

**Caracterización molecular del germoplasma
cultivado y silvestre de frijol común de
Honduras**

Becky del Cisne Herrera Dávila

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Diciembre, 2004

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Caracterización molecular del germoplasma
cultivado y silvestre de frijol común de
Honduras**

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

Presentado por

Becky del Cisne Herrera Dávila

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2004

La autora 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

Becky del Cisne Herrera Dávila

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2004

**Caracterización molecular del germoplasma cultivado y silvestre de
frijol común de Honduras**

Presentado por:

Becky del Cisne Herrera Dávila

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor Principal

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

María Mercedes Roca, Ph. D.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.
Coordinador Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Alonso Suazo, Ph. D.
Asesor

Aurelio Revilla, M.S.A.
Decano Académico Interino

Jorge Venegas, Ing. Agr.
Asesor

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

DEDICATORIA

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

A mis padres Jaime y María, el triunfo es suyo.

A mis hermanos Jimmy, Dayanna y Brinna, el mejor de mis ejemplos.

A mis abuelitos Miguel Antonio y Carmen Amelia, por creer en mí y por su inmenso cariño.

AGRADECIMIENTOS

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

A mis padres María y Jaime por su amor incondicional, mil bendiciones y por heredarme “almafuerte” y valor.

A Jimmy, Dayanna y Brinna porque compartimos alegrías y tristezas, por dar luz a mis recuerdos, por ser mis amigos, mis hermanos y mi razón para no equivocarse el camino.

A José Paz, porque el mundo es un lugar mejor a tu lado, porque compartimos la bendición del amor.

A Guadalupe Dávila y familia por sus oraciones y su cariño.

A las familias Dávila Puruncajas y Herrera Castillo por su apoyo y sus palabras.

A la Familia Paz Cerda por abrirme las puertas de su hogar.

Al Dr. Juan Carlos Rosas, por sus consejos, por atender mis dudas e inquietudes y confiar en la oportuna culminación de este estudio.

A la Dra. María Mercedes Roca, por brindarme su sincero aprecio, sus consejos y su apoyo.

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

Al Ing. Jorge Venegas por su gran apoyo y su ayuda siempre oportuna, por su paciencia y su valiosa amistad.

A Luz Clarita, Tomasita, Ing. Melissa Castillo, Ing. Byron Reyes, Dr. Hugh y mis queridos amigos del PIF por brindarme sonrisas, cariño y amistad, nunca los olvidaré.

A Rosy, Salomé, Norma, Landy y a todos mis amigos a quienes no mencionaré por temor a que la ingrata memoria deje a alguien sin nombrar, pero que están presentes en el corazón.

A todos aquellos que con una palabra o una sonrisa alentaron mi propósito y me animaron a seguir siempre adelante.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A la Escuela Agrícola Panamericana a través del Fondo de Becas RAPACO, por financiar mis cuatro años de estudio en Zamorano.

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

RESUMEN

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

La variabilidad genética es la interacción dinámica de individuos que adaptan la información de su genoma, manifestando características comunes y variantes individuales que transmiten a sus generaciones. La conservación de recursos genéticos exige caracterizar la diversidad genética usando marcadores moleculares, para identificar fuentes de mejoramiento amplias y diversas. Los objetivos de este estudio fueron determinar las diferencias y relaciones genéticas en una colección núcleo del germoplasma hondureño empleando marcadores moleculares RAPD; determinar las relaciones genéticas entre las accesiones de frijol cultivado y poblaciones silvestres de frijol común; identificar la presencia de genes de resistencia a enfermedades por medio de marcadores moleculares SCAR; definir el valor potencial del germoplasma hondureño de frijol para fines de mejoramiento. El estudio se desarrolló de enero a octubre de 2004. Se estableció una colección núcleo con 58 accesiones de *P. vulgaris* y dos de *P. coccineus*. Los 60 materiales se sembraron en los invernaderos del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) y la extracción, cuantificación, dilución, amplificación y separación de ADN se realizó en el Laboratorio de Biotecnología. El análisis de diferencias y relaciones genéticas se realizó con 24 marcadores moleculares RAPD. Se determinó el porcentaje de similitud genética empleando el método UPGMA y la distancia genética mediante el Coeficiente de Dice. Los dos dendrogramas generados a partir de distanciamientos genéticos formaron cinco y cuatro grupos genéticos, respectivamente. Se concluyó que existe una amplia variabilidad genética en el germoplasma hondureño representada por cinco grupos genéticos. Las accesiones silvestres y cultivadas, se separaron en dos grupos genéticos, lo que indica que las accesiones criollas serían producto de la domesticación de una porción relativamente estrecha de la diversidad de accesiones silvestres analizadas en este estudio (efecto fundador). La presencia de genes de resistencia se determinó empleando marcadores moleculares SCAR. Existen QTL (Quantitative Trait Locus) de resistencia a la bacteriosis común, en siete accesiones de la colección núcleo. Tres accesiones presentaron el gen *bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol. El *gen I* de resistencia al virus del mosaico común está presente en cinco accesiones. El germoplasma hondureño presenta un alto valor potencial para fines de mejoramiento y para ampliar la base genética del frijol común. Las accesiones criollas deben evaluarse para introducir las a programas de mejoramiento.

Palabras clave: Genes de resistencia, marcadores moleculares, mejoramiento, relaciones genéticas y variabilidad genética.

CONTENIDO

Portada.....	i
Portadilla.....	ii
Autoría.....	iii
Hoja de firmas.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Agradecimiento a patrocinadores.....	vii
Resumen.....	viii
Contenido.....	ix
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras.....	xii
Índice de anexos.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	3
EVALUACIÓN GENOTÍPICA CON MARCADORES MOLECULARES.....	3
Adaptaciones al protocolo de la Universidad de Wisconsin Madison.....	4
Evaluación de diferencias y relaciones genéticas.....	6
Presencia de genes de resistencia.....	6
Análisis estadístico.....	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
ADAPTACIONES AL PROTOCOLO DE LA UNIVERSIDAD DE WISCONSIN.....	9
EVALUACION GENOTÍPICA CON MARCADORES MOLECULARES.....	9
Evaluación de diferencias y relaciones genéticas.....	9
Presencia de genes de resistencia.....	12
CONCLUSIONES.....	15
RECOMENDACIONES.....	16
BIBLIOGRAFÍA.....	17

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros		página
1	Accesiones de la colección núcleo de germoplasma cultivado y silvestre de frijol común. Zamorano, Honduras. 2004.....	5
2	Marcadores moleculares RAPD empleados en la evaluación de relaciones y diferencias genéticas del germoplasma hondureño. Zamorano, Honduras. 2004.....	10

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		página
1	Amplificación del <i>primer</i> OPT-07 con adaptaciones al protocolo de la Universidad de Wisconsin. Zamorano. Honduras. 2004.....	9
2	Dendrograma de distanciamiento genético entre 60 accesiones de <i>Phaseolus</i> evaluadas con 11 marcadores moleculares RAPD. Zamorano. Honduras. 2004.....	11
3	Dendrograma de distanciamiento genético de 12 accesiones de <i>Phaseolus</i> evaluadas con 13 marcadores moleculares RAPD. Zamorano. Honduras. 2004.....	13
4	Amplificación de SAP6 en accesiones con presencia del QTL de resistencia a la bacteriosis común. Zamorano. Honduras. 2004.....	14

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		página
1	Guía de Procedimientos para uso de Marcadores Moleculares RAPD.....	19
2	Guía para Elaboración de Componentes Adaptados para PCR.....	21

INTRODUCCIÓN

El frijol común *Phaseolus vulgaris* es la leguminosa de grano de mayor consumo en el mundo. La mayor área de producción se concentra en América Latina (45% de la producción mundial), la cual es también la de mayor consumo del grano (Araya 2003). El frijol está ampliamente distribuido en los cinco continentes y es el complemento nutricional indispensable en la dieta alimenticia de Centro y Suramérica (López *et al.* 1985). En Honduras, ocupa el segundo lugar entre los granos básicos tanto en superficie sembrada como en producción para consumo, generación de ingresos y fuentes de trabajo (Rodríguez 2000).

La amplia adaptabilidad del frijol en el Viejo Mundo provocó que se olvidara su origen americano por mucho tiempo se consideró procedente de Asia o entre las especies de origen desconocido o incierto (Alvarenga 1995). A partir del siglo XX, los científicos reconocieron al Nuevo Mundo como centro de origen del frijol, respaldándose en evidencias históricas, arqueológicas, botánicas y lingüísticas (Rosas 2003). Así mismo, se evidenció la existencia de dos centros de domesticación del frijol cultivado, debido a una domesticación simultánea y relacionados a dos acervos genéticos denominados Andino y Mesoamericano.

En el siglo XIX, Vavilov propuso que las regiones geográficas con mayor diversidad genética de un cultivo eran su centro de origen. Sin embargo, muchos cultivos no se originaron en los centros mencionados por Vavilov y otros no tienen centros de diversidad (Harlan 1992). La variabilidad genética de una especie vegetal como indican Franco e Hidalgo (2003), se debe a que los individuos permanecen en interacción dinámica, adaptando la información de su genoma a factores bióticos y abióticos para sobrevivir en su entorno, manifestando características comunes y variantes individuales que transmiten de generación en generación. Estas fuentes de variabilidad son de origen evolutivo (diferencias en el sistema reproductivo, mutación, migración, recombinación, deriva genética y selección natural y artificial); geográfico y de domesticación.

Durante el siglo XX, la tendencia de enriquecimiento genético se ha desacelerado y en algunos casos se detuvo con el advenimiento de prácticas modernas de fitomejoramiento. Los rendimientos han aumentado, pero la base genética de las especies se ha reducido y el ritmo y escala de la erosión genética, no tienen precedentes (Plucknet *et al* 1992). La pérdida de recursos filogenéticos y la erosión de la biodiversidad amenazan la agricultura y la seguridad alimentaria mundial; a medida que se incrementa la uniformidad de los cultivos, se aumenta la vulnerabilidad genética (FAO 1999).

Plucknett (1992) menciona que al enfrentar la pérdida concreta e inminente de materiales vegetales en el campo, los científicos propusieron el desarrollo de bancos genéticos modernos como fuente constante, confiable y disponible de germoplasma.

El mantenimiento de la diversidad genética de las especies cultivadas y la conservación de las plantas y animales silvestres se ha convertido en un principio básico.

El Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), durante los últimos 15 años ha conducido misiones de exploración y recolección de germoplasma de frijol común y sus parientes del género *Phaseolus* en 15 departamentos de Honduras. Actualmente, se conservan 665 accesiones en el Banco de Germoplasma de la Escuela Agrícola Panamericana (Rosas 2004).

Karp *et al.* (1997) señala que las actividades de conservación de recursos genéticos requieren la caracterización de la diversidad en acervos y bancos genéticos, para ampliar y complementar la caracterización basada en descriptores morfológicos y bioquímicos, a través del uso de marcadores moleculares.

Cornide (2002) señala que conocer la variabilidad genética es vital para identificar fuentes de mejoramiento amplias y diversas. Sin embargo, el éxito dependerá de la habilidad para incorporar la diversidad genética y lograr una mayor ganancia en los caracteres de valor agronómico. Por lo tanto, la evaluación de germoplasma debe ser una labor permanente en los programas de mejoramiento.

Los marcadores moleculares tipo RAPD (siglas en inglés de ADN polimórfico amplificado al azar), amplifican simultáneamente fragmentos de sitios complementarios del genoma. Son marcadores dominantes, de modo que las condiciones de homocigosis son los únicos genotipos diferenciables con la presencia o ausencia de bandas. Se han empleado en mapeo genético, marcaje de genes, información filogenética y diversidad taxonómica y genética.

Los marcadores moleculares SCAR (siglas en inglés de regiones amplificadas de secuencia caracterizada), son *primers* (cebadores) específicos ligados a características de interés, ampliamente utilizados en mapeo genético y selección asistida por marcadores (SAM) que determinan la presencia o ausencia de genes de resistencia.

El objetivo general de este estudio fue caracterizar la variabilidad genética y estimar el valor para el mejoramiento del germoplasma hondureño de frijol común mediante técnicas moleculares. Los objetivos específicos fueron: determinar las diferencias y relaciones genéticas de la colección núcleo del germoplasma hondureño empleando marcadores moleculares tipo RAPD; determinar las relaciones genéticas entre las accesiones de frijol cultivado y poblaciones silvestres de frijol común de Honduras; identificar la presencia de genes de resistencia a enfermedades en la colección núcleo hondureña de frijol por medio de marcadores moleculares tipo SCAR; y, definir el valor potencial del germoplasma hondureño para fines de mejoramiento del frijol común en Honduras.

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN DEL ESTUDIO

La siembra de accesiones y análisis molecular se realizaron durante el período de enero a octubre de 2004, en los invernaderos del PIF y en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, respectivamente. Zamorano, está ubicado en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, a una altura de 800 msnm, con temperatura media de 24°C y precipitación media anual de 1100 mm.

EVALUACIÓN GENOTÍPICA CON MARCADORES MOLECULARES

Material experimental. Se estableció una colección núcleo con 60 accesiones de *Phaseolus* del germoplasma hondureño contenidas en el Banco de Germoplasma de la Escuela Agrícola Panamericana, recolectadas durante 1990-94 y 2001-03 en 15 departamentos de Honduras. Los criterios de selección se establecieron según características agronómicas y diversidad de zonas agroecológicas, e incluyen 58 accesiones de *P. vulgaris* (46 criollas, cuatro mejoradas, seis de *P. vulgaris* variedad *aborigineus* y dos accesiones andinas) y dos de *P. coccineus* (Cuadro 1). De las 60 accesiones de la colección núcleo, 48 pertenecen al grupo de materiales utilizados por Rubio (2002), y las 12 adicionales fueron tomadas del Banco de Germoplasma de acuerdo con las características antes mencionadas.

Siembra. Se realizaron cuatro siembras de los 60 materiales seleccionados en los invernaderos del PIF, colocando un promedio de cuatro semillas de cada genotipo en tres maceteros de 15.24 cm de altura x 15.24 cm de diámetro. Las semillas fueron escarificadas y pregerminadas para garantizar la siembra de semillas viables y para acortar el período de emergencia.

Extracción de ADN. Se siguieron los protocolos de la Universidad de Wisconsin-Madison (UW). Se recolectaron 4-5 hojas terminales de cada genotipo a los 12 días después de la siembra, en tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 50 µl de buffer PEX (etil xantogenato de potasio) para macerar 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 300 μ l 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 peletizó centrifugando a 3000 rpm por 5 min. Los pellets se lavaron con etanol 70%, se centrifugaron a 14000 rpm por 15 s y se secaron por 2-3 horas o de un día para otro. Luego se rehidrataron los pellets con 100-150 μ l 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.

Adaptaciones al protocolo de la UW

Durante pruebas preliminares se detectaron deficiencias en el empleo del protocolo de amplificación de la UW, por lo que se realizaron pruebas para su adaptación a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana. Los resultados se resumen en la Guía de Procedimientos para uso de Marcadores Moleculares RAPD (Anexo 1).

Cuantificación y dilución de ADN. Se empleó un fluorómetro Hoefer D y NA QuantTM 200, calibrado con ADN de timo de bovino estándar (100 ng/ μ l). Las muestras se cuantificaron usando 2 ml de buffer de cuantificación (10 ml de TNE 1X y 10 μ l de solución concentrada de tintura).

Se corrigió la concentración NaCl (2 M) en el buffer TNE 10X, según las indicaciones de Hoefer Pharmacia Biotech Inc, debido a que el uso anterior de una concentración errada de NaCl en el compuesto (1 M) ocasiona lecturas fluctuantes, poco confiables y afecta la alta sensibilidad del equipo.

Las muestras de ADN se diluyeron en 100 μ l de buffer TE 0.1X, a una concentración de 8 ng/ml para la amplificación con marcadores moleculares RAPD, usando la fórmula $V_i=800/C_i-8$ y a una concentración de 30 ng/ml, usando la fórmula $V_i=3000/C_i-30$ para la amplificación con marcadores moleculares SCAR.

Cuadro 1. Accesiones de la colección núcleo de germoplasma cultivado y silvestre de frijol común. Zamorano, Honduras. 2004.

Código	Nombre Local	Departamento	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
<i>Phaseolus vulgaris</i>					
Variedades Criollas					
F-0009	Concha Blanca	Yoro	15° 04' 40"	87° 22' 15"	1700
F-0022	Cuarenteño	Olancho	14° 33' 15"	86° 17' 20"	400
F-0030	Chilito	Olancho	14° 55' 20"	86° 21' 30"	575
F-0034	Gualiqueme	Yoro	15° 06' 15"	87° 10' 30"	650
F-0047	Frijol de Montaña	Yoro	15° 01' 55"	87° 16' 45"	1400
F-0057	Vaina Rosada	Yoro	15° 12' 20"	87° 22' 00"	1150
F-0072	Desarrural	Fco. Morazán	13° 41' 50"	87° 08' 40"	
F-0077	Frijol Arbolito	Fco. Morazán	13° 47' 35"	87° 28' 10"	200
F-0079	Frijol Rojo	Valle	13° 39' 40"	87° 32' 00"	150
F-0080	Retinto Rojo	Valle	13° 39' 40"	87° 32' 00"	150
F-0085	Chelito	Valle	13°42' 35"	87° 33' 20"	450
F-0091	Cuarenteño	Choluteca	13° 18' 05"	86° 59' 20"	650
F-0097	Arbolito	Choluteca	13° 15' 40"	86° 59' 20"	400
F-0102	Sangre de Toro	Sta. Bárbara	15°03' 30"	88° 25' 00"	1200
F-0104	Retinto Vaina Blanca	Sta. Bárbara	14°42' 35"	88° 05' 20"	400
F-0107	Frijol Ñato	Comayagua	14°54' 30"	87° 19' 30"	780
F-0117	Danlí	Comayagua	14°54' 45"	87° 22' 40"	350
F-0126	Negro Ligerero	Intibucá	14°18' 15"	88° 23' 10"	850
F-0130	Talete	Intibucá	14°00' 00"	88° 22' 40"	968
F-0147	Chile	Copán	15°02' 10"	88° 45' 55"	490
F-0155	Arbolito Rojo, Vaina	Copán	15°08' 40"	88° 40' 30"	350
F-0169	Cincuentaño	Copán	14°01' 00"	88° 52' 00"	1200
F-0190	Talete de Guía	Lempira	14°49' 50"	88° 36' 30"	900
F-0201	Talete	Lempira	14°26' 50"	88° 39' 25"	1750
F-0211	Alilí	Lempira	14°06' 00"	88° 34' 05"	800
F-0218	Arbolito Rojo	Lempira	14°02' 00"	88° 37' 00"	275
F-0245	Gringo	Ocotepeque	14°30' 15"	88° 48' 55"	1830
F-0253	Negro	Ocotepeque	14°28' 45"	89° 12' 35"	887
F-0264	Arbolito	Ocotepeque	14°18' 20"	89° 01' 10"	1200
F-0321	Vaina Blanca	Sta. Bárbara	15°28' 00"	88° 31' 00"	565
F-0332	Seda	El Paraíso	13°53' 50"	85° 53' 50"	550
F-0340	Chile	El Paraíso	13°49' 02"	86° 24' 14"	1100
F-0371	Moro	Choluteca	13°30' 00"	87° 11' 30"	910
F-0405	Arbolito Vaina Blanca	Atlántida	15°39'43"	86° 40' 25"	320
F-0419	Chile	Atlántida	15°39'35"	87° 25' 50"	250
F-0421	Vaina Roja Arbolito	Atlántida	15°38'39"	87° 21' 47"	100
F-0428	Rojo	Olancho	15°19'00"	86° 33' 55"	400
F-0505	Liberal	Fco. Morazán	14°48' 40"	86°56' 00"	835
F-0518	Frijol Mantequilla	Fco. Morazán	14°42' 00"	87°06' 45"	700
Variedades Silvestres					
01-001-2		Fco. Morazán	14°01' 985"	87°06' 594"	1225
01-004-1		Fco. Morazán	14°02' 713"	87°01' 465"	1250
03-021-6b		Fco. Morazán	14°05' 012"	87°20' 566"	1340
01-006-6a		El Paraíso	13°51' 174"	86°55' 710"	1600
01-009-1		Fco. Morazán	14°11' 465"	87°03' 183"	1550
01-016-1		Fco. Morazán	14°13' 687"	87°04' 557"	1160

Continuación Cuadro 1

Variedades Mejoradas				
Amadeus 77				
Tío Canela 75				
Dorado				
Milenio				
Variedades Andinas				
G06727				
Pompadour J				
<i>Phaseolus coccineus</i>				
03-020-7a	La Paz	14° 01'591"	87°59' 976"	1700
01-005-3a	El Paraíso	13°56' 698"	86°54' 296"	1475

Fuente: Rosas 2004.

Evaluación de diferencias y relaciones genéticas

Amplificación con marcadores moleculares tipo RAPD. Se amplificó el ADN de las 60 accesiones de frijol con 32 marcadores moleculares RAPD, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con adaptaciones al protocolo de la UW.

Se preparó una mezcla maestra con 3.4 µl de agua, 0.6 µl de *primer* (10 µM), 1.5 µl de buffer 10X, 1.5 µL de dNTP's 10X (Nucleótidos), 0.5 µl de Taq-Polimerasa (6 U/µl) y 7.5 µl de ADN (8 ng/ml) de cada accesión. Se usó un perfil térmico, empleando un termociclador PCR-100TM, con un ciclo de desnaturalización a 94°C por 1 min, 41 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, acoplamiento a 35°C por 30 s y elongación a 72°C por 75 s y un ciclo de elongación a 72°C por 5 min.

Para la amplificación de ADN, se reemplazó el buffer 5X por el buffer 10X, que contiene la concentración correcta de MgCl₂ (2.5 mM), antes repartida en el buffer 5X y dNTP's, en este último compuesto puede contribuir a la formación de concatómeros (acoplamiento de *primers* entre sí). Reactivos como Ficoll y Xylene cyanol se eliminaron de la formulación del buffer 10X, su presencia durante la PCR no cumple ninguna función y degrada la Taq-Polimerasa, el volumen de estos compuestos se compensó con agua destilada.

Presencia de genes de resistencia

Amplificación con marcadores moleculares tipo SCAR. Se emplearon los protocolos específicos para la amplificación de ADN mediante PCR para los marcadores SU91, SAP6, SR2 y SW13 (Miklas 2003), para determinar la presencia o ausencia de QTL's (del inglés, Quantitative Trait Locus) y genes de resistencia a la bacteriosis común, el virus del mosaico dorado amarillo y el virus del mosaico común del frijol.

El marcador SU91 para identificar un QTL de resistencia a la bacteriosis común, se amplificó con un perfil térmico de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 s; acoplamiento a 58°C por 40 s y elongación a 72°C por 2 min y un ciclo final de elongación a 72°C por 5 min. Los componentes usados fueron 7.1 µl de agua, 2 µl de

buffer 5X, 0.7 µl de dNTP's (4 mM), 1 µl de *primer* SU-91A, 1 µl *primer* SU-91B, 0.7 µl de Taq-Polimerasa y 2 µl de ADN (30 ng/ml).

El marcador SAP6 para identificar un QTL de resistencia a la bacteriosis común. Se amplificó con un perfil térmico de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 seg; acoplamiento a 55°C por 40 s y elongación a 72°C por 2 min y un ciclo final de elongación a 72°C por 5 min. Los componentes usados fueron 6 µl de agua, 2 µl de buffer 5X, 1 µl de dNTP's (4 mM), 1.4 µl de *primer* SAP6-A, 1.4 µl *primer* SAP6-B, 0.7 µl de Taq-Polimerasa y 2.5 µl de ADN (30 ng/ml).

El marcador SR2 para identificar el *gen bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol, se amplificó con un perfil térmico de un ciclo de desnaturalización a 94°C por 30 s; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, acoplamiento a 60°C por 1 min y elongación a 72°C por 3 min y un ciclo final de elongación a 72°C por 5 min. Los componentes usados fueron 9 µl de agua, 2 µl de buffer 5X, 0.7 µl de dNTP's (4 mM), 0.3 µl de *primer* SR2-A, 0.3 µl *primer* SR2-B, 0.7 µl de Taq-Polimerasa y 2 µl de ADN (30 ng/ml).

El marcador SW13 para identificar el *gen I* de resistencia a virus del mosaico común, se amplificó con un perfil térmico de un ciclo de desnaturalización a 94°C por 30 s; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, acoplamiento a 60°C por 1 min y elongación a 72°C por 3 min y un ciclo final de elongación a 72°C por 5 min. Los componentes usados fueron 10.6 µl de agua, 5 µl de buffer 5X, 1.5 µl de dNTP's (4 mM), 1.2 µl de *primer* W13-7XP, 1.2 µl *primer* W13-4RP, 0.5 µl de Taq-Polimerasa y 5 µl de ADN (30 ng/ml).

Separación de ADN. Se sembró una escalera de ADN de 100 pb, un control negativo y las muestras amplificadas en geles de 1.2% de agarosa, para separar fragmentos de ADN por diferencia de cargas, según su peso molecular en tanques de electroforesis a 110 V, por una hora. Se tiñeron los geles en una solución de bromuro de etidio y agua, luego se destiñeron en agua y se visualizaron las bandas de ADN en el transiluminador de rayos ultravioleta Fotodyne Foto UV 26 y se fotografiaron con una cámara Polaroid Fotodyne y una cámara digital Sony. El peso molecular de las bandas se determinó usando una escalera de ADN de 100 pb y el programa Kodak EDAS 290.

Se ajustó la concentración de ácido bórico (0.3 M) para la elaboración de geles, ya que pequeñas diferencias en la carga iónica o pH, crea frentes en la gel que afectan enormemente la movilidad de los fragmentos de ADN.

Para la separación de ADN, se elaboró el buffer 6X que simplifica el proceso de sembrado de las muestras, usando Ficoll para incrementar la densidad de las muestras, lo que garantiza que el ADN caiga dentro del foso de la gel. Se utilizó Bromofenol azul que migra 2.2 veces más rápido que Xylene cyanol, independientemente de la concentración de agarosa en la gel, que indica el recorrido de los fragmentos más pequeños de ADN (300 pb). El Xylene cyanol antes usado, sólo indica el recorrido de fragmentos mayores (4 kpb).

El bromuro de etidio se eliminó de la elaboración de geles, ya que durante la electroforesis, este compuesto migra a través de la gel en dirección al ánodo (-), dirección opuesta al ADN que migra hacia el cátodo (+) provocando un frente

eléctrico que causa la pérdida de visibilidad de fragmentos pequeños en aproximadamente 15%.

Análisis estadístico

El porcentaje de similitud genética de los análisis con RAPD se determinó con el programa NTSYS-pc versión 2.1 para establecer los grupos filogenéticos a los que pertenecen las 60 accesiones empleando el método UPGMA (siglas en inglés de agrupación de pares no ponderados mediante promedios aritméticos). La distancia genética se evaluó mediante el Coeficiente de Dice.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ADAPTACIONES AL PROTOCOLO DE LA UW

Las adaptaciones al protocolo de UW, generaron un mayor número de bandas amplificadas con pesos moleculares mayores a 1500 pares de bases (pb) y menores a 500 pb y un mayor nivel de polimorfismo, producto de la optimización del protocolo (Figura 1). Además, la mezcla de componentes para PCR, se redujo en 5 μ l de volumen final por muestra, lo que representa un ahorro de 25% en los costos de amplificación de ADN.

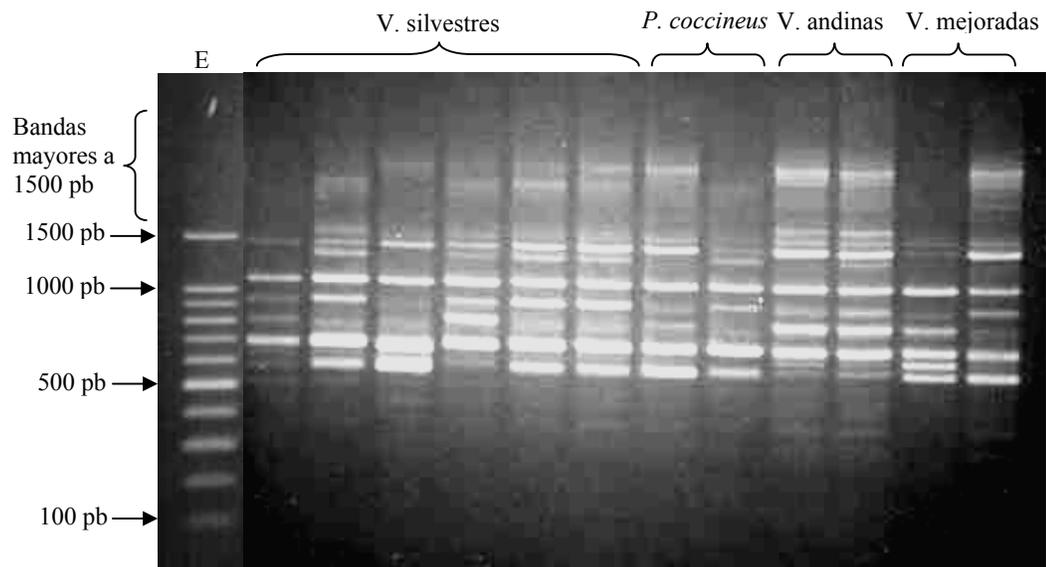


Figura 1. Amplificación del *primer* OPT-07 con adaptaciones al protocolo de UW. Zamorano. Honduras. 2004.

EVALUACIÓN GENOTÍPICA CON MARCADORES MOLECULARES

Evaluación de diferencias y relaciones genéticas

Se evaluaron 32 marcadores RAPD, de los cuales 24 presentaron bandas polimórficas visibles (Cuadro 2), utilizándose 13 de estos últimos, para analizar las 12 nuevas accesiones y 11 marcadores para el total de accesiones empleadas en este estudio. Bandas monomórficas y polimórficas de los dos grupos de RAPD, se utilizaron para el análisis de distanciamiento genético, utilizando el Coeficiente de Dice y el UPGMA para generar un dendrograma molecular por grupo.

Cuadro 2. Marcadores moleculares RAPD empleados en la evaluación de relaciones y diferencias genéticas del germoplasma hondureño. Zamorano, Honduras. 2004.

Cebador	Secuencia	Cebador	Secuencia
OPA - 02	TGCCGAGCTG	OPO - 05	CCCAGTCACT
OPB - 10	CTGCTGGGAC	OPO - 13	GTCAGAGTCC
OPB - 15	GGAGGGTGTT	OPO - 19	GGTGCACGTT
OPC - 04	CCGCATCTAC	OPP - 09	GTGGTCCGCA
OPD - 08	GTGTGCCCCA	OPQ - 09	GGCTAACCGA
OPF - 13	GGCTGCAGAA	OPQ - 14	GGACGCTTCA
OPG - 03	GAGCCCTCCA	OPT - 07	GGCAGGCTGT
OPG - 08	TCACGTCCAC	OPT - 15	GGATGCCACT
OPG - 15	ACTGGGACTC	OPU - 01	ACGGACGTCA
OPH - 08	GAAACACCCC	OPU - 19	GTCAGTGCGG
OPI - 16	TCTCCGCCCT	OPX - 01	CTGGGCACGA
OPL - 04	GACTGCACAC	OPY - 06	AAGGCTCACC

El primer dendrograma, generado a partir de los distanciamientos genéticos entre las 60 accesiones con 11 marcadores RAPD, formó cinco grupos (Figura 2):

El primer grupo (coeficiente de similaridad 0.67), está compuesto por siete de las ocho accesiones silvestres de *Phaseolus* (seis *P. vulgaris* var. *aborigineus* y una *P. coccineus*) y las variedades Milenio, Zamorano, G06727 y Pompadour J, estas dos últimas andinas. Las accesiones de *P. vulgaris* var. *aborigineus* se agrupan con bajo distanciamiento genético entre ellas por ser de la misma especie; estas accesiones fueron colectadas en una zona geográfica cercana en los departamentos vecinos de Francisco Morazán y El Paraíso. Otro subgrupo estuvo conformado por Milenio, Zamorano y la accesión de *P. coccineus* 03-020-07a. Además, se observó una relación cercana entre las variedades andinas G06727 y Pompadour J con los materiales silvestres, lo que sugiere que estos materiales andinos se encuentran emparentados con las accesiones silvestres de Honduras.

El segundo grupo compuesto por Amadeus 77, Tío Canela 75 y Paraisito, presentó un coeficiente de similaridad de 0.74. Amadeus 77 y Tío Canela 75 se subagruparon con un coeficiente de 0.90. La similitud entre estas dos variedades se debe a que Amadeus-77 fue desarrollada mediante la cruce de Tío Canela 75 x DICTA 105, es decir, es descendiente de esta variedad.

El tercer grupo (coeficiente de similaridad 0.83), está conformado por variedades criollas provenientes en su mayoría de los departamentos colindantes de Yoro, Olancho y Francisco Morazán.

Un cuarto grupo (coeficiente de similaridad 0.80), está conformado por variedades criollas en su mayoría provenientes de los departamentos occidentales de Copán, Ocotepeque, Lempira y Santa Bárbara.

El quinto grupo (coeficiente de similaridad 0.78), agrupa variedades criollas procedentes de los departamentos de Atlántida, Francisco Morazán, Olancho y Choluteca.

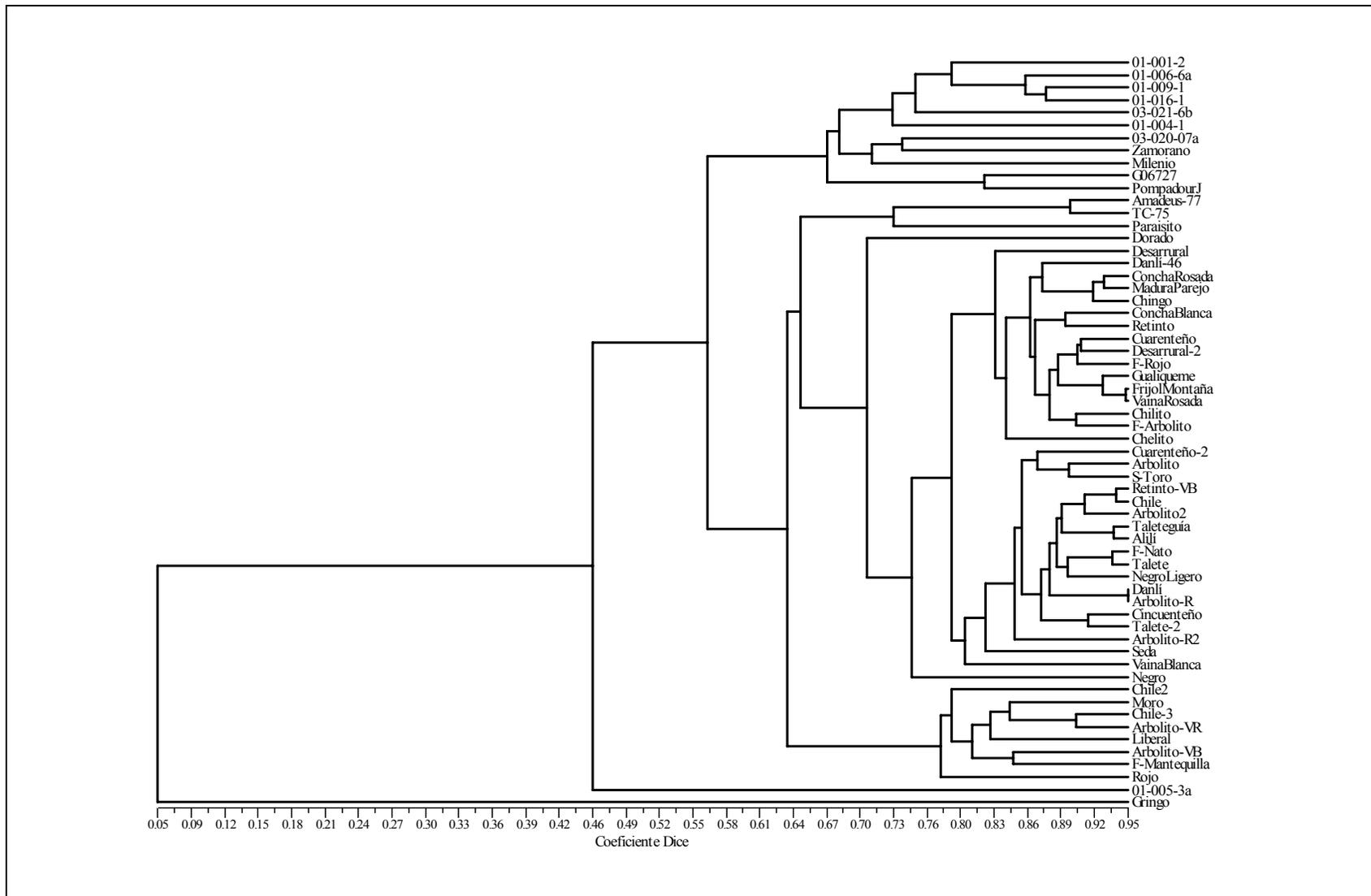


Figura 2. Dendrograma de distanciamiento genético entre 60 accesiones de *Phaseolus* evaluadas con 11 marcadores moleculares RAPD. Zamorano. Honduras. 2004.

Separadas de los grupos antes descritos en el dendrograma, se ubican la variedad mejorada Dorado y la criolla Gringo. Dorado fue desarrollada a partir de diversos progenitores del reservorio mesoamericano, mientras que la accesión criolla Gringo es del tipo habichuela y pertenece al acervo andino de frijol.

El segundo dendrograma generado en la evaluación de 12 accesiones con 13 marcadores RAPD, indicó la presencia de cuatro grupos (Figura 3), que contribuye a corroborar los resultados obtenidos en el primer dendrograma:

El primer grupo (coeficiente de similaridad 0.66), reúne las seis accesiones de *Phaseolus* var. *aborigineus*, lo que confirma la estrecha relación genética entre estos materiales silvestres, que fueron recolectados en un área continua en los departamentos de Francisco Morazán y El Paraíso (Rosas 2004), donde las condiciones similares de esta región pueden inducir una variabilidad menor entre estos materiales.

El segundo grupo conformado por las accesiones G06727 y Pompadour J, mostró un coeficiente de similaridad de 0.63 entre estos materiales pertenecientes al acervo andino. G06727 es la variedad Guarzo Popayán de Colombia y Pompadour J es una variedad criolla colectada en la República Dominicana.

Un tercer grupo conformado por la accesión *P. coccineus* 01-005-3a y Zamorano, presentó un coeficiente de 0.62-0.63. En condiciones naturales existe cruzamiento entre *vulgaris* y *coccineus*, favorecido por el proceso de domesticación y el uso de variedades criollas.

El cuarto grupo (coeficiente de similaridad 0.80), está conformado por la accesión *P. coccineus* 03-020-07a y Milenio (variedad mejorada de Honduras).

Presencia de genes de resistencia

Mediante el uso del marcador SU91 se determinó la ausencia del QTL de resistencia a la bacteriosis común en las 60 accesiones de la colección núcleo. Con el marcador SAP6 se determinó la presencia del QTL de resistencia a la bacteriosis común en las accesiones Amadeus 77, Concha Rosada, Paraisito, Gualiqueme, Vaina Rosada, Arbolito y Moro (Figura 4).

El marcador SR2 que identifica la presencia del *gen bgm-1*, determinó la resistencia a virus del mosaico dorado amarillo del frijol en las accesiones Milenio, Amadeus 77 y Tío Canela 75. Esto se debe a que estas variedades son mejoradas y se les han introducido genes de resistencia en el mejoramiento.

El marcador SW13 que identifica la presencia del *gen I* de resistencia al virus del mosaico común, fue observado en las accesiones Milenio, Amadeus 77, Tío Canela 75, Chingo y Vaina Rosada.

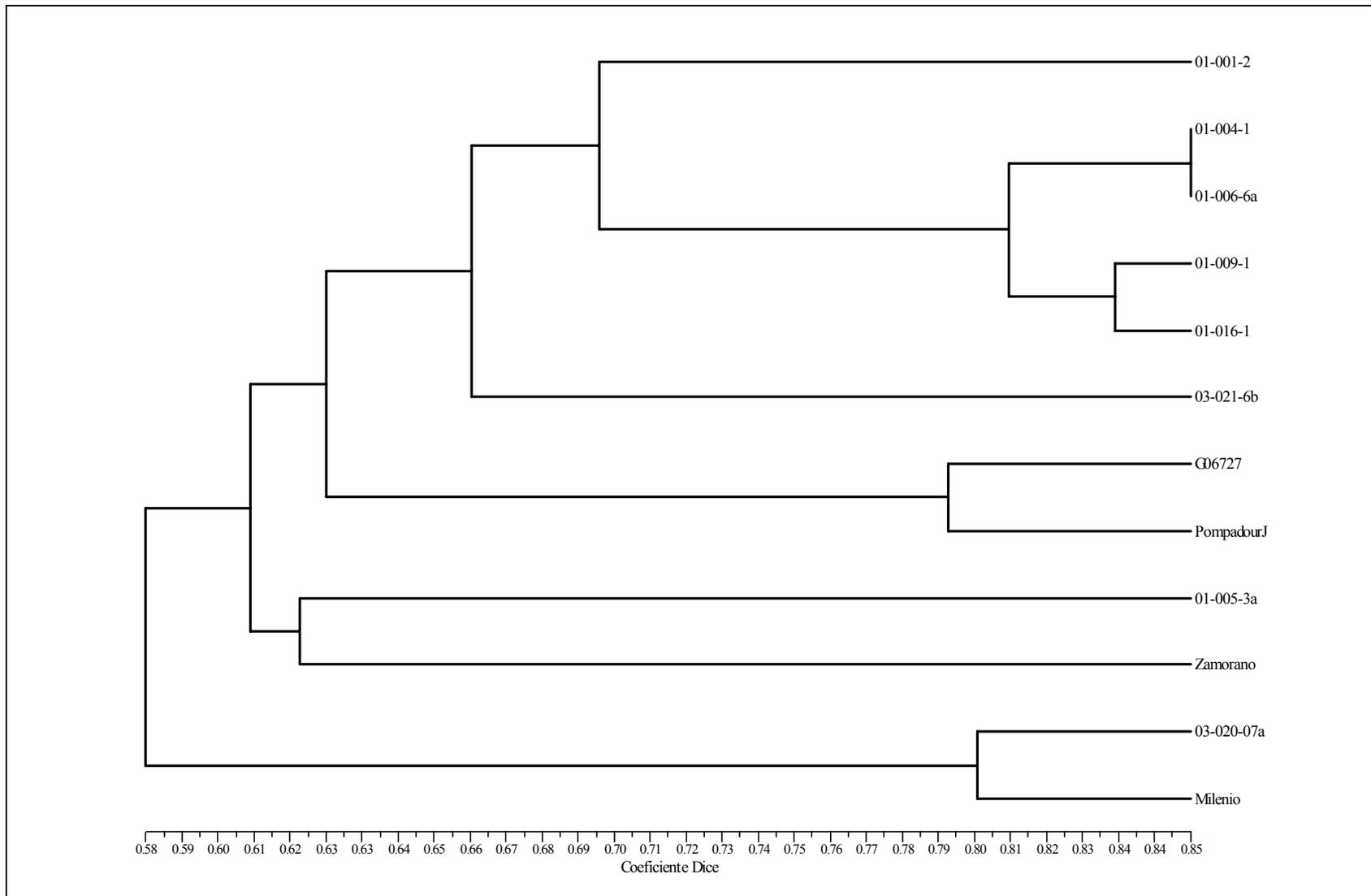


Figura 3. Dendrograma de distanciamiento genético de 12 accesiones de *Phaseolus* evaluadas con 13 marcadores moleculares RAPD. Zamorano. Honduras. 2004.

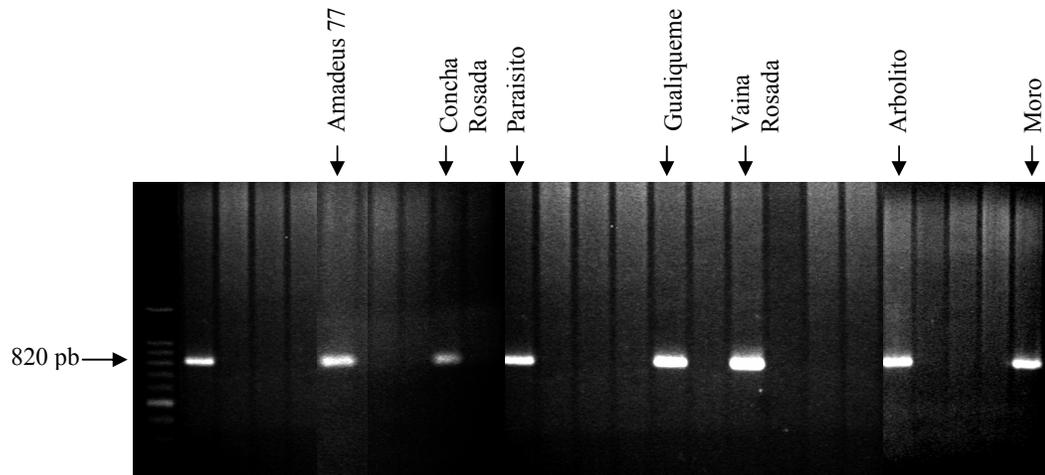


Figura 4. Amplificación de SAP6 en accesiones con presencia del QTL de resistencia a la bacteriosis común. Zamorano. Honduras. 2004.

CONCLUSIONES

- Existe una amplia variabilidad genética en la colección núcleo del germoplasma hondureño representada por cinco grupos genéticos, dentro de los cuales los materiales presentan alta similitud genética entre sí, pero difieren entre grupos.
- Las accesiones silvestres y cultivadas, se separaron en dos grupos genéticos bien diferenciados lo que indica que no existe una relación estrecha entre éstas. Por lo tanto, las accesiones criollas serían producto de la domesticación de una porción relativamente estrecha de la diversidad de las accesiones silvestres analizadas en este estudio (efecto fundador). La variabilidad genética de accesiones criollas al separarse en diferentes grupos de acuerdo con zonas geográficas, puede deberse a diferencias en la presión de selección de sus habitats.
- Existen QTL's de resistencia a la bacteriosis común, en las accesiones Amadeus 77, Concha Rosada, Paraisito, Gualiqueme, Vaina Rosada, Arbolito y Moro. Las accesiones Milenio, Amadeus 77 y Tío Canela 75, presentan el *gen bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol. El *gen I* de resistencia al virus del mosaico común está presente en las accesiones Milenio, Amadeus 77, Tío Canela 75, Chingo y Vaina Rosada.
- El germoplasma hondureño presenta un alto valor potencial para fines de mejoramiento y ampliación de la base genética del frijol común. Las accesiones criollas Concha Rosada, Paraisito, Gualiqueme, Vaina Rosada, Arbolito y Moro, deben evaluarse para introducirlas a programas de mejoramiento.

RECOMENDACIONES

- Usar un mayor número de accesiones del germoplasma hondureño para caracterizaciones moleculares debido a que el acervo mesoamericano presenta la mayor variabilidad genética de frijol común.
- Evaluar el germoplasma hondureño con un mayor número de marcadores SCAR, para determinar la presencia de otros genes de resistencia a patógenos, ya que en Centro América se presenta una alta variabilidad patogénica y debido a la coevolución se pueden encontrar otras fuentes de resistencia.
- Emplear la información proporcionada por la caracterización molecular para complementar caracterizaciones agronómicas de estudios realizados en frijol común, para introducir estos materiales a programas de mejoramiento.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarenga, J. 1995. Caracterización y evaluación de germoplasma hondureño de frijol común. Tesis Lic. Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 75 p.

Araya, C. 2003. Coevolución de Interacciones Hospedante-Patógeno en Frijol Común. *Fitopatología Brasileira* 28:221-228.

Cornide, M. 2002. Marcadores Moleculares: nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas. Edit. Félix Varela. La Habana, Cuba. 366 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1996. Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos en el Mundo. 85 p.

Franco, T.L. e Hidalgo, R. (eds). 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Filogenéticos. Cali, Colombia. IPGRI. 89 p. (Boletín Técnico no. 8).

Harlan, J. 1992. *Crops & Man*. Eds. G.A. Peterson; P.S. Baenziger; R.C. Dinauer. 2 ed. Madison, USA. 284 p.

Karp, A; Kresovich, S; Bhat, K.V; Ayad, W.G. y Hodgkin, T. 1997. *Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: a guide to the technologies*. Roma, IT. IPGRI. 45 p. (Boletín Técnico no. 2).

Miklas, P. 2003. For Resistance Traits (en línea). Consultado 9 de feb. 2004. Disponible en: <http://www.usda.pvrosser.wsu.edu/scartable3.htm>

Plucknett, D.L.; Williams, J.T.; Smith, N.J.R. y Murty, N. 1992. *Los Bancos Genéticos y la Alimentación Mundial*. IICA. CIAT. San José, Costa Rica. 260 p.

Rodríguez, F. 2000. Producción artesanal de semilla de frijol de buena calidad. Tegucigalpa, Honduras, 32 p.

Rosas, J.C. 2003. *El Cultivo del Frijol Común en América Tropical*. 2 ed. Tegucigalpa, Honduras. 57 p.

Rosas, J.C. 2004. Recursos Genéticos del Género *Phaseolus* en Honduras. EAP, Zamorano. Tegucigalpa, Honduras. 41 p.

Rubio, R. 2002. Caracterización de la diversidad genética del germoplasma hondureño de frijol común. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 72 p

López, M; Fernández, F y Schoonhoven. (comps). 1985. Frijol: Investigación y Producción. Publicación del Programa de Naciones Unidas y Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Edit. XYZ. 417 p.

ANEXOS

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

Protocolo para Amplificación de ADN mediante PCR usando marcadores RAPD Método UW, adaptado por A. Suazo y B. Herrera.

1. Descongelar las muestras de ADN y los componentes para PCR en una bandeja con hielo de forma que los tubos estén en contacto con el hielo y se descongelen a bajas temperaturas.
2. Preparar tubos para PCR etiquetados, colocando el volumen final de agua para las muestras y para el control negativo (empezar con el control negativo). Después agregar 7.5 µl de ADN de cada muestra.
3. Colocar en un tubo eppendorf las cantidades de *primer*, buffer 10X, dNTP's (Nucleótidos) 10X y Taq-Polimerasa, especificadas en el cuadro de Adaptación de componentes para PCR usando marcadores RAPD, para formar una mezcla maestra.
4. Agitar la mezcla maestra manualmente en forma suave.
5. Colocar 7.5 µl de mezcla maestra en los aliquots antes preparados con agua y ADN.
6. Colocar los aliquots en el plato del termociclador y sellar con papel plástico (Microseal TM "A" Film) equilibrando el número de aliquots en el plato.
7. Iniciar la amplificación usando el perfil térmico para RAPD que se indica en el cuadro de Adaptación de perfil térmico para PCR usando marcadores RAPD.

Adaptación de componentes para PCR usando marcadores RAPD

Componentes	Volumen (µl)	
	Control negativo	Muestra X
H ₂ O	10.9	3.4
ADN (8 ng/ml)	0	7.5
Primer (10µM)	0.6	0.6
Buffer 10X	1.5	1.5
10X dNTP's (10 mM)	1.5	1.5
Taq-Polimerasa (6 U/µl)	0.5	0.5
Volumen Final	15.0	15.0

Adaptación de perfil térmico para PCR usando marcadores RAPD

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)	Ciclos
1	Desnaturalización	95	0:01:00	1
2	Desnaturalización	94	00:00:45	41
3	Acoplamiento	35	00:00:30	41
4	Elongación	72	00:01:15	41
5			40 veces al paso 2	
6	Elongación Final	72	00:05:00	1
7	Conservación	4	00:00:00	

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 1:30 minutos. Retirar y agitar vigorosamente.
4. Calentar nuevamente durante un 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.

Procedimiento para electroforesis usando marcadores RAPD

1. Mezclar 10 µl de cada muestra amplificada con 2.5 µl de Buffer 6X y sembrar en los orificios de la gel.
2. Dejar correr la electroforesis por 60 min a 110 V.
3. Sumergir la gel en una solución con 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 µM.

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

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

Anexo 2. Guía para Elaboración de Componentes Adaptados para PCR**CUANTIFICACIÓN DE ADN****Buffer TNE 10X (1000 ml)**

12.11 g (100 mM) Tris Base
3.72 g (10 mM) EDTA Na₂·2H₂O
116.89 g (2 M) 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 1 M (pH 8.5)
20 ml (200 mM) KCl 1 M
2.5 ml (25 mM) MgCl₂

Procedimiento:

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

dNTP's 10X (1000 µl)

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

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 (1000 ml)

54 g 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 agarosa y llenar el tanque de electroforesis es necesario emplear el 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 completar 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.
- Transferir la solución a un frasco volumétrico de 10 ml y completar el volumen con agua destilada.

Solución de Bromuro de Etidio (400 ul)

- Colocar 400 ml de agua destilada en un recipiente.
- Agregar 40 μ l de Bromuro de Etidio de una solución 10 mg/ml.
- Después de correr la electroforesis sumergir la gel en la solución diluida de Bromuro de Etidio por 30-45 min y observar al transiluminador UV.