

**Caracterización de razas y selección  
fenotípica y molecular de líneas de frijol  
común resistentes a la mancha angular  
(*Phaeoisariopsis griseola*) Sacc. Ferraris**

**Iveth Yassmin Rodriguez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Caracterización de razas y selección  
fenotípica y molecular de líneas de frijol  
común resistentes a la mancha angular  
(*Phaeoisariopsis griseola*) Sacc. Ferraris**

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

Presentado por

**Iveth Yassmin Rodriguez**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2013

## Caracterización de razas y selección fenotípica y molecular de líneas de frijol común resistentes a la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) Sacc. Ferraris

Iveth Yassmin Rodriguez

**Resumen:** La mancha angular es una de las principales enfermedades del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en las regiones tropicales y subtropicales, causada por el hongo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris. El objetivo del estudio fue caracterizar razas patogénicas de *P. griseola* y seleccionar líneas de frijol común resistentes a la mancha angular. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. Las líneas se sembraron en casa de malla con micro aspersión, usando maceteros de 8". Las plantas se inocularon a los 15 y 25 días después de la siembra (DDS) con los aislamientos *Pg- ZII*, *Pg- O* y *Pg- PRR* de *P. griseola* a una concentración de  $2 \times 10^4$  conidias/mL. A los 42 DDS, se evaluó la reacción de las 34 líneas usando la escala de severidad de daño del CIAT (1987). Se identificaron tres razas patogénicas de *P. griseola* (31-63, 62-33 y 63-63). Las líneas G06727, ALS 0531-97, ALS 0532-6, ALS 0532-38, ALS 0546-97 y G10474 presentaron reacción de resistencia a las tres razas de *P. griseola* caracterizadas. Se optimizó el protocolo SCAR EACA/M-CTT 330 del gen de la accesión G10474. Se evaluó la presencia de los genes *Phg-1*, *Phg-2* y G10474 en las 34 líneas de frijol, con los marcadores SCAR SH13, SNO2 y EACA/M-CTT 330, respectivamente. Únicamente las líneas ALS 0626-35 y AMFF 1-12-1-17-1 presentaron los marcadores de los tres genes de resistencia a *P. griseola*. El gen dominante de la línea G10474 confiere resistencia a la raza 63-63 de *P. griseola*, considerada como la más virulenta de este patógeno.

**Palabras clave:** ADN, aislamientos, marcadores SCAR, *Phaseolus vulgaris* L, razas patogénicas.

**Abstract:** The angular leaf spot is one of the main diseases of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the tropical and subtropical regions, caused by the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris. The objective of the study was to characterize pathogenic races of *P. griseola* and select common bean lines resistant to angular leaf spot. A randomized complete block design with four replications were used in this study. The lines were grown in a screen house with micro spray, using 8" pots. Plants were inoculated at 15 and 25 days after planting (DAP) with the isolates *Pg- ZII*, *Pg- O* and *Pg- PRR* of *P. griseola* using a concentration of  $2 \times 10^4$  conidia/mL. At 42 DAP, the response of 34 lines were evaluated using the CIAT severity scale (1987). Three pathogenic races of *P. griseola* were identified (31-63, 62-33 and 63-63). The lines G06727, ALS 0531-97, 0532-6 ALS, ALS 0532-38, 0546-97 and G10474 showed resistance reaction to the three races characterized. The protocol for the SCAR marker EACA/M-CTT 330 of the G10474 resistant gen was optimized. The presence of genes *Phg-1*, *Phg-2* and G10474 were evaluated with SCAR markers SH13, SNO2, and EACA/M-CTT 330, respectively. In the 34 bean lines only the lines AMFF 1-12-1-17-1 and ALS 0626-35, presented the markers for the three resistance genes to *P. griseola*. The dominant gene of the line G10474 conferred resistance to race 63-63 of *P. griseola*, considered the most virulent of this pathogen.

**Key words:** DNA, isolates, pathogenic races, *Phaseolus vulgaris* L, SCAR markers.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	v
Índice de cuadros, figuras y anexo .....	vi
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>23</b>
<b>5 RECOMENDACIONES .....</b>	<b>24</b>
<b>6 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>25</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>28</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Líneas diferenciales para la caracterización patogénica de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> .....	4
2. Líneas de frijol común utilizadas para la evaluación fenotípica y molecular con resistencia a <i>Phaeoisariopsis griseola</i> .....	5
3. Aislamientos de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> de muestras de frijol colectadas en Honduras.....	6
4. Primers de marcadores moleculares SCAR para identificar genes con resistencia a <i>Phaeoisariopsis griseola</i> .....	7
5. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo SCAR SH13 e identificar la presencia del gen <i>Phg-1</i> .....	10
6. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo SCAR SH13 e identificar la presencia del gen <i>Phg-1</i> .....	11
7. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para protocolo SCAR SNO2 e identificar la presencia del gen <i>Phg-2</i> .....	11
8. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el marcador molecular SCAR SNO2 e identificar gen <i>Phg-2</i> .....	11
9. Razas de los tres aislamientos de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> , caracterizadas mediante 12 líneas diferenciales de la mancha angular del frijol común.....	12
10. Variaciones en la mezcla maestra para amplificar el marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330.....	13
11. Perfil térmico para la Reacción en Cadena de la Polimerasa del marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330.....	14
12. Evaluación de los marcadores moleculares SCAR para identificar la presencia de los genes <i>Phg-1</i> , <i>Phg-2</i> y G10474 en las 34 líneas de frijol común.....	22

Figuras	Página
1. Escala de severidad de daño (1-9) establecida por el CIAT (1987).....	7
2. Diferentes temperaturas de acople de primer EACA/M-CTT 330.....	13
3. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de 12 líneas de frijol común para identificar la presencia del gen G10474. Líneas 2-8 son andinas, líneas 1, 9-12 son mesoamericanas.....	15
4. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de líneas de frijol común (13-20) para identificar la presencia del gen G10474. ....	16
5. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de líneas de frijol común (21-32) para identificar la presencia del gen G10474. ....	16
6. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de líneas de frijol común (33 y 34) para identificar la presencia del gen G10474.....	17
7. Bandas generadas por el primer SH13 en ADN de líneas de frijol común (1-13) para identificar la presencia del gen <i>Phg-1</i> . ....	18
8. Bandas generadas por el primer SH13 en ADN de líneas de frijol común (14-22) para identificar la presencia del gen <i>Phg-1</i> . ....	18
9. Bandas generadas por el primer SH13 en ADN de líneas de frijol común (23-34) para identificar la presencia del gen <i>Phg-1</i> . ....	19
10. Bandas generadas por el primer SNO2 en ADN de líneas de frijol común (1-17) para identificar la presencia del gen <i>Phg-2</i> . ....	20
11. Bandas generadas por el primer SON2 en ADN de líneas de frijol común (18- 34) para identificar la presencia del gen <i>Phg-2</i> . ....	20

Anexos	Página
1. Caracterización de la raza 31-63 de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> .....	28
2. Caracterización de la raza 63-63 de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> .....	29
3. Caracterización de la raza 62-33 de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> .....	30
4. Evaluación fenotípica (escala 1-9) de las líneas de frijol común con las razas de <i>Phaeoisariopsis griseola</i> caracterizadas.....	31
5. Protocolo de extracción de ADN para el análisis de RAPD (Método de la Universidad de Wisconsin, UW – Madison).....	32
6. Cuantificación de ADN- Instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc.....	33
7. Dilución de ADN (20 ng/ml) por el método de la UW. ....	33
8. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores tipo SCAR. ....	34

## 1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa importante en la dieta y es considerado la principal fuente de proteína para la población rural y urbana de menores ingresos en Centroamérica y el Caribe (Rosas *et al.* 2000). El frijol es cultivado generalmente por pequeños agricultores que carecen de suficientes recursos económicos y por ello esperan sembrar durante la época lluviosa, esta condición climática favorece el desarrollo de enfermedades, contribuyendo considerablemente a que los rendimientos del frijol sean bajos e inestables (CIAT 1987).

La mancha angular es una de las principales enfermedades del frijol común en las regiones tropicales y subtropicales y es causada por el hongo *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris (Schwartz *et al.* 1982). En los últimos años se ha observado mayor incidencia y daños al cultivo por la mancha angular en la región centroamericana, alcanzando reducciones en rendimiento de hasta un 80% en variedades susceptibles (Rosas 2003).

La mancha angular se caracteriza por provocar lesiones típicamente angulares delimitadas por nervaduras, las cuales son comunes en las hojas primarias, luego estas se vuelven inóculo para las hojas secundarias; las lesiones angulares pueden llegar a extenderse sobre toda la lámina foliar. Los síntomas iniciales aparecen como pequeños puntos grises y dependiendo de la variación patogénica puede presentar un halo clorótico de márgenes indefinidos (Schwartz 2011). Los ataques tempranos de la mancha angular pueden causar defoliación parcial prematura; las lesiones en vainas, tallos y peciolo son de color café rojizo y frecuentemente presentan un borde más oscuro (Schwartz *et al.* 1982). El hongo penetra por los estomas y el avance en el tejido del hospedero primero es intercelular en el mesófilo y parénquima empalizada y luego intracelular (Ferraz 1980).

El inóculo de la mancha angular proviene de restos contaminados de la cosecha anterior y semilla contaminada con el patógeno. Las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad incluyen temperaturas moderadas, humedad continua sobre el follaje y tallos, alternada con periodos de baja humedad y viento (Schwartz *et al.* 1982). Temperaturas entre 16 y 28 °C son ideales para la mancha angular (Leon Saavedra 2009).

El patógeno de mancha angular (*P. griseola*) posee una amplia variabilidad patogénica. En América Central se encontró la presencia de razas de la mancha angular, donde el 60% de los aislamientos caracterizados corresponden a nuevas razas; los aislamientos recolectados en México y Honduras resultaron ser los más virulentos (Jara 1998).

La resistencia a la mancha angular se atribuye a varios genes, siendo algunos de ellos dominantes y otros recesivos (Barros *et al.* 1958; Cardona Álvarez 1962; Santos Filho *et al.* 1976; Singh y Saini 1980; Sartorato *et al.* 1993). La mayoría de las líneas de frijol común evaluados hasta ahora son resistentes a unas razas y susceptibles a otras, por ello es de mucha importancia conocer la diversidad genética, la organización poblacional y la evolución del patógeno para poder desarrollar líneas de frijol resistentes a la mancha angular (Beebe *et al.* 1991, Gepts *et al.* 1991).

Existen dos acervos genéticos de frijol común, el andino que corresponde a la región andina y el mesoamericano que incluye México y Centroamérica (Gepts *et al.* 1991). Así mismo también existen dos grupos de aislamientos de *P. griseola*, uno andino y otro mesoamericano que corresponden a los dos acervos genéticos de frijol común (Chacón *et al.* 1996).

En 1995 se aprobaron 12 líneas diferenciales y su valor binario para la caracterización patogénica de *P. griseola*. Las 12 líneas diferenciales se encuentran divididas en dos grupos: seis andinas; Don Timoteo, G11796, Bolón Bayo, Montcalm, Amendoin y G05686 y seis mesoamericanas; PAN 72, G2858, Flor de Mayo, MEX 54, BAT 332, Cornell 49242 (Pastor Corrales y Jara 1995).

Para seleccionar líneas de frijol común resistentes a la mancha angular, es necesario el uso de marcadores moleculares SCAR (regiones amplificadas de secuencia caracterizada), que utilizan primers específicos ligados a características de interés; ampliamente utilizados en el mapeo genético y en la SAM (selección asistida por marcadores moleculares) que determinan presencia o ausencia de genes de resistencia (Herrera Dávila 2004). Los SCAR utilizan primers específicos de 20 a 30 pares de bases, diseñados a partir de secuencias establecidas mediante marcadores RAPD ligados a una característica de interés (Castro *et al.* 2003).

Se encontraron dos marcadores RAPD OPN 02890c y OPE 04650c, ligados en la fase de acoplamiento en 3.2 y 12.5 centimorgan (cM), respectivamente, al gen mesoamericano de resistencia a *P. griseola* en una población derivada del cruce de los cultivares Cornell 49242 (resistente) × Ruda (susceptible). Para aumentar la reproducibilidad de la detección del marcador OPN 02890c este fue convertido a un marcador SCAR, para facilitar la presencia del gen *Phg-2* resistente a la mancha angular presente en Cornell 49242 (Nietsche *et al.* 2000).

Según estudios realizados el marcador RAPD OPH13490c está asociado con el locus de resistencia presente en AND-277; este marcador fue convertido a SCAR para identificar la presencia del gen *Phg-1* (Carvalho *et al.* 1998; Queiroz *et al.* 2004).

Otro estudio realizado en el 2004, determinaron que el genotipo G10474 de origen andino es ampliamente resistente a *P. griseola*, incluyendo a la raza 63-63 (una de las razas más virulentas), por lo que identificaron marcadores moleculares ligados al gen de resistencia en G10474. La resistencia en G10474 está dada por un gen dominante y para poder identificar ese gen se convirtió con éxito el marcador AFLP (polimorfismo de longitud de fragmento amplificado) E-ACA/M-CTT330 a una secuencia de marcador codominante

SCAR a 5 cM del gen de resistencia. La utilidad del marcador SCAR se limitó al acervo genético andino de *Phaseolus vulgaris* (Mahuku *et al.* 2004).

El presente estudio tiene como objetivos:

Caracterizar razas patogénicas de *Phaeoisariopsis griseola* de aislamientos colectados en Honduras, utilizando el vivero de diferenciales.

Adaptar y validar el protocolo SCAR EACA/M-CTT 330 del gen G10474 resistente a la mancha angular para su uso en selección asistida con marcadores moleculares en el PIF.

Determinar la resistencia de líneas mejoradas usando los aislamientos caracterizados de la mancha angular y la presencia de tres genes con los marcadores moleculares SCAR SH13, SNO2 y EACA/M-CTT 330.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del estudio.** La caracterización patogénica y las evaluaciones de resistencia a las razas de *Phaeoisariopsis griseola* se realizaron en casas de malla con micro aspersión del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF). El análisis molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, a una altura de 800 msnm, con temperatura promedio de 24 °C y precipitación promedio anual de 1100 mm.

**Caracterización patogénica de *Phaeoisariopsis griseola*.** Se sembraron 12 líneas diferenciales (Cuadro 1), junto a 22 líneas mejoradas de frijol común (Cuadro 2), incluidos dos testigos, Tío Canela 75 y G06727. Tío Canela 75 es una variedad que fue liberada en Honduras en el año 1996 (Rosas *et al.* 1997), el grano es de color rojo brillante, de origen mesoamericano y susceptible a la mancha angular. La accesión de germoplasma G06727 identificado como Guarzo-Popayán es originario de la región andina de Colombia, su grano es de color amarillo moteado y resistente a la mancha angular (CIAT 1992). Para caracterizar las razas de *P. griseola* se utilizó el valor binario, el cual consiste en asignar un valor único a cada diferencial andino seguido por otro valor para los diferenciales mesoamericanos.

Cuadro 1. Líneas diferenciales para la caracterización patogénica de *Phaeoisariopsis griseola*.

Número	Líneas diferenciales	Valor binario	Centro de origen
1	Don Timoteo	1	Andinas
2	G11796	2	
3	Bolón Bayo	4	
4	Montcalm	8	
5	Amendoin	16	
6	G5686	32	
7	PAN 72	1	Mesoamericanas
8	G2858	2	
9	Flor de Mayo	4	
10	MEX 54	8	
11	BAT 332	16	
12	Cornell 49242	32	

## Evaluación fenotípica con aislamientos de *Phaeoisariopsis griseola* de Honduras.

**Siembra.** Se hicieron tres siembras para evaluar fenotípicamente la resistencia de las líneas de frijol (Cuadro 2) a cada aislamiento de la mancha angular (Cuadro 3), en casas de malla de 5 × 3 m. Para la siembra se utilizaron maceteros de 8", que contenían sustrato de suelo: compost (2:1), se utilizaron dos maceteros por cada línea de frijol y se sembraron dos semillas por macetero.

Cuadro 2. Líneas de frijol común utilizadas para la evaluación fenotípica y molecular con resistencia a *Phaeoisariopsis griseola*.

Líneas	Pedigrí
Tío Canela 75	DOR483//F1(DOR391/PompadourJ)
G06727	Guarzo- Popayán
ALS 0531-41	Amadeus 77//F1 (ALS 9951-42/MR 13697-2-5)
ALS 0531-97	Amadeus 77//F1 (ALS 9951-42/MR 13697-2-5)
ALS 0532-4	Cardenal// F1 (ALS 9951-62/MR 13697-2-5)
ALS 0532-6	Cardenal// F1 (ALS 9951-62/MR 13697-2-5)
ALS 0532-38	Cardenal// F1 (ALS 9951-62/MR 13697-2-5)
ALS 0546-60	Aifiwuriti// F1 (ALS 9951-62/MR13697-2-5)
ALS 0546-78	Aifiwuriti// F1 (ALS 9951-62/MR13697-2-5)
ALS 0546-97	Aifiwuriti// F1 (ALS 9951-62/MR13697-2-5)
ALS 0626-35	Cardenal// F1 (ALS 9951-62/MR 13697-2-5)
SX 14816-71	/S/B 122/PRF 9653-16B-1/F1/S/B 125/MC-16P-MO
MER 2221-20	Tío Canela 75/ Orguloso
AMFF 1-12-16-2	Amadeus 77/FF1
AMFF 1-12-1-17-1	Amadeus 77/FF1
MHR 314-18	SRC2-18-1//F1 MHC 2-12
ALS 9951-101-R1	Tío Canela 75// F1 (Tío Canela 75/ G06727)
SEQ 341-99	L88-63//Milenio/L88-63
SJC 730-70	Negro Vaina Blanca/BCN 20-02-94
SJC 730-40	Negro Vaina Blanca/BCN 20-02-94
G10474	Guatemala 889
SEQ 342-87	L88-63//Carrizalito/L88-63

Las casas de malla estaban provistas de un sistema de ventilación y micro aspersores que se encendían cada 30 minutos por 30 segundos, para dar las condiciones ideales para el desarrollo de la enfermedad y así mantener una humedad relativa alta (80-95%), temperatura media (24-28 °C) y una lámina de agua continua sobre la superficie de las hojas para facilitar la entrada del hongo por los estomas y que este produzca lesiones.

**Inoculación.** Se utilizaron tres aislamientos de *P. griseola* (Cuadro 3), los cuales fueron recolectados en El Ocotal, El Paraíso; Zamorano y Santa Bárbara. Se realizaron dos inoculaciones en las plantas a los 15 y 25 días después de la siembra (DDS) con cada aislamiento de *P. griseola*.

Cuadro 3. Aislamientos de *Phaeoisariopsis griseola* de muestras de frijol colectadas en Honduras.

Aislamientos	Lugar de recolección	Material recolectado	Año
<i>Pg.</i> O	Ocotal, El Paraíso	Landrace	2002
<i>Pg.</i> ZII	Zona II, Zamorano, Francisco Morazán	Amadeus 77	2011
<i>Pg.</i> PRR	Santa Bárbara	ALS 9951-98	2005

El inóculo se obtuvo de aislamientos puros de *P. griseola*, multiplicados en medio V8 durante 12 días, a una concentración de  $2 \times 10^4$  conidias/mL; por cada litro de inóculo se colocó una gota de Tween 20 para dispersar las esporas y facilitar la adhesión de estas al follaje.

La inoculación se hizo sobre el haz y el envés de la hoja con un atomizador de Bilviss adaptado a un compresor de 10 psi de presión, después de cada inoculación las plantas pasaron un periodo de incubación de 48 horas, sin riego por micro aspersion, para promover la infección de las plantas.

**Evaluación de la severidad de daño.** Se evaluó la reacción de las líneas de frijol a los aislamientos de *P. griseola* utilizando la escala de severidad de 1-9 establecida por el CIAT (1987), (Figura 1). La severidad de la enfermedad en las líneas de frijol se evaluó en la etapa de floración (42 DDS); siendo plantas resistentes (1-3) y susceptibles (4-9).

**Evaluación genotípica con marcadores moleculares SCAR.** Se utilizaron tres primers de marcadores moleculares SCAR (Cuadro 4), para identificar los genes *Phg-1*, *Phg-2* y G10474.

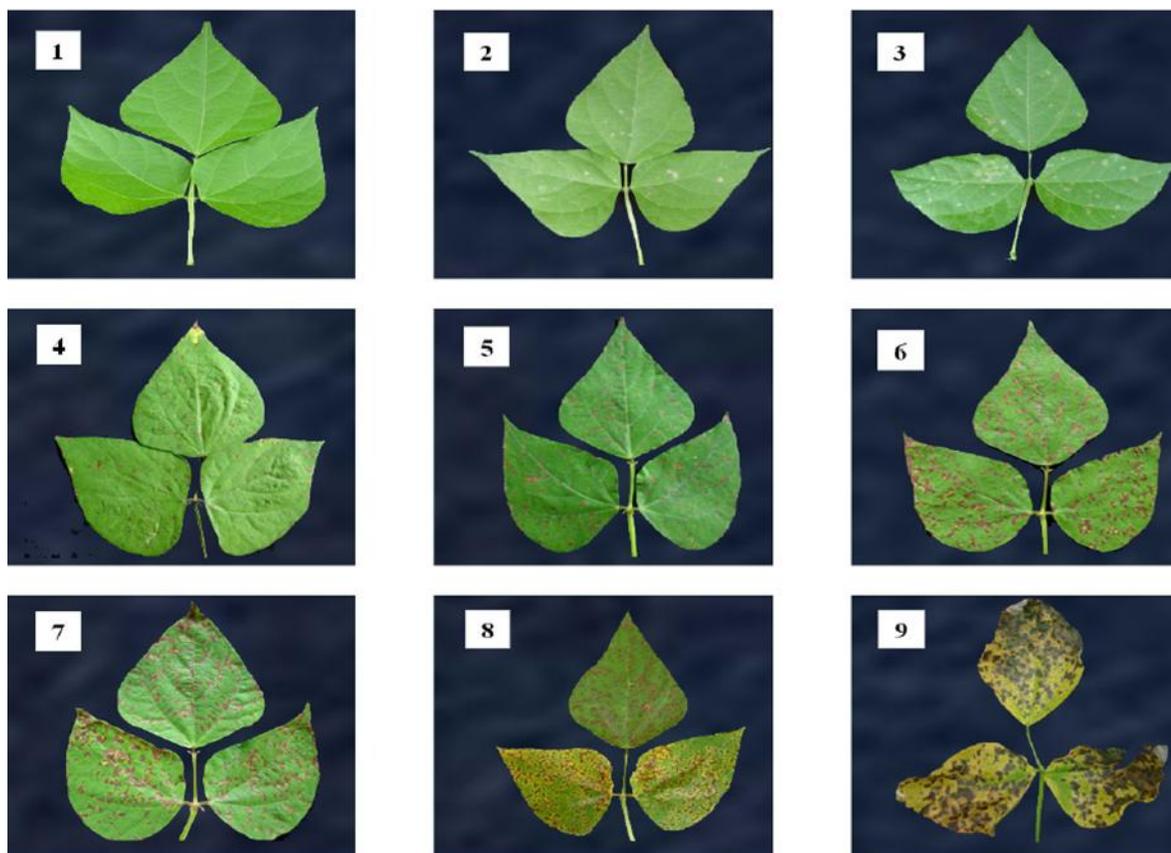


Figura 1. Escala de severidad de daño (1-9) establecida por el CIAT (1987).

Cuadro 4. Primers de marcadores moleculares SCAR para identificar genes con resistencia a *Phaeoisariopsis griseola*.

SCAR	Tamaño (pb)	Secuenciación de avance	Secuenciación de reversa	Gen
SH13	520	GAC GCC ACA CCC ATT ATG TT	GCC ACA GAC ATG GAG CTT TA	<i>Phg-1</i>
SNO2	890	ACC AGG GGC ATT ATG AAC AG	ACC AGG GGC AAC ATA CTA TG	<i>Phg-2</i>
EACA/M- CTT 330	305 R/280 S	CTT GTT CTG AGT CAT TTA CCT TGC	GAA TTC ACA GTC CAA ACT CTA ATC	G10474

Fuente: *Phg-1* (Queiroz *et al.* 2004a); *Phg-2* (Nietsche *et al.* 2000 y Miklas 2002); Gen G10474 (Mahuku *et al.* 2004).

**Utilización de marcadores moleculares tipo SCAR.** Para identificar la presencia o ausencia de los genes resistentes a *P. griseola* en las 34 líneas de frijol evaluadas, se utilizaron los protocolos de extracción, cuantificación, dilución, amplificación y separación de ADN establecidos por la Universidad de Wisconsin- Madison.

**Extracción de ADN.** Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de la Universidad de Wisconsin-Madison. El ADN se extrajo de los primeros brotes de plantas de dos semanas de edad. Las muestras se recolectaron de plantas individuales en micro tubos *ependorf* de 1.5 mL, se agregó 50 µL de buffer PEX (Etil xantogenato de potasio) para macerar el tejido en el micro tubo usando una barra *pestle* de plexiglass de laboratorio, se le adicionó 450 µL de buffer PEX. Las muestras se colocaron en baño María a 65 °C por 60 min; para concentrar los residuos de tejido las muestras se centrifugaron a 14000 RPM por 10 min. Luego se precipitaron los ácidos nucleicos, llenando los micro tubos con una mezcla 6:1 etanol: acetato de amonio 7.5 M. por 30 min a temperatura ambiente; se peletizaron los ácidos nucleicos centrifugando las muestras a 3000 RPM durante 10 min. A los micro tubos con tejido se les adicionó 300 µL de RNAasa (100 µg/mL) + buffer TE 0.1X y se colocaron en baño maría a 37 °C por 1 hora, para eliminar el ARN de las muestras. Posteriormente se precipitó el ADN llenando los micro tubos con una mezcla de 10:1 etanol: acetato de sodio (3M), se mezcló invirtiendo los micro tubos, para permitir que se precipite el ADN a temperatura ambiente por 30 min. Para peletizar el ADN las muestras se centrifugaron a 3000 RPM por 5 min. El tejido de ADN lavado con etanol al 70% y secado a temperatura ambiente por 3 horas se rehidrató con 100 µL de buffer TE 0.1X y se almacenó a -20 °C.

**Cuantificación de ADN.** Para determinar la concentración de ADN de cada una de las muestras se siguió el protocolo sugerido en el manual del módulo de Diagnóstico Molecular (Guachambala *et al.* 2008.) Se utilizó un fluorómetro Hoefer TKO-100,  $\lambda_{ex}$  + 365nm,  $\lambda_{em}$  + 460 nm, calibrado con ADN estándar bovino, concentrado a 100 ng/mL Para calibrar el fluorómetro se mezcló 2 mL de buffer de cuantificación TNE (100 mL de TNE 1X, pH=7.4 y 10 µL de solución para tinción concentrada Dye) con 2µL de ADN estándar bovino, en una cubeta de cuarzo puro, para minimizar el margen de error al momento de la lectura. Luego de la calibración el procedimiento se repitió utilizando 2 µL de ADN puro de cada una las muestras. La concentración mínima de ADN que se necesita para un protocolo SCAR es de 30 ng/mL.

**Dilución de ADN.** Una vez que se obtuvo el dato de concentración de ADN, las muestras que presentaron concentraciones de ADN mayor a 30 ng/mL se diluyeron con buffer TE 0.1X, para que todo el ADN tuviera la misma capacidad de amplificarse.

La dilución se hizo utilizando la fórmula: 
$$V_i = \frac{(C_f \times V_f)}{C_i} - V_b$$

$V_i$ : Volumen inicial (µL),  $C_f$ : Concentración final (ng/mL),  $V_b$ : Volumen del buffer de dilución TE 0.1X (100 µL),  $C_i$ : Concentración inicial (ng/mL),  $V_f$ : Volumen final (100 µL).

**Amplificación de ADN.** El ADN se amplificó en un termociclador Techne Unit TC-512 (Thermal cycler), utilizando tres primers o cebadores (SH13, SNO2 y EACA/M-CTT 330), con diferentes protocolos (Cuadros 5, 7 y 10) y perfiles térmicos (Cuadros 6, 8 y 11).

**Visualización de ADN.** Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa a 1.2% (SH13 y SNO2) y 1.5% (EACA/M-CTT 330), en solución tampón TE 0.5X (Tris-HCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA) en tanques de electroforesis. Se utilizó una escalera molecular de 100 pares de bases, para verificar la presencia o ausencia de bandas. Las bandas fueron separadas en un Transphor/ Electrophoresis de 2.5 amperios a 110 Voltios durante 1 h 10 min. Luego los geles de agarosa fueron teñidos en una solución 1:10 de bromuro de etidio por 20 min y después se pasaron a agua destilada durante 15 min para lavar excesos de bromuro de etidio. Las bandas de ADN se visualizaron en el transiluminador Benchtop, UVP, modelo M- 26 VX (95-0413-01), con una longitud de onda de 302 nm, a los geles de agarosa se les tomó una fotografía bajo luz ultravioleta para registrar los resultados.

**Protocolos de marcadores moleculares SCAR.** Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se preparó la mezcla maestra para cada protocolo (SH13 y SNO2) con agua bi-destilada, buffer (5X) para mantener el pH estable (6.5 a 7.0), dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatos), MgCl<sub>2</sub> (Cloruro de magnesio), primers de avance y de reversa (10 mM), Taq (*Thermus aquaticus*) polimerasa (5 U/μL) y ADN (30 ng/mL) (Cuadros 5 y 7).

Para identificar la presencia del gen *Phg-1* se utilizó el protocolo del marcador SCAR SH13 (Cuadros 5 y 6). El control positivo para este gen de resistencia a la mancha angular es la línea AND 277 de origen andina, el tamaño de la banda es 520 pares de bases (pb), se utilizó una escalera de 100 pb. La PCR permite amplificar el ADN combinando ciclos de tiempo y temperatura, específicos para cada marcador molecular (Queiroz *et al.* 2004a).

El protocolo de la PCR que se utilizó para identificar el gen *Phg-2* del SCAR SNO2 (Cuadros 7 y 8), que posee resistencia a la mancha angular. El control positivo con resistencia a mancha angular es la línea Cornell 49242 de origen mesoamericana, el tamaño de la banda es 890 pb. Se utilizó una escalera 100 pb (Nietsche *et al.* 2002).

### Adaptación del protocolo para el marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330.

En el 2004 un grupo de investigadores convirtieron el marcador AFLP (siglas en ingles de la amplificación de fragmentos polimorficos) a un marcador SCAR, utilizando tres primers (E-ACA/M-CTT 330, E-AAC/M-CAG 310 y E-AAC/M-CAT 285), pero solo el primer E-ACA/M-CTT 330 fue convertido con éxito a una secuencia codominante SCAR, localizado a 5 cM (centimorgan) del gen de resistencia contenido en la accesión G10474 (Mahuku *et al.* 2004).

El procedimiento para adaptar el protocolo del marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330 (Mahuku *et al.* 2004), que indica la presencia del gen G10474, a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano (Cuadros 10 y 11), se realizó de la siguiente manera: La extracción, cuantificación, dilución y amplificación del ADN se llevo a cabo utilizando los mismos reactivos, pero modificando el Tris- HCl, KCl y la concentración de ADN (20 ng/mL) y adicionando agua bidestilada y buffer 5X en la preparación de la mezcla maestra para la PCR. La PCR se llevó a cabo utilizando muestras de ADN de los genotipos G10474, Tío Canela 75 y MEX 54 en las mezclas maestras y utilizando 12 gradientes de temperatura de acople de primers (55.6, 56.2, 57, 57.9, 58.7, 59.6, 60.2, 61.2, 62.2, 63, 63.8 y 64.2 °C). El corrido electroforetico con los productos de la PCR se hizo usando agarosa al 1.5%, 110 voltios por dos horas y empleando una escalera molecular de 50 pb. Una vez que se determinó que la mejor temperatura de acople fue la de 59.6 °C, la cual permitió visualizar las bandas más claras y estaba cerca de la temperatura de acople 60 °C (Mahuku *et al.* 2004), se repitió la PCR con las tres muestras utilizando esta temperatura de acople, para asegurarnos de la validez del protocolo.

Luego de haber logrado el funcionamiento del protocolo EACA/M-CTT 330, se evaluaron las 34 líneas de frijol para identificar la presencia del gen específico G10474. El control positivo con resistencia a la mancha angular utilizado fue la accesión G10474; este gen presenta codominancia a 305 pb en líneas resistentes y 280 pb en líneas susceptibles. Se utilizó una escalera molecular de 100 pb.

Cuadro 5. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo SCAR SH13 e identificar la presencia del gen *Phg-1*.

Reactivos	$\mu\text{L}/\text{muestra de ADN}$	$\mu\text{L}/ 34 \text{ muestras de ADN}$
DD H <sub>2</sub> O	7.1	241.4
Buffer 5X	3.0	102.0
dNTP's sin MgCl <sub>2</sub>	1.2	40.8
Primer (F) SH13 (F)	0.5	17.0
Primer(R) SH13 (R)	0.5	17.0
Taq Polimerasa	0.7	23.8
ADN (30 ng/mL)	2.0	
Total	15.0	442.0

Fuente: Queiroz *et al.* 2004a.

Cuadro 6. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el protocolo SCAR SH13 e identificar la presencia del gen *Phg-1*.

<b>Fases de la PCR</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización	94	30	1
Desnaturalización inicial	94	30	35
Acoplamiento de primers	59	60	35
Extensión	72	90	35
Extensión final	72	90	1

Fuente: Queiroz *et al.* 2004a.

Cuadro 7. Mezcla maestra para la reacción en cadena de la polimerasa para protocolo SCAR SNO2 e identificar la presencia del gen *Phg-2*.

<b>Reactivos</b>	<b>μL/muestra de ADN</b>	<b>μL/ 34 muestras de ADN</b>
DD H <sub>2</sub> O	6.5	221.0
Buffer 5X	2.0	68.0
dNTP's con MgCl <sub>2</sub>	1.0	34.0
Primer (F) SH13 (F)	1.4	47.6
Primer(R) SH13 (R)	1.4	47.6
Taq Polimerasa	0.2	6.8
ADN (30 ng/mL)	2.5	
<b>Total</b>	<b>15.0</b>	<b>425.0</b>

Fuente: Nietsche *et al.* 2002.

Cuadro 8. Perfil térmico para la reacción en cadena de la polimerasa para el marcador molecular SCAR SNO2 e identificar gen *Phg-2*.

<b>Fases de la PCR</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización	94	30	1
Desnaturalización inicial	94	30	30
Acoplamiento de primers	65	60	30
Extensión	72	90	30
Extensión final	72	90	1

Fuente: Nietsche *et al.* 2002.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización patogénica de *Phaeoisariopsis griseola*.** La evaluación fenotípica de las líneas diferenciales con los tres aislamientos de *P. griseola* de Honduras, se hizo en casas de malla con micro aspersión del PIF. Al evaluarse los aislamientos de *P. griseola* recolectados en Honduras se caracterizaron tres razas (Cuadro 10), esto demuestra la gran variabilidad patogénica de la mancha angular. Para evaluar la reacción de severidad se utilizó la escala 1-9, considerando como resistentes las plantas que presentaron una severidad de daño de 1-3 y susceptibles de 4-9. Las razas caracterizadas (31-63, 62-33 y 63-63) a través de las 12 líneas diferenciales corresponden a los aislamientos *Pg. ZII*, *Pg. O* y *Pg. PRR*, respectivamente. El aislamiento *Pg. PRR* caracterizado como la raza 63-63 fue el más virulento, afectando a todas las líneas diferenciales andinas y mesoamericanas. El aislamiento *Pg. O* fue el menos virulento, afectó a la mayoría de diferenciales andinos excepto la línea diferencial Don Timoteo.

La línea diferencial G5686 fue la que mostró mayor resistencia a las tres razas de la mancha angular, tuvo resistencia similar a la línea testigo G06727, ambas andinas. De las tres razas de *P. griseola* caracterizadas, la 31-63 y 63-63 se encuentran presentes en Nicaragua, Costa Rica y Honduras (Mahuku *et al.* 2004).

Cuadro 9. Razas de los tres aislamientos de *Phaeoisariopsis griseola*, caracterizadas mediante 12 líneas diferenciales de la mancha angular del frijol común.

Número	Líneas diferenciales	Reacción a aislamientos			Valor binario
		<i>Pg. ZII</i>	<i>Pg. O</i>	<i>Pg. PRR</i>	
1	Don Timoteo	S	R	S	1
2	G11796	S	S	S	2
3	Bolón Bayo	S	S	S	4
4	Montcalm	S	S	S	8
5	Amendoin	S	S	S	16
6	G5686	R	S	S	32
7	PAN 72	S	S	S	1
8	G2858	S	R	S	2
9	Flor de Mayo	S	R	S	4
10	MEX 54	S	R	S	8
11	BAT 332	S	R	S	16
12	Cornell 49242	S	S	S	32
<b>Razas</b>		<b>31-63</b>	<b>62-33</b>	<b>63-63</b>	

S: susceptible, R: resistente.

**Marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330.** La adaptación del protocolo para el marcador molecular EACA/M-CTT 330, a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF, es de mucha utilidad para identificar fuentes de resistencia a la mancha angular.

Para la amplificación del SCAR EACA/M-CTT 330, se modificaron las cantidades de los reactivos sugeridos (Mahuku *et al.* 2004). Para ello a la mezcla maestra se le adicionó agua bidestilada y buffer 5X (Cuadro 11). Con esta mezcla modificada se amplificaron 34 muestras de ADN, utilizando 12.5 µL de mezcla maestra por muestra más 2.5 µL de ADN puro.

Cuadro 10. Variaciones en la mezcla maestra para amplificar el marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330.

Reactivos	Concentración de reactivos	µL/ muestra de ADN recomendado	µL/ muestra de ADN
DD H <sub>2</sub> O		0.00	5.60
Buffer 5X		0.00	2.50
dNTP's	0.25 mM	3.12	2.00
MgCl <sub>2</sub>	1.50 mM	0.75	0.50
Primer (F) EACA/M-CTT 330	0.50 mM	0.62	0.60
Primer (R) EACA/M-CTT 330	0.50 mM	0.62	0.60
Taq Polimerasa	1 unidad	2.50	0.70
ADN	20 ng/mL	8.30	2.50

Utilizando un rango de temperatura de acople de primer de 55.5 a 64.2 °C (Figura 2) se logró determinar el perfil térmico adecuado a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF, siendo esta temperatura la de 59.6 °C, que difiere ligeramente a la temperatura de acople de primers sugerida (60 °C) (Mahuku *et al.* 2004).

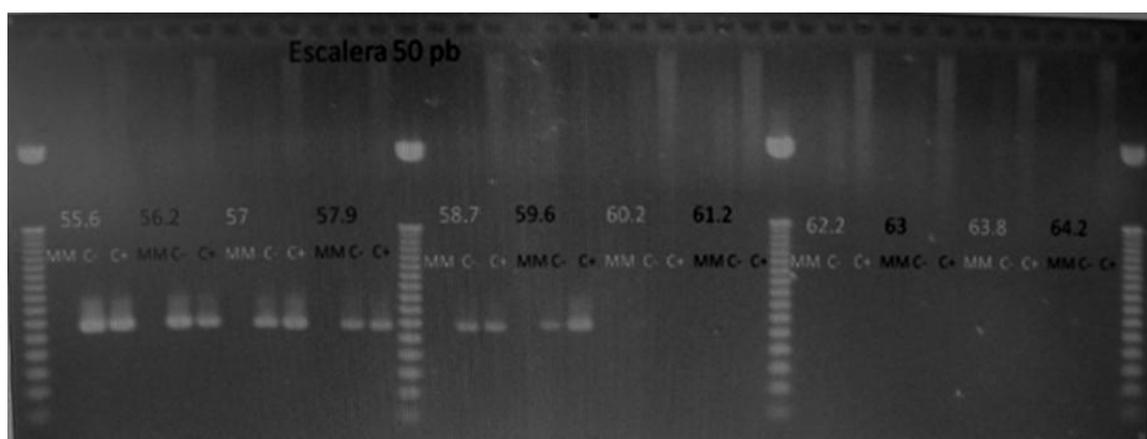


Figura 2. Diferentes temperaturas de acople de primer EACA/M-CTT 330.

La temperatura de acople de los primers es importante para obtener bandas claras del gen que se quiere identificar, para ello se utilizó el perfil térmico recomendado (Mahuku *et al.* 2004), donde difiere ligeramente en la temperatura de acople de primers de 60 °C a 59.6 °C (Cuadro 11).

Cuadro 11. Perfil térmico para la Reacción en Cadena de la Polimerasa del marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330.

<b>Fases de la PCR</b>	<b>Temperatura recomendada (°C)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>
Desnaturalización	94.0	94.0	300
Desnaturalización inicial	94.0	94.0	30
Acoplamiento de primers	60.0	59.6	45
Extensión	72.0	72.0	30
Extensión final	72.0	72.0	600

### **Evaluación genotípica con marcadores moleculares SCAR.**

La evaluación genotípica de las 34 líneas de frijol común con los marcadores moleculares SCAR fue realizada para identificar la presencia de los genes *Phg-1*, *Phg-2* y G10474 de resistencia a *P. griseola*, utilizando los marcadores SH13, SNO2 y EACA/M-CTT 330, respectivamente.

Para comprobar la validez del protocolo EACA/M-CTT 330 adaptado a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF, este se usó para amplificar el ADN de las 34 líneas de frijol común e identificar la presencia del gen G10474, donde se puede observar que las bandas de ADN amplificadas son claras (Figuras 3, 4, 5 y 6).

Se realizó un estudio donde indica que el marcador SCAR EACA/M-CCT 330 fue codominante; es decir el fragmento asociado con resistencia a *P. griseola* está a 305 pb y el fragmento susceptible a 280 pb (Figura 3), las líneas diferenciales de origen andino presentaron susceptibilidad a *P. griseola* (280 pb) y las de origen mesoamericano fueron resistentes (305 pb) excepto la línea mesoamericana MEX 54 la cual mostró susceptibilidad debido a que presentó la banda a 280 pb (Mahuku *et al.* 2004). Los resultados obtenidos con el primer EACA/M-CTT 330 permitieron identificar la presencia del gen G10474 en las líneas diferenciales de frijol común de origen mesoamericano Tío Canela 75 (1), Pan 72 (9), G2858 (10), Flor de Mayo (11), BAT 332 (13) y Cornell (14) a 305 pb; MEX 54 (12) fue la única línea de origen mesoamericano que mostró la banda a 280 pb, las líneas diferenciales de origen andino Don Timoteo (3), G11796 (4), Montcalm (6) y Amendoin (7) mostraron la banda a 280 pb.

Comparando las reacciones fenotípicas de resistencia a la raza 63-63 con las del marcador molecular SCAR EACA/M-CTT 330, se encontró que de las seis líneas resistentes a la raza 63-63 cinco presentaron el gen G10474 excepto la línea G06727 (Cuadro 12).

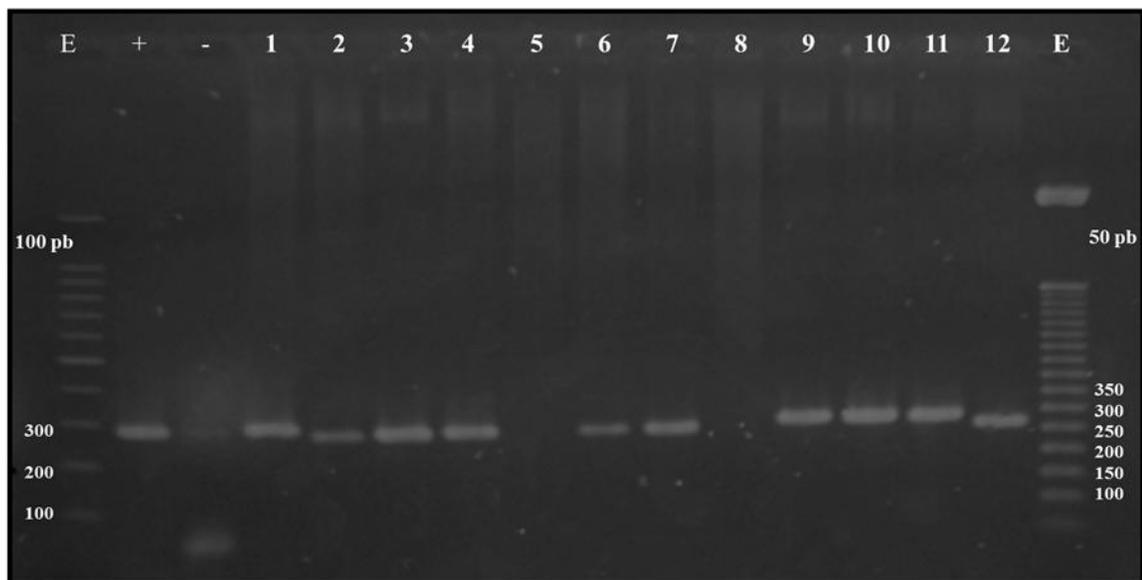


Figura 3. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de 12 líneas de frijol común para identificar la presencia del gen G10474. Líneas 2-8 son andinas, líneas 1, 9-12 son mesoamericanas. **E:** Escalera molecular de 100, + (Control positivo G10474), - (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **1** (Tío Canela 75), **2** (G06727), **3** (Don Timoteo), **4** (G11796), **5** (Bolón Bayo), **6** (Montcalm), **7** (Amendoin), **8** (G5686), **9** (Pan 72), **10** (G2858), **11** (Flor de Mayo), **12** (MEX 54).

Las líneas de frijol común de la 15-23 pertenecen al ensayo regional de la mancha angular (ERMAN) y han sido seleccionadas por presentar resistencia a *P. griseola*; los resultados moleculares muestran que estas líneas presentaron la banda de resistencia a 305 pb, lo que demuestra que el cruce de ALS 9951-42 y ALS 9951-62 con MR 13697-2-5 confiere el gen G10474 de resistencia a la mancha angular (Figuras 4 y 5).

Las bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 muestran que las líneas SX 14816-71 (24), MER 2221-20 (25), AMFF 1-12-1-17-1 (27) y SJC 730-70 (31) presentaron la banda a 305 pb excepto la línea AMFF 1-12-16-2 (26) que presentó la banda a 280 pb, comparando los resultados fenotípicos esta línea es susceptible a las tres razas de *P. griseola* caracterizadas en el estudio (Figura 5).

Las líneas Bolón Bayo (5) y G5686 (8) de origen andino, debieron mostrar bandas a 280 pb esto se atribuye a que la concentración de ADN en cada muestra no fue suficiente para que se amplificara el gen G10474; las líneas de frijol común MHR 314-18, ALS 9951-101-R1, SEQ 341-99, SJC 730-40 y SEQ 342-87 no mostraron presencia de ninguna banda (305 y 380 pb), esto se debe a que el gen G10474 no estaba presente en estas líneas.

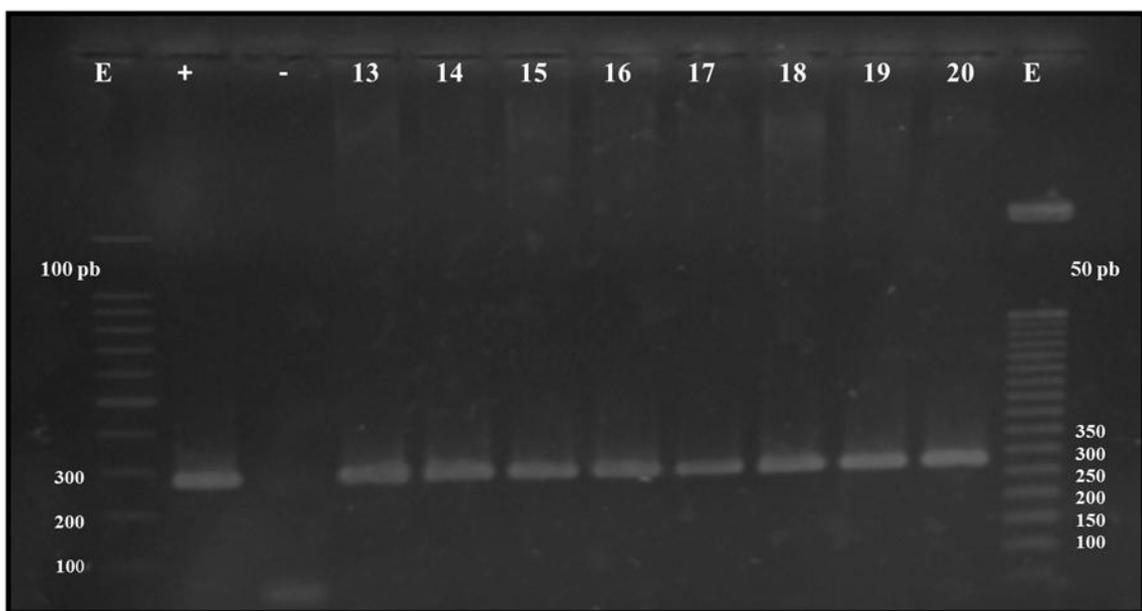


Figura 4. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de líneas de frijol común (13-20) para identificar la presencia del gen G10474. **E**: Escalera molecular de 100, + (Control positivo G10474), - (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **13** (BAT 332), **14** (Cornell 49242), **15** (ALS 0531-41), **16** (ALS 0531-97), **17** (ALS 0532-4), **18** (ALS 0532-6), **19** (ALS 0532-38), **20** (ALS 0546-60).

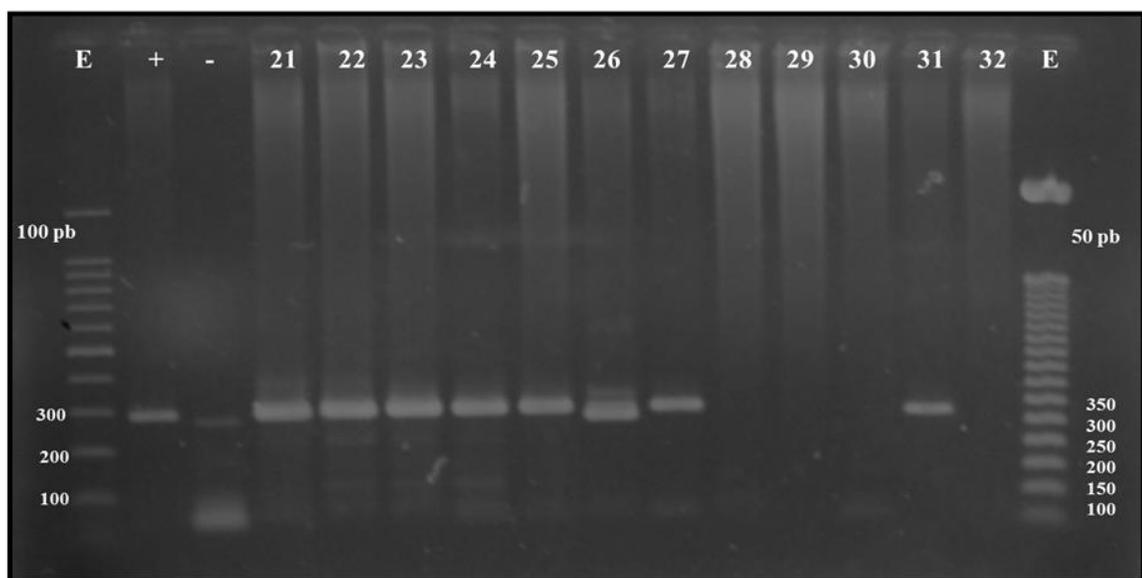


Figura 5. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de líneas de frijol común (21-32) para identificar la presencia del gen G10474. **E**: Escalera molecular de 100, + (Control positivo G10474), - (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **21** (ALS 0546-78), **22** (ALS 0546-97), **23** (ALS 0626-35), **24** (SX 14816-71), **25** (MER 2221-20), **26** (AMFF 1-12-16-2), **27** (AMFF 1-12-1-17-1), **28** (MHR 314-18), **29** (ALS 9951-101-R1), **30** (SEQ 341-99), **31** (SJC 730-70), **32** (SJC 730-40).

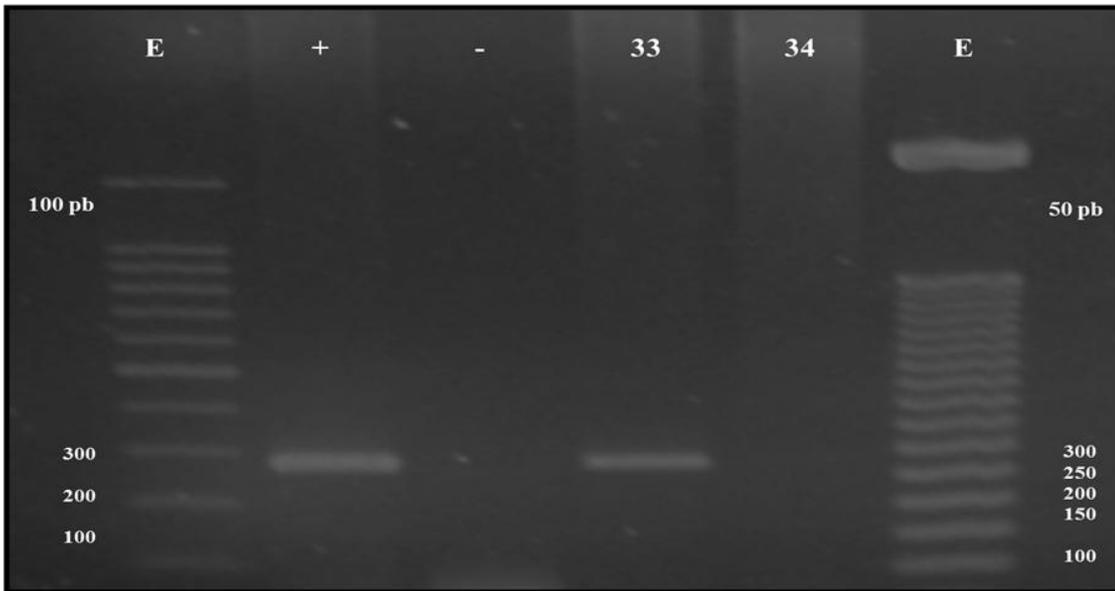


Figura 6. Bandas generadas por el primer EACA/M-CTT 330 en ADN de líneas de frijol común (33 y 34) para identificar la presencia del gen G10474. **E:** Escalera molecular de 100, + (Control positivo G10474), - (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **33** (G10474), **34** (SEQ 342-87).

**Marcador molecular SCAR SH13.** Para llevar a cabo la amplificación del marcador SH13 se utilizó como control positivo la línea AND 277 de origen andino. Este cultivar es una fuente importante de resistencia para la mancha angular ya que posee el gen *Phg-1* que confiere resistencia específicamente a la raza 63-23 de *Phaeoisariopsis griseola* (Carvalho *et al.* 1998, Queiroz *et al.* 2004)

De las 34 líneas de frijol evaluadas con el marcador SH13, siete líneas presentaron la banda a 520 pb, que expresa la presencia de este marcador ligado al gen de resistencia de la mancha angular (Figuras 7, 8 y 9).

La línea G06727 (2) de origen andino se usó como testigo resistente a la mancha angular el cual efectivamente presento alta resistencia a las tres razas caracterizadas en el estudio, además se observa la presencia del gen *Phg-1* (Figura 7). La presencia del gen *Phg-1* solo se observó en las líneas ALS 0626-35 (23), AMFF 1-12-1-16-2 (27), AMFF 1-12-1-17-1 (28), SJC 730-70 (31) y SEQ 342-87 (34), según lo reportado (Queiroz *et al.* 2004) este gen confiere resistencia a la raza 63-23 de la mancha angular (Figuras 7, 8 y 9).

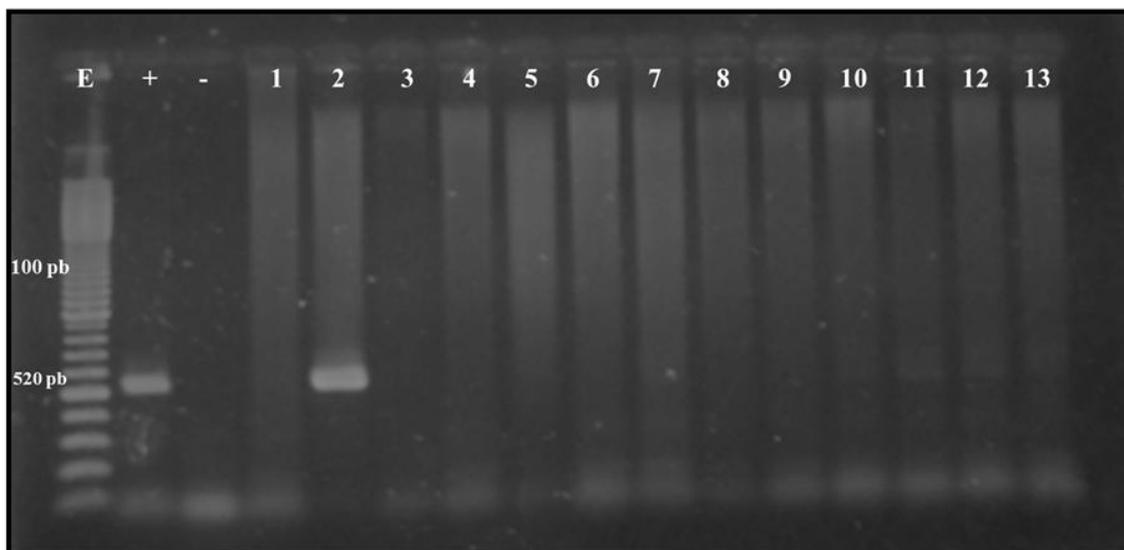


Figura 7. Bandas generadas por el primer SH13 en ADN de líneas de frijol común (1-13) para identificar la presencia del gen *Phg-1*. **E**: Escalera molecular de 100 pb, **+** (Control positivo AND 277), **-** (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **1** (Tío Canela 75), **2** (G06727), **3** (Don Timoteo), **4** (G11796), **5** (Bolón Bayo), **6** (Montcalm), **7** (Amendoin), **8** (G5686), **9** (Pan 72), **10** (G2858), **11** (Flor de Mayo), **12** (MEX 54), **13** (BAT 332).

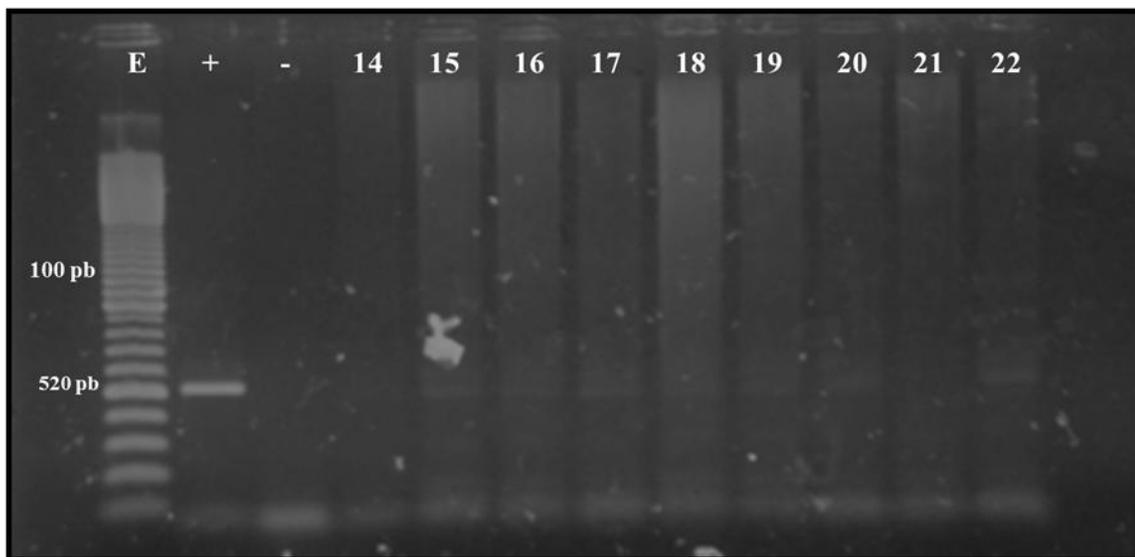


Figura 8. Bandas generadas por el primer SH13 en ADN de líneas de frijol común (14-22) para identificar la presencia del gen *Phg-1*. **E**: Escalera molecular de 100 pb, **+** (Control positivo AND 277), **-** (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **14** (Cornell 49242), **15** (ALS 0531-41), **16** (ALS 0531-97), **17** (ALS 0532-4), **18** (ALS 0532-6), **19** (ALS 0532-38), **20** (ALS 0546-60), **21** (ALS 0546-78), **22** (ALS 0546-97).

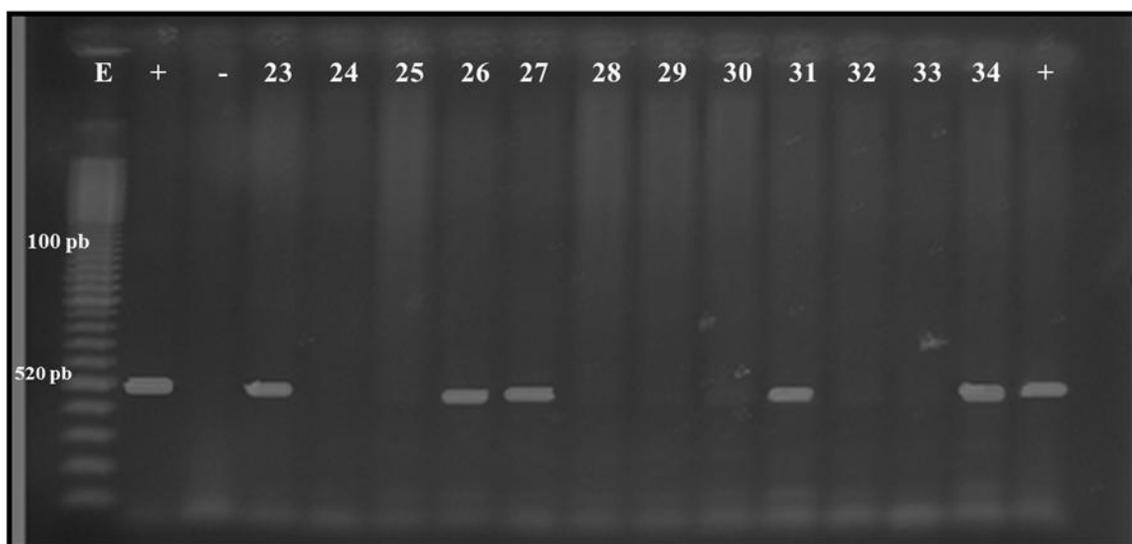


Figura 9. Bandas generadas por el primer SH13 en ADN de líneas de frijol común (23-34) para identificar la presencia del gen *Phg-1*. E: Escalera molecular de 100 pb, + (Control positivo AND 277), - (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **23** (ALS 0626-35), **24** (SX 14816-71), **25** (MER 2221-20), **26** (AMFF 1-12-16-2), **27** (AMFF 1-12-1-17-1), **28** (MHR 314-18), **29** (ALS 9951-101-R1), **30** (SEQ 341-99), **31** (SJC 730-70), **32** (SJC 730-40), **33** (G10474), **34** (SEQ 342-87).

**Marcador molecular SCAR SNO2.** Para amplificar el marcador SCAR SNO2 se utilizó como control positivo la línea Cornell 49242 de origen mesoamericano, que indica la presencia del gen *Phg-2* que confiere resistencia a la mancha angular, específicamente a la raza 31-17 (Nietsche *et al.* 2000).

De las 34 líneas evaluadas con el marcador SCAR SNO2, 26 líneas de frijol presentaron la banda de resistencia a la mancha angular a 890 pb (Figura 10).

La presencia del gen *Phg-2* se encontró en líneas resistentes y susceptibles a las tres razas (31-63, 62-22 y 63-63), al comparar los resultados fenotípicos con los moleculares se asume que la presencia del gen no provee resistencia a las razas caracterizadas en el estudio, pero si es útil para la selección asistida con marcadores moleculares.

La línea de frijol común MEX 54 de origen mesoamericano posee tres genes (*Phg-2*, *Phg-5* y *Phg-6*) de resistencia a la mancha angular, por ello es una fuente importante de resistencia para los programas de mejoramiento genético destinados a piramidar genes de resistencia (Caixeta *et al.* 2005). Los resultados moleculares del estudio muestran que la línea de frijol común MEX 54 presenta el gen *Phg-2* de resistencia a la mancha angular (Figura 10).

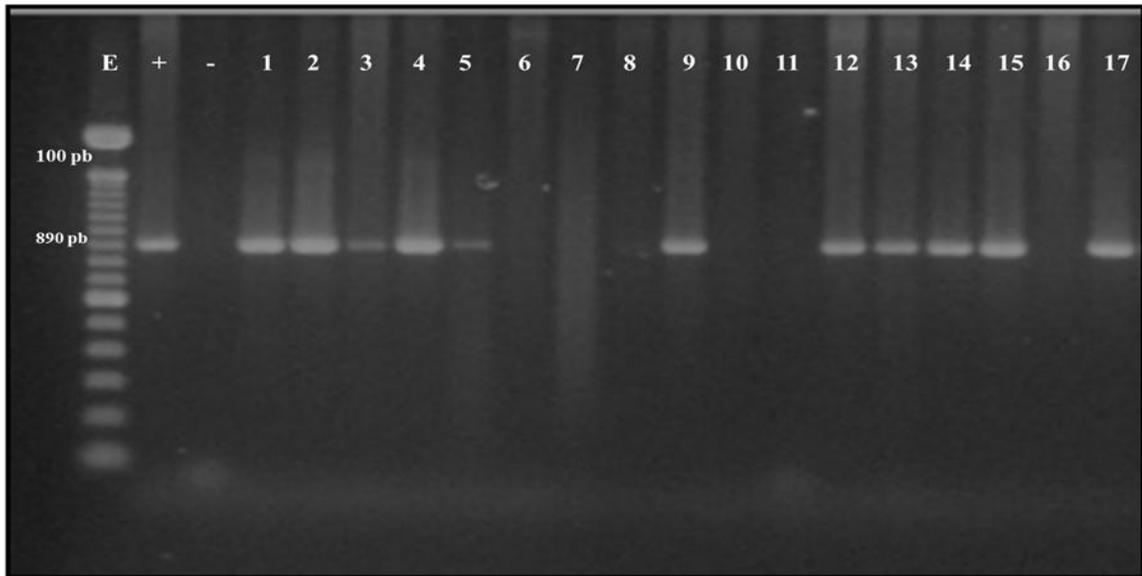


Figura 10. Bandas generadas por el primer SNO2 en ADN de líneas de frijol común (1-17) para identificar la presencia del gen *Phg-2*. **E**: Escalera molecular de 100, + (Control positivo Cornell 49242), - (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **1** (Tío Canela 75), **2** (G06727), **3** (Don Timoteo), **4** (G11796), **5** (Bolón Bayo), **6** (Montcalm), **7** (Amendoin), **8** (G5686), **9** (Pan 72), **10** (G2858), **11** (Flor de Mayo), **12** (MEX 54), **13** (BAT 332), **14** (Cornell 49242), **15** (ALS 0531-41), **16** (ALS 0531-97), **17** (ALS 0532-4).

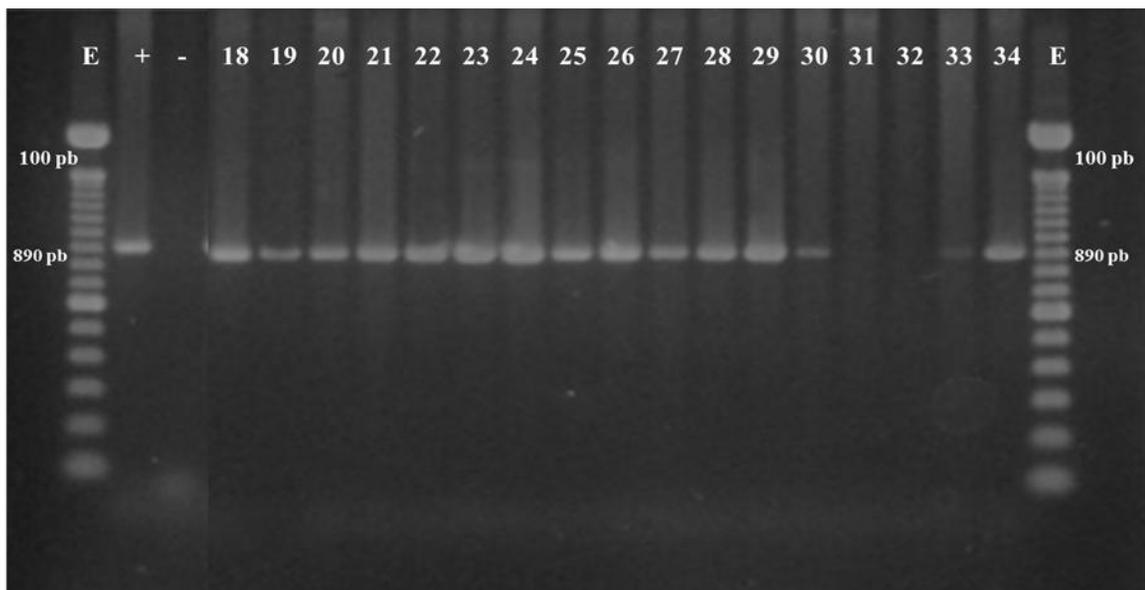


Figura 11. Bandas generadas por el primer SON2 en ADN de líneas de frijol común (18-34) para identificar la presencia del gen *Phg-2*. **E**: Escalera molecular de 100 pb, + (Control positivo Cornell 49242), - (Mezcla maestra sin ADN control negativo), **18** (ALS 0532-6), **19** (ALS 0532-38), **20** (ALS 0546-60), **21** (ALS 0546-78), **22** (ALS 0546-97), **23** (ALS 0626-35), **24** (SX 14816-71), **25** (MER 2221-20), **26** (AMFF 1-12-16-2), **27** (AMFF 1-12-1-17-1), **28** (MHR 314-18), **29** (ALS 9951-101-R1), **30** (SEQ 341-99), **31** (SJC 730-70), **32** (SJC 730-40), **33** (G10474), **34** (SEQ 342-87).

Los resultados con los marcadores moleculares muestran que de las 34 líneas evaluadas, solo las líneas ALS 0626-35 y AMFF 1-12-1-17-1 presentaron los tres genes que confieren resistencia a la mancha angular (Cuadro 13). La línea ALS 0626-35 es derivada de la cruce Cardenal// F1 (ALS 9951-62/MR 13697-2-5); la línea ALS 9951-62 es derivada de la cruce Tío Canela 75 × G06727 y es resistente a la raza 15-17 de *P. griseola* debido al gen *Phg-2* procedente del padre andino G06727 (Zeledon 2003). Sin embargo, al comparar los resultados de la evaluación fenotípica con los aislamientos de *P. griseola* (Cuadro 10) y de los marcadores SCAR (Cuadro 13) obtenidos en el estudio, indican que la línea ALS 0626-35 es susceptible a las razas 63-63 y 31-63 de *P. griseola*.

La línea AMFF 1-12-1-17-1 presentó los tres genes *Phg-1*, *Phg-2* y G10474, pero fue susceptible a las tres razas de la mancha angular.

Comparando las reacciones fenotípicas de las líneas G06727, ALS 0531-97, ALS 0532-6, ALS 0532-38, ALS 0546-97 y G10474 a las razas 31-63, 62-33 y 63-63 con las de los marcadores moleculares SCAR SH13, SNO2 y EACA/M-CTT 330, se trató de identificar líneas que fueran resistentes a las tres razas de *P. griseola* y asociar la resistencia con la presencia de los genes *Phg-1*, *Phg-2* y G10474, pero no hubo relación ya que los genes también estuvieron presentes en las líneas Tío Canela 75, SX 14816-71, AMFF 1-12-16-2, AMFF 1-12-1-17-1, ALS 9951-101-R1, SJC 730-70 y SJC 730-40 susceptibles a las tres razas caracterizadas.

Cuadro 12. Evaluación de los marcadores moleculares SCAR para identificar la presencia de los genes *Phg-1*, *Phg-2* y G10474 en las 34 líneas de frijol común.

Numero	Líneas	Genes de resistencia a <i>Phaeoisariopsis griseola</i>		
		<i>Phg-1</i>	<i>Phg-2</i>	G10474
1	Tío Canela 75	-	+	+
2	G06727	+	+	-
3	Don Timoteo	-	+	-
4	G11796	-	+	-
5	Bolón Bayo	-	+	¶
6	Montcalm	-	-	-
7	Amendoin	-	-	-
8	G5686	-	-	-
9	PAN 72	-	+	+
10	G2858	-	-	+
11	Flor de Mayo	-	-	+
12	MEX 54	-	+	-
13	BAT 332	-	+	+
14	Cornell 49242	-	+	+
15	ALS 0531-41	-	+	+
16	ALS 0531-97	-	-	+
17	ALS 0532-4	-	+	+
18	ALS 0532-6	-	+	+
19	ALS 0532-38	-	+	+
20	ALS 0546-60	-	+	+
21	ALS 0546-78	-	+	+
22	ALS 0546-97	-	+	+
23	ALS 0626-35	+	+	+
24	SX 14816-71	-	+	+
25	MER 2221-20	-	+	+
26	AMFF 1-12-16-2	+	+	-
27	AMFF 1-12-1-17-1	+	+	+
28	MHR 314-18	-	+	¶
29	ALS 9951-101-R1	-	+	¶
30	SEQ 341-99	-	+	¶
31	SJC 730-70	+	-	+
32	SJC 730-40	-	-	¶
33	G10474	-	+	+
34	SEQ 342-87	+	+	¶

-: Ausente

+: Presente

¶: No presentó la banda esperada.

#### 4. CONCLUSIONES

- Se caracterizaron las razas de tres aislamientos de *P. griseola* recolectados en Honduras, las cuales fueron identificadas como las razas 31-63, 62-33 y 63-63, mediante el uso del vivero de diferenciales.
- Se implementó el uso del protocolo SCAR EACA/M-CTT330 para identificar la presencia del gen G10474 resistente a la raza 63-63.
- La evaluación fenotípica permitió identificar 10 líneas resistentes a la raza 31-63, 14 líneas a la raza 62-33 y seis a la raza 63-63; pero sólo seis líneas resultaron resistentes a las tres razas.
- Con los marcadores SCAR SH13, SNO2 y G10474, se confirmó la presencia de los genes *Phg-1*, *Phg-2* y G10474 en las líneas mejoradas de frijol AMFF 1-12-1-17-1 y ALS 0626-35.

## 5. RECOMENDACIONES

- Utilizar las líneas G10474 (Guatemala 889), AMFF 1-12-1-17-1 y ALS 0626-35 como progenitores para el mejoramiento y la ampliación de fuentes de resistencia del frijol a la mancha angular.
- Utilizar los marcadores SCAR de los genes *Phg1*, *Phg2* y G10474, en la selección asistida con marcadores en el Programa de Investigaciones en Frijol.
- Caracterizar otros aislamientos de *P. griseola* para conocer la variabilidad patogénica de la mancha angular en Honduras y Centro América.

## 6. LITERATURA CITADA

Barros, O; C. Cardona; R. Cardeñosa y R.L. Skiles.1958. Angular leaf spot of bean in Colombia. Plant Disease Report 42:420-424.

Beebe, S.E y M.A. Pastor Corrales. 1991. Breeding for disease resistance. *In*: A.V. Schonhoooven; O. Voysest (eds). Research for Crop Improvement: Common beans. CAB, ORSTON. UK. p 561-617.

Caixeta, E. T; A. Borém; A.L. Alzate Marin; S. Fagundes; M.G. Silva; E.G. Barros; M. Alves Moreira. 2005. Allelic relationships for genes that confer resistance to angular leaf spot in common bean. *Euphytica* 145(3) 237-245. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-005-1258-3>.

Carvalho, G.A; T.J. Paula Junior; A.L. Alzate Marin; S. Nietsche; E.G. Barros; M.A. Moreira. 1998. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. *Fitopatologia Brasileira* 23:482-485.

Cardona Alvarez, C. 1962. Herencia de la resistencia a la mancha angular en frijol. *Agronomía Tropical* 18:330-331. 1962. (En línea). Consultado el 13 de mayo de 2013. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BAC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=002240>.

Castro, A; J.C. Rosas y L.L. Aranda. 2003. Manual del módulo de biodiversidad y fitomejoramiento. EAP, Zamorano.23p (Manuscrito).

Chacon, M.I; C. Jara; G. Castellanos; C.E. Posso; R. Buruchara; J.B. Cuasquer; M.A. Pastor Corrales. 1996. Diversidad genética y relación entre aislamientos de África y América Latina del hongo de la mancha angular del frijol común: Implicaciones para el mejoramiento genético. *In*: S.P. Singh; O. Voysest (eds). Taller de mejoramiento de frijol para el siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina. 559 p. CIAT. Cali, Colombia.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Trad. EDITEC. A.V. Schoonhoven; M.A. Pastor-Corrales (comp). Cali, Colombia. 56 p.

EAP (Escuela Agrícola Panamericana).1994. Enfermedades de frijol: La mancha angular. Departamento de Agronomía, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras (Trifolio ilustrado).

Ferraz, S. 1980. La mancha foliar angular. *In*: H.F. Schwartz; G.E. Gálvez (eds). Problemas de Producción del Frijol: Enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Cali, Colombia. p 55-64.

Gepst, P y D.G. Debouck. 1991. Origin, domestication and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *In*: A.V. Schonhooven; O. Voysest (eds). Research for Crop Improvement: Common beans. CAB, ORSTON. UK. p 7-53.

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

Herrera Dávila, B. 2004. Caracterización molecular del germoplasma cultivado y silvestre de frijol común de Honduras. Proyecto especial de Graduación del Programa de Ingeniero Agrónomo, EAP, Zamorano. 22 p.

Jara, C. 1998. Diversidad patogénica de *Phaeoisariopsis griseola* centroamericana, causante de la mancha angular del frijol común. Resúmenes XLIV Reunión Anual PCCMCA. Managua, Nicaragua. p 102.

Leon Saavedra, I. 2009. La antracnosis y la mancha angular del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). Temas de ciencia y tecnología 13(39):45-54. (En línea). Consultado el 6 de mayo de 2013. Disponible en: [http://www.utm.mx/edi\\_antiores/Temas39/2NOTAS%2039-3.pdf](http://www.utm.mx/edi_antiores/Temas39/2NOTAS%2039-3.pdf).

Mahuku, G; C. Montoya; M.A. Henríquez; C. Jara; H. Terán; S. Beebe. 2004. Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene. *Crop Science* 44(5):1817-1824.

Nietsche, S; A. Borem; G.A. Carvalho; R.C. Rocha; T.J. Paula; E.G. de Barros; M.A. Moreira. 2000. RAPD and SCAR markers linked to a gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. *J. of Phytopathology* 148:117-121.

Pastor Corrales, M.A y C. E. Jara. 1995. La evolución de *Phaeoisariopsis griseola* con el frijol común en América Latina. *Fitopatología Colombiana* 19:15-24.

Queiroz, V.T; C.S. Sousa; M.R. Costa; D.A. Sanglad; K.M.A. Arruda; T.L.P.O. Souza; V.A. Ragagnin; E.G. Barros and M.A. Moreira. 2004a. Development of SCAR markers linked to common bean angular leaf spot resistance genes. *Annu. Rep. Bean Improvement Cooperative*. 47:237-238.

- Rosas, J.C y A. Castro; E. Flores. 2000. Mejoramiento genético del frijol rojo y negro mesoamericano para Centroamérica y el Caribe. *Agronomía Mesoamericana* 11(2): 37-43.
- Rosas, J.C. 2003. El cultivo de frijol común en América Tropical. EAP, Zamorano. 2 ed. Imprenta Litocom. Tegucigalpa, Honduras. 57 p.
- Santos Filho, H.P; S. Ferraz y C. Vieira. 1976. Resistência à mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres* 23:226-230.
- Sartorato, A; M.J.O. Zimmermann; C.A. Rava; J.E.S. Carneiro. 1993. Inheritance of dry bean resistance to *Isariopsis griseola*. *Summa Phytopathologica* 19:30.
- Schwartz, H.F. 2011. Angular Leaf Spot: *Phaeoisariopsis griseola*. Legume ipmpipe Diagnostic Pocket Series. p 1-2.
- Schwartz, H.F; F. Correa y M. Pastor Corrales. 1982. La mancha angular del frijol y su control. CIAT. Calí, Colombia. 28 p.
- Singh, A.K y S.S. Saini. 1980. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Isariopsis griseola* Sacc.) in french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 29:175-176.
- Zeledón, S. 2003. Identificación de la resistencia a razas específicas de *Phaeoisariopsis griseola* en frijol común. Tesis Ing. Agr; Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 16 p.

## 7. ANEXOS

Anexo 1. Caracterización de la raza 31-63 de *Phaeoisariopsis griseola*.

<b>Inoculación:</b> 15 DDS		<b>Aislamiento:</b> Pg. ZII					
<b>Evaluación:</b> 2/7/13 (28 DDI)		<b>Descripción:</b> 12 diferenciales,					
<b>Ubicación:</b> Casas de malla		<b>Testigos:</b> G06727, Tío Canela 75					
Origen	Diferenciales	Plantas/Severidad (1-9)				Valor binario	Reacción
		1	2	3	4		
Andinos	Don Timoteo	6	7	7	6	1	S
	G11796	5	4	4	7	2	S
	Bolón Bayo	5	4	8	6	4	S
	Montcalm	5	7	5	4	8	S
	Amendoin	4	6	4	6	16	S
	G5686	1	1	2	2	32	R
Mesoamericanos	PAN 72	6	8	8	9	1	S
	G2858	5	6	5	6	2	S
	Flor de Mayo	7	7	4	7	4	S
	MEX 54	8	8	7	6	8	S
	BAT 332	8	8	7	5	16	S
	Cornell 49242	6	3	5	6	32	S
Testigos	Tío Canela 75 (S)	7	8	9	8		S
	G06727 (R)	1	1	2	3		R
						<b>Raza</b>	<b>31-63</b>

R: resistente, S: susceptible

Resistentes: (1-3)

Susceptibles:(4-9)

DDS: Días después de la siembra

DDI: Días después de la primera inoculación

Anexo 2. Caracterización de la raza 63-63 de *Phaeoisariopsis griseola*.

<b>Inoculación:</b> 15 DDS		<b>Aislamiento:</b> Pg. PRR					
<b>Evaluación:</b> 7/12/12 (28 DDI)		<b>Descripción:</b> 12 diferenciales,					
<b>Ubicación:</b> Casas de malla		<b>Testigos:</b> G06727, Tío Canela 75					
Origen	Diferenciales	Plantas/Severidad (1-9)				Valor binario	Reacción
		1	2	3	4		
Andinos	Don Timoteo	4	4	4	4	1	S
	G11796	6	6	6	5	2	S
	Bolón Bayo	6	5	4	6	4	S
	Montcalm	7	7	7	7	8	S
	Amendoin	5	5	5	6	16	S
	G5686	5	5	5	5	32	S
Mesoamericanos	PAN 72	7	7	7	6	1	S
	G2858	5	6	5	5	2	S
	Flor de Mayo	6	6	6	4	4	S
	MEX 54	5	5	5	7	8	S
	BAT 332	5	5	5	6	16	S
	Cornell 49242	7	7	7	7	32	S
Testigos	Tío Canela 75 (S)	8	6	6	6		S
	G06727	3	3	3	3		R
						<b>Raza</b>	<b>63-63</b>

R: resistente, S: susceptible

Resistentes: (1-3)

Susceptibles:(4-9)

DDS: Días después de la siembra

DDI: Días después de la primera inoculación

Anexo 3. Caracterización de la raza 62-33 de *Phaeoisariopsis griseola*.

<b>Inoculación:</b> 15 DDS		<b>Aislamiento:</b> Pg. O					
<b>Evaluación:</b> 5/8/13 (28 DDI)		<b>Descripción:</b> 12 diferenciales,					
<b>Ubicación:</b> Casas de malla		<b>Testigos:</b> G06727, Tío Canela 75					
Origen	Diferenciales	Plantas/Severidad (1-9)				Valor binario	Reacción
		1	2	3	4		
Andinos	Don Timoteo	1	1	1	3	1	R
	G11796	7	6	5	5	2	S
	Bolón Bayo	5	5	6	6	4	S
	Montcalm	4	4	4	3	8	S
	Amendoin	7	6	4	6	16	S
	G5686	5	5	5	4	32	S
Mesoamericanos	PAN 72	5	4	6	5	1	S
	G2858	3	3	3	1	2	R
	Flor de Mayo	1	1	1	3	4	R
	MEX 54	1	1	1	1	8	R
	BAT 332	1	3	3	1	16	R
	Cornell 49242	7	5	6	6	32	S
Testigos	Tío Canela 75 (S)	8	8	9	8		S
	G06727	2	2	1	3		R
						<b>Raza</b>	<b>62-33</b>

R: resistente, S: susceptible

Resistentes: (1-3)

Susceptibles:(4-9)

DDS: Días después de la siembra

DDI: Días después de la primera inoculación

Anexo 4. Evaluación fenotípica (escala 1-9) de las líneas de frijol común con las razas de *Phaeoisariopsis griseola* caracterizadas.

Número	Líneas	Razas de <i>Phaeoisariopsis griseola</i>		
		31-63	62-33	63-63
1	ALS 0531-41	1	1	5
2	ALS 0531-97	2	1	3
3	ALS 0532-4	1	2	4
4	ALS 0532-6	2	1	3
5	ALS 0532-38	1	2	3
6	ALS 0546-60	1	1	5
7	ALS 0546-78	3	1	4
8	ALS 0546-97	2	2	2
9	ALS 0626-35	5	3	5
10	SX 14816-71	4	5	5
11	MER 2221-20	5	7	5
12	AMFF 1-12-16-2	4	6	5
13	AMFF 1-12-1-17-1	7	4	4
14	MHR 314-18	7	1	5
15	ALS 9951-101-R1	6	7	6
16	SEQ 341-99	6	3	6
17	SJC 730-70	7	4	5
18	SJC 730-40	7	6	6
19	G10474	2	1	3
20	SEQ 342-87	5	1	5

Resistentes: (1-3), Susceptibles:(4-9)

Anexo 5. 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  $\mu$ L del buffer de extracción (PEX) en un tubo para micro centrífuga *eppendorf* de 1.5 mL. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (*pestle*) de *plexiglass* de laboratorio. Agregar 450  $\mu$ L 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 *eppendorf* 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  $\mu$ L de RNAasa A (concentración de 100  $\mu$ g/mL) + buffer TE<sup>a</sup> 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<sup>b</sup> 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  $\mu\text{L}$  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.

<sup>a</sup> Buffer TE (TRIS HCl 1 M, pH=7.5 ; EDTA 0.5 M, pH=8.0)

<sup>b</sup> Usar acetato de sodio 3H<sub>2</sub>O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

#### Anexo 6. 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  $\mu\text{L}$  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.

∕ Buffer de cuantificación. 10  $\mu\text{L}$  solución para tinción concentrada + 100 mL buffer TNE 1X (pH=7.4).

#### Anexo 7. Dilución de ADN (20 ng/mL) por el método de la UW.

1. Agregar 100  $\mu\text{L}$  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  $V_i = C_f \cdot V_f / C_i$
3. Diluir las muestras en platos de 96 celdas con fondo redondeado (Microplate <sup>TM</sup>96, 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 8. 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/ $\mu$ L) 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  $\mu$ L de la mezcla maestra por cada celda en platos con fondo V. Agregar 1  $\mu$ L 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.