

**Optimización del protocolo para el marcador
molecular de los alelos *elF4E* del gen *bc-3* de
resistencia al virus del mosaico necrótico en
frijol**

**Luz De María Albertina Montejo Domínguez
Hugo Alejandro Pantigoso Guevara**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Optimización del protocolo para el marcador molecular de los alelos *elF4E* del gen *bc-3* de resistencia al virus del mosaico necrótico en frijol

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Luz De María Albertina Montejo Domínguez
Hugo Alejandro Pantigoso Guevara

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Optimización del protocolo para el marcador molecular de los alelos *elF4E* del gen *bc-3* de resistencia al virus del mosaico necrótico en frijol

Presentado por:

Luz de María Albertina Montejo Domínguez
Hugo Alejandro Pantigoso Guevara

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

Renan Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

María Alexandra Bravo, M. Sc.
Asesora

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Optimización del protocolo para el marcador molecular de los alelos *elf4E* del gen *bc-3* de resistencia al virus del mosaico común necrótico en frijol.

Luz de María Albertina Montejo Domínguez
Hugo Alejandro Pantigoso Guevara

Resumen. El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los granos básicos de mayor importancia en centro américa, por ser una fuente de proteína para la alimentación humana y su cultivo un generador de ingresos y empleo rural. El virus del mosaico común necrótico (VCMN) es el virus más común y destructivo que infecta al frijol común; pertenece al género *Potyvirus*, y se encuentra distribuido a escala mundial. El VCMN es de tipo no persistente, y es diseminado a través de la semilla infectada. Una estrategia eficaz de control es el uso de variedades resistentes con la combinación del gen *i* y el gen *bc-3*; sin embargo, solo las variantes homocigotas recesivas (*elf4E²/elf4E²*) del gen *bc-3* presentan la resistencia al VCMN. El objetivo del estudio fue optimizar el protocolo del marcador molecular ENM de tipo CAPS y la enzima de restricción *Rsal* para determinar la presencia del gen *bc3* y sus alelos *elf4e²*, en cuatro genotipos de frijol (Raven, Xrav40-4, DPC-40 y Widusa). El protocolo optimizado se validó en una población de 92 plantas F2 de la cruce Amadeus 77/Raven, segregando por la presencia del gen recesivo *bc-3*. El protocolo fue adaptado a las condiciones del laboratorio de biotecnología aplicada de Zamorano, para ser usado en la selección asistida con marcadores de germoplasma de frijol resistente al VCMN. Las principales modificaciones para la optimización del protocolo del gen *bc-3* fueron en las concentraciones de ADN, Taq polimerasa y ddH₂O; la modificación del perfil térmico a 61.6 °C para la temperatura de acoplamiento; y el empleo de 40 ciclos en la PCR. Para el protocolo de la enzima de restricción *Rsal*, usada para separar el gen *bc3* en sus alelos *elf4E*, se utilizaron 10 uL de producto de la PCR, 3 µL de colorante de carga, lográndose un corrido limpio y uniforme en la electroforesis. La prueba del χ^2 (*Chi-cuadrado*) en la población F2 indicó el ajuste de los datos observados a la segregación esperada (3 susceptibles: 1 resistente), obteniéndose un valor significativo ($p=0.20 > 0.05$).

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., reacción en cadena de la polimerasa, resistencia genética a virus, selección asistida con marcadores.

Abstract. Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is one of the basic grains of greater importance in Central America, as a source of protein for human consumption and its cultivation a generator of income and rural employment. The mosaic common necrotic virus (VMCN) is the most common and most destructive virus that infects the common bean; belongs to the genus *Potyvirus* and is distributed worldwide. The VMCN is not persistent and is spread through infected seed. An effective control strategy is the use of

resistant gene combination varieties *I* and gene *bc-3*; However, only recessive homozygotes variants (*elF4E2/2elF4E*) gene *bc-3* present the resistance to the VMCN. The objective of the study was to optimize the protocol of the ENM molecular marker type CAPS and restriction enzyme to determine the presence of the gene *bc-3* and their alleles *elF4E2*, four genotypes of bean (Raven, XRAV40-4, DPC-40 and Widusa). The optimized protocol was validated in a population of 92 F2 plants of crosses Amadeus 77/Raven, segregating by the presence of the recessive gene *bc-3* The Protocol was adapted to the conditions of the laboratory of biotechnology applied by Zamorano, to be used for assisted selection with markers of germplasm resistant to the VMCN bean. The main modifications for the optimization of the Protocol of the gene *bc-3* were in concentrations of Taq DNA polymerase and ddH₂O; modification of the thermal profile 38.3°C for temperature coupling; and the use of 40 cycles on PCR. For the Protocol of the restriction enzyme, used to separate the gene *bc-3* in their alleles *elF4E*, used 10 uL of the PCR, 3 µL of loading dye product, achieving a clean and uniform amplification in electrophoresis. Test of Chi-square (Chi- square) in the F2 population indicated the setting of observed to expected segregation data (likely 3: resistant 1), obtaining significant value ($p = 0.20 > 0.05$).

Key words: Genetic resistance to virus, Marker - assisted selection, *Phaseolus vulgaris* L., polymerase chain reaction.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4 CONCLUSIONES.....	14
5 RECOMENDACIONES.....	15
6 LITERATURA CITADA.....	16
7 ANEXOS.....	18

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Reactivos para mezcla maestra de PCR de los protocolos originales.	4
2. Perfil térmico de PCR de los protocolos originales.....	4
3. Protocolos de prueba para amplificación de alelos <i>elF4E</i>	5
4. Pruebas de mezcla maestra para PCR para el gen <i>bc-3</i>	6
5. Gradiente de temperatura de acoplamiento para el protocolo A.	7
6. Perfil térmico para PCR optimizado para la amplificación del gen <i>bc-3</i>	9
7. Protocolo de mezcla maestra para PCR optimizado para amplificación del gen <i>bc-3</i>	10
8. Protocolo de mezcla maestra para enzima <i>Rsal</i> optimizado, para amplificación de los alelos <i>elF4E</i>	11
9. Análisis estadístico de <i>Chi</i> cuadrado para la población F2 (Amadeus 77 × Raven)..	13

Figuras	Página
1. Amplificación del gen <i>bc-3</i> con los protocolos A-H.....	6
2. Amplificación del gen <i>bc-3</i> a diferentes temperaturas de acoplamiento.....	8
3. Amplificación del gen <i>bc-3</i> con gradiente de 61.1 a 62.8 °C en el acoplamiento.....	9
4. Amplificación del gen <i>bc-3</i> con el protocolo optimizado.	10
5. Protocolos con la enzima de restricción <i>Rsal</i> [®] para los alelos <i>elF4E</i>	10
6. Evaluación de protocolos con la enzima de restricción <i>Rsal</i> adicionando 3 µL Loadin dye [®] (buffer 6X) al producto de PCR.	10
7. Presencia de alelos <i>elF4E</i> en plantas F2, 1 a 22.....	11
8. Presencia de alelos <i>elF4E</i> en plantas F2, 25 a 46.....	12
9. Presencia de alelos <i>elF4E</i> en plantas F2, 47 a 68.....	12
10. Presencia de alelos <i>elF4E</i> en plantas F2, 23, 24, y 69 a 88.....	12
11. Presencia de alelos <i>elF4E</i> en plantas F2, 89 a 96.....	13

1. Protocolo de extracción de ADN para el análisis de RAPD (Método de la Universidad de Wisconsin, UW - Madison)	18
2. Cuantificación de ADN - Instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer	19
3. Dilución de ADN (20 ng/mL) por el método de la UW	20
4. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores tipo SCAR	20

1. INTRODUCCIÓN

La siembra de frijol común es una de las principales actividades de la economía campesina en varias regiones de Centro América, siendo de mucha importancia como generador de ingresos y empleo rural y como producto básico en la dieta alimenticia de la población (FAO 2007).

La producción de frijol es afectada por el virus del mosaico común necrótico (VMCN) del frijol, o virus del mosaico común – serotipo A (McKern *et al.* 1992; Vetten *et al.* 1992) del género *Potyvirus*. El VMCN se encuentra ampliamente distribuido a escala mundial y es tal vez el virus más común y destructivo de los 34 virus conocidos que infectan naturalmente el frijol (McKern *et al.* 1992), ocasionando pérdidas considerables en el rendimiento del cultivo y una baja calidad del grano (Drijfhout 1978). Este virus es transmitido por áfidos de forma no persistente y rápida, sin necesidad de colonización. Este virus es portado por la semilla que le permite una rápida diseminación de la enfermedad (Drijfhout 1978).

La mayoría de variedades de frijol sembradas en Centro América y el Caribe poseen el gen *I* para resistencia del mosaico común (VMC) (Fernandez *et al.* 1985). Estas líneas con el gen *I* producen una reacción de hipersensibilidad reflejado en necrosis vascular y muerte de la planta (Pierce 1934) con las cepas necróticas (VMCN). La identificación de fuentes recesivas de resistencia al virus del VMCN ante la presencia del gen *bc-3*, mostraron que la mejor estrategia de control para el daño del VMCN es la combinación del gen *I* y el gen *bc-3* (Drijfhout 1978). Cabe resaltar que la resistencia otorgada por el gen *bc-3* depende de la combinación de los alelos dominantes o recesivos de los genes implicados (Drijfhout 1978).

Estudios recientes demuestran que debido a una mutación en el factor de iniciación en la traducción de la proteína (*eIFs*, por sus siglas en ingles), en su variante alélica *eIF4E²/eIF4E²* homocigótica presente en este gen *bc-3* muestra la ausencia de síntomas comunes del VMCN en las plantas (Naderpour *et al.* 2010).

El objetivo de este estudio fue optimizar y adaptar el protocolo para el marcador molecular ENM del gen *bc-3* a condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Escuela Agrícola Panamericana (EAP) Zamorano, para facilitar la identificación de los alelos de resistencia recesiva al VMCN por medio de selección asistida por marcadores (SAM) y CAPS.

Una vez optimizado el protocolo, se procedió a su validación en una población de 92 plantas F2 de la cruce Amadeus77/Raven, portadora del gen *bc-3* proveniente de Raven, para evaluar la relación de la segregación usando el marcador molecular y la segregación genética mendeliana esperada.

La relevancia del estudio está en la generación de variedades resistentes al VMCN utilizando el marcador molecular del gen resistente *bc-3*, útiles en países del Caribe como Cuba, Haití y República Dominicana, dónde se encuentra presente el VMCN, y para contrarrestar su diseminación futura en la región de Centro América donde por efectos del cambio climático se vienen presentando condiciones que favorecerían su dispersión (Beaver *et al.* 2003; Rosas 2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cuatro genotipos de frijol que poseen el gen recesivo *bc-3*: Widusa, Raven, XRAV40-4 y DPC-40. El gen recesivo *bc-3* puede contener las combinaciones alélicas homocigóticas o heterocigóticas de los alelos *elF4E¹* y *elF4E²*. El gen *bc-3* tiene un peso de 541 pb. La combinación alélica homocigótica resistente al VMCN *elF4E²/elF4E²* presenta bandas de 381 y 160 pb. La combinación alélica homocigoto susceptible *elF4E¹/elF4E¹* presenta bandas de 541 y 160 pb, y el heterocigoto susceptible *elF4E¹/elF4E²* presenta bandas de 541, 381 y 160 pb.

El marcador molecular ENM permitió mediante las técnicas de PCR y electroforesis amplificar el gen *bc-3*, el cual fue posteriormente dividido en sus respectivos alelos *elF4E¹* y *elF4E²*, con la enzima de restricción *RsaI*[®], para identificar los genotipos resistentes al VMCN.

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de la Universidad de Wisconsin-Madison (Skroch *et al.* 1998). El ADN se extrajo de los primeros brotes de plantas con 10 días después de la siembra. Los brotes fueron identificados y recolectados en micro tubos de 1.5 mL.

Cuantificación de ADN. Se cuantificó la concentración de ADN de cada muestra para luego llevarlas a la misma concentración. Se siguió el protocolo sugerido en el Manual del Módulo de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP) Zamorano (Guachambala y Rosas, 2008). Se utilizó un fluorómetro Hoefer TKO-100, $\lambda_{ex} + 365$ nm, $\lambda_{em} + 460$ nm, calibrado con ADN estándar concentrado a 100 ng/mL. Se mezcló 2 mL de buffer de cuantificación (10 μ L de solución para tinción concentrada + 100 mL de buffer TNE 1X; pH= 7.4) con 2 μ L de muestra de ADN, se colocó en una cubeta de cuarzo puro para minimizar el margen de error al momento de la lectura.

Dilución de ADN. Las muestras de ADN se diluyeron a 30 ng/mL empleando buffer TE 0.1X, para que todo el ADN tenga la misma capacidad de amplificarse en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés).

Amplificación del gen *bc-3*. La amplificación se realizó con el método de la PCR. Primero se amplificó la banda de 541 pb que corresponde al gen *bc-3*. Para la reacción se utilizaron los primers o cebadores ENM-R y ENM-F (10 ng/ μ L), buffer 5X Green Go Taq[®], desoxinucleotidos trifosfatos (dNTP's) (4 μ M) sin cloruro de magnesio, cloruro de

magnesio (MgCl₂) (10 mM/μL), enzima Go Taq[®] Flexi DNA polymerase, agua destilada y esterilizada, y ADN de los genotipos seleccionados (30 ng/mL).

La secuencia de los primers que se utilizaron para la amplificación del gen *bc-3* es:

ENM-R: (5'CAACCAACTGGTATCGGA'3)

ENM-F: (5'ACCGATGAGCAAAACCCT'3)

Con base en el protocolo del gen *bc-3* (Naderpour *et al.* 2010) y el gen *I* (Erazo Villegas 2001) (Cuadro 1 y 2) se generaron ocho protocolos iniciales, que son el resultado de la interacción y modificación de las cantidades de reactivos y del perfil térmico.

Cuadro 1. Reactivos para mezcla maestra de PCR de los protocolos originales.

Reactivos	Protocolo gen <i>bc-3</i>	Protocolo gen <i>I</i>
	Cantidad (μL)	Cantidad (μL)
ddH ₂ O	12.0	12.0
Buffer	3.0	3.0
MgCl ₂	1.5	1.5
dNTP's	2.0	2.0
Primer ENM-F	2.5	2.5
Primer ENM-R	2.5	2.5
GoTaq [®]	1.0	0.5
ADN	0.5	1.0
Total	25.0	25.0

Fuente: Naderpour *et al.* (2010) y Erazo Villegas (2001).

Cuadro 2. Perfil térmico de PCR de los protocolos originales.

Fases	Amplificación gen <i>bc-3</i>		Amplificación gen <i>I</i>	
	Temp. °C	Tiempo	Temp. °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	3 min	94	10 s
Desnaturalización	94	20 s	94	10 s
Acoplamiento	69	20 s	67	40 s
Extensión	72	2 min	72	2 min
Extensión final	72	5 min	72	5 min
Ciclos:	40		34	

Fuente: Naderpour *et al.* (2010) y Erazo Villegas (2001)

Amplificación de los alelos *elF4E*. Luego de la amplificación del gen *bc-3* se procedió a dividirlo en los alelos *elF4E*¹ y *elF4E*², mezclando el producto de la PCR con la enzima de restricción *RsaI*[®] (Promega[®]). Se elaboraron cuatro mezclas de prueba variando la

cantidad de producto de la PCR, con base en las recomendaciones de la casa comercial Promega® (Cuadro 3). La mezcla del producto de la PCR con la enzima *Rsal*® fue incubada a 37 °C en el termociclador durante 4 horas. Luego se procedió a correr la electroforesis, teñir el gel y visualizarla como indica el procedimiento de amplificación y visualización.

Cuadro 3. Protocolos de prueba para amplificación de alelos *elF4E*.

Reactivos	A μ L	B μ L	C μ L	D μ L
Agua	13.3	11.3	9.3	7.3
Buffer 10X	2.0	2.0	2.0	2.0
BSA	0.2	0.2	0.2	0.2
Enzima (10 μ / μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5
Producto PCR	4.0	6.0	8.0	10.0
Total	20.0	20.0	20.0	20.0

Visualización del ADN. La visualización se realizó a través de la técnica de electroforesis. Los productos de la PCR fueron observados en tanques de electroforesis usando geles de agarosa a 1.2% en solución tampón TE 0.5X (Tris-HCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA). Las bandas fueron separadas a 110 Voltios durante 1 h 15 min, teñidas en una solución 1:10 de bromuro de etidio, y agua destilada durante 15 min para lavar excesos de bromuro de etidio. Luego se visualizaron las bandas de ADN en el transluminador Bench top, UVP y se fotografiaron bajo luz ultravioleta. Se utilizó una escalera molecular de ADN de 100 pb, para verificar la presencia o ausencia de bandas.

Análisis estadístico. Se utilizó la prueba de ajuste de χ^2 (Chi-cuadrado) para determinar la concordancia entre los valores esperados y los observados de la población F2, con una probabilidad ≤ 0.05 .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del protocolo del gen *bc3*. Variando la cantidad de reactivos de los protocolos originales para mezcla de PCR se generaron ocho protocolos de prueba. Se utilizó ADN de los genotipos Widusa, Raven, XRAV40-4 y DPC-40. Los protocolos A-D fueron sometidos al perfil térmico del gen *bc-3* y los protocolos E-F al perfil térmico del gen *I*. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Pruebas de mezcla maestra para PCR para el gen *bc-3*

Reactivos PCR	Protocolos (μL)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
ddH ₂ O	12.0	12.2	12.0	12.2	12.0	11.0	8.0	6.3
Buffer	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.4	1.5	1.5
MgCl ₂	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.0	1.2
dNTP's	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.2	1.5
Primer ENM-F	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.5	1.0
Primer ENM-R	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.5	1.0
GoTaq®	1.0	0.8	0.5	0.3	1.0	0.7	0.3	0.5
ADN	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	1.5	2.0	2.0
Total	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	15.0	15.0

El protocolo A fue el único que presentó la amplificación de la banda de 541 pb del gen *bc-3* (Figura 1).

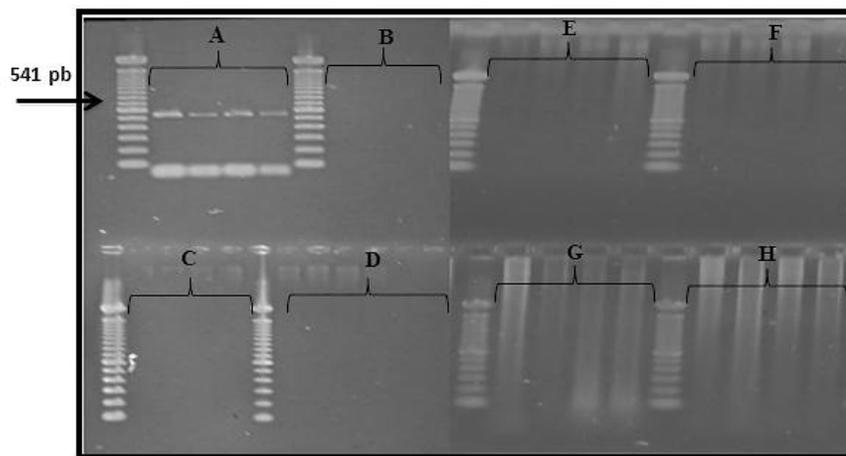


Figura 1. Amplificación del gen *bc-3* con los protocolos A-H.

Seguidamente, se utilizó el protocolo A con los genotipos de la primera prueba, pero con este protocolo A no se logró amplificar el gen *bc-3* en la segunda prueba. En una tercera prueba, se procedió a modificar el perfil térmico del protocolo A para el marcador ENM del gen *bc3*, utilizando diferentes temperaturas de la etapa de acoplamiento, ya que en esta etapa se identifica la secuencia a copiar y se adhieren los primers al ADN (Cuadro 5). Se utilizaron cinco repeticiones de esta prueba. Las mejores bandas del gen *bc-3* fueron amplificadas a temperaturas de acoplamiento que oscilan entre 59.6 a 62.7 °C (T1 a T5) (Figura 2).

Cuadro 5. Gradiente de temperatura de acoplamiento para el protocolo A.

Tratamiento	Temperatura °C
1	59.6
2	60.2
3	61.0
4	61.9
5	62.7
6	63.6
7	64.2
8	65.2
9	66.2
10	67.0
11	67.8
12	68.2

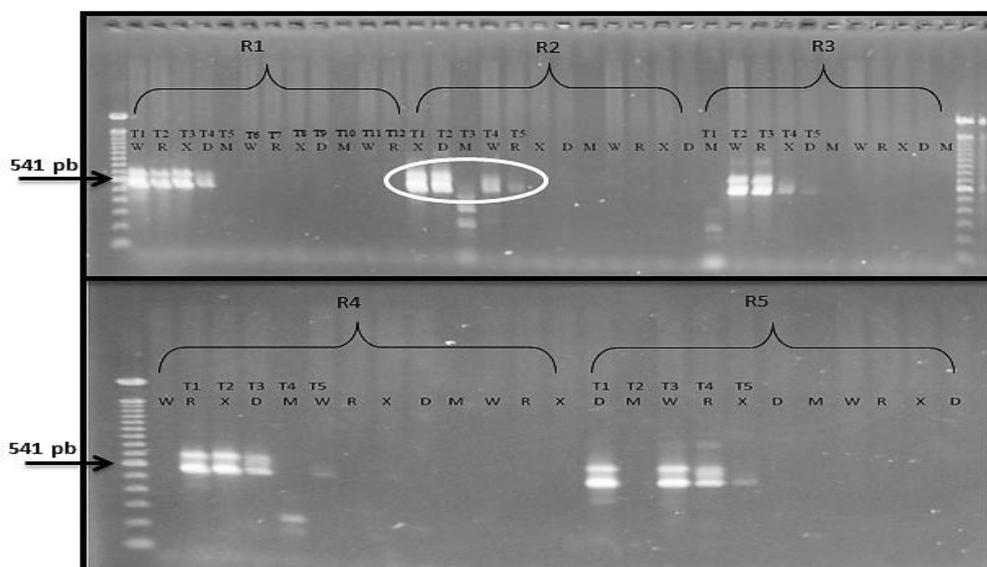


Figura 2. Amplificación del gen *bc-3* a diferentes temperaturas de acoplamiento.
 ¥ W= Widusa R= Raven D= DPC-40 X= XRAV40-4 M= Mezcla maestra sin ADN.

En una cuarta prueba, se decidió identificar la mejor temperatura de acoplamiento entre el rango de 59.6 a 62.7 °C, para garantizar la amplificación de una banda de 541 pb definida y fuerte. También se modificó la cantidad de reactivos, aumentando la cantidad de ADN en la mezcla maestra de PCR. La temperatura de acoplamiento que amplificó la banda más definida y fuerte fue la de 61.6 °C (Figura 3).

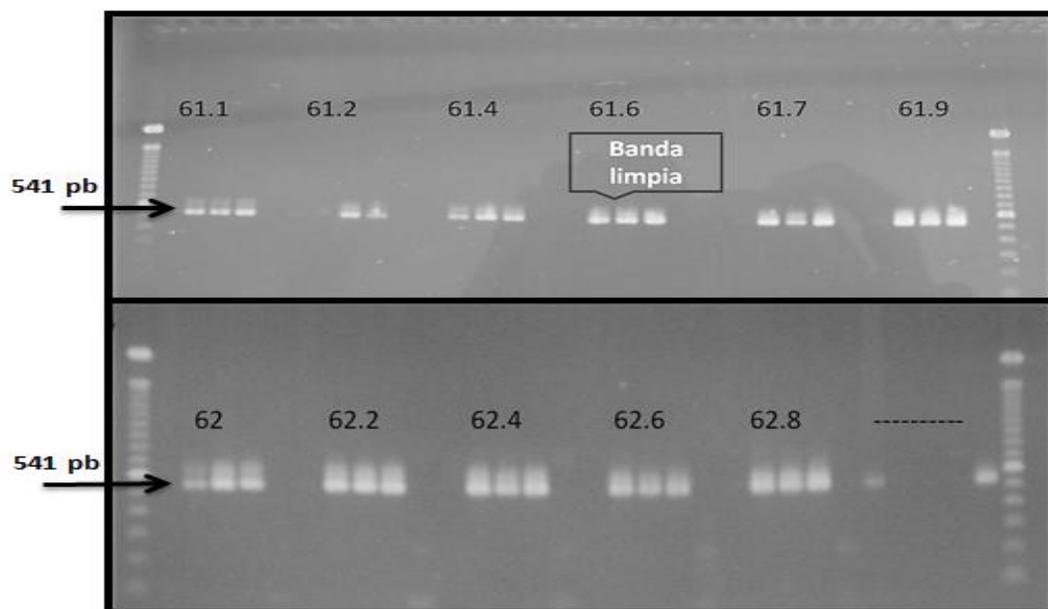


Figura 3. Amplificación del gen *bc-3* usando gradientes de 61.1 a 62.8 °C de temperatura de acoplamiento.

Con los resultados de las pruebas anteriores, se definió el nuevo perfil térmico para el marcador ENM (Cuadro 6) y la cantidad óptima de reactivos para la mezcla maestra de PCR (Cuadro 7), los cuales permiten amplificar adecuadamente el gen *bc-3* con bandas bien definidas de 541 pb. Con este protocolo optimizado, se validó la presencia del gen *bc-3* en los genotipos Widusa, Raven, XRAV40-4 y DPC-40, obteniéndose las bandas de 541 pb en los cuatro genotipos de manera nítida, indicando que el protocolo estaba funcionando adecuadamente en las condiciones del laboratorio (Figura 4).

Cuadro 6. Perfil térmico para PCR optimizado para la amplificación del gen *bc-3*.

Fases	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95.0	3 min
Desnaturalización	94.0	20 s
Acoplamiento	61.6	25 s
Extensión	72.0	40 s
Extensión final	72.0	5 min
Ciclos: 40		

Cuadro 7. Protocolo de mezcla maestra para PCR optimizado para amplificación del gen *bc-3*.

Reactivos	Cantidad μL	CF ^Ω
ddH ₂ O	12.1	
Buffer	3.0	1.0 mM
MgCl ₂	1.5	1.5 mM
dNTP's	2.0	0.32 mM
Primer F (ENM-F)	2.5	1.0 uM
Primer R (ENM-R)	2.5	1.0 uM
GoTaq [®]	0.4	0.2 U
ADN	1.0	0.6 ng
Total	25.0	

^ΩCF: Concentración Final.

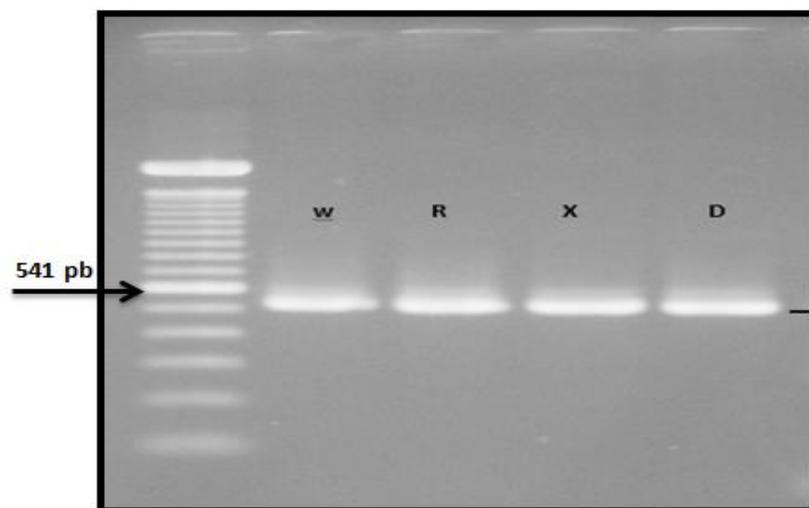


Figura 4. Amplificación del gen *bc-3* con el protocolo optimizado del marcador ENM del gen *bc3*. W= Widusa, R= Raven, X= XRAV40-4 y D= DPC 40.

Amplificación de los alelos *elF4E* del gen *bc3*. Una vez optimizado el perfil térmico y la mezcla maestra de la PCR para la amplificación del gen *bc-3*, se procedió a realizar las pruebas con la enzima de restricción *Rsal*[®] para identificar la presencia de los alelos *elF4E*¹ y *elF4E*², y las combinaciones heterocigóticas de genotipos susceptibles y resistentes al VMCN. Se utilizaron los mismos genotipos de frijol usados para amplificar el gen *bc-3* para encontrar los alelos relacionados a la resistencia al VMCN, es decir los alelos *elF4E*² ubicados a 381 y 160 pb.

Se observó que los protocolos con 8 y 10 μL de producto de la PCR permiten que la enzima divida mejor las bandas correspondientes a los alelos *elF4E*¹ y *elF4E*², pero aún fue necesario mejorar la claridad de las mismas (Figura 5).

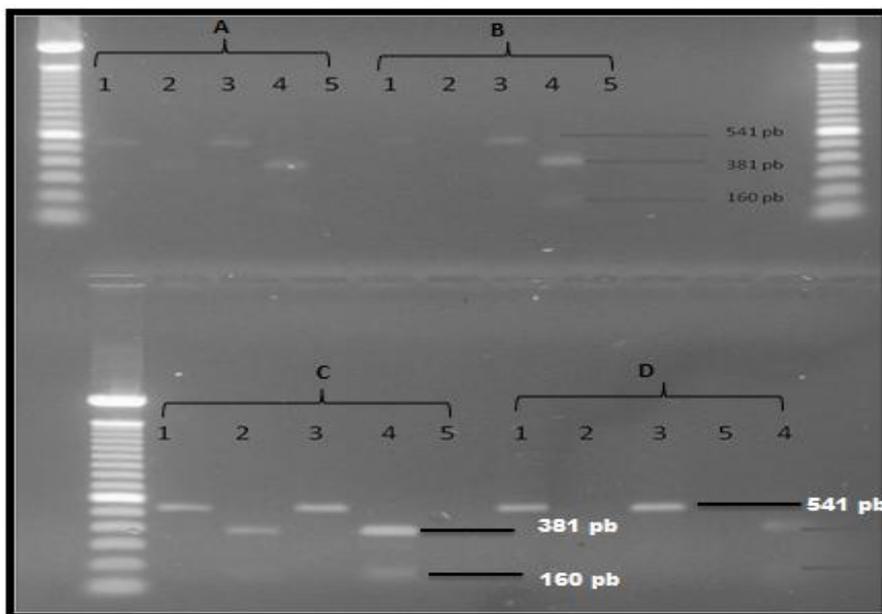


Figura 5. Protocolos con la enzima de restricción *RsaI*[®] para los alelos *eIF4E*.
 A= 4 µL B= 6 µL C= 8 µL D= 10 µL. 1: Widusa, 2: Raven, 3: XRAV 40-4, 4: DPC 40 y
 5: Mezcla Maestra.

Para corregir el resultado anterior, se procedió a utilizar Loading dye[®] buffer 6x mezclando 2 µL con el producto de la PCR al momento de colocar las muestras en el gel para electroforesis, por recomendación de la casa comercial Promega. El buffer 6X tiñe y añade peso al producto para un mejor corrido de electroforesis y para dar mayor nitidez a las bandas. Empleando 10 µL de producto de la PCR en mezcla con la enzima *RsaI*[®] y utilizando el Loadig dye[®] buffer 6X se mejoró la intensidad, nitidez y división de las bandas (Figura 6).

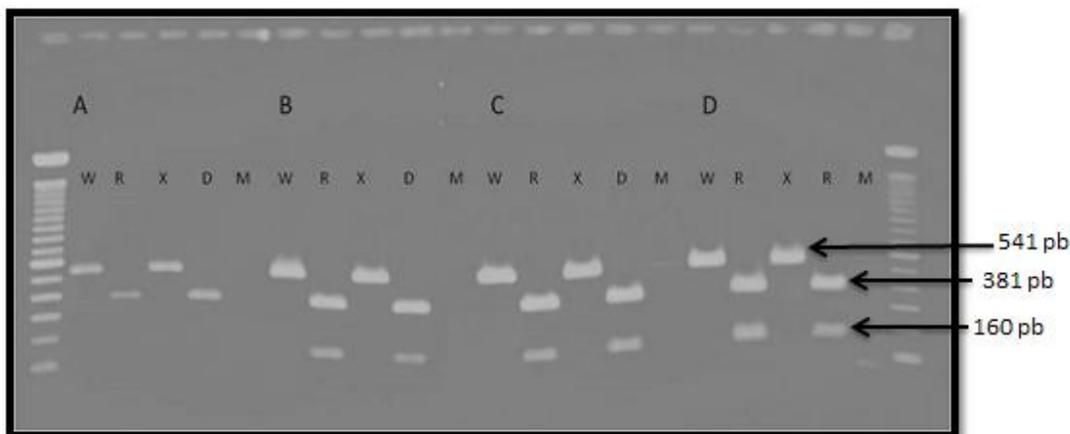


Figura 6. Evaluación de protocolos con la enzima de restricción *RsaI* adicionando 3 µL Loadin dye[®] (buffer 6X) al producto de la PCR. A= 4 µL B= 6 µL C= 8 µL y D= 10 µL.

Con los resultados anteriores, la segunda fase del protocolo ENM quedó optimizada (Cuadro 8).

Cuadro 8. Protocolo de mezcla maestra para enzima *Rsal*[®] optimizado, para amplificación de los alelos *elF4E*.

Reactivos	μL
Agua	7.3
Buffer 10X	2.0
BSA	0.2
Enzima (10 μ/μL)	0.5
Producto PCR	10.0
Total	20.0

Validación del protocolo. La validación del protocolo se realizó utilizando una población F2 (MER 2222) proveniente de la cruce de Amadeus 77/Raven, segregando por los alelos del gen *bc3*, *elF4E*¹ y *elF4E*².

De acuerdo a la presencia de los alelos homocigotos *elF4E*²/*elF4E*² las plantas F2 resistentes al VMCN fueron las identificadas como: 7, 8, 14, 15, 20, 21, 30, 44, 50, 55, 60, 61, 63, 73, 80, 87, 93 y 95 (presencia de bandas con 381 pb y 160 pb).

De acuerdo a los resultados de las PCR para el gen *bc-3* y sus alelos *elF4*¹ y *elF4*², la proporción resultante fue de 74 susceptibles y 18 resistentes; aproximadamente una relación genética mendeliana de 3:1, la cual fue posteriormente confirmada con la prueba de ajuste del *Chi* Cuadrado según se indica a continuación.

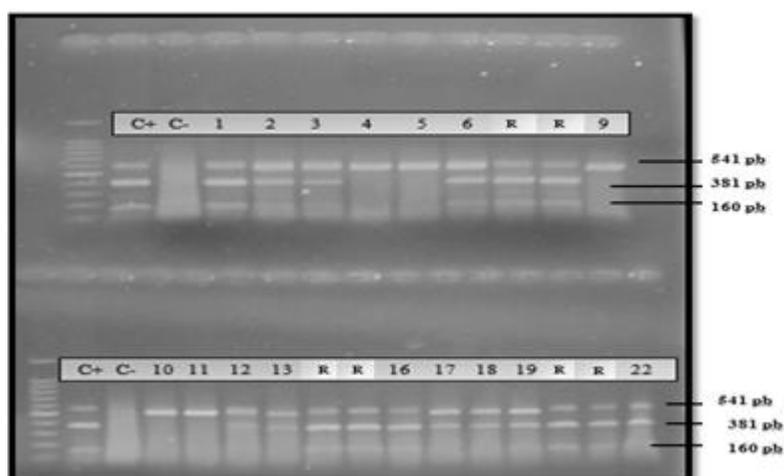


Figura 7. Presencia de alelos *elF4E* en plantas F2 1 a 22.

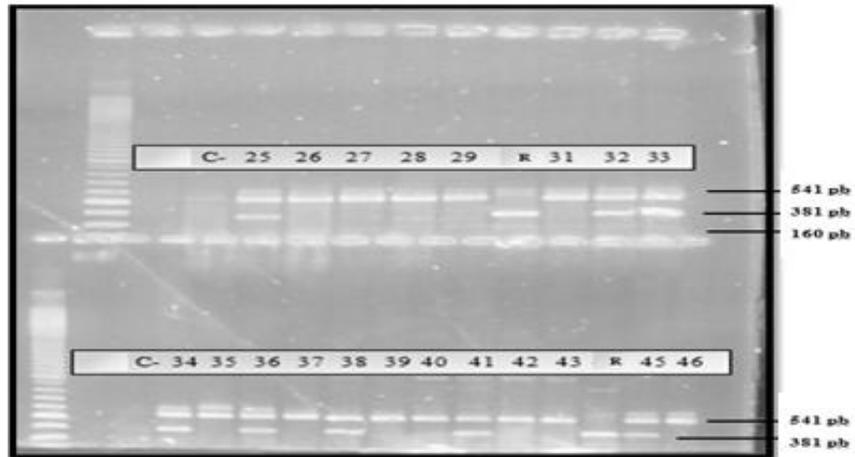


Figura 8. Presencia de alelos *eIF4E* en plantas F2 25 a 46.

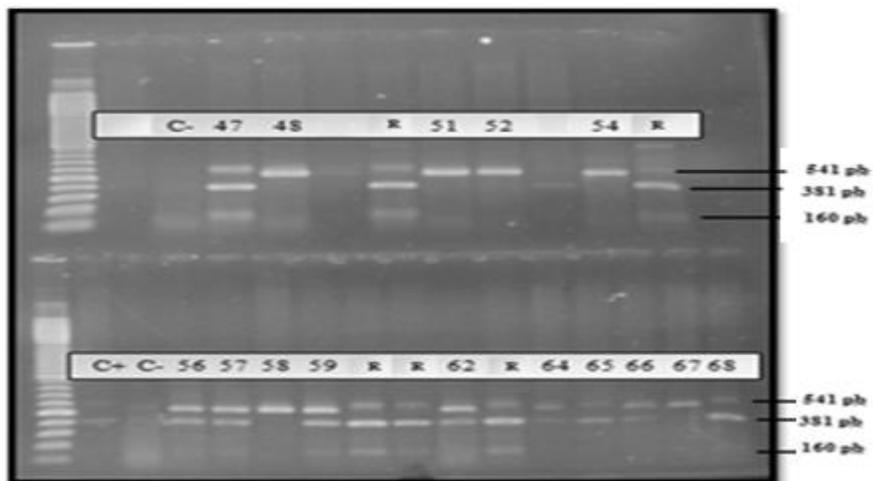


Figura 9. Presencia de alelos *eIF4E* en plantas F2 47 a 68.

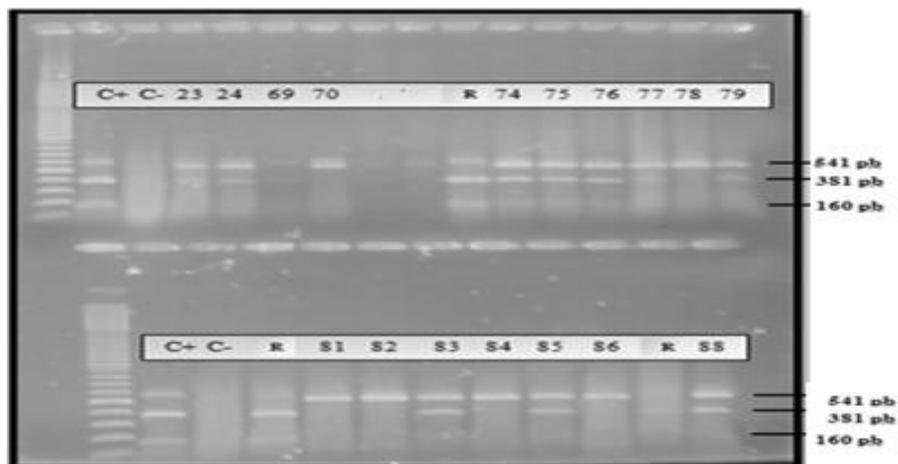


Figura 10. Presencia de alelos *eIF4E* en plantas F2 23, 24, y 69 a 88

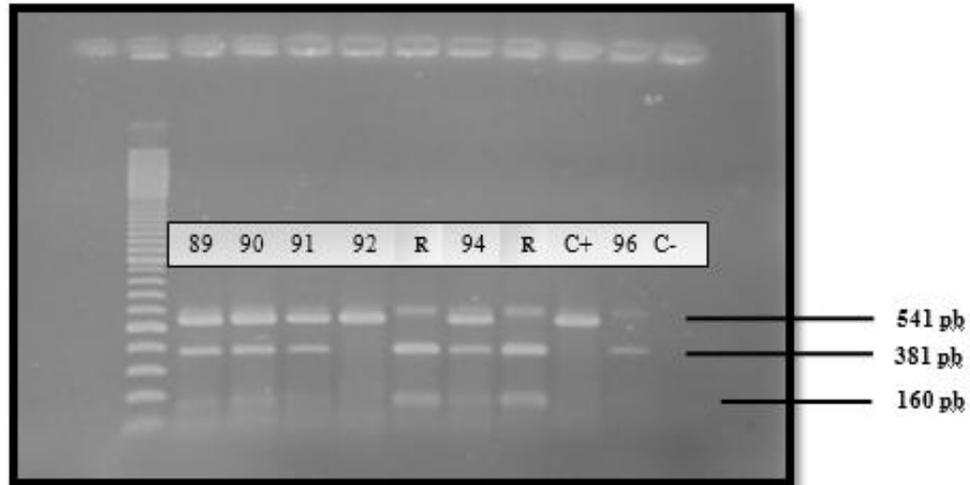


Figura 11. Presencia de alelos *eIF4E* en plantas F2, 89 a 96.

Análisis estadístico. Los valores observados fueron determinados por medio del experimento; mientras que, los esperados son de acuerdo a la segregación genética mendeliana de dominancia completa, que implica una relación de 3:1 (susceptibles: resistentes).

Para este estudio se utilizó una población F2 conformada por 92 plantas individuales provenientes de la cruce de los genotipos de frijol Amadeus 77 (susceptible) × Raven (resistente) al VMCN. El margen de error propuesto fue de $p > 0.05$. Los valores resultantes son $\chi^2 = 1.61$ con grados de libertad=1 y un valor de probabilidad $P = 0.20$ ($> p = 0.05$). Por lo tanto se acepta la *H₀* de segregación 3:1 (susceptible: resistente), debido a que los datos valores observados se ajustan estadísticamente a los esperados.

Cuadro 9. Análisis estadístico de *Chi* cuadrado para la población F2 (Amadeus 77 × Raven).

Genotipo	Observado	Esperado	O-E	$(O-E)-(0.5)/E$
Susceptibles	74	69	5	0.29
Resistentes	18	23	-5	1.32
Total	92	92	0	$\chi^2 = 1.61$
Significancia($p=0.95$)				

4. CONCLUSIONES

- Se optimizó el protocolo del marcador CAPS ENM del gen *bc-3*, ajustando las cantidades de la Taq polimerasa (Go taq[®]), ddH₂O y concentración de ADN, con un perfil térmico de 61.6 °C para la temperatura de acoplamiento y de 40 ciclos de la PCR.
- Se obtuvo la identificación de los alelos *elF4E¹* y *elF4E²* del gen *bc3* involucrados en la resistencia del frijol al virus del mosaico común necrótico (VMCN) utilizando la enzima de restricción *RsaI*[®], ajustando las cantidades de producto de la PCR en 10 µL, e incluyendo 3 µL Loading dye[®] lo cual favoreció al corrido electroforético y la claridad de las bandas.
- Se validó el protocolo para el marcador molecular CAPS ENM, utilizando 92 plantas individuales de la población F2 de la cruce Amadeus 77/Raven, encontrándose la relación esperada de 3:1 (susceptible: resistente), según la presencia de los alelos *elF4E¹* y *elF4E²* en sus combinaciones *elF4E¹/elF4E¹* y *elF4E¹/elF4E²* (susceptibles) y *elF4E²/elF4E²* (resistente).

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar el protocolo del marcador CAPS ENM para la selección asistida con marcadores de líneas de frijol portadoras del gen *bc-3* y con la forma alélica *elF4E²/elF4E²* resistentes al VMCN del frijol, en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.
- Enviar las semillas de las familias F3 resistentes de este estudio para la evaluación fenotípica en campo en un país que tenga presente el VMCN frijol (Haití o República Dominicana), o para su evaluación con el virus en invernadero (Puerto Rico).
- Investigar sobre la segregación alélica del gen *bc-3* y sus alelos *elF4E* en otras poblaciones segregantes y líneas avanzadas disponibles en Zamorano, derivadas de cruces con padres resistentes, con fines de selección por resistencia al VMCN del frijol.

6. LITERATURA CITADA

Beaver J.S., J.C. Rosas, J. Myers, J. Acosta, J.D. Kelly, S. Nshimbe-Msolla, R. Misangu, J. Bokosi, S. temple, E. Arnaud-Santana y D.P. Coyne. 2003. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. *Field Crops Research* 82:87-102.

CIAT. 1985. Frijol: investigación y producción: referencia de los cursos de capacitación sobre frijol dictados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical. Eds. M. Lopez, F. Fernández y A. V. Schoonhoven. Cali. Colombia, 417 P.

Drijfhout, E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. (Doctoral thesis, Wageningen) (en línea). Consultado 20 de agosto de 2013. Disponible en: <http://edepot.wur.nl/202002>

Erazo Villegas, E.V. 2001. Uso de marcadores moleculares SCAR para la selección por resistencia múltiple a enfermedades virales en frijol común. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 53 p.

FAO 2007. Manual: Buenas prácticas agrícolas en frijol voluble. Eds. Arias Restrepo, J.H., T. Rengifo y M. Jaramillo Cardona. Medellín, Colombia. CTP Print Ltda. 166 p.

Guachambala Canto, M. y J. C. Rosas Sotomayor. 2008. Manual del Módulo de Diagnóstico Molecular. Laboratorio de Biotecnología del PIF. Zamorano, Honduras. Zamorano Academic Press. 50p.

Narderpour, M., O., Sogaard Lund, R., Larsen and E., Johansen. 2010. Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated *elF4E* allele. *Molecular Plant Pathology* 11(2):255-263.

Mc Kern, N. M., G.I., Mink, O.W., Barnett, A., Mishra, L.A., Whittaker, M.J., Silbernagel, C.W., Ward and D.D. Shukla. 1992. Isolates of Bean Common Mosaic Virus Comprising Two Distinct Potyviruses. (en línea). Consultado 21 de agosto de 2013. Disponible en: <http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n09923.pdf>

Pierce, W.H. 1934. Viruses of the bean. *Phytopathology* 24: 87-115.

Rosas, J.C. 2011. Contribuciones del Programa de Investigaciones en Frijol en Centro América y El Caribe. Ceiba 52(1):65-73.

Skroch, P.W., J., Nienhuis, S., Beebe, J., Tohne, F., Pedraza. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. Crop Sci. 38 (2): 488-496.

Vetten H.J., D.E., Lesemann and E., Maiss. 1992. Serotype A and B strains of bean common mosaic virus are two distinct potyviruses. (en línea). Consultado 22 de agosto del 2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1280510/>

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN para el análisis de RAPD (Método de la Universidad de Wisconsin, UW – Madison)

1. Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes).
2. Agregar 50 μL del *buffer* de extracción (PEX) en un tubo para micro centrífuga *ependorf* de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (*pestle*) de *plexiglass* de laboratorio. Agregar 450 μL adicionales de *buffer* PEX y agitar el tubo en el vortex.
3. Lo más pronto posible (antes de 1 hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 min.
4. Centrifugar la muestra durante 10 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una micro centrífuga, para concentrar los residuos de tejido (*pellet*).
5. Transferir el sobrenadante a un tubo *ependorf* de 1.5 mL limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
6. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una micro centrífuga.
7. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300 μL de RNAasa A (concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + *buffer* TE^a 0.1X (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.
8. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por 1 min (3 min si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de micro centrífuga de 1.5 mL.
10. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol: acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.

11. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletearlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
12. Vaciar el etanol/acetato de sodio^b y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
13. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.
14. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).
15. Rehidratar los pellets agregando 100-200 μ L de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos en baño maría a 65 °C durante 15 minutos.
16. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN (ng/ml), con el fin de preparar las diluciones necesarias para efectuar las reacciones para su amplificación.

^a Buffer TE (TRIS HCl 1 M, pH=7.5 ; EDTA 0.5 M, pH=8.0)

^b Usar acetato de sodio 3H₂O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

Anexo 2: Cuantificación de ADN- Instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc.

1. Colocar 2 mL de *buffer* de cuantificación en un recipiente cúbico (*cuvette*) limpio y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 μ L de muestra de ADN al buffer cuantificador.
3. Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.
4. Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/ml.
5. Vaciar el cubo, enjuagarlo con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

* Fluorómetro: (Hoefer) TKO-100, λ_{ex} + 365 nm, λ_{em} + 460 nm

* Buffer de cuantificación:

10 μ L solución para tinción concentrada + 100 mL buffer TNE 1X (pH=7.4)

Anexo 3: Dilución de ADN (20 ng/mL) por el método de la UW

1. Agregar 100 μL de *buffer* TE 0.1 X + Tartrazine en tubos eppendorf de 1.5 mL.
2. Agregar el volumen inicial de la muestra de ADN extraído de tejido, estimado mediante la fórmula $V_i = C_f * V_f / C_i$
3. Diluir las muestras en platos de 96 celdas con fondo redondeado (Microplate TM96, Polypropylene, MJ Research, INC.). Cubrir las celdas del plato con tapa selladora, y almacenarlo en el congelador (o refrigerador si se va a usar en los siguientes días). Guardar el resto de ADN en el congelador.

Anexo 4: Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores tipo SCAR

1. Descongelar el ADN a temperatura ambiente del plato con las muestras diluidas de ADN (30 ng/ μL) guardados en el refrigerador.
2. Preparar la mezcla maestra de acuerdo a los volúmenes de agua, *buffer* 10X, cebador (*primer*), dNTPs y *Taq* polimerasa especificados el protocolo.
3. Colocar 24 μL de la mezcla maestra por cada celda en platos con fondo V. Agregar 1 μL de ADN de cada muestra, aunque esto depende de los protocolos.
4. Colocar el plato en el termociclador y sellarlo con papel plástico para platos de 96 celdas (Microseal TM "A" Film) antes de cerrar la tapa.
5. Realizar la amplificación usando el perfil térmico para ENM (Perfil térmico para resistencia al virus de mosaico necrótico)
6. Una vez finalizadas las reacciones PCR, guardar los platos con las muestras en el refrigerador hasta proceder a la electroforesis.