant endogamic F_8 lines, derived from the cross BAT 477 x Pinto UI-114, in Isla and Cotaxtla, Veracruz, Mexico (W test of Shapiro-Wilk for normality, $p > 0.05$).

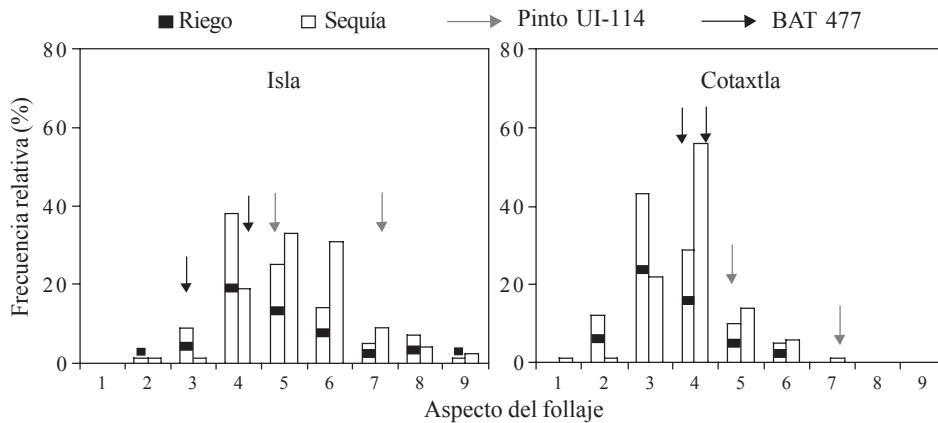


Fig. 3. Distribución de frecuencias del aspecto del follaje, en líneas endogámicas recombinantes F_8 , derivadas de la cruce entre BAT 477 x Pinto UI-114, en Isla y Cotaxtla, Veracruz, México (pruebas de W de Shapiro-Wilk para normalidad, $p > 0.05$).

Fig. 3. Frequency distribution of foliage condition, in recombinant endogamic F_8 lines, derived from the cross BAT 477 x Pinto UI-114, in Isla and Cotaxtla, Veracruz, Mexico (W test of Shapiro-Wilk for normality, $p > 0.05$).

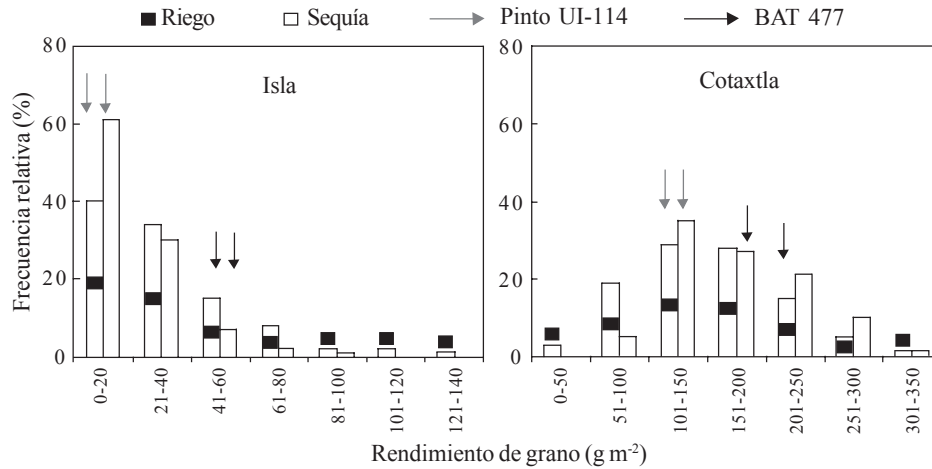


Fig. 4. Distribución de frecuencias del rendimiento de grano m^{-2} , en líneas endogámicas recombinantes F_8 , derivadas de la cruce entre BAT 477 x Pinto UI-114, en Isla y Cotaxtla, Veracruz, México (pruebas de W de Shapiro-Wilk para normalidad, $p > 0.05$).

Fig. 4. Frequency distribution for grain yield m^{-2} , in recombinant endogamic F_8 lines, derived from the cross BAT 477 x Pinto UI-114, in Isla and Cotaxtla, Veracruz, Mexico (W test of Shapiro-Wilk for normality, $p > 0.05$).

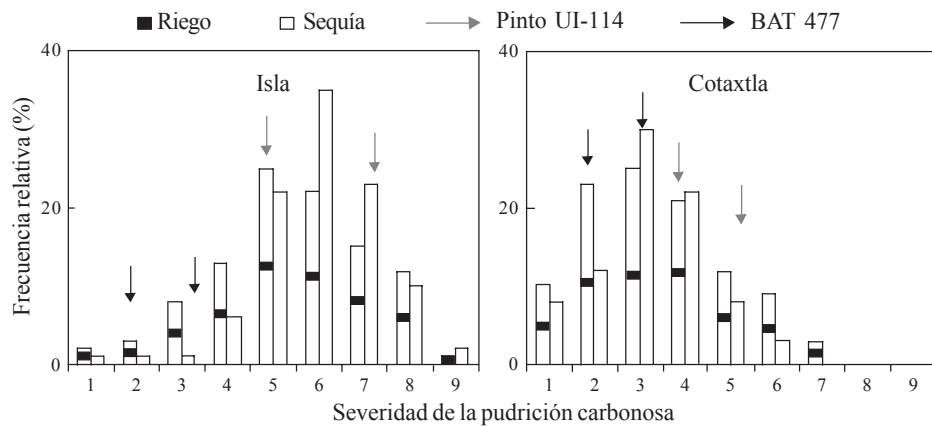


Fig. 5. Distribución de frecuencias de la severidad de la pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), en líneas endogámicas recombinantes F_8 , derivadas de la cruce entre BAT 477 x Pinto UI-114, en Isla y Cotaxtla, Veracruz, México (pruebas de W de Shapiro-Wilk para normalidad, $p > 0.05$).

Fig. 5. Frequency distribution of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) severity, in recombinant endogamic F_8 lines, derived from the cross BAT 477 x Pinto UI-114, in Isla and Cotaxtla, Veracruz, Mexico (W test of Shapiro-Wilk for normality, $p > 0.05$).

En ambos sitios de prueba el déficit hídrico en fase reproductiva aceleró la madurez fisiológica del germoplasma, redujo el rendimiento de grano, incrementó la severidad de daño por *M. phaseolina* así como amarillamiento y marchitez del follaje (Cuadro 2). La heredabilidad, en sentido estricto, para rendimiento de grano fue de 0.62 en Cotaxtla y de 0.20 en Isla, mientras que los valores de heredabilidad para la reacción a pudrición carbonosa, fueron de 0.35 y 0.09 en cada localidad respectiva. El número de genes implicados en la resistencia genética a *M. phaseolina* fue de dos en Cotaxtla y nueve en Isla. La re-clasificación de la reacción de las LERs a *M.*

in our work, germplasm was evaluated under natural selection pressure by *M. phaseolina* (Mayek-Pérez *et al.*, 2001b), which could have had high percentage of escapes because inoculum distribution in the soil was not homogeneous. Progress to obtain resistant germplasm to *M. phaseolina* in breeding programs has been difficult because of the inoculation methods used, and the effect of weather on disease development. These factors could influence on determination that field resistance to this fungus is polygenic (Miklas *et al.*, 1998; Miklas and Beaver, 1994). Also, there are problems to relate the reaction of segregating germplasm under controlled

Cuadro 1. Cuadros medios del análisis de varianza, de las variables medidas en líneas endogámicas recombinantes F₈ de frijol (*Phaseolus vulgaris*), en condiciones de campo en Veracruz, México.

Table 1. Mean squares of the analysis of variance for the variables measured in recombinant endogamic F₈ lines of bean (*Phaseolus vulgaris*), under field conditions in Veracruz, Mexico.

FV	Cotaxtla					Isla				
	Días a floración	Días a madurez fisiológica	Rendimiento de grano	Severidad de la pudrición carbonosa	Aspecto de follaje	Días a floración	Días a madurez fisiológica	Rendimiento de grano	Severidad de la pudrición carbonosa	Aspecto de follaje
Repetición	2	9	4038	0.1	1.5	160 ^y	4727 ^y	2721 ^y	33 ^y	13 ^y
Humedad	82 ^y	831 ^y	82920 ^y	31.2 ^y	40.1 ^y	361 ^y	413	17956 ^y	46 ^y	41 ^y
Genotipo	29 ^y	97 ^y	9932 ^y	4.4 ^y	2.5 ^y	21 ^y	1374 ^y	665 ^y	3 ^y	2 ^z
Humedad	6	13 ^y	1451	1.2 ^y	0.4	9	1206 ^y	370 ^z	2 ^z	1
X Genotipo										
Error	5	9	1176	0.9	0.3	8	817	267	2	2
CV (%)	6	4	26	25	15	6	33	67	23	24

^ySignificativo a p < 0.01.

^zSignificativo a p < 0.05.

phaseolina en un tipo de acción génica Mendeliano (resistentes: susceptibles) y con una segregación teórica esperada 9/16:7/16 (dos genes dominantes con epistasis doble recesiva) mostró ajuste a dicho modelo en el experimento de Cotaxtla (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

En la mayoría de los casos, la distribución de frecuencias de la reacción de las LERs, no mostró grados de resistencia similares a los de los progenitores, algo ya observado en BAT 477 por Olaya *et al.* (1996) en la crusa BAT 477 x A 70 y en BAT 477 x Pinto UI-114 por Mayek-Pérez *et al.* (2001a) en plantas F₂ y F₃. Al dividir las reacciones de resistencia y susceptibilidad con la escala de nueve valores de daño descrita por Abawi y Pastor-Corrales (1990), los datos mostraron distribución normal de frecuencias, que ajustó a una resistencia gobernada por dos pares de genes dominantes, con efectos epistáticos doble recesivos. La división entre resistencia y susceptibilidad se estableció entre los valores de 3 y 4 de la escala visual usada, pues mientras

conditions and in the field. It is probable that resistance in seedlings is evaluated under controlled conditions, and adult plant resistance in the field (Miklas *et al.*, 1998). These authors point out that it is necessary to define and utilize an adequate disease selection pressure, in order to facilitate the separation between resistant and susceptible genotypes. Therefore, it is possible that a reduced selection pressure might contribute to a greater escape frequency, and consequently a lesser reproducibility of multiple loci models that explain better the resistance. Also, for quantitative resistance, it is convenient to evaluate a great number of individuals in multiple environments in order to identify without error the resistant genotypes; so, using a rating scale with few damage levels and under controlled conditions, inheritance of resistance to *M. phaseolina* would be simple, while results from the field would suggest the action of several genes with additive effect. Miklas *et al.* (1998) studied the inheritance of resistance to charcoal rot of a bean recombinant endogamic population derived from the cross XAN 176 (resistant) and Dorado (susceptible) under field conditions. Narrow sense heritability

Cuadro 2. Comparación de medias entre niveles de humedad, para las variables medidas en líneas endogámicas recombinantes F₈ de frijol (*Phaseolus vulgaris*), cultivadas en Veracruz, México.

Table 2. Mean comparison between humidity levels for the variables measured in recombinant endogamic F₈ lines of bean (*Phaseolus vulgaris*), cultivated in Veracruz, Mexico.

Experimento	Días a floración ^z	Días a madurez fisiológica	Rendimiento de grano	Severidad de la pudrición carbonosa	Aspecto de follaje
Cotaxtla					
Riego	38 a	73 a	152 a	3.4 b	3.5 b
Sequía	38 a	71 b	128 b	3.9 a	4.1 a
Isla					
Riego	45 a	88 a	30 a	5.5 b	4.9 b
Sequía	46 a	86 b	19 b	6.1 a	5.5 a

^zLetras iguales en cada columna y en cada experimento son estadísticamente iguales (Tukey, p < 0.05).

Cuadro 3. Prueba de ji-cuadrada de la reacción a *Macrophomina phaseolina*, en líneas endogámicas recombinantes F₈ de frijol (*Phaseolus vulgaris*), cultivadas en Veracruz, México.

Table 3. Chi-square test for reaction to *Macrophomina phaseolina*, in recombinant endogamic F₈ bean (*Phaseolus vulgaris*) lines, cultivated in Veracruz, Mexico.

Experimento	Resistentes	Susceptibles	9:7	X ² _{calc}	X ² _{tab(0.05, 1 g. l.)}
Isla	11	126	77:60	129.2***	3.84
Cotaxtla	69	68	77:60	1.9NS	3.84

que el valor de 3 equivale al desarrollo de lesiones limitadas a los tejidos cotiledonales y lesiones restringidas en los tallos (1 a 2 mm de longitud), el valor de 4 indica que las lesiones de los tejidos cotiledonales han alcanzado al tallo y ocasionado lesiones de casi 1 cm de largo. Las lesiones mayores a 1 cm tienen mayor probabilidad de progresar rápidamente en la planta, colapsando el tallo en pocos días y causan eventualmente la muerte de la planta (Abawi y Pastor-Corrales, 1990). La definición de las categorías de resistencia y susceptibilidad a la pudrición carbonosa, no es crítica para evaluar material segregante de frijol, el problema es definir donde situar objetivamente los grados intermedios de daño, que incluyen los valores de 4 a 6 en la escala utilizada. Las frecuencias de reacción a *M. phaseolina* ajustaron a una distribución normal de probabilidades. Miklas *et al.* (1998) señalaron que las frecuencias de reacción que muestran distribuciones normales, son indicadoras de resistencia poligénica a la pudrición carbonosa en frijol común. Sin embargo, la información de este trabajo sugiere que en la resistencia a *M. phaseolina*, están involucrados dos loci que explican la mayor parte de la respuesta observada. Posiblemente, la amplitud de frecuencias de reacción está influida por el método de inoculación utilizado en este trabajo. Olaya *et al.* (1996) inocularon artificialmente el suelo en condiciones controladas para reducir el escape al patógeno, mientras que en el presente trabajo se evaluó al germoplasma bajo la presión de selección natural que *M. phaseolina* muestra bajo condiciones de campo con antecedentes de altas incidencia y severidad de daño en frijol (Mayek-Pérez *et al.*, 2001b), y que no está exenta de altos porcentajes de escape dada la distribución no homogénea del inóculo del hongo. El avance en la obtención de resistencia a *M. phaseolina* en los programas de mejoramiento, se ha dificultado por diversos factores, entre ellos, los procedimientos de inoculación utilizados y el efecto ambiental en el desarrollo de la enfermedad, lo que en cierto modo puede influir en que se determine que la resistencia de campo a *M. phaseolina* sea poligénica (Miklas *et al.*, 1998; Miklas y Beaver, 1994). Además, existen problemas para relacionar la reacción de germoplasma segregante en campo y bajo condiciones controladas. Es probable que bajo condiciones controladas se evalúa la resistencia en plántula, mientras que en campo, en plantas adultas se cuantifica la resistencia integrada a través de todo el ciclo de cultivo; por ejemplo, en evaluaciones de campo no se observaron altas frecuencias de muerte de plántulas en

showed values from 0.53 to 0.57, and a frequency distribution of reaction by the fungus was found close to normal, with the absence of discrete segregation classes, which indicated the presence of a quantitative resistance. The results obtained are not promising in relation to the use of molecular markers for selection of resistant genotypes in segregating generations, because values for phenotypic variation are low, and these in turn, are strongly influenced by field conditions (De and Kaiser, 1991; Lodha and Solanki, 1993; Sinhamahapatra and Das, 1992; Tenkouano *et al.*, 1993). In future studies, it would be appropriate to provide the optimum environmental conditions for a homogeneous selection pressure to the fungus, as well as favorable conditions for its development; in this way, accurate estimations of germplasm reaction to *M. phaseolina* could be accomplished and the information obtained could be applied in genetic breeding programs. The severity rating scale did not allow to detect the phenotype of progenitors in most of the recombinant endogamic F₈ lines, so besides the presence and action of the two major resistance genes, it is possible that other genes are participating with minor effect on resistance to charcoal rot. These genetic effects are cryptic, and are characterized by phenotypic allele effects derived from the susceptible progenitor (Young, 1996). Re-classification of reaction of the RELs to *M. phaseolina* in a bimodal pattern (resistant: susceptible), indicated fitness to a theoretical model of segregation governed by two dominant genes with double recessive epistasis in the germplasm evaluated in Cotaxtla, which was also confirmed by Wright's formula (1968).

End of the abbreviated article.

pre y post-emergencia, efectos que constituyen un componente importante del daño en las plántulas (Miklas *et al.*, 1998). Estos autores señalan que es necesario definir y utilizar una presión de selección adecuada de la enfermedad para facilitar la separación entre genotipos resistentes y susceptibles. Lo anterior indica que existe la posibilidad de que una presión de selección reducida contribuya a una mayor frecuencia de escape al patógeno y por tanto, a una menor reproducibilidad de modelos de loci múltiples que expliquen mejor la resistencia. Además, al considerar que la resistencia es de tipo cuantitativo, es conveniente evaluar un gran número de individuos en ambientes múltiples de selección para identificar, sin equivocación, a los genotipos resistentes. Lo

anterior indica que bajo condiciones controladas y con el uso de una escala que considere pocas clases de grados de daño, la herencia de la resistencia a *M. phaseolina* es simple, mientras que los resultados obtenidos en condiciones de campo sugieren la acción de varios genes con efectos aditivos. Miklas *et al.* (1998) evaluaron bajo condiciones de campo la herencia de la resistencia a la pudrición carbonosa en frijol, en una población endogámica recombinante derivada de la cruce entre XAN 176 (resistente) y Dorado (susceptible). La heredabilidad en sentido estricto exhibió valores de 0.53 a 0.57, y se encontró una distribución de frecuencias de reacción al hongo cercana a la normal, con la ausencia de clases discretas de segregación; lo que indicó la presencia de resistencia del tipo cuantitativo. Los presentes resultados no son prometedores en cuanto a la utilización de marcadores moleculares para la selección de genotipos resistentes a *M. phaseolina* en generaciones segregantes debido a los valores bajos de variación fenotípica explicada. Ésta a su vez parece estar fuertemente influida por las condiciones variables de la presión de selección del patógeno prevaeciente bajo condiciones de campo. Lodha y Solanki (1993) determinaron la presencia de efectos epistáticos en genotipos resistentes de *Cyamopsis tetragonoloba* L., además de la presencia de efectos de dominancia y aditividad. Por su parte, Sinhamahapatra y Das (1992) observaron que en ajonjolí (*Sesamum indicum* L.), el componente de dominancia tiene una función importante en el control de la resistencia a la pudrición carbonosa (aptitud combinatoria específica). Lodha y Solanki (1993) determinaron que el ambiente juega un papel importante en la expresión de la resistencia a la pudrición carbonosa, debido a que la heredabilidad en sentido estricto fue menor a 0.38. Tenkouano *et al.* (1993) relacionaron la resistencia a la pudrición carbonosa del sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.], con la capacidad de “retardar” la senescencia de la planta bajo condiciones de déficit hídrico. Encontraron que ambas características se heredan de igual forma y de manera dominante, además de la presencia de interacciones epistáticas dominantes y recesivas entre dos loci. Dichos autores no señalaron problemas en el análisis mendeliano de la información, no obstante, los informes previos de la existencia de resistencia poligénica a ambas características evaluadas y a que los genotipos heterogéneos no segregaron en clases discretas, debido a que el rango de reacciones a la enfermedad en plantas resistentes no se traslapó con el de susceptibles. De y Kaiser (1991) efectuaron un análisis genético de la resistencia a *M. phaseolina* en yute (*Corchorus sativus* L.), determinando la predominancia de efectos aditivos y resistencia heredada en forma dominante, así como altas aptitudes combinatorias general y específica. En futuros trabajos, será apropiado proporcionar las condiciones ambientales óptimas de presión de selección homogénea del hongo y del clima favorable para su desarrollo adecuado, para realizar estimaciones correctas de la reacción de germoplasma de frijol a *M. phaseolina*, de manera que la información obtenida sea aplicable en programas de

mejoramiento genético. La escala de evaluación de la severidad de la pudrición carbonosa no permitió detectar el fenotipo de los progenitores en la mayoría de las LERs F_8 , lo que sugiere que aparte de la presencia y acción de los dos genes mayores de resistencia, detectados tanto por la fórmula de Wright (1968) como por la re-clasificación de la reacción de las LERs a un patrón bimodal de segregación y validados por la prueba de ji-cuadrada, posiblemente están participando otros genes con efectos menores en la resistencia a la pudrición carbonosa. Estos efectos genéticos se denominan crípticos y se caracterizan porque los efectos fenotípicos de dichos alelos provienen del progenitor susceptible (Young, 1996). La re-clasificación de la reacción de las LERs a *M. phaseolina* en un patrón bimodal (resistentes: susceptibles), indicó ajuste a un modelo teórico de segregación gobernado por dos genes dominantes con epistasis doble recesiva en el germoplasma evaluado en Cotaxtla, lo que también se confirmó de acuerdo con la fórmula de Wright (1968). Algo similar se observó en el modo de herencia del tiempo de cocción del germoplasma $F_7:F_8$ derivado de la cruce entre las variedades Bayo Mecentral x Bayo Victoria (Jacinto-Hernández *et al.*, 2003), lo que confirma la consistencia de los resultados, para el cálculo del número de genes implicados en la resistencia a la pudrición carbonosa, con las dos formas de análisis estadístico.

CONCLUSIONES

La herencia de la resistencia a *M. phaseolina* en LERs F_8 de la línea de frijol BAT 477 estuvo influenciada por el ambiente, pues en las condiciones más restrictivas (Isla) se determinaron nueve genes, y en las menos restrictivas (Cotaxtla) se determinaron dos genes controlando la resistencia al hongo. Cuando la reacción a la pudrición carbonosa se re-categorizó, sólo en Cotaxtla se determinó que dos genes dominantes con efectos de epistasis doble recesiva gobiernan la resistencia de BAT 477.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México (Proyectos J33785B y 48457-Z). La publicación de los resultados ha sido financiada por el Fondo Mixto-Gobierno del Estado de Tamaulipas, México. Los autores agradecen el apoyo técnico de campo a Hilario Peña (q.e.p.d.) (INIFAP-Campo Experimental Cotaxtla; Cotaxtla, Veracruz) y Uvence Cortés-Olivera (INIFAP-Campo Experimental Papaloapan; Ciudad Isla, Veracruz). Los autores, con excepción de J. Cumpián-Gutiérrez son becarios del Sistema Nacional de Investigadores. N. Mayek-Pérez es becario EDI y COFAA del IPN.

LITERATURACITADA

Abawi, G.S., and Pastor-Corrales, M.A. 1990. Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. CIAT. Cali, Colombia. 114 p.

- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. A. van Schoonhoven y M.A. Pastor-Corrales (comps.). Cali, Colombia. 56 p.
- De, D.K., and Kaiser, S.A.K.M. 1991. Genetic analysis of resistance to stem rot pathogen (*Macrophomina phaseolina*) infecting jute. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 26:1017-1022.
- Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. 1978. Biology and Pathology of *Macrophomina phaseolina*. Universidade Federal de Vicosa. Vicosa, Brazil. 166 p.
- Jacinto-Hernández, C., Azpiroz-Rivero, S., Acosta-Gallegos, J.A., Hernández-Sánchez, H., and Bernal-Lugo, I. 2003. Genetic analysis and random amplified polymorphic DNA markers associated with cooking time in common bean. Crop Science 43:329-332.
- Lodha, S., and Solanki, K.R. 1993. Inheritance of resistance to dry root rot in cluster bean. Indian Phytopathology 45:430-433.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C. y Acosta-Gallegos, J.A. 1997. Variación en características culturales in vitro de aislamientos de *Macrophomina phaseolina* y su virulencia en frijol. Agrociencia 31:187-195.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C., Acosta-Gallegos, J.A., and Cumpeán-Gutiérrez, J. 1996. Reaction to *Macrophomina phaseolina* in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). In: J.P.R. Martínez-Soriano (comp.). Proceedings XXXVI Annual Meeting of the American Phytopathological Society-Caribbean Division. Guadalajara, Jalisco, México. p. 010.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C., López-Salinas, E. y Acosta-Gallegos, J.A. 2001a. Herencia de la resistencia genética a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol. Agrociencia 35:637-648.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C., López-Salinas, E., Cumpián-Gutiérrez, J. y Acosta-Gallegos, J.A. 2001b. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* en frijol común bajo condiciones de campo en México. Agrociencia 35:649-661.
- Mayek-Pérez, N., López-Salinas, E., Cumpián-Gutiérrez, J. y Acosta-Gallegos, J.A. 2004. Reacción de germoplasma de frijol común a *Macrophomina phaseolina* en condiciones de riego-secano en Veracruz, México. Agronomía Mesoamericana 15:45-52.
- Miklas, P.N., and Beaver, J.S. 1994. Inheritance of field resistance to ashy stem blight in dry bean. Bean Improvement Cooperative 37:233-234.
- Miklas, P.N., Stone, V., Urrea, C.A., Johnson, E., and Beaver, J.S. 1998. Inheritance and QTL analysis of field resistance to ashy stem blight in common bean. Crop Science 38:916-921.
- Molina-Galán, J.D. 1992. Introducción a la Genética de Poblaciones y Cuantitativa. AGT Editor. México, D.F. 370 p.
- Montes-García, N. y Díaz-Franco, A. 2006. Fitopatología. pp. 192-213. In: L.A. Rodríguez-Del Bosque (ed.). Campo Experimental Río Bravo: 50 Años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos. Libro Técnico 1. Río Bravo, Tamaulipas, México. 325 p.
- Olaya, G., Abawi, G.S., and Weeden, N.F. 1996. Inheritance of the resistance to *Macrophomina phaseolina* and identification of RAPD markers linked to the resistance genes in beans. Phytopathology 86:674-679.
- Pastor-Corrales, M.A., and Abawi, G.S. 1988. Reactions of selected bean accessions to infection by *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 72:39-41.
- Ramírez, M.E. y López, Q. 1993. Métodos Estadísticos no Paramétricos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 223 p.
- Rosales-Serna, R., Acosta-Gallegos, J.A., Muruaga-Martínez, J.S., Hernández-Casillas, J.M., Esquivel-Esquivel, G y Pérez-Herrera, P. 2004. Variedades Mejoradas de Frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico No. 6. INIFAP. México, D.F. 148 p.
- Singh, S.P. 1982. A key for identification of different growth habits of *Phaseolus vulgaris* L. Bean Improvement Cooperative 25:92-95.
- Singh, S.P., Gepts, P., and Debouck, D.G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Economic Botany 45:379-396.
- Sinhamahapatra, S.P., and Das, S.N. 1992. Combining ability for resistance to charcoal rot [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.] in sesame. Indian Journal of Genetics 52:261-263.
- Songa, W., Hillocks, J., Mwangi, A.W., Buruchara, R., and Ronno, W.K. 1997. Screening common bean accessions for resistance to charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in Eastern Kenya. Experimental Agriculture 33:459-468.
- Tenkouano, A., Miller, F.R., Frederiksen, R.A., and Rosenow, D.T. 1993. Genetics of non senescence and charcoal rot resistance in sorghum. Theoretical and Applied Genetics 85:644-648.
- Wright, S. 1968. Evolution and Genetics of Populations. Vol. 1. Genetic and Biometric Foundations. University of Chicago Press. Chicago, Illinois, USA. 469 p.
- Young, N.D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. Annual Review of Phytopathology 34:479-501.