

Optimización de marcadores moleculares SCAR para la selección asistida de la resistencia a la roya del frijol

Damián Fernando Pulla Samaniego

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Noviembre, 2005

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Optimización de marcadores moleculares
SCAR para la selección asistida de la
resistencia a la roya del frijol**

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

Presentado por:

Damián Fernando Pulla Samaniego

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reserva el derecho de autor

Damián Fernando Pulla Samaniego

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005

**Uso de marcadores moleculares SCAR en la evaluación de la resistencia
a la roya del frijol**

Presentado por:

Damián Fernando Pulla Samaniego

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor Principal

Abelino Pitty, Ph. D.
Coordinador de Área Temática
Fitotecnia

Alonso Suazo, Ph. D.
Asesor

Abelino Pitty, Ph. D.
Director Interino Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

Jorge Venegas, Ing. Agr.
Asesor

George Pilz, Ph. D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, porque mi deuda es inmensamente mayor que este millón de dones.

A mi querida hija Ángeles Renné, por ser mi inspiración y dedicación.

A mi madre Ruth, el triunfo es de ella.

A mi abuelita Maria Eugenia, por creer en mí y por su inmenso cariño.

A mis tíos Ligia, Martha, Jeannette, Clara y Luis por ser mi mejor ejemplo.

A mis primos, por ser los mejores amigos y hermanos

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por proteger mi alma y permanecer en mi corazón, por la inquebrantable fortaleza que viene de ti.

A mi madre por su gran amor eterno, su sinceridad, su amistad, por su apoyo incondicional y por su confianza en mí que ha sido el mejor curso de superación personal.

A mis primos, por las alegrías y tristezas que compartimos, por dar luz a mis recuerdos, por ser mis amigos, mis hermanos y mi razón para servirles de ejemplo.

A mis tíos Luis, Ligia, Martha, Jeannette, Clara y sus familias por sus oraciones, su cariño, su apoyo, sus palabras y abrirme las puertas de su hogar.

Al Dr. Juan Carlos Rosas, por su tiempo y apoyo en la realización del trabajo.

Al Dr. Alonso Suazo, por compartir a manos llenas sus conocimientos, por su inmensa paciencia y por ser magnífico ejemplo de humildad.

Al Ing. Jorge Venegas por su ayuda en todo momento, por su paciencia y por su amistad.

Al Ing. Wilmer Rodríguez, por ser amigo, un hermano más y haber compartido cuatro años de compañerismo que se harán eternos.

Al Ing. Byron Reyes, Luz, Tomasa, Hernán y mis amigos del PIF, por brindarme sonrisas, cariño y amistad, nunca los olvidaré.

A mis mejores amigos: Amaru, Nelson, José, Sixto, Antonio, Jorge, Daniel, Verónica, Erika, Laura, Lorena y a los amigos a quienes la ingrata memoria deje sin nombrar, pero que están presentes en el corazón.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Al Programa Bean/Cowpea CRSP (Donación USAID N° GDG-G-00-02-00012-00), por el financiamiento de este estudio.

RESUMEN

Pulla, Damián. 2005. Optimización de marcadores moleculares SCAR para la selección asistida de la resistencia a la roya del frijol. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras, 20 p.

Una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo del frijol, por su amplia distribución geográfica en las regiones tropicales y subtropicales asociada a bajos rendimientos, es la roya del frijol común causada por el hongo *Uromyces appendiculatus*. El objetivo de este estudio fue optimizar marcadores moleculares SCAR a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología y determinar la confiabilidad de estos marcadores para su uso en la selección asistida de la resistencia a la roya del frijol común. El estudio se realizó en Zamorano, Honduras. Se optimizó seis marcadores SCAR (SK-14, SA-14, SI-19, SBC-6, SOAD-12, UR11-GT2) ligados a los genes de resistencia Ur-3, Ur-4, Ur-5, Ur-6, Ur-7, Ur-11, respectivamente presentes en las variedades Aurora, Early Gallatin, México 309, Golden Gate Wax, GN 1140 y PI 181996. Se adaptó el perfil térmico para el SCAR SOAD-12 (desnaturalización, 94°C, 5 min; 34 ciclos de desnaturalización, 94°C, 1 min; acoplamiento, 65°C, 1 min, elongación, 72°C, 90 s, ciclo final de elongación, 72°C, 5 min.) y se optimizó la mezcla maestra para la amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa con cada SCAR. En algunos protocolos se pudo reducir la enzima Taq-polimerasa generando un ahorro económico. Se evaluó la confiabilidad del uso de cada marcador comparando el porcentaje de similitud en los patrones de bandas para cada SCAR y se analizó con la prueba de Chi-cuadrado (X^2). Los resultados que se obtuvieron fueron una probabilidad mas del 90 % en cinco marcadores ($P > 0.9$) a excepción del SCAR UR11-GT2 con una probabilidad significativamente menor ($P < 0.05$). Las evaluaciones con los SCAR muestran un excelente ajuste a las condiciones del Laboratorio de Zamorano; el caso del marcador UR11-GT2, se determinó que no hay confiabilidad para su uso.

Palabras clave: ADN, enzima, *Phaseolus vulgaris*, “primers”, roya, *Uromyces appendiculatus*.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADILLA	i
AUTORIA.....	ii
PÁGINA DE FIRMAS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES	vi
RESÚMEN	vii
CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	3
LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	3
ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS PARA SCAR.....	3
Optimización de protocolo de PCR para marcadores de roya	4
EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE SCAR.....	5
Análisis estadístico.....	5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
OPTIMIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES TIPO SCAR.....	6
Optimización de protocolo de PCR para marcadores de roya	6
EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE SCAR.....	9
Análisis Estadístico.....	9
CONCLUSIONES.....	11
RECOMENDACIONES	12
BIBLIOGRAFÍA.....	13
ANEXOS.....	15

ÍNDICE DE CUADROS

1. Lista de variedades y marcadores SCAR ligados a genes de resistencia a la roya del frijol.....3
2. Análisis de Chi-cuadrado de marcadores SCAR optimizados para determinar genes de resistencia a la roya del frijol.....9

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Optimización del primer SK-14 con adaptaciones al protocolo de UW.....	6
2. Optimización del primer SA-14 con adaptaciones al protocolo de UW.....	7
3. Optimización del primer SI-19 con adaptaciones al protocolo de UW.	7
4. Optimización del primer SBC-6 con adaptaciones al protocolo de UW.	8
5. Optimización del primer SOAD-12 con adaptaciones al protocolo de UW.....	8
6. Optimización del primer UR11-GT2 con adaptaciones al protocolo de UW.....	9
7. Patrón de presencia y ausencia de bandas para el SCAR SA-14, Zamorano. Honduras. 2005.....	10

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Guía de Procedimientos para uso de Marcadores Moleculares SCAR.....15
2. Adaptación de componentes para PCR usando marcadores SCAR..... 15

INTRODUCCIÓN

El frijol común, *Phaseolus vulgaris*, es un componente particularmente importante de la dieta de la población de América Latina, por su alto contenido de proteínas y carbohidratos. Se encuentra cultivado bajo las más diversas condiciones, desde los 52° latitud norte a los 32° latitud sur, y desde el nivel del mar hasta más de 3000 msnm. Se estima que más del 90% de la producción mundial de frijol común se da bajo condiciones de estrés donde los rendimientos promedio son bajos (< 600 kg/ha). En América Latina, donde las fincas son pequeñas, el frijol se cultiva intercalado, en muchos casos para autoconsumo, y los agricultores, debido a sus limitados recursos, aplican pocos insumos o ninguno (CIAT 1997). Se ha constituido en un rubro muy dinámico y representa una importante alternativa de producción e ingresos para miles de pequeños y medianos agricultores en Latinoamérica (Castañeda y Galván 2000).

Las enfermedades son uno de los factores limitantes de mayor importancia económica que afectan al frijol común en el trópico. Estas son causadas principalmente por hongos, virus y bacterias que pueden reducir significativamente los rendimientos y la calidad de la vaina y de la semilla (Cepeda 1998).

La roya del frijol, *Uromyces appendiculatus*, es una de las enfermedades más importantes que limita la producción de frijol en las regiones del trópico y subtropical y se caracteriza por una alta diversidad de la virulencia del patógeno en sistemas natural y cultivado (Acevedo *et al.* 2005).

La roya es una enfermedad favorecida por ambientes con temperaturas moderadas (17-18 °C) y alta humedad relativa, que ataca mayormente a cultivos localizados en áreas sobre los 1000 msnm. Las esporas son transportadas a grandes distancias por el viento. Los residuos de cosecha, y algunas malezas, pueden albergar al hongo (Rosas 2003).

La falta de variedades de alto rendimiento y calidad de grano comercial con resistencia duradera a la roya es otra limitante muy importante. En frijol arbustivo, la roya puede reducir el rendimiento de un 30 a 40% necesitándose de 3 a 4 aplicaciones de fungicidas para controlar la enfermedad; lo que causa contaminación ambiental, enfermedades por intoxicación y aumento de los costos de producción (Peralta 1998).

La mejor forma de combatir o reducir la severidad del daño es usando variedades resistentes a esta enfermedad. Algunas de las variedades mejoradas presentan buena resistencia, sin embargo, la resistencia genética puede ser relativa debido a la aparición de nuevas razas fisiológicas como consecuencia de la alta variabilidad del agente causal (Rosas 2003).

Tradicionalmente el mejoramiento de variedades se ha realizado mediante la selección sobre la base del fenotipo; sin embargo, debido a la influencia del ambiente, esta selección constituye una medida imperfecta del potencial genético de las plantas. El problema puede ser mayoritariamente revertido con el uso de marcadores moleculares, los cuales pueden ser utilizados para la selección de caracteres agronómicos, en la identificación y aislamiento de genes o grupos de genes junto con el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus aplicaciones han revolucionado esta tecnología (Cornide 2002).

Los marcadores moleculares constituyen una herramienta moderna y poderosa para el viejo arte de la selección. El empleo ha significado grandes adelantos proporcionando la localización de genes deseables para la selección, como es el caso de la selección asistida con marcadores moleculares (SAM) (Cornide 2002).

Frente a esta situación, el Programa de Investigación en Frijol (PIF) de Zamorano trazó una estrategia de mejoramiento genético integrado. Para lo cual en este estudio se ha planteado identificar fuentes estables de resistencia a roya con la ayuda de marcadores moleculares tipo SCAR (siglas en inglés de Regiones Amplificadas de Secuencias Caracterizadas), que son *primers* (cebadores) específicos ligados a características de interés, que determinan la presencia o ausencia de genes de resistencia; y así seleccionar líneas promisorias para futuras variedades, con el fin de dar soluciones a las limitantes mencionadas anteriormente y desarrollar estrategias apropiadas para la utilización de estos genes en el programa de mejoramiento genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

La siembra de variedades y análisis molecular se realizaron durante el período de enero a octubre de 2005, en los invernaderos del PIF y en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, ubicado en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, a una altura de 800 msnm, con una temperatura promedio de 24°C y precipitación promedio anual de 1100 mm.

ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS PARA SCAR

Material experimental

Se seleccionaron seis variedades de frijol, dos andinas y cuatro mesoamericanas, contenidas en el banco de germoplasma de la Escuela Agrícola Panamericana. Los criterios de selección para las variedades se establecieron por la presencia de genes de resistencia a la roya del frijol común, tomando las recomendaciones hechas por los investigadores que generaron los marcadores SCAR (cuadro 1).

Cuadro 1. Lista de variedades y marcadores SCAR ligados a genes de resistencia a la roya del frijol.

Variedades	SCAR	Gen	Referencia
Andinas			
Early Gallatin	SA-14	Ur-4	Miklas <i>et al.</i> 2003
Golden Gate Wax	SBC-6	Ur-6	Park <i>et al.</i> 2003
Mesoamericanas			
Aurora	SK14	Ur-3	Nemchinova y Stavely 1998
México 309	SI-19	Ur-5	Melotto y Kelly 1998
GN 1140	SOAD-12	Ur-7	Park <i>et al.</i> 2003
PI 181996	UR11-GT2	Ur-11	Boone <i>et al.</i> 1999

Siembra

Se sembraron en los invernaderos del PIF las seis variedades de frijol que poseen genes resistentes a la roya, caracterizados por marcadores SCAR. Se colocaron un promedio de cinco semillas por macetero, dos maceteros por cada variedad, para un total de doce maceteros, cuyas medidas fueron de 15.24 cm de altura × 15.24 cm de diámetro.

Las semillas fueron escarificadas y pregerminadas para seleccionar las más viables y acortar el periodo de emergencia. La siembra se hizo el 13 de febrero del 2005 y 13 días después, cuando aparecieron los primeros trifolios, se prosiguió con la extracción de ADN.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo de los cuatro primeros trifolios de las variedades sembradas siguiendo el protocolo establecido por la Universidad de Wisconsin-Madison (UW). Se cosecharon y recolectaron las muestras en tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 50 µl de buffer PEX (Etil Xantogenato de Potasio), se maceró el tejido usando barras de plexiglass y se adicionaron 450 µl de buffer PEX. Las muestras se colocaron en baño maría a 65°C por una hora y se centrifugaron por 10 min a 14000 rpm para concentrar los residuos de tejido. Se precipitaron los ácidos nucleicos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min para peletizarlos. Se agregaron 300µl de ARNasa y se incubaron en baño maría a 37°C por una hora. Los tejidos remanentes se peletizaron centrifugando a 14000 rpm por 1 min. Se precipitó ADN con 10:1 etanol:acetato de sodio 3 M y se peletizaron centrifugando a 3000 rpm por 5 min. Los pellets de ADN se lavaron con etanol 70% y se centrifugaron a 14000 rpm por 15 segundos y se secaron por 2-3 horas o de un día para otro. Luego se rehidrataron los pellets con 100 µl de buffer TE 0.1X, colocándolos en baño maría a 65°C por 15 min. Finalmente, se almacenaron las muestras de ADN a -20°C.

Cuantificación y dilución de ADN

La cuantificación de ADN se realizó con un fluorómetro Hoefer^D y NA QuantTM 200, calibrado con ADN estándar de timo de bovino a 100 ng/µl. Se agregaron 2 µl de muestra de ADN en buffer de cuantificación (100 ml de TNE 1X y 10 µl de solución concentrada de tintura), colocados en una cubeta de cuarzo puro para minimizar el margen de error al momento de la lectura. Las muestras de ADN se diluyeron a 30 ng/ml con 100 µl de Buffer TE 0.1X usando platos de 96 celdas con fondo redondo (Polypropylene), para la amplificación con marcadores moleculares tipo SCAR.

Optimización de protocolo de PCR para marcadores de roya

Durante pruebas preliminares en la amplificación de ADN, se detectaron ausencia o deficiencia en la visibilidad de bandas en las muestras de las variedades con genes de resistencia, por lo que se realizaron pruebas de cantidades y concentraciones de diferentes soluciones en la mezcla maestra para PCR, generando nuevas mezclas maestras para la optimización en las condiciones del laboratorio de biotecnología (Anexo 1).

Mezcla maestra y amplificación

Se realizaron varias pruebas empleando los protocolos específicos, para la amplificación de ADN mediante PCR, en un termociclador (MJ Research, Inc. PTC 100tm) para los marcadores SK-14, SA-14, SI-19, SBC-6, SOAD-12 y UR11-GT2, para determinar la presencia o ausencia de genes de resistencia a la roya del frijol común.

Electroforesis

Se colocó una escalera de ADN de 100 pares de bases (pb), un control negativo y las muestras amplificadas mezcladas con Buffer Loading Dye 6X en geles de agarosa al 1.2%, colocadas en tanques de electroforesis a 100 y 110 voltios respectivamente, con Buffer TBE 0.5X por 50 minutos. Se tiñeron los geles en una solución 1:10 Bromuro de Etidio y agua destilada (10 µl en 100 ml), luego se visualizaron las bandas de ADN en el transiluminador Fotodyne Foto UV 26 y se fotografiaron con una cámara digital.

EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE SCAR

Para el análisis estadístico se usaron los bancales de infección aledaños al laboratorio de Biotecnología, en donde se sembraron 40 plantas por cada variedad, en total 240 plantas para ser analizadas en un Chi-cuadrado (X^2).

Análisis estadístico

La evaluación de las variedades resistentes con marcadores SCAR fue realizada para identificar aquellos que pudieran presentar cambios en el patrón de bandas dentro de la misma variedad y poder determinar que tan probable es usar los SCAR en la implementación del SAM para líneas en investigación ubicadas en el banco de germoplasma del PIF, en la Escuela Agrícola Panamericana el Zamorano. Para determinar el porcentaje de aceptabilidad de presencia o ausencia de bandas de cada SCAR, se aplicó la distribución de X^2 (Chi-cuadrado) para observar la concordancia entre los valores esperados y observados identificando la similitud en el patrón de bandas empleando 40 muestras de ADN evaluado de las 40 plantas de las 6 variedades con su SCAR específico (Cuadro 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OPTIMIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES TIPO SCAR

Se optimizaron seis marcadores SCAR, con presencia de bandas en todas las muestras (Cuadro 1), lográndose la reducción en algunos reactivos y mejorando la calidad de amplificación de bandas.

Optimización de protocolo de PCR para marcadores de roya

El marcador SK-14 amplificó una banda a 620 pares de bases. Las bandas amplificadas correspondieron a las variedades Aurora (C+) y Aifi Wirite (C-), esta última susceptible a razas de roya presentes en Zamorano (Figura 1). Con el protocolo 1 se visualizaron bandas con exceso de $MgCl_2$, debido al uso de buffer Xylene Cyanole (5X) y dNTP's (4mM) con $MgCl_2$. Con el protocolo 2 se obtuvo una mejor visualización de bandas por lo cual se procedió a reducir la cantidad de Taq-Polimerasa de 0.7 a 0.2 μl por muestra, creando con esto un ahorro significativo de la enzima y su costo (Anexo 1).

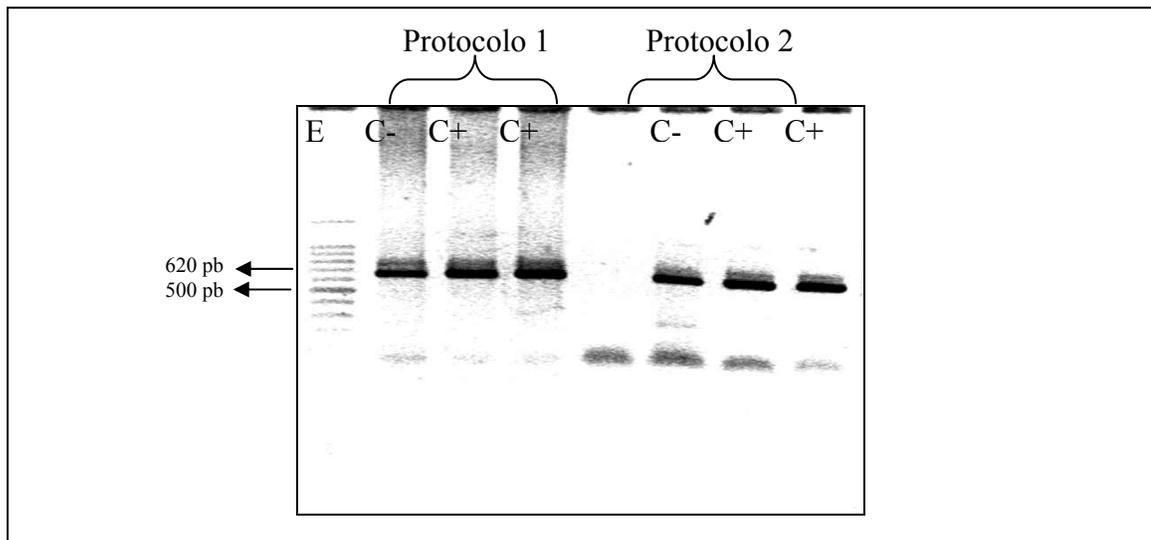


Figura 1. Optimización del *primer* SK-14 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2005.

El marcador codominante SA-14 amplificó una banda a 1079 (dominante) y 800 (recesivo) pares de bases, corroborando la presencia del gen Ur-4. y su alelo susceptible. Las bandas amplificadas correspondieron a las variedades Early Gallatin (C+) y Aifi Wirite (C-), (Figura 2). Con el protocolo 2 se visualizaron bandas con exceso de MgCl₂, debido al uso de buffer Xylene Cyanole (5X) y dNTP's (4mM) con MgCl₂. Con el protocolo 1 se obtuvo una mejor visualización de bandas (Anexo 1).

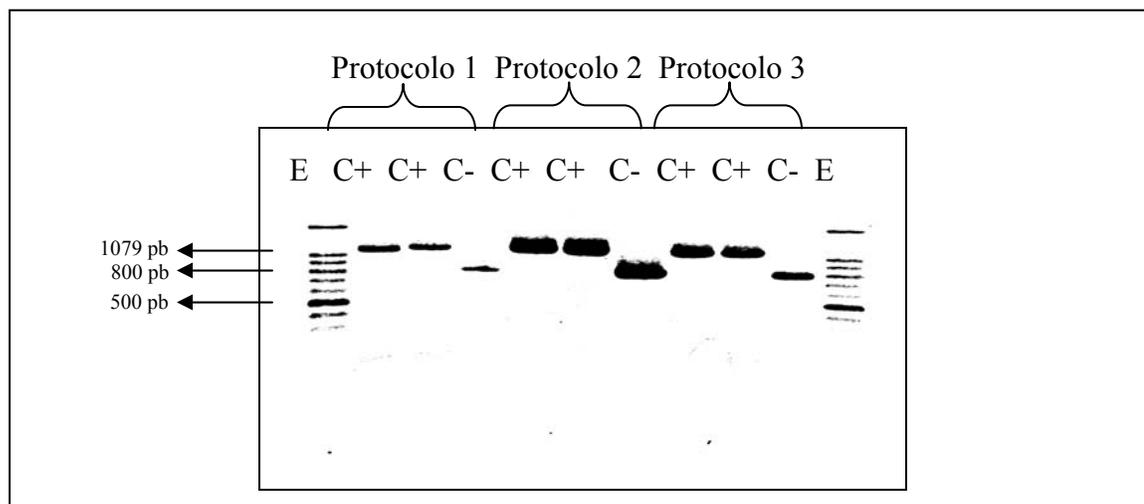


Figura 2. Optimización del *primer* SA-14 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2005.

El marcador SI-19 amplificó una banda a 560 pares de bases, corroborando la presencia del gen Ur-5. Las bandas amplificadas correspondieron a las variedades México 309 (C+) (Figura 3). Con el protocolo 1 se visualizaron bandas con exceso de MgCl₂, debido al uso de buffer Xylene Cyanole (5X) y dNTP's (4mM) con MgCl₂. Con el protocolo 2 se obtuvo una mejor visualización de bandas (Anexo 1).

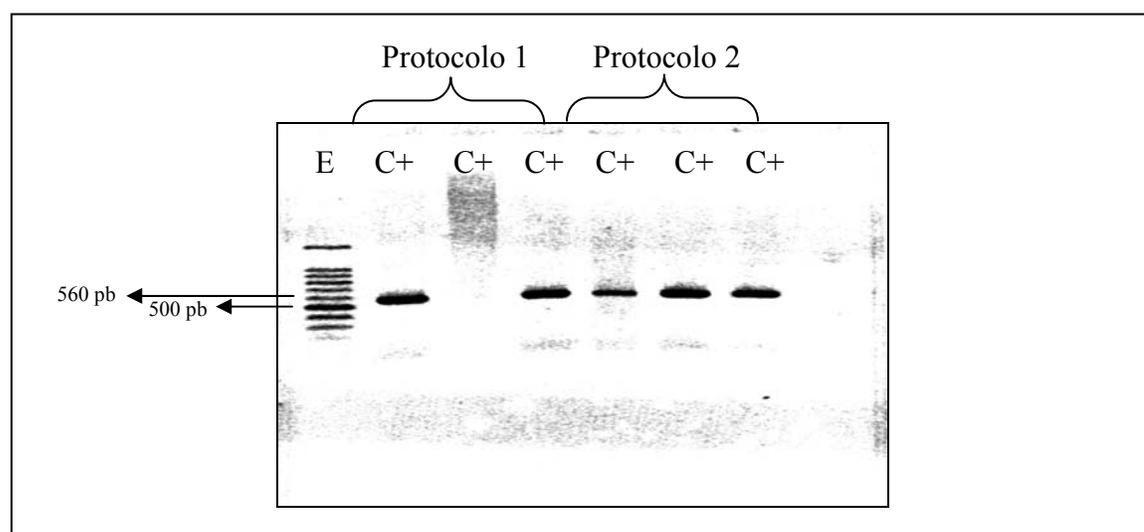


Figura 3. Optimización del *primer* SI-19 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2005.

El marcador SBC-6 amplificó una banda a 308 pares de bases, corroborando la presencia del gen Ur-6. Las bandas amplificadas correspondieron a las variedades Golden Gate Wax (C+) y Aifi Wirite (C-), (Figura 4). Con el protocolo 1 se visualizaron bandas con exceso de MgCl₂, debido al uso de buffer Xylene Cyanole (5X) y dNTP's (4mM) con MgCl₂. Con el protocolo 2 se obtuvo una mejor visualización de bandas. Con el protocolo 3 y 4 la visualización fue difusa (Anexo 1).

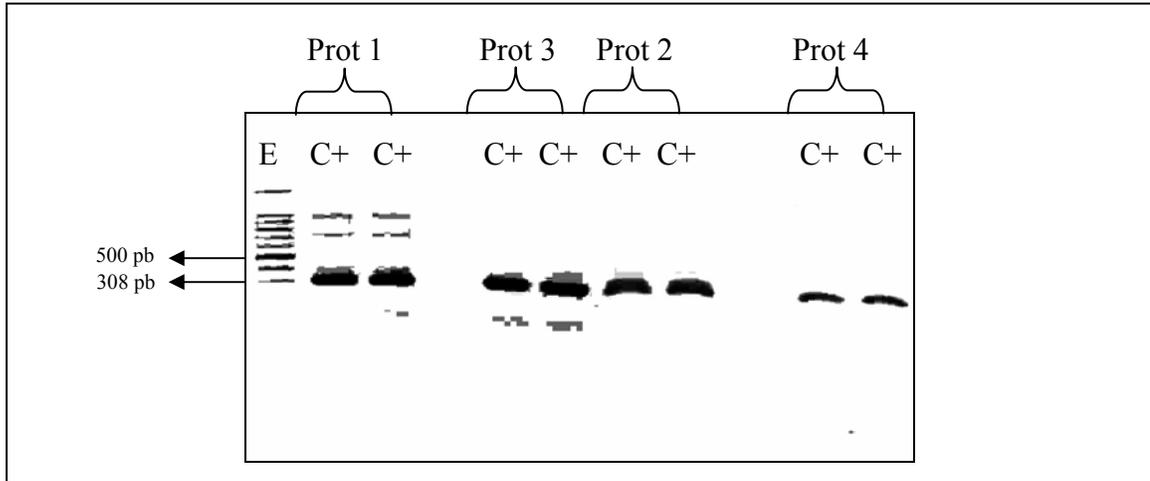


Figura 4. Optimización del *primer* SBC-6 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2005.

El marcador SOAD-12 amplificó una banda a 537 pares de bases, corroborando la presencia del gen Ur-7. Las bandas amplificadas correspondieron a las variedades GN 1140 (C+) (Figura 5). Con el protocolo 1 se visualizaron bandas con exceso de MgCl₂, debido al uso de buffer Xylene cyanole (5X) y dNTP's (4mM) con MgCl₂. Con el protocolo 2 se obtuvo una mejor visualización de bandas por lo cual se procedió a reducir la cantidad de Taq-Polimerasa de 0.7 a 0.3 µl por muestra (Anexo 1).

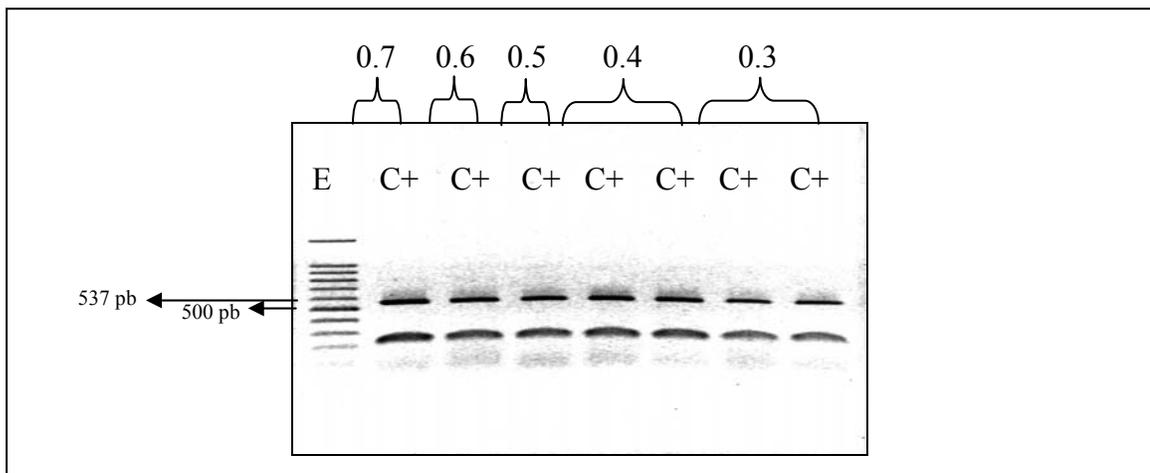


Figura 5. Optimización del *primer* SOAD-12 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2005.

El marcador UR11-GT2 amplificó una banda a 450 y 490 pares de bases, corroborando la presencia del gen Ur-3 en algunas muestras de la misma variedad. Las bandas amplificadas correspondieron a las variedades PI 181996 (C+) y Aifi Wirite (C-). La presencia de doble banda a la misma altura en algunas de las muestras disminuyó la confiabilidad del marcador usado (Figura 6). Con el protocolo 1 se visualizaron bandas con exceso de $MgCl_2$, debido al uso de buffer Xylene Cyanole (5X) y dNTP's (4mM) con $MgCl_2$. Con el protocolo 2 se obtuvo una mejor visualización de bandas por lo cual se procedió a reducir la cantidad de Taq-Polimerasa de 0.7 a 0.2 μ l por muestra (Anexo 1).

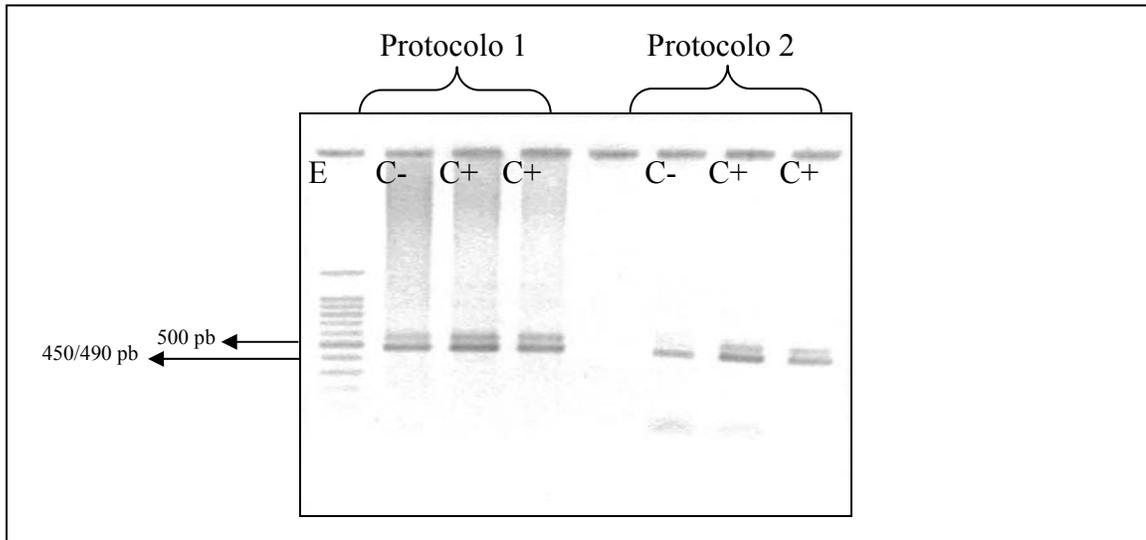


Figura 6. Optimización del *primer* UR11-GT2 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2005.

EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE SCAR

Análisis Estadístico

Cuadro 2. Análisis de Chi-cuadrado de marcadores SCAR optimizados para determinar genes de resistencia a la roya del frijol.

SCAR	Observado	Esperado	Obs-Esp	$[(O-E)-(0.5)]^2/E$
SK-14	33	33	0	0.01
SA-14	36	36	0	0.01
SI-19	31	31	0	0.01
SBC-6	32	32	0	0.01
SOAD-12	33	33	0	0.01
UR11-GT2	21	33	-12	4.73

Los resultados obtenidos con el *primer* SK-14, permitieron identificar un patrón de bandas similar en las 33 muestras viables (sin ADN degradado) de la variedad Aurora, a una altura de 620 pares de bases (pb), indicando la resistencia esperada genotípicamente. La amplificación producida por el *primers* SA-14, permitió identificar un patrón de

bandas similar en las 36 muestras viables de la variedad Early Gallatin, a una altura de 1079 pb.

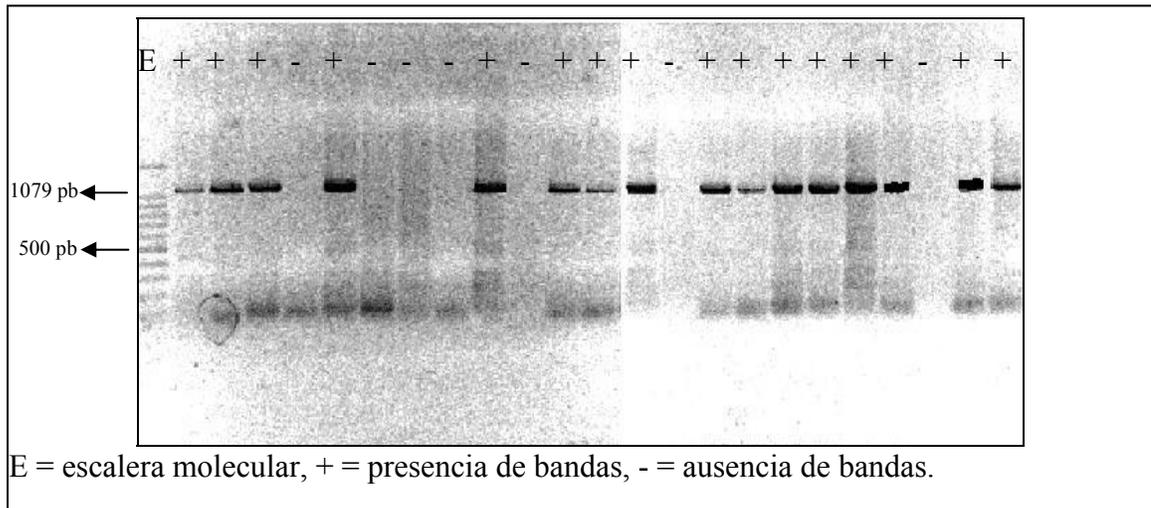


Figura 7. Patrón de presencia y ausencia de bandas para el SCAR SA-14, Zamorano. Honduras. 2005.

El patrón de bandas generado por el *primer* SI-19 fue similar en las 31 muestras viables de la variedad México 309, a una altura de 560 pb. Los resultados obtenidos con el *primer* SBC-6, permitieron identificar un patrón de bandas similar en las 32 muestras viables de la variedad Golden Gate Wax, a una altura de 308 pb, indicando la resistencia esperada genotípicamente. Los resultados obtenidos con el *primers* SOAD-12, permitieron identificar un patrón de bandas similar en las 33 muestras viables de la variedad GN1140, a una altura de 537 pb, indicando la resistencia esperada genotípicamente. De acuerdo con el análisis Chi cuadrado, los resultados sugirieron que los marcador SK-14, SA-14, SI-19, SBC-6, SOAD-12 se ajustaron a la expresión esperada de resistencia ($P > 0.9$). Atribuyéndose que estos resultados observados no se deben al azar (Cuadro 2). Los resultados obtenidos con el *primers* UR11-GT2, permitieron identificar un patrón de bandas con variaciones en las 33 muestras viables recolectadas de la variedad PI 181996, presentándose de estas 21 bandas a una altura de 450 pb y 12 dobles bandas a la misma altura, disminuyendo las probabilidades de determinar la resistencia esperada genotípicamente para la roya del frijol común. De acuerdo con el análisis Chi cuadrado, los resultados sugirieron que el marcador UR11-GT2 no se ajusta a la expresión esperada de resistencia ($P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

Las evaluaciones genotípicas de la resistencia a la roya del frijol común evaluadas con marcadores tipo SCAR muestran un ajuste perfecto a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología de Zamorano.

Los marcadores SCAR SK-14, SA-14, SI-19, SBC-6, SOAD-12, se pueden utilizar de manera confiable para identificar la presencia de los genes Ur-3, Ur-4, Ur-5, Ur-6, Ur-7 respectivamente, que confieren la resistencia a una gran diversidad de razas de roya mesoamericanas y andinas.

El marcador UR11-GT2 mostró una probabilidad muy baja ($P < 0.05$), reduciendo la confiabilidad para identificar la presencia del gen Ur-11 resistente a la roya.

RECOMENDACIONES

Confirmar los resultados de este estudio y de estudios anteriores, realizando evaluaciones con otras variedades ligadas a genes de resistencia a la roya del frijol común.

Ampliar con un mayor número de marcadores SCAR la optimización de protocolos para la evaluación de la resistencia a la roya del frijol común.

Evaluar un grupo de germoplasma élite por presencia de genes de resistencia a la roya usando los marcadores ya optimizados en este estudio.

A través de los marcadores SCAR, identificar líneas de frijol con combinaciones de genes resistentes deseables para el mejoramiento de la resistencia a la roya del frijol en Centro América.

Realizar estudios que involucre más el marcador UR11-GT2, para una optimización más confiable, probando con ADN nuevo de la misma variedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, M.; Steadman J.R., Rosas, J.C; Venegas, J. 2005. Characterization of virulence diversity of the bean rust pathogen *Uromyces appendiculatus* in wild bean populations as a tool for effective resistance gene deployment. Annu. Rept. Bean Improv.
- Boone, W.E.; Stavely, J.R.; Weeden, N.F. 1999. Development of a sequence-tagged site (STS) marker for Ur-11, a gene conferring resistance to the bean rust fungus, *Uromyces appendiculatus*. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 42:33-34.
- Castañeda, D.; Galván, M. 2000. Hongos fitopatógenos del estado de Veracruz I. Uredinales. Bol. Soc. Mex. Mic. 14 : 81-100.
- Cepeda, M. 1998. Prácticas de fitopatología agrícola. UAAAN, México. 87 p.
- Cornide, M. 2002. Marcadores Moleculares: Nuevos Horizontes en la Genética y la Selección de las Plantas. Editorial Félix Varela. La Habana, Cuba. 366 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1997. Problemas de campo en los cultivos de frijol en el Trópico. Trad. Por EDITEC. Ed. Por Mata F., Van Schoonhoven, A. y Pastor-Corrales, M.A. (comps.). Cali, Colombia, CIAT. 220 p.
- Melotto, M.; Kelly, J.D. 1998. SCAR markers linked to major disease resistance genes in common bean. Annu. Rept. Bean Improv. Crop. 41:64-65.
- Miklas, P.N.; Delorme, R.; Riley, R.H. 2003. Identification of QTL conditioning resistance to white mold in a snap bean population. J. Am. Soc. Hort. Sci. 128:564-570.
- Nemchinova, Y.P.; Stavely, J.R. 1998. Development of SCAR primers for the Ur-3 rust resistance gene in common bean. Phytopathology 88:S67.
- Park, S.O.; Crosby. K.M.; Coyne, D.P.; Steadman, J.R. 2003. Survey of RAPD and SCAR Markers Linked to the Ur-6 Gene in Pinto Beans. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 46:189-190.
- Peralta, E. 1998. El aporte genético de las leguminosas de grano comestible al desarrollo agrícola sostenible. Memorias RELEZA VI. Santa Cruz, Bolivia. 17-18 p.

Rosas, J.C. 2003. Recomendaciones para el manejo agronómico del cultivo del frijol. Programa de Investigaciones en Frijol, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Imprenta LitoCom, Tegucigalpa, Honduras. 33 p.

ANEXOS

Anexo 1. Guía de Procedimientos para uso de Marcadores Moleculares SCAR.

Protocolo para la Amplificación de ADN mediante PCR usando marcadores SCAR.

1. Descongelar el ADN a temperatura ambiente del plato con las muestras diluidas de ADN guardados en el refrigerador.
2. Realizar los cálculos pertinentes para preparar la mezcla de reacción, según el anexo.
3. Preparar la mezcla de reacción sin incluir las muestras de ADN.
4. Colocar 13 μ l de la mezcla de reacción a cada celda del plato, luego agregar 2 μ l de muestra de ADN.
5. Tapar con papel plástico (Microseal TM “a”) la caja de reacción (platos de 96 celdas).
6. Colocar el plato en el termociclador y amplificar con el perfil térmico para SCAR.
1. Una vez finalizada la amplificación, guardar los platos con las muestras en el refrigerador hasta proceder a la electroforesis.

Adaptación de componentes para PCR usando marcadores SCAR.

Componentes	Volumen (μ l)					
	SK-14	SA-14	SI-19	SBC-6	SOAD-12	UR11-GT2
Agua	8.1	7.6	7.6	7.6	7.5	8.1
Buffer (10X) Promega	2.5	2.5	2.5	2.5	3.0	2.5
dNTP's (4mM) Sin MgCl ₂	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Primers 1 (10 μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Primers 2 (10 μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Taq-Polimerasa (6 U/ μ l)	0.2	0.7	0.7	0.7	0.3	0.2
AND (30 ng/ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Volumen Final	15	15	15	15	15	15

Optimización de perfil térmico para PCR usando marcadores SCAR

Perfil de programación del termociclador para el SCAR SK-14 (Ur-3)

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)
1	Desnaturalización	94	0:00:10
2	Acoplamiento	63	0:00:40
3	Elongación	72	0:02:00
4			33 veces al paso 1
5	Elongación	72	0:05:00
6	Conservación	4	0:00:00
7		FIN	

Perfil de programación del termociclador para el SCAR SA-14 (Ur-4)

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)
1	Desnaturalización	94	0:05:00
2	Desnaturalización	94	0:01:00
3	Acoplamiento	55	0:01:00
4	Elongación	72	0:01:30
5			34 veces al paso 2
6	Elongación	72	0:05:00
7	Conservación	4	0:00:00
8		FIN	

Perfil de programación del termociclador para el SCAR SI-19 (Ur-5)

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)
1	Desnaturalización	94	0:00:10
2	Acoplamiento	67	0:00:40
3	Elongación	72	0:02:00
4			33 veces al paso 1
5	Elongación	72	0:05:00
6	Conservación	4	0:00:00
7		FIN	

Perfil de programación del termociclador para el SCAR SBC-6 (Ur-6)

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)
1	Desnaturalización	94	0:02:00
2	Desnaturalización	94	0:00:30
3	Acoplamiento	59	0:01:00
4	Elongación	72	0:02:00
5			29 veces al paso 2
6	Elongación	72	0:07:00
7	Conservación	4	0:00:00
8		FIN	

Perfil de programación del termociclador para el SCAR SOAD-12 (Ur-7)

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)
1	Desnaturalización	94	0:05:00
2	Desnaturalización	94	0:01:00
3	Acoplamiento	65	0:01:00
4	Elongación	72	0:01:30
5			34 veces al paso 2
6	Elongación	72	0:05:00
7	Conservación	4	0:00:00
8		FIN	

Perfil de programación del termociclador para el SCAR UR11-GT2 (Ur-11)

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)
1	Desnaturalización	94	0:00:10
2	Acoplamiento	60	0:00:40
3	Elongación	72	0:02:00
4			33 veces al paso 1
5	Elongación	72	0:05:00
6	Conservación	4	0:00:00
7		FIN	

Procedimiento para preparación de geles (1.2% agarosa)

1. Pesar 1.32 g de agarosa y transferir a un erlenmeyer de 500 ml.
2. Agregar 110 ml de Buffer TBE 0.5X.
3. Calentar la solución en el horno microondas durante 40 segundos. Retirar y agitar vigorosamente.
4. Calentar nuevamente durante un 20 segundos.

5. Colocar el erlenmeyer en un recipiente con agua para bajar la temperatura de la solución a 60 °C.
6. Colocar la solución en una bandeja para electroforesis, previamente sellada en los extremos y colocar el peine.

Procedimiento para electroforesis usando marcadores SCAR

1. Mezclar 15 µl de cada muestra amplificada con 3 µl de Buffer 6X y sembrar en los orificios de la gel.
2. Dejar correr la electroforesis por 50 min a 100 V.
3. Sumergir la gel en una solución de Bromuro de Etidio y agitar suavemente durante 30-45 min.
4. Transferir la gel al transiluminador de rayos UV, usando el equipo de protección adecuado.
5. Fotografiar la gel.

Procedimiento para dilución de primers

1. Centrifugar durante un minuto el primer liofilizado.
2. Multiplicar por el factor 10 el peso del primer (nmoles), para determinar el volumen de TBE 1X que se usará en la dilución.
3. De esta manera se obtiene una solución madre del primer a una concentración de 100 µl.

Para preparar aliquots de primers a una concentración de 10 µM:

- Colocar en un tubo eppendorf 10 µl de primer (100 µM).
- Agregar 90µl de buffer TBE 1X.
- Refrigerar.

Anexo 2. Guía para la elaboración de Componentes Adaptados para PCR

CUANTIFICACIÓN DE ADN

Buffer TNE 10X (1000 ml)

12.11 g (100mM) Tris Base
 3.72 g (10mM) EDTA Na₂·2H₂O
 116.89 g (2m) NaCl

Procedimiento:

- Pesar en un beaker los reactivos y disolver con 800 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.4 agregando gotas de HCl concentrado y agitando después de cada adición.

- Filtrar con papel 0.45 μm , al momento de transferir a un frasco volumétrico de 1000 ml.
- Completar el volumen con agua destilada y refrigerar.

AMPLIFICACIÓN DE ADN

Buffer 10X (100 ml)

50 ml (500 mM) Tris Base 1M (pH 8.5)
 20 ml (200 mM) KCL 1 M
 2.5 ml (25 Mm) MgCl_2

Procedimiento:

- Usar pipetas volumétricas para medir los ingredientes señalados.
- Trasferir s un frasco volumétrico de 100 ml y completar el volumen con agua destilada.
- Refrigerar.

dNTP's 10X (1000 μl)

25 μl (25mM) dCTP 100mM
 25 μl (25mM) dGTP 100mM
 25 μl (25mM) dTTP 100mM
 25 μl (25mM) dATP 100mM

Procedimiento :

- Colocar los volúmenes indicados de dNTP's en un tubo eppendorf.
- Agregar 900 μl de agua destilada y mezclar.
- Refrigerar

SEPARACIÓN DE ADN

Buffer TBE 5X (1000ml)

54g de Tris Base
 27.5 g de Ácido bórico
 20 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0

Procedimiento:

- Pesar en un beaker los ingredientes indicados.
- Disolver y transferir a un frasco volumétrico de 1000 ml.
- Medir con pipeta volumétrica 20 ml de EDTA y agregar a la solución anterior.
- Mezclar y completar el volumen de 1000 ml con agua destilada.

Para elaborar la gel de azarosa y llenar el tanque de electroforesis es necesario emplear de TBE Buffer a una concentración 0.5X, para esto:

- Medir en una probeta 100 ml de Buffer TBE 5X.
- Transferir a un frasco volumétrico de 1000 ml y complementar el volumen con agua destilada.

Buffer 6X (10 ml)

25 mg de Bromofenol azul
2 g de Ficoll

Procedimiento:

- Pesar en un beaker los ingredientes.
- Disolver los compuestos agregando pequeñas cantidades de agua destilada.
- Trasferir la solución a un frasco volumétrico de 10 ml y complementar el volumen con agua destilada.

Solución de Bromuro de Etidio (400 µl)

- Colocar 400 ml de agua destilada en un recipiente.
- Agregar 40µl de Bromuro de Etidio en una solución de 10 mg/ml.
- Después de correr la electroforesis sumergir la gel en la solución diluida de Bromuro de Etidio por 30-40 min y observar al transiluminador UV.

Procedimiento para preparación de geles (1.2 % agarosa)

1. Pesar 1.32 g de agarosa y transferir a un erlenmeyer de 500 ml.
2. Agregar 110 ml de Buffer TBE 0.5 X.
3. Calentar la solución en el horno microondas durante 1:30 minutos. Retirar y agitar
4. Calentar nuevamente durante 1:00 minuto
5. Colocar el erlenmeyer en un recipiente con agua para bajar la temperatura de la solución a 60 °C.
6. Colocar la solución en una bandeja para electroforesis, previamente sellada en los extremos y colocar el peine.