

**Evaluación del gen *circumlineatus* en la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con marcadores moleculares microsatélites**

**Laura Melissa Lara Santisteban**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2012

ZAMORANO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Evaluación del gen *circumlineatus* en la  
semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)  
con marcadores moleculares microsatélites**

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

Presentado por:

**Laura Melissa Lara Santisteban**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2012

# **Evaluación del gen *circumlineatus* en la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con marcadores moleculares microsatélites**

Presentado por:

Laura Melissa Lara Santisteban

Aprobado:

---

Juan Carlos Rosas, Ph.D  
Asesor principal

---

Abel Gernat, Ph.D  
Director  
Departamento de Ciencia y Producción  
Agropecuaria

---

Timothy Porch, Ph.D  
Asesor

---

Raúl Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

---

Estela Aguilar, M.Sc.  
Asesora

## RESUMEN

Lara Santisteban, L.M. 2012. Evaluación del gen *circumlineatus* en la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con marcadores moleculares microsátélites. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 17p.

La característica expresada por el gen *circumlineatus* se reconoce por presentar una línea precipitada en el borde de las pigmentaciones oscuras de la testa en la semilla del frijol blanco con áreas coloreadas, se expresa en su forma homocigota recesiva y se encuentra únicamente en semillas de patrón restringido. Se intentó identificar un marcador molecular para localizar el gen *circumlineatus* mediante la optimización del perfil térmico y del protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 57 microsátélites. Adicionalmente, se realizó la evaluación de la expresión fenotípica del gen *circumlineatus* en la testa de la semilla de familias avanzadas de frijol. La búsqueda del marcador molecular del mencionado gen se realizó para su incorporación en el mapa genético del frijol. La investigación se llevo a cabo en la estación de USDA-Servicio de investigación agrícola en Mayagüez, Puerto Rico. Para el análisis genotípico se emplearon 12 plantas de genotipos contrastantes, homocigota dominante (*Cl/Cl*) y homocigota recesivo (*cl/cl*); siendo analizados usando PCR con 57 microsátélites. Para el análisis fenotípico se evaluó en estereoscopio la presencia o ausencia de característica evaluada en la testa de la semilla de frijol. De los 57 microsátélites evaluados, sólo el marcador BM150 presentó el patrón de bandas esperado ( $p=0.60$ ); sin embargo, este marcador no fue suficientemente consistente como para ser considerado marcador molecular del gen. Debido a que ninguno de los microsátélites evaluados brindó los resultados esperados, se recomienda continuar la investigación con otro tipo de marcadores como los SNP (Polimorfismo de un nucleótido).

**Palabras clave:** PCR, pigmentación, SSR, testa.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>14</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>15</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>16</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>17</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Número de plantas emergidas por cada línea de la generación F5, provenientes de la cruce $t z cl G b v$ virgarcus BC3 5-593 x $t z^{sel} Cl G b v$ sellatus BC3 5.593, Mayagüez, Puerto Rico. ....	3
2. Genotipos esperados de las 12 plantas de la generación F5, usadas en la extracción de ADN.....	4
3. Concentración de ADN en las 12 plantas de la F5 usadas para el análisis molecular. ....	5
4. Protocolo estándar de los reactivos para la PCR con microsatélites.....	5
5. Perfil térmico de la PCR para el análisis con microsatélites incluyendo la temperatura, el tiempo y el número de ciclos de la PCR.....	6
6. Listado de microsatélites (SSR) con la temperatura de acople recomendada y la optimizada en TARS, Mayagüez, Puerto Rico.....	8
7. Bandas electroforéticas (tamaño expresado en pares de bases, pb) obtenidas y esperadas de cada microsatélite evaluado. ....	10
8. Resumen del análisis de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) para los resultados del análisis de PCR con marcadores SSR.....	11
9. Evaluación fenotípica de semillas de plantas de frijol de la generación F5, segregantes para el gen <i>circumlineatus</i> . El valor esperado se obtuvo de las evaluaciones realizadas en la generación F4. ....	13
Figuras	Página
1. Bandas electroforéticas del producto de la PCR de los marcadores microsatélites BM 171 y BM 173, para los 12 genotipos evaluados.....	9
2. Fenotipos del gen <i>circumlineatus</i> con la línea precipitada indicada por la felcha en líneas representativas de la población $t z cl G b v$ virgarcus BC3 5-593 X $t z^{sel} Cl b v$ sellatus BC3 5-593 (Aranda <i>et al.</i> 2006). Genotipo homocigota dominante $Cl/Cl$ (izq.) y homocigota recesivo $cl/cl$ (der.).....	12
Anexos	Página
1. En la sección A se observa el patrón llamado Virgarcus ( $t z Bip$ ). En la sección B se observa el patrón Sellatus ( $t z^{sel} Bip$ ). Bassett y McClean (2000).....	17
2. Segmento B7 del mapa genético del frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ), donde se muestra interacción de genes (Blair <i>et al.</i> 2003) .....	17

## 1. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es la especie de las leguminosas de grano más importante para el consumo humano, debido a su alto contenido de proteínas, carbohidratos, minerales y fibra. América Latina, la zona de mayor producción y consumo, produce más del 45% de la producción mundial (FENALCE 2010). Dada la importancia económica del frijol, se ha incrementado el interés en su estudio con el fin de aumentar la resistencia a factores bióticos y abióticos que limitan la productividad del cultivo, y mejorar el contenido nutricional del grano.

Para poder estudiar la genética del frijol, es importante contar con un mapa genético, con el mayor número de genes localizados, mediante el cual se infieren interacciones entre genes y se determinan *loci* específicos de características a mejorar en el genoma del frijol. La presente investigación da continuidad a una serie de estudios realizados en USDA-ARS (Servicio para la investigación agrícola) en Mayagüez, Puerto Rico, con la finalidad de completar el mapa genético del frijol, estudiando específicamente el gen recesivo *circumlineatus* (*cl*). La construcción de mapas genéticos es uno de los objetivos principales para el estudio de la organización, distribución y conocimiento del genoma de una población (Vienne 2003).

El gen *circumlineatus* se caracteriza por presentar una línea precipitada en el borde de las pigmentaciones oscuras de la testa en la semilla del frijol blanco con áreas coloreadas. Este gen se expresa cuando se encuentra de manera recesiva y es expresado únicamente en la testa de las semillas que son parcialmente coloreadas, con patrones restringidos (Aranda *et al.* 2006). Las semillas parcialmente coloreadas, son controladas por el genotipo *t/t*, siendo éste el genotipo recesivo para el gen *T* de semilla totalmente coloreada (Bassett y McClean 2000). Entre el *loci T* y el *Cl* hay una distancia aproximada de 36cM (Prakken 1972), y acorde al estudio de McClean *et al.* (2002) el gen *T* está localizado en el grupo de ligamiento Pv9, localización que se busca comprobar con el presente estudio mediante microsatélites (también llamados SSR-Secuencias de Simple Repetición). Los microsatélites son segmentos cortos de ADN (2 a 6 pares de bases) que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma (Aranguren-Méndez *et al.* 2005). Se emplean SSR debido a su elevado nivel de polimorfismo y co-dominancia, por lo que generan diferencias entre los organismos que presentan el gen y aquellos que no.

Los microsatélites han sido usados para estudios de mapeo en maíz, arroz, cebada y soya (Vienne 2003). Adicionalmente al análisis molecular, se caracterizará fenotípicamente la población F5 segregante para el gen *circumlineatus*, con el fin de verificar la proporción del genotipo esperado con base en el fenotipo y dar continuidad a la caracterización que se ha realizado en todas las generaciones del estudio.

El objetivo del presente estudio fue optimizar el protocolo de PCR y la temperatura de acople de 57 microsatélites para identificar un marcador molecular que permita mapear el *locus* del gen *circumlineatus* en el mapa genético del frijol común y realizar la caracterización fenotípica de este gen en semillas de frijol.

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

La población estudiada pertenece a la generación F5 de la cruce entre *t z cl G b v virgarcus* BC<sub>3</sub> 5-593 x *t z<sup>sel</sup> Cl G b v sellatus* BC<sub>3</sub> 5-593, desarrollada en USDA-ARS-TARS (Estación de Investigación de Agricultura Tropical), Mayagüez, Puerto Rico y en la Universidad de Florida, Gainesville. La población es segregante para el gen *Circumlineatus* (*cl*) y la selección se inició en la F2 para una testa parcialmente colorada con un patrón virgarcus (*z/z*), sin el borde *circumlineado*. En la generación F3, la población segregó para el gen *cl* pero fue cruce verdadera para virgarcus. En las generaciones F3 y F4 se realizaron caracterizaciones fenotípicas de las semillas obtenidas (Aranda *et al.* 2006). Adicionalmente, en la generación F3, la población fue evaluada con marcadores de tipo AFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados), sin encontrarse la localización de los marcadores polimórficos en el genoma (Aranda *et al.* 2006).

El 20 de enero del 2012, se sembró bajo invernadero la generación F5 en 79 maceteros, con cinco semillas cada uno, en Mayagüez, Puerto Rico. Luego de la emergencia de las plantas, se ralearon, dejando una planta por macetero. En los 79 maceteros estuvieron representadas 13 líneas, con diferente número de plantas por línea, debido a las diferencias en la germinación de cada una. En el cuadro 1 se presentan las líneas que se sembraron y la cantidad de plantas que emergieron de cada una.

Cuadro 1. Número de plantas emergidas por línea de la generación F5, provenientes de la cruce *t z cl G b v virgarcus* BC<sub>3</sub> 5-593 x *t z<sup>sel</sup> Cl G b v sellatus* BC<sub>3</sub> 5-593 en Mayagüez, Puerto Rico.

Línea	Genotipo esperado	Número de plantas
04IS-6248	<i>cl/cl</i>	7
04IS-6249	<i>Cl/cl</i>	10
04IS-6250	<i>cl/cl</i>	8
04IS-6251	<i>Cl/Cl</i>	7
04IS-6252	<i>cl/cl</i>	7
04IS-6253	<i>Cl/Cl</i>	5
04IS-6254	<i>Cl/cl</i>	2
04IS-6255	<i>Cl/cl</i>	3
04IS-6256	<i>Cl/cl</i>	13
04IS-6325	<i>Cl/Cl</i>	4
04IS-6326	<i>Cl/cl</i>	2
04IS-6327	<i>Cl/cl</i>	4
04IS-6328	<i>cl/cl</i>	3

**Extracción y estandarización de ADN.** Cuando las plantas de frijol se encontraban en la etapa de la segunda hoja trifoliada, se agruparon de acuerdo a la línea proveniente y se muestrearon 12 de las plantas emergidas de la generación F5 para la extracción de ADN (Cuadro 1). Cada muestra de ADN fue estudiada de manera individual. En este grupo de 12 plantas se presentan seis plantas homocigotas dominantes ( $Cl/Cl$ ) y seis plantas homocigotas recesivas ( $cl/cl$ ). Estas 12 plantas además se pueden clasificar en siete líneas diferentes, tres son homocigotas dominantes ( $Cl/Cl$ ) y cuatro son homocigotas recesivos ( $cl/cl$ ). En el cuadro 2 se presenta la lista de plantas usadas para la extracción de ADN y su respectivo genotipo esperado.

Cuadro 2. Genotipos esperados de las 12 plantas de la generación F5, usadas en la extracción de ADN.

<b>Número de planta</b>	<b>Genotipo esperado</b>
04IS-6248-6	$cl/cl$
04IS-6248-9	$cl/cl$
04IS-6250-10	$cl/cl$
04IS-6250-3	$cl/cl$
04IS-6251-2	$Cl/Cl$
04IS-6251-4	$Cl/Cl$
04IS-6252-6	$cl/cl$
04IS-6253-3	$Cl/Cl$
04IS-6253-6	$Cl/Cl$
04IS-6325-5	$Cl/Cl$
04IS-6325-6	$Cl/Cl$
04IS-6328-1	$cl/cl$

Para la extracción de ADN se empleó el kit QIAGEN<sup>®</sup> DNeasy Plant Maxi, y luego de la extracción acorde al protocolo QIAGEN<sup>®</sup> (2006) se cuantificaron las 12 extracciones, por medio del Ultramark<sup>™</sup> Microplate Reader Bio-Rad. La cuantificación se realizó tomando 100µl del ADN extraído y 100µl de buffer AE (control usado). Debido a la variación en la concentración de ADN (Cuadro 3) se trabajó con una concentración final de 25 ng/µl, teniendo el ADN estandarizado en las pruebas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Para la dilución del ADN se utilizó agua de grado HPLC (líquido de alta eficacia para cromatografía).

Cuadro 3. Concentración de ADN en las 12 plantas F5 usadas para el análisis molecular.

<b>Número de planta</b>	<b>Concentración de ADN (ng/ <math>\mu</math>l)</b>
04IS-6328-1	98.67
04IS-6248-6	108.42
04IS-6248-9	111.72
04IS-6250-3	98.65
04IS-6250-10	52.60
04IS-6251-2	68.92
04IS-6251-4	80.72
04IS-6252-6	83.58
04IS-6253-3	50.68
04IS-6253-6	64.45
04IS-6325-5	61.47
04IS-6325-6	99.73

**Análisis del ADN con los microsatélites.** Con el fin de estandarizar las pruebas de PCR en el análisis con microsatélites, se realizó la optimización del protocolo y de las temperaturas de acople de cada microsatélite (Cuadro 4). Esto se realizó llevando a cabo la PCR con gradiente de temperatura y eligiendo la temperatura de acople a la cual se observaba la mejor calidad de banda de manera consistente para cada marcador. El perfil térmico de este protocolo también fue optimizado variando únicamente la temperatura de acople de cada marcador (Cuadro 5). Para observar las bandas expresadas por cada marcador se empleó la técnica de electroforesis usando gel de agarosa al 1%. Las muestras se corrieron bajo electroforesis a 100V, por dos horas para obtener una buena separación de bandas y luego observarlas en un cuarto oscuro en un transiluminador UV.

Cuadro 4. Protocolo estándar de los reactivos para la PCR con microsatélites.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad para una muestra (<math>\mu</math>l)</b>
Agua doblemente destilada	13.75
Buffer para PCR (5 x)	5.00
Nucleótidos para PCR (10mM)	1.00
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.00
Microsatélite de reversa	0.50
Microsatélite de avance	0.50
Go Taq® Polimerasa de ADN (5u/ $\mu$ l)	0.25
ADN (25 ng/ $\mu$ l)	2.00
<b>Total</b>	<b>25.00</b>

Cuadro 5. Perfil térmico de la PCR para el análisis con microsatélites incluyendo la temperatura, el tiempo y el número de ciclos de la PCR.

<b>Perfil térmico</b>	<b>Temperatura(°C)</b>	<b>Tiempo(min)</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	94	0.3	40
Acople	Variable	0.5	40
Extensión	72	1	40
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento final	8	∞	

**Evaluación fenotípica de la generación F5.** La segunda parte de la investigación consistió en cosechar las plantas de la generación F5 y realizar una evaluación fenotípica de las semillas, mediante la observación a través de un estereoscopio de disección. Se tomó como referencia el estudio de Aranda *et al.* (2006) para identificar las semillas que presentaban la característica *circumlineada*. Se evaluaron las semillas de cada planta cosechada de manera individual, no por genotipo o línea correspondiente.

## **2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Mediante las pruebas para la optimización de la temperatura de acople de la PCR con microsatélites, se cambió la temperatura de acople de 15 microsatélites; las pruebas indicaron que las temperaturas de acople estándar eran adecuadas para la PCR de los 42 microsatélites restantes. De esta manera, se logró optimizar el perfil térmico para la PCR de los 57 marcadores microsatélites usados en el estudio. En el cuadro 6 se presenta un resumen de los marcadores y la temperatura de acople recomendada en comparación con la optimizada. La mayoría de microsatélites empleados fueron desarrollados por Gaitan-Solis (2002). A través de las técnicas de PCR y electroforesis se obtuvieron diferentes bandas de amplificación. El tamaño de las bandas se determinó comparándolas con una escalera molecular de 1kb (GeneRuler™1kb Plus DNA ladder).

Cuadro 6. Listado de microsatélites (SSR) con la temperatura de acople recomendada y la optimizada en TARS, Mayagüez, Puerto Rico.

SSR	Recomendada (°C)	Optimizada (°C)	SSR	Recomendada (°C)	Optimizada (°C)
AG1	52	52	BM167	50	50
BM114	50	50	BM170	50	47
BM137	55	55	BM171	50	47
BM138	50	48	BM173	50	47
BM139	50	50	BM181	50	50
BM141	55	55	BM184	50	48
BM142	55	55	BM185	52	52
BM143	55	55	BM195	54	54
BM146	58	58	BM197	54	54
BM147	48	48	BM199	56	56
BM148	58	58	BM20	55	55
BM149	50	47	BM200	52	52
BM150	50	47	BM201	50	50
BM151	50	47	BM202	50	48
BM152	50	50	BM209	56	56
BM153	50	50	BM210	52	52
BM154	50	50	BM211	52	52
BM155	50	50	BM213	52	52
BM156	52	52	BM25	55	55
BM157	52	52	BM3	56	54
BM158	52	52	BM48	58	58
BM159	52	52	BM53	55	55
BM16	54	54	BM6	48	48
BM160	52	48	BM67	50	48
BM161	52	52	BM68	56	56
BM164	52	50	BM79B	52	52
BM165	52	50	BM98	55	55
BM166	52	52	GATS11B	52	52
			GATS54	50	48

En la figura 1 se observa un ejemplo de la diferenciación de bandas por genotipo y marcador. Se presentan los resultados de la electroforesis de dos marcadores moleculares (BM171 y BM173); y en cada uno se diferencian las 12 muestras (plantas) evaluadas, nombradas en las partes superiores y diferenciadas por color de acuerdo al genotipo, diferenciándose las homocigotas recesivas de las homocigotas dominantes. Cada banda observada representa la presencia del marcador en el genotipo de la planta. Con el marcador BM171 (lado izquierdo), se lograron observar bandas de un mismo tamaño (pares de bases) en todas las plantas, indicando que con este marcador no se pueden identificar diferencias entre los genotipos, ya que todas las muestras expresan un mismo

tamaño de banda (149pb). Con el marcador BM173 (lado derecho), se obtuvieron tres bandas en todas las muestras (280, 600 y 800pb), pero no se observan diferencias entre los genotipos, ni la presencia de la banda esperada con este marcador (185pb). Según los resultados de Gaitan-Solis *et al.* (2002), quienes desarrollaron los microsatélites usados, se presenta los tamaños de banda esperados (Cuadro 7).

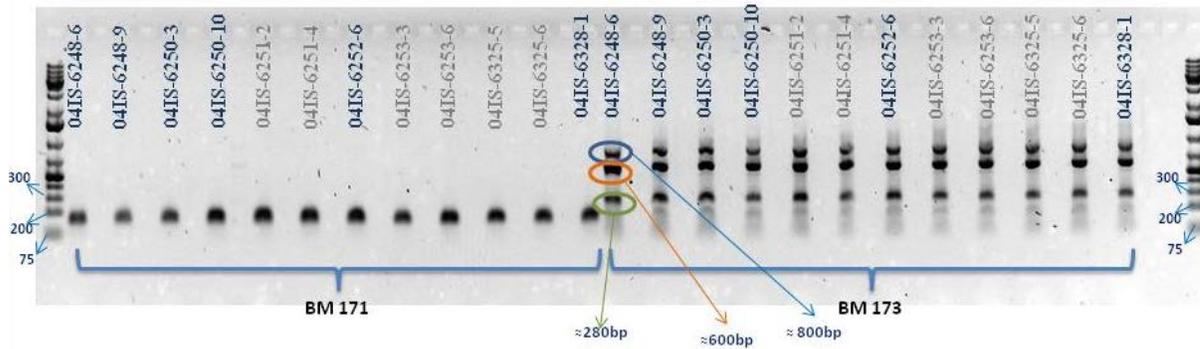


Figura 1. Bandas electroforéticas del producto de la PCR de los marcadores microsatélites BM 171 y BM 173, para los 12 genotipos evaluados.

Para cada marcador se analizaron las bandas observadas, sus tamaños y en qué genotipos se expresaban. En el cuadro 7, se presentan los tamaños de banda observados en relación a los tamaños de banda esperados. En 23 marcadores microsatélites se observaron tamaños de banda diferentes a los esperados. Se esperaba obtener bandas en los genotipos homocigotos recesivos (*cl/cl*) y no obtener ninguna banda en los homocigotos dominantes (*Cl/Cl*), o encontrar la banda en los genotipos homocigotas dominantes (*Cl/Cl*) y no encontrar la banda en los homocigota recesivos (*cl/cl*). En la mayoría de los marcadores se presentaron las mismas bandas en todos los genotipos; cuando se observaron diferencias en las bandas en algunos genotipos, estas fueron inconsistentes, lo cual descarta a los marcadores para el fin deseado.

Para el análisis estadístico de los resultados con cada marcador se utilizó el análisis de Chi cuadrado. Este análisis permite establecer si los resultados observados se ajustan estadísticamente a los observados, según el planteamiento de una hipótesis nula. Se consideraron dos posibles clases fenotípicas (presencia y ausencia) para la banda expresada con cada marcador. Lo esperado era tener presente la banda en seis de las doce muestras. De los 57 marcadores evaluados, sólo el microsatélite BM150 presentó una probabilidad de ser aceptado según la hipótesis nula ( $p= 0.60$ ). A pesar de que el valor  $p$  de este marcador es  $\geq 0.05$ , no se pudo considerar como marcador del gen *Circumlineatus* porque los resultados no fueron consistentes. Un marcador debe presentar una alta consistencia (presencia o ausencia) en relación a todos los genotipos homocigotos para la característica en estudio. El marcador BM150 se encuentra en el grupo de ligamiento B7, razón por la cual es probable sea poco consistente, ya que según McClean *et al.* (2002) y Prakken (1972), el gen está asociado al gen *T* encontrado en el grupo de ligamiento B9.

Cuadro 7. Bandas electroforéticas (tamaño expresado en pares de bases, pb) obtenidas y esperadas de cada microsatélite evaluado.

<b>Microsatélite SSR</b>	<b>Banda(s) esperada</b>	<b>Banda(s) obtenida</b>	<b>Microsatélite SSR</b>	<b>Banda(s) esperada</b>	<b>Banda(s) obtenida</b>
AG1	132	180	BM167	165	100, 165
BM114	234	80 ,234	BM170	179	179,500,1470
BM137	155	155	BM171	149	149
BM138	203	203	BM173	185	280,600, 800
BM139	115	115	BM181	192	192
BM141	218	218,450,580	BM184	160	200, 400
BM142	157	157	BM185	105	105
BM143	143	143	BM195	138	138, 160
BM146	281	281	BM197	201	201
BM147	178	178	BM199	304	304
BM148	295	200,295,450	BM20	146	75, 200
BM149	273	273,350	BM200	221	80, 221
BM150	196	150	BM201	102	102, 500
BM151	153	153	BM202	156	200, 400,500,1000
BM152	127	127	BM209	129	129
BM153	226	226,500	BM210	166	166
BM154	218	218	BM211	186	186, 400
BM155	114	114	BM213	154	154
BM156	267	267	BM25	227	400, 550
BM157	113	113	BM3	193	193
BM158	130	130,360,460	BM48	232	232
BM159	198	198	BM53	287	310, 400
BM16	149	300	BM6	153	153,700,1300
BM160	211	211	BM67	289	180, 500
BM161	185	185	BM68	170	170
BM164	182	182	BM79B	125	300, 700
BM165	177	177	BM98	247	247
BM166	151	151	GATS11B	160	120
			GATS54	114	114

Cuadro 8. Resumen del análisis de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) para los resultados del análisis de PCR con 57 marcadores SSR.

SSR	Clases	$\Sigma \chi^2$	gl	p	SSR	Clases	$\Sigma \chi^2$	gl	p
AG1	2	12.00	1	0.001	BM167	4	24.00	3	0.001
BM114	4	12.00	3	0.001	BM170	6	11.00	5	0.050
BM137	2	12.00	1	0.001	BM171	2	12.00	1	0.001
BM138	2	8.33	1	0.008	BM173	6	36.00	5	0.001
BM139	2	12.00	1	0.001	BM181	2	12.00	1	0.001
BM141	6	24.33	5	0.001	BM184	4	24.00	3	0.001
BM142	2	12.00	1	0.001	BM185	2	12.00	1	0.001
BM143	2	12.00	1	0.001	BM195	4	24.00	3	0.001
BM146	2	12.00	1	0.001	BM197	2	12.00	1	0.001
BM147	4	16.67	3	0.008	BM199	2	12.00	1	0.001
BM148	6	36.00	5	0.001	BM20	4	24.00	3	0.001
BM149	4	5.33	3	0.030	BM200	4	24.00	3	0.001
BM150	2	0.33	1	0.600	BM201	4	24.00	3	0.001
BM151	2	5.33	1	0.030	BM202	8	27.33	7	0.001
BM152	2	12.00	1	0.001	BM209	2	12.00	1	0.001
BM153	4	12.00	3	0.001	BM210	2	12.00	1	0.001
BM154	2	12.00	1	0.001	BM211	4	20.33	3	0.001
BM155	2	12.00	1	0.001	BM213	2	36.00	1	0.001
BM156	2	12.00	1	0.001	BM25	4	8.67	3	0.060
BM157	2	12.00	1	0.001	BM3	2	12.00	1	0.001
BM158	6	36.00	5	0.001	BM48	2	12.00	1	0.001
BM159	2	12.00	1	0.001	BM53	4	15.00	3	0.001
BM16	2	12.00	1	0.001	BM6	6	20.33	5	0.001
BM160	2	12.00	1	0.001	BM67	2	12.00	1	0.001
BM161	2	12.00	1	0.001	BM68	2	12.00	1	0.001
BM164	2	12.00	1	0.001	BM79B	4	16.67	3	0.001
BM165	2	12.00	1	0.001	BM98	2	12.00	1	0.001
BM166	2	12.00	1	0.001	GATS11B	2	12.00	1	0.001
					GATS54	2	12.00	1	0.001

gl = grados de libertad

p=probabilidad

Como parte del estudio se realizó la evaluación fenotípica de la generación F5, para evaluar la evaluación de la expresión fenotípica del gen *circumlineatus*, en las semillas. Cabe mencionar que las semillas obtenidas presentaban cierto corrugamiento que dificultó la lectura. En la figura 2 (Aranda *et al.* 2006) se ejemplifican las semillas en las que el gen se consideró presente, el genotipo homocigota recesivo (*cl/cl*) expresa esta característica, y aquellas en las que se presentó el genotipo homocigota dominante (*Cl/Cl*) no expresan la característica *circumlineada*. Los dos fenotipos de semillas presentan testa blanca, con

pigmentación oscura y de patrón restringido. Pero en la imagen de la derecha se observa una línea precipitada en el borde de la pigmentación, que expresa la presencia del gen *Circumlineatus*. Mientras en la imagen de la izquierda no observamos, ni la línea bordeando la sección pigmentada, ni la precipitación que acompaña la línea.



Figura 2. Fenotipos del gen *Circumlineatus* con la línea precipitada indicada por la flecha en líneas representativas de la población *t z cl G b v virgarcus BC3 5-593 X t z sel Cl G b v sellatus BC3 5-593* (Aranda *et al.* 2006). Genotipo homocigota dominante *Cl/Cl* (izq.) y homocigota recesivo *cl/cl* (der.).

Los resultados de la evaluación fenotípica, fueron analizados mediante la Prueba del Chi cuadrado ( $\chi^2$ ), donde se comparó el fenotipo esperado y el obtenido (cuadro 9). Los valores esperados se obtuvieron de los análisis fenotípicos previos realizados por Aranda *et al.* (2006); y los valores observados fueron los obtenidos mediante observaciones en el estereoscopio de las semillas de plantas F5.

Cuadro 9. Evaluación fenotípica de semillas de plantas de frijol de la generación F5, segregantes para el gen *circumlineatus*, por medio del análisis de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ). El valor esperado se obtuvo de las evaluaciones realizadas en la generación F4 (Aranda *et al.* 2006).

Nombre	Genotipo	Plantas evaluadas	Fenotipo		$\chi^2$	gl	p
			Observado	Esperado			
04IS-6248	<i>cl/cl</i>	7	7	7	0	6	1
04IS-6249	<i>Cl/cl</i>	10	1	10	8.1	9	0.48
04IS-6250	<i>cl/cl</i>	8	8	8	0	7	1
04IS-6251	<i>Cl/Cl</i>	7	3	7	2.29	6	0.89
04IS-6252	<i>cl/cl</i>	7	7	7	0	6	1
04IS-6253	<i>Cl/Cl</i>	5	5	5	0	4	1
04IS-6254	<i>Cl/cl</i>	2	1	2	0.5	1	0.48
04IS-6255	<i>Cl/cl</i>	3	3	1	1.33	2	0.51
04IS-6256	<i>Cl/cl</i>	13	1	13	11.08	12	0.35
04IS-6325	<i>Cl/Cl</i>	4	0	4	4	3	0.30
04IS-6326	<i>Cl/cl</i>	2	0	2	2	1	0.15
04IS-6327	<i>Cl/cl</i>	4	1	4	2.25	3	0.65
04IS-6328	<i>cl/cl</i>	3	3	3	0	2	1

gl =grados de libertad

p=probabilidad

En 5 de los 13 genotipos evaluados, el marcador fenotípico fue efectivo en la diferenciación entre los genotipos que no presentan la característica (homocigota dominante *-Cl/Cl-* y heterocigoto *-Cl/cl-* y el genotipo homocigota recesivo (*cl/cl*) en el cual si se presenta el patrón *circumlineado*. La diferencia se atribuye a que en las plantas de la generación F5 todavía existe un nivel de heterocigocidad (6-7%), que genera segregaciones por el fenotipo en estudio. Para asegurar que las plantas sean altamente homocigotas, se requiere usar generaciones más avanzadas (>F6).

### 3. CONCLUSIONES

- Se confirmaron las temperaturas de acople de 42 marcadores microsatélites, y se modificaron las temperaturas de acople de 15 marcadores, lográndose optimizar el análisis de PCR con los marcadores moleculares empleados en el estudio.
- No se encontró un marcador molecular de tipo microsatélite que brindara consistencia en la diferenciación entre los genotipos que presentan la característica del gen *circumlineatus* y los que no la presentan. El único microsatélite que presentó diferencia pero no consistente fue BM150.
- En la caracterización fenotípica de la semilla se encontraron diferencias entre lo esperado (determinado en la F4) y lo observado en la generación F5, debido a que los genotipos heterocigotas (*Cl/cl*) todavía presentan segregaciones en la expresión de la característica del gen *Circumlineatus* en las semillas.

#### 4. RECOMENDACIONES

- Debido a que no fue posible encontrar un marcador molecular para localizar el gen *circumlineatus* en el genoma, se recomienda continuar la investigación con marcadores de tipo SNP (Polimorfismo de un nucleótido), con los cuales se tienen mayores probabilidades de encontrar un marcador molecular para el gen estudiado, debido al alto nivel de especificidad, abundancia (alrededor de 10,600 de ellos), la facilidad de poderlos estudiar sin necesidad de usar gel para la observación y acorde a Gupta *et al.* (2001) el grado de fidelidad de los SNP es mayor, en comparación con otros marcadores moleculares.
- Se recomienda realizar la investigación utilizando plantas con una generación más avanzada (F7-F8) de la población estudiada, para tener un mayor nivel de homocigocidad y evitar las segregaciones fenotípicas en la caracterización de la población.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aranda, L; Porch, TG; Bassett, MJ. 2006. Initial AFLP tagging of the gene (Cl) for circumlineated pattern. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 49:55-56.

Aranguren-Méndez, JA; Román-Bravo, R; Isea, W; Villasmil, Y; Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. ALPA (Asociación Latinoamericana de Producción Animal) 13:30-42

Bassett, MJ; McClean, P. 2000. A Brief Review of the Genetics of Partly Colored Seed Coats in Common Bean. Universidad de Florida y NDSU, USA. 5 p. *Sin publicar*.

Blair, MW; Pedraza, F; Buendia, HF; Gaitán-Solís, E; Beebe, SE; Gepts, P; Tohme, J. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Springer-Verlag 107:1362-1374.

FENALCE (Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas).2010. El cultivo del frijol, historia e importancia. El Cerealista 26: 30-31.

Gaitán-Solís, E; Duque, MC; Edwards, KJ; Tohme, J. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Science 42: 2128-2136.

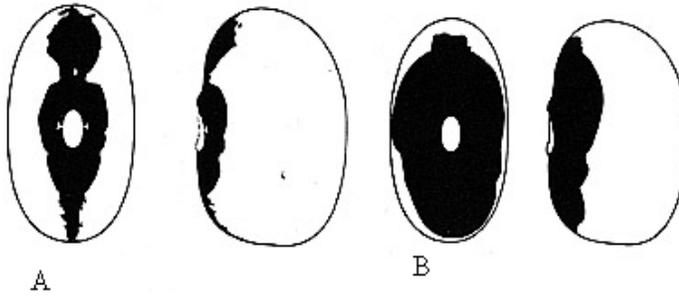
Gupta, PK; Roy, JK; Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. Current Science 80: 524-535.

McClean, PE; Lee, RK; Otto, C; Gepts, P; M.J. Bassett. 2002. Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Hered 93:148-152.

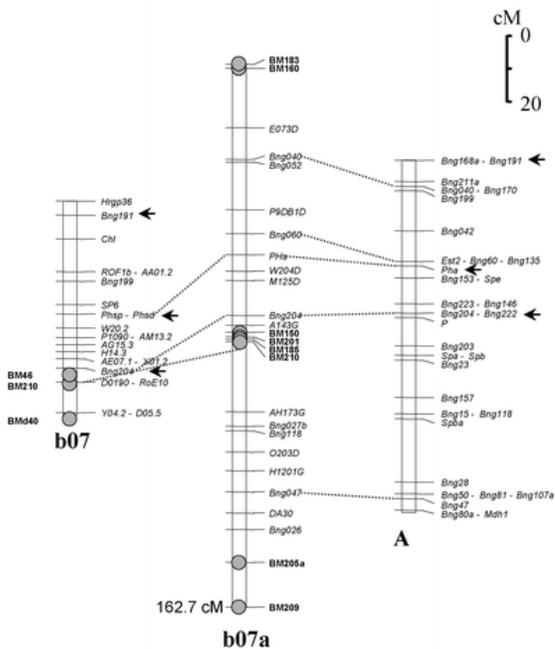
Prakken, R. 1972. Inheritance of colours in *Phaseolus vulgaris* L. III. On genes for red seedcoat colour and a general synthesis. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 72-29:1-82.

Vienne, D de (ed). c2003. Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology. NH, USA. Science Publishers. 229 p.

## 6. ANEXOS



Anexo 1. En la sección A se observa el patrón llamado Virgarcus ( $t z Bip$ ). En la sección B se observa el patrón llamado Sellatus ( $t z^{sel} Bip$ ). Tomado de Bassett y McClean (2000).



Anexo 2. Segmento B7 del mapa genético del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), donde se muestra la interacción de genes (Blair *et al.* 2003).