

**Optimización de los protocolos para el  
marcador SCAR BAC6 y de PCR múltiple  
con los marcadores SCAR SAP6 y SU91 de la  
resistencia a la bacteriosis común del frijol**

**Roberto César Chavarría Hermida**

**Zamorano, Honduras**

Diciembre, 2010

ZAMORANO  
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Optimización de los protocolos para el  
marcador SCAR BAC6 y de PCR múltiple  
con los marcadores SCAR SAP6 y SU91 de la  
resistencia a la bacteriosis común del frijol**

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

Presentado por

**Roberto César Chavarría Hermida**

**Zamorano, Honduras**

Diciembre, 2010

# **Optimización de los protocolos para el marcador SCAR BAC6 y de PCR múltiple con los marcadores SCAR SAP6 y SU91 de la resistencia a la bacteriosis común del frijol**

Presentado por:

Roberto César Chavarría Hermida

Aprobado:

---

Juan Carlos Rosas, Ph.D.  
Asesor principal

---

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

---

Marcelino Guachambala, Ing.  
Asesor

---

Raúl Espinal, Ph.D.  
Decano Académico

---

Nils Berger, Ph.D.  
Asesor

---

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

---

Abelino Pitty, Ph.D.  
Coordinador Área de Fitotecnia

## RESUMEN

Chavarría, R. 2010. Optimización de los protocolos para el marcador SCAR BAC6 y de PCR múltiple con los marcadores SCAR SAP6 y SU91 de la resistencia a la bacteriosis común del frijol. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 19 p.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los principales componentes en la dieta tradicional y una de las principales fuentes de proteína de América Latina y África. La bacteriosis común en frijol causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, es una de las enfermedades que limitan su producción y puede ocasionar pérdidas en el rendimiento hasta el 40%. La resistencia genética a esta enfermedad ha sido identificada como de *loci* de carácter cuantitativo (QTL, por sus siglas en inglés). La estrategia más efectiva y ambientalmente segura para controlar esta enfermedad es el desarrollo de cultivares resistentes con la ayuda de la selección asistida con marcadores (SAM). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) múltiple permite amplificar e identificar simultáneamente dos o más marcadores. El objetivo de este estudio fue optimizar los protocolos para el marcador BAC 6 y la PCR múltiple de los marcadores SAP 6 y SU 91 para ampliar la capacidad de selección asistida con marcadores para la resistencia a esta enfermedad. Para la optimización del marcador BAC 6, se utilizaron los genotipos resistentes VAX 6, VAX 3, GN Weihing, XAN 176, BAT 93 y el susceptible Catrachita; y para la validación de este protocolo se utilizaron 35 genotipos de reacción conocida (susceptibles y resistentes). El protocolo de la PCR múltiple fue optimizado utilizando los genotipos Amadeus 77 y VAX 6. Se utilizó la prueba  $\chi^2$  (Chi-cuadrado) para determinar la concordancia entre los valores esperados y los observados de la presencia o ausencia del QTL identificado en la variedad GN#1 Sel 27, asociado al marcador BAC 6. Las principales variaciones fueron en los reactivos ddH<sub>2</sub>O, buffer PCR, dNTP's con y sin MgCl<sub>2</sub>, la temperatura de acoplamiento y el número de ciclos de la PCR. Se optimizó y validó el protocolo del marcador BAC 6 utilizando una temperatura de acoplamiento de 73°C y 25 ciclos, y se optimizó el protocolo de PCR múltiple de los marcadores SAP 6 y SU 91 a una temperatura de acoplamiento de 65°C. Estos marcadores serán usados en SAM en el programa de mejoramiento genético de frijol en Zamorano.

**Palabras clave:** Acoplamiento, optimizar, PCR, *Phaseolus vulgaris*, QTL, resistencia, validar, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>16</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>17</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>18</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Página
1. Genotipos de frijol usados en la optimizacion del protocolo del marcador SCAR BAC 6 .....	3
2. Genotipos de frijol usados en la validación del protocolo del marcador BAC 6 y el protocolo de la PCR múltiple . .....	4
3. Descripción de los cebadores utilizados para la bacteriosis común del frijol .....	4
4. Perfil térmico inicial utilizado en la optimización de la PCR del SCAR BAC 6. ....	6
5. Variaciones en las mezclas maestras y perfiles térmicos para PCR, para el marcador BAC6 .....	7
6. Protocolo inicial y variaciones utilizadas en la optimización de PCR múltiple de los marcadores SU 91 Y SA P6.....	7
7. Variaciones en las mezclas maestras y perfiles térmicos para PCR múltiple de los marcadores SU 91 Y SA P6.....	7
8. Validación del protocolo I con temperatura de 73°C y 25 ciclos. ....	12

Figura	Página
1. Vizualización del protocolo A con temperatura de 72 °C. ....	9
2. Vizualización del protocolo D con una temperatura de acoplamiento de 73 °C. ....	10
3. Vizualización del protocol I, con una temperatura de acoplamiento de 73°C.....	11
4. Protocolo I optimizado con temperatura de 73°C y 25 ciclos. ....	11
5. Validación del protocolo para el marcador BAC 6.....	12
6. Vizualización de los protocolos A y B con temperatura de acomplamiento de 58°C con las variedades VAX 6 y Amadeus 77. ....	13
7. Visualización de los protocolos A y B con temperatura de acomplamiento de 56°C con las variedades VAX 6 y Amadeus 77 .....	14
8. Vizualización de los protocolos A, C, y D con temperatura de acomplamiento de 57°C.....	14
9. Vizualización de la prueba del protocolo A con temperatura de acomplamiento de 65°C.....	15

## 1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un componente de la dieta tradicional y la fuente principal de proteína para las familias de bajos ingresos de América Latina y África (Voysset 1983). Como la mayoría de cultivos, el frijol está sujeto a la incidencia de una serie de factores como plagas y enfermedades que pueden limitar su producción (PRIAG 1993). La bacteriosis común es una de las enfermedades que afecta el cultivo de frijol en la mayoría de las zonas frijoleras de América Latina, es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, y es una de las enfermedades más destructivas alrededor del mundo y puede ocasionar pérdidas superiores al 40% en variedades comerciales susceptibles (Rosas 1998 y Mahuku *et al.* 2006).

El patógeno se desarrolla mayormente en climas cálidos y causa un mayor daño a temperaturas de 28°C (Goss 1940; Mack y Wallen 1974) y alta humedad (Sutton y Wallen 1970). Los resultados de muchas investigaciones sugieren que la resistencia a bacteriosis común está controlada por unos pocos genes (Urrea *et al.* 1999). Este tipo de resistencia ha sido reportada como cuantitativa, teniendo como mínimo tres genes determinantes de la misma (Nodari *et al.* 1993). La estrategia más efectiva y ambientalmente segura para controlar esta enfermedad es el desarrollo de cultivares resistentes, lo cual ha sido el mayor objetivo de los programas de mejoramiento de frijol (Yu *et al.* 2000). En busca de líneas con alta resistencia a bacteriosis común se desarrollaron cruza entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius* (Singh y Muñoz 1999). Sin embargo la resistencia a bacteriosis común en frijol es difícil de evaluar y seleccionar debido a que son caracteres de herencia complejos y de baja heredabilidad (Coyne y Schuster 1974). La evaluación de la asociación de marcadores de loci de caracteres cuantitativos (QTL, por sus siglas en inglés) a través de medios genéticos y ambientales es esencial para confirmar la utilidad de los mismos en la implementación de métodos de selección asistida con marcadores moleculares (Jung *et al.* 1999).

Durante la última década, el diagnóstico rápido, sensible y confiable de los agentes causales de las enfermedades infecciosas ha empezado a experimentar una transformación. Entre las técnicas moleculares utilizadas, la reacción en cadena de la polimerasa desarrollado por Mullis *et al.* (1986) (PCR, por sus siglas en inglés) ha adquirido un gran valor de diagnóstico, permitiendo la detección de agente etiológicos, y de genotipos de resistencia y virulencia, con gran sensibilidad y rapidez. Las PCR (polymerase chain reaction) múltiples son reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en una sola reacción diferentes secuencias de ADN, lo que permite la detección e identificación simultánea de los genes de interés (Mendez y Pérez 2004). Esta técnica requiere de optimización ya que los productos no específicos pueden interferir en

la amplificación de productos específicos. Los análisis moleculares de caracteres complejos como la resistencia a enfermedades, tolerancia a factores abióticos, fijación biológica de nitrógeno, pueden ayudar a los mejoradores a encontrar estrategias más efectivas de selección (Beaver y Osorno 2009).

Según Jung *et al.* (1999), el marcador molecular BC409.1250 está asociado a la resistencia a la bacteriosis común en frijol, lo que sugiere que dicho marcador es de gran ayuda para el mejoramiento de las variedades existentes; así mismo, con base en la secuencia del RAPD SU91 se construyeron un par de oligonucleótidos cebadores de 20 pares de base (pb) de longitud cada uno asociados a la resistencia a bacteriosis común (Pedraza *et al.* 1997). Miklas *et al.* (2000) manifiesta que la eficiencia de la selección directa con marcadores puede ser mejorada si se utilizan tres marcadores SCAR (specific characterized and amplified region) en la misma reacción de PCR (polymerase chain reaction), y que esta reacción múltiple permite seleccionar de forma simultánea tres QTL (quantitative trait loci) con un gran efecto en la resistencia a bacteriosis común de los 24 que han sido reportados de resistencia a esta enfermedad. En el presente trabajo se implementó el uso de los marcadores BAC 6, SAP 6 y SU 91, para ello se optimizó el protocolo para el marcador molecular BAC6 y se desarrolló un protocolo para PCR múltiple con los marcadores SAP6 y SU91 de QTL de resistencia a la bacteriosis común en frijol, para ampliar la capacidad de selección asistida con marcadores para la resistencia a esta enfermedad.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria (CCPA), Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el Valle del Yegüare a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

### 2.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

Para la optimización del marcador BAC 6 (1250 pb) se utilizaron seis variedades de frijol de distintas fuentes de origen y de reacción conocida (cuadro 1), cinco resistentes y una susceptible a la bacteriosis común del frijol para la detección del QTL asociado a la resistencia a esta enfermedad, originalmente identificado en la variedad GN#1 Sel 27. Para la validación del protocolo se utilizaron 35 genotipos resistentes y susceptibles (Cuadro 2). Para la optimización del protocolo de PCR múltiple de los marcadores SU91 y SAP6 (cuadro 3) se utilizaron los genotipos de Amadeus 77 y VAX 6 como controles positivos, y para la validación del mismo se utilizaron los mismos 35 genotipos descritos en el cuadro 2.

Cuadro 1. Genotipos de frijol usados en la optimización del protocolo del marcador SCAR BAC6.

Genotipos	Procedencia
<b>Resistentes:</b>	
VAX6	CIAT
VAX3	CIAT
GN Weihing	Nebraska/USA
XAN 176	CIAT
BAT 93	CIAT
<b>Susceptible:</b>	
Catrachita	Honduras

Cuadro 2. Genotipos de frijol usados en la validación del protocolo del marcador BAC6 y el protocolo de PCR múltiple.

Resistentes		Susceptibles	
Genotipos	Procedencia	Genotipos	Procedencia
<b>Resistentes:</b>		<b>Susceptibles:</b>	
X069-153-9-4-3-2	UPR/EAP	Macuzalito	Zamorano
X069-153-9-4-3-5	UPR/EAP	G2333	CIAT
X069-157-8-5-6-1	UPR/EAP	Milenio	Zamorano
X069-157-14-4-3-1	UPR/EAP	Don Silvio	Zamorano
X069-157-14-4-5-9	UPR/EAP	TC 75	Zamorano
X0104-38-2-2-2	UPR/EAP	CENTA Pipil	El Salvador
X0104-38-3-4-4	UPR/EAP	CENTA CPC	El Salvador
X0104-45-3-5-5	UPR/EAP	INTA Zamorano	Nicaragua
X0104-49-5-1-4	UPR/EAP	ICTA - Zam	Guatemala
X0104-52-5-5-6	UPR/EAP	ICTA Sayaxché	Guatemala
VAX1	CIAT	628 5M 15215-33-3	CIAT
VAX2	CIAT	H7719	EEUU
VAX3	CIAT	Catrachita	EAP/Honduras
VAX4	CIAT	Tío Canela 75	EAP/Honduras
VAX6	CIAT	PC50	Dominicana
GN Weihing	Nebraska/EEUU	Marciano	EAP/Honduras
XAN 176	CIAT		
BAT 93	CIAT		
Amadeus 77	CIAT		

UPR: Universidad de Puerto Rico, EAP: Escuela Agrícola Panamericana, CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Cuadro 3. Descripción de los cebadores utilizados para la bacteriosis común del frijol.

Nombre del marcador	Tamaño (pb)	Secuencia	Genotipo	Gen	Referencia
BAC6	1250	TAG GCG GCG GCG CAC GTT TTG	GN #1	B10	Jung et al. (1999)
		TAG GCG GCG GAA GTG GCG GTG	Sel 27		
SAP6	820	GTC ACG TCT CCT TAA TAG TA	XAN	B10	Miklas et al.(2000b,c)
		GTC ACG TCT CAA TAG GCA AA	159		
SU91	700	CCA CAT CGG TTA ACA TGA GT	GN #1	B8	Pedraza et al. (1997)
		CCA CAT CGG TGT CAA CGT GA	Sel 27		



## 2.5 AMPLIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN DEL ADN.

La amplificación del ADN se realizó mediante el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollado por Mullis *et al.* (1986), para ello se utilizó un termociclador TECHNE TC 512. Las muestras se almacenaron en un refrigerador a 10°C hasta el momento de la electroforesis. La mezcla utilizada en la reacción de amplificación estuvo compuesta por el buffer PCR 5× Green Go Taq<sup>®</sup>, desoxinucleotidos trifosfatos (dNTP's) a una concentración de 4 μM con y sin cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), enzima Go Taq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase y ADN de los genotipos seleccionados. Para la optimización del protocolo del marcador SCAR BAC6, se generó un protocolo basado en las recomendaciones de la mezcla maestra de la Taq. polimerasa Go Taq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase de Promega.

La técnica utilizada para la visualización del ADN fue la electroforesis, preparada en una gel de agarosa al 1.2 %, en solución buffer TBE 0.5× (Tris-HCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA) en tanques para electroforesis. La separación se realizó a 100 V por una hora, teñidas en una solución de bromuro de etidio con una relación agua destilada: bromuro de etidio 10:1 durante 30 minutos, luego se destiñeron en agua destilada durante 30 minutos. Posteriormente se procedió a la visualización de las bandas de ADN en un transluminador y se fotografiaron bajo luz UV. Se usó una escalera molecular de 100 pares de bases (pb), para determinar el tamaño de las bandas obtenidas.

Cuadro 4. Perfil térmico inicial utilizado en la optimización de la PCR del SCAR BAC6.

Fase	Temperatura C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	1 min
Desnaturalización	94	30 seg
Acoplamiento	72	1 min
Elongación	72	1 min

Cuadro 5. Variaciones en las mezclas maestras y perfiles térmicos para PCR, para el marcador BAC6.

Reactivos ( $\mu\text{L}$ )	Protocolos								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
ddH <sub>2</sub> O	7,5	7,5	7,7	8,2	7,2	7,2	8,0	7,7	8,4
PCR Buffer	3,0	3,0	2,5	2,0	3,0	3,0	2,5	2,5	2,1
MgCl <sub>2</sub>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
dNTP's con MgCl <sub>2</sub>	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
dNTP's sin MgCl <sub>2</sub>	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,2	1,0	0,9
Primer F	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2
Primer R	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2
Go Taq <sup>®</sup>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2
ADN	2,7	2,7	3,0	3,0	3,0	3,0	2,0	3,0	3,0
Total	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0

\* Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) de cumplimiento para los protocolos A y B= **71,72,73,74**; C= **71**; D= **71 y 73**; E, F y G= **73**; H= **73 y 74**; I= **73** .

Cuadro 6. Protocolo inicial y variaciones utilizadas en la optimización de PCR múltiple de los marcadores SU91 Y SAP6.

Fase	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	1 min
Desnaturalización	94	30 seg
Acoplamiento	58	1 min
Elongación	72	1 min

Cuadro 7. Variaciones en las mezclas maestras y perfiles térmicos para PCR múltiple de los marcadores SU91 Y SAP6.

Reactivos ( $\mu\text{L}$ )	Protocolos			
	A	B	C	E
ddH <sub>2</sub> O $\mu\text{l}$	9,4	9,1	16,0	8,0
Buffer	4,0	4,2	5,0	2,5
MgCl <sub>2</sub>	0,0	0,0	0,0	0,0
dNTP's con MgCl <sub>2</sub>	0,0	0,0	0,0	0,0
dNTP's sin MgCl <sub>2</sub>	2,0	2,0	2,4	1,2
Primer F SU91/SAP6	0,3/0,3	0,3/0,3	0,5/0,5	0,25/0,25
Primer R SU91/SAP6	0,3/0,3	0,3/0,3	0,5/0,5	0,25/0,25
Go Taq <sup>®</sup>	0,4	0,5	0,6	0,3
ADN	3,0	3,0	4,0	2,0
Total	15,0	15,0	30,0	15,0

\* Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) de cumplimiento para los protocolos A= **55, 56, 57, 58, 59, 65, 66, 67**; B= **55, 56, 58, 65, 66, 67**; C= **57**; D= **57, 58, 59, 65, 66, 67**.

## 2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba de ajuste de  $\chi^2$  (Chi-cuadrado) para determinar la concordancia entre los valores esperados y los observados, para cada variación en la preparación de la mezcla maestra para amplificar el ADN de las muestras, el perfil térmico del PCR y la electroforesis con un nivel de significancia de 5 %.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA EL MARCADOR SCAR BAC6

Con base en el protocolo inicial, se realizaron pruebas utilizando variaciones en las cantidades de los reactivos y la temperatura de acoplamiento para PCR (cuadro 4 y 5). Los reactivos con mayores variaciones fueron ddH<sub>2</sub>O, PCR buffer, dNTP's con MgCl<sub>2</sub> y sin MgCl<sub>2</sub>. La temperatura de acoplamiento fue un factor determinante en el proceso de optimización del protocolo, tomando en consideración la amplificación de las bandas en la electroforesis y la cantidad de acoplamientos fuera de la secuencia del marcador.

Los genotipos utilizados en estas pruebas fueron: Catrachita, VAX 6, VAX 3, GN Weihing y BAT 93 porque presentan resistencia y susceptibilidad a bacteriosis común (cuadro 1). La estrategia utilizada antes de realizar cambios en las cantidades de los reactivos de las mezclas maestras, fue realizar pruebas para identificar la temperatura de acoplamiento adecuada para el marcador molecular en estudio. Todas las temperaturas de acoplamiento utilizadas en el protocolo A (cuadro 4) dieron como resultado acoples fuera de la secuencia del marcador a una longitud de 900 pb. Se observó bandas claras a 1250 pb en los genotipos VAX6 y GN Weihing en el protocolo A con MgCl<sub>2</sub>, pero en el mismo protocolo sin MgCl<sub>2</sub> en los dNTP's la banda presente en el genotipo VAX 6 desapareció y se presentó en el genotipo VAX 3, el cual presentó el marcador en las pruebas siguientes. No hubo diferencia entre el uso de dNTP's con MgCl<sub>2</sub> y sin MgCl<sub>2</sub> (figura 1) en mezcla con los dNTP's, la intensidad de las bandas y la cantidad de acoples no específicos fue igual para ambos protocolos, razón por la cual se continuó usando dNTP's sin cloruro de magnesio, porque el exceso de magnesio produce pegas fuera de la secuencia buscada.

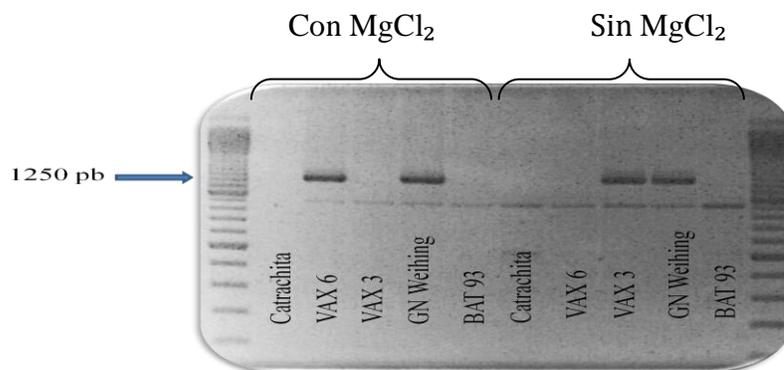


Figura 1. Visualización del protocolo A con temperatura de 72 °C.

Los genotipos utilizados para esta prueba fueron Catrachita, VAX 6, VAX 3, GN Weihing, XAN 176 y BAT 93 (figura 2), las variantes en temperatura de acoplamiento y cantidades de reactivos en la mezcla maestra (cuadro 5) se hicieron para eliminar los acoples fuera de la secuencia del marcador que se presentaban en los protocolos anteriores; el protocolo D con temperatura de 73 °C (figura 2) dio como resultado menor intensidad en las bandas de acoples fuera de secuencia con el genotipo BAT 93, razón por la cual se seleccionó éste genotipo como control positivo para este marcador molecular en las pruebas posteriores. Los genotipos Catrachita, VAX6 Y XAN176 no presentaron bandas a la altura del marcador molecular, por lo que se asegura que no poseen el QTL de GN#1 Sel 27 asociado a resistencia a bacteriosis. Los genotipos VAX3, GN Weihing presentaron claramente las bandas a la altura del marcador molecular al usar dNTP's sin MgCl<sub>2</sub> con acoples inespecíficos que no se pudieron eliminar con ningún cambio en el protocolo.

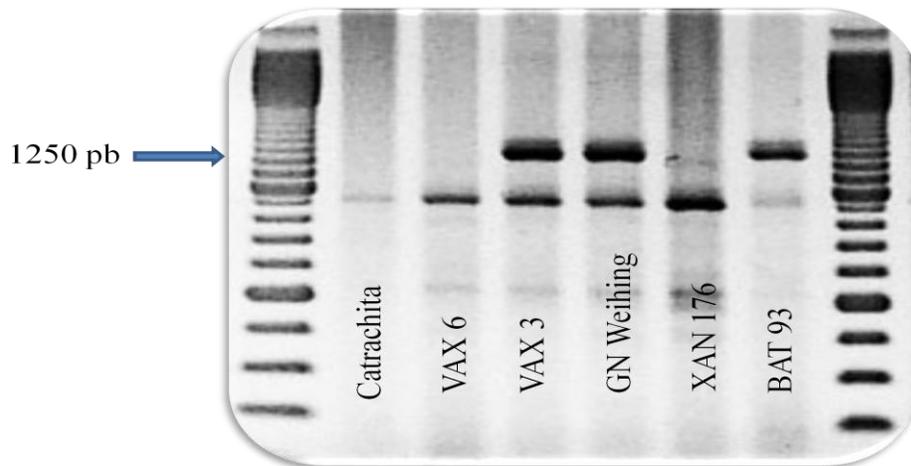


Figura 2. Vizualización del protocolo D con una temperatura de acoplamiento de 73 °C.

El genotipo BAT93 se utilizó en todas las repeticiones del siguiente experimento. Este genotipo se definió como control positivo (figura 2 y 3), el protocolo I con temperatura de 73°C se identificó como el adecuado para este marcador dada la clara definición de su banda a la altura predeterminada del marcador de 1250 pb y que la cantidad de Go Taq<sup>®</sup> utilizada fue la más baja de 0.2 µl, no se eliminaron los acoples fuera de la secuencia del marcador a pesar de los cambios en temperatura y cantidades de los reactivos utilizados en los protocolos E, F, G, H (cuadro 5).

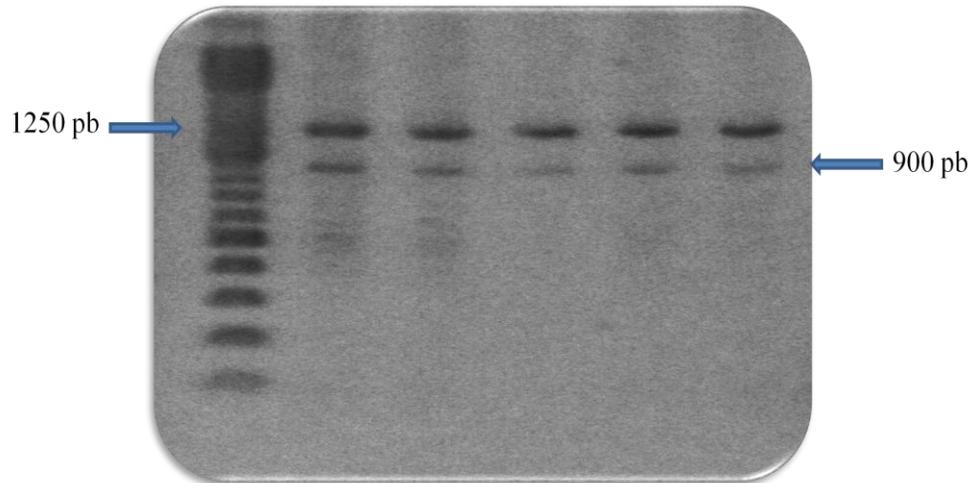


Figura 3. Visualización del protocolo I, con una temperatura de acoplamiento de 73°C.

Para eliminar las bandas de 900pb se bajó el número de ciclos del perfil térmico de 30 que eran originalmente a 28 sin obtener ningún resultado y así sucesivamente hasta 25 ciclos. Con una combinación de temperatura de 73°C y 25 ciclos se lograron eliminar las bandas de los acoples fuera de la secuencia del marcador.

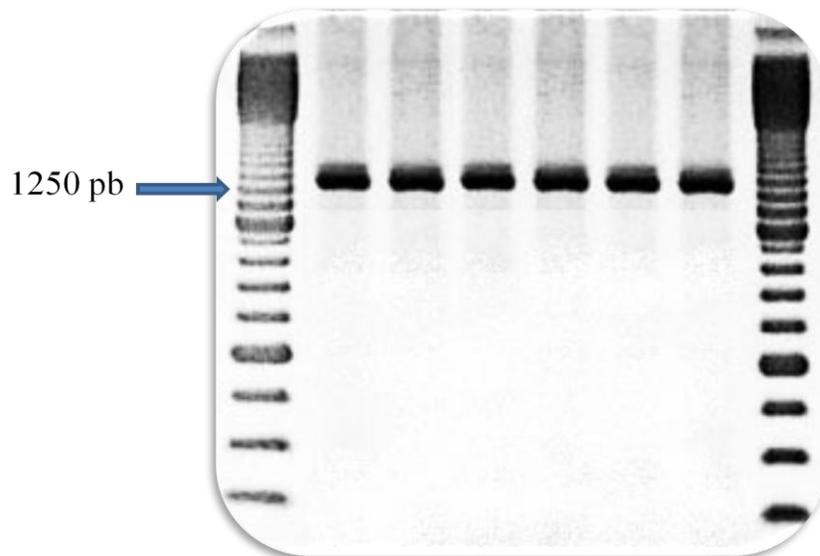


Figura 4. Protocolo I optimizado con temperatura de 73°C y 25 ciclos.

### 3.2 VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO PARA EL MARCADOR BAC 6.

Para la validación del protocolo para el marcador BAC 6 se utilizaron 35 genotipos de reacción conocida (cuadro 2). Se validó el protocolo I optimizado, el control positivo utilizado fue el genotipo BAT 93 con una escalera molecular de 100 pb, se realizaron dos repeticiones de cada muestra. Los genotipos VAX3, GN Weihing, y BAT 93 presentaron el QTL de GN#1 sel 27 asociado al marcador (figura 4) tal como se obtuvo en el protocolo D a 73°C (figura 2).

Los datos obtenidos en el gel de validación del marcador fueron analizados con  $\chi^2$  (Chi-cuadrado), se utilizaron 35 genotipos (cuadro 2) con dos repeticiones para tener un total de 70 repeticiones. Se esperaba que 64 de los genotipos resultaran negativos (sin el QTL GN#1 sel 27) y 6 positivos. Se utilizó un nivel de significancia ( $P > 0.95$ ).

Cuadro 8. Validación del protocolo I con temperatura de 73°C y 25 ciclos,

Genotipo	Observado	Esperado	O-E	$[(O-E)-(0.5)]^2/E$
Con el QTL GN#1 sel 27	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>-1</b>	<b>0,375</b>
Sin el QTL GN#1 sel 27	<b>65</b>	<b>64</b>	<b>1</b>	<b>0,003</b>
Total	<b>70</b>	<b>70</b>	<b>0</b>	$\chi^2 = \mathbf{0,003^{**}}$

\*\* Altamente significativo ( $P > 0.95$ )

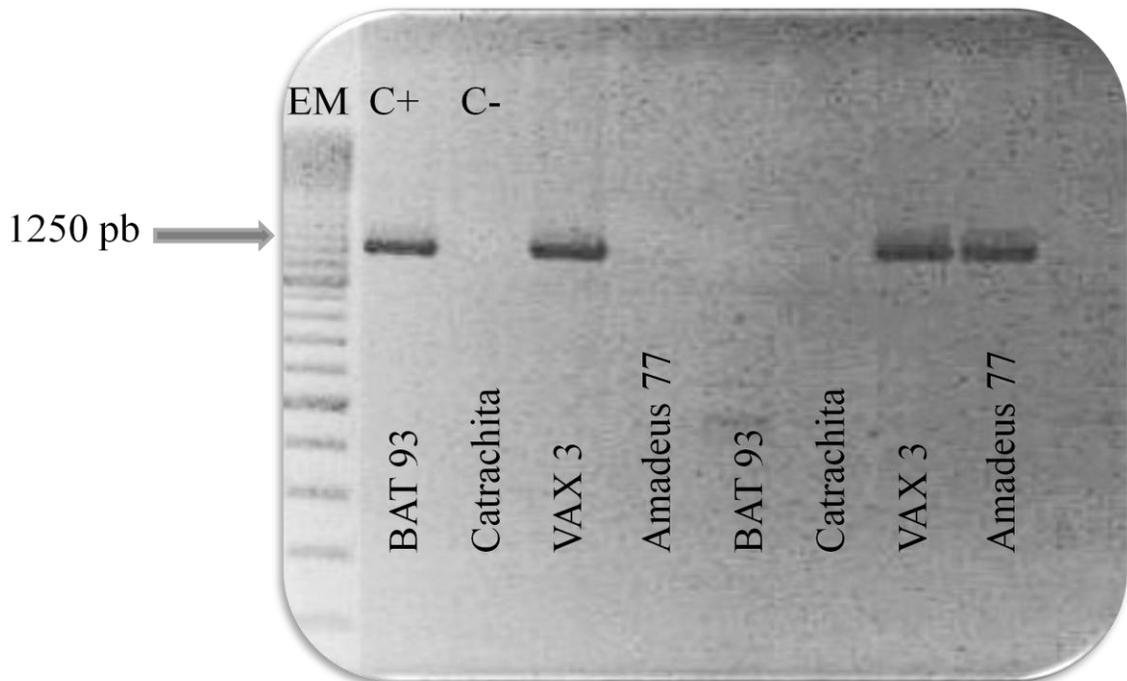


Figura 5. Validación del protocolo para el marcador BAC 6.

### 3.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA PCR MÚLTIPLE CON LOS MARCADORES SU91 Y SAP6.

En la optimización del protocolo para PCR múltiple de los marcadores SU91 y SAP6 se tomaron en cuenta los protocolos optimizados para los mismos (Barrera *et al.* 2001 y Zabala 2003) y las recomendaciones de la casa Promega, productora de la Go Taq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase dando como resultado los protocolos iniciales A y B (cuadro 7), para la optimización de esta reacción se utilizaron los genotipos de Amadeus 77 y VAX 6 porque fueron los utilizados como controles en éstos protocolos ya que presentan el marcador de cada uno de sus QTLs las variaciones en las cantidades de los reactivos y la temperatura de acoplamiento se hicieron con base en los resultados obtenidos de la prueba con el protocolo inicial cuadro 6 y 7.

Los protocolos A y B (cuadro 7) dieron como resultado la amplificación de bandas de 700 pb correspondientes al marcador SU 91 (figura 4), no se amplificaron las bandas del marcador SAP 6 de 820 pb esto debido a una temperatura de acoplamiento muy baja para el marcador SAP 6. Se observó también la presencia de acoples fuera de la secuencia del marcador a una altura de 120 pb.

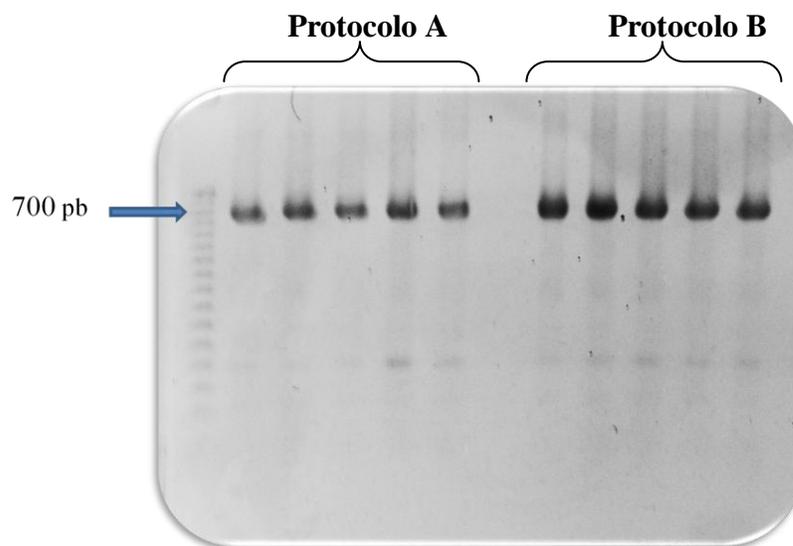


Figura 6. Vizualización de los protocolos A y B con temperatura de acomplamiento de 58°C con las variedades VAX 6 y Amadeus 77.

Con los resultados obtenidos de los protocolos A y B (Figura 4), se procedió a disminuir dos grados en la temperatura de acoplamiento para poder obtener el acople de los primers del marcador SAP 6 de 820 pb, basados en que cuando la temperatura de acoplamiento es muy alta no se amplifican las bandas dependiendo del marcador utilizado (Löffert *et. al* 1999). La temperatura de acoplamiento del marcador SAP6 es de 55°C, por lo cual para no perder el acople del marcador SU91 se utilizó una temperatura de 56°C para las siguientes pruebas. La disminución en la temperatura de acoplamiento de 2°C (58°C a 56°C) provocó la aparición de las bandas del marcador SAP 6 a una altura de 820 pb las que con una

temperatura de 58°C no se amplificaron, pero no se obtuvo el resultado esperado dado que no se amplificó el marcador SU 91 (Figura 5). Se descartó el uso del protocolo B (cuadro 7) ya que la intensidad de las bandas obtenidas fueron similares a las del protocolo A (figura 5) y porque se utiliza menor cantidad de enzima Go Taq®.

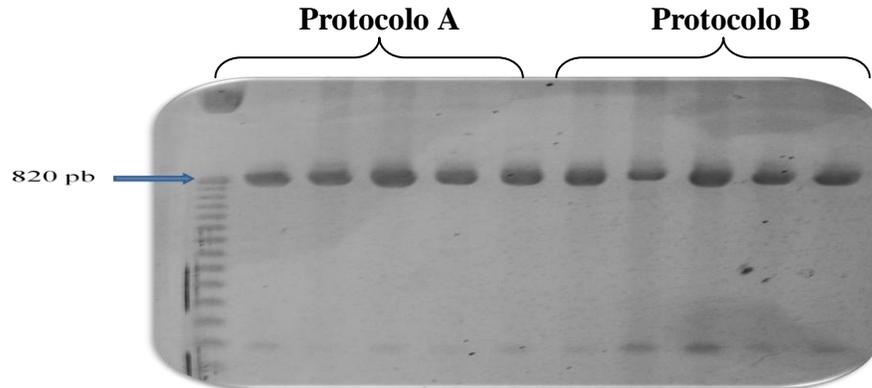


Figura 7. Visualización de la prueba de los protocolos A y B con temperatura de acoplamiento de 56°C con las variedades VAX 6 y Amadeus 77.

Se originaron los protocolos C y D (cuadro 7) para asegurar que los resultados obtenidos no fueron por una concentración inadecuada de los reactivos de la mezcla maestra sino la temperatura de acoplamiento. Se incrementó un grado en la temperatura de acoplamiento (57°C) para lograr obtener el acople de los primers para los dos marcadores. Según las recomendaciones de (Barrera *et al.* 2001 y Zabala 2003) se generó el protocolo C, el cual es la suma de los reactivos utilizados para PCR de ambos marcadores (SU 91 Y SAP 6) y el protocolo D es la división a la mitad del volumen de los reactivos del protocolo C (cuadro 7). No se presentaron las bandas de ninguno de los dos marcadores (700 y 820 pb). Se observó acoples a una longitud de 200 pb y hubo diferencias en las bandas obtenidas entre los protocolos utilizados.

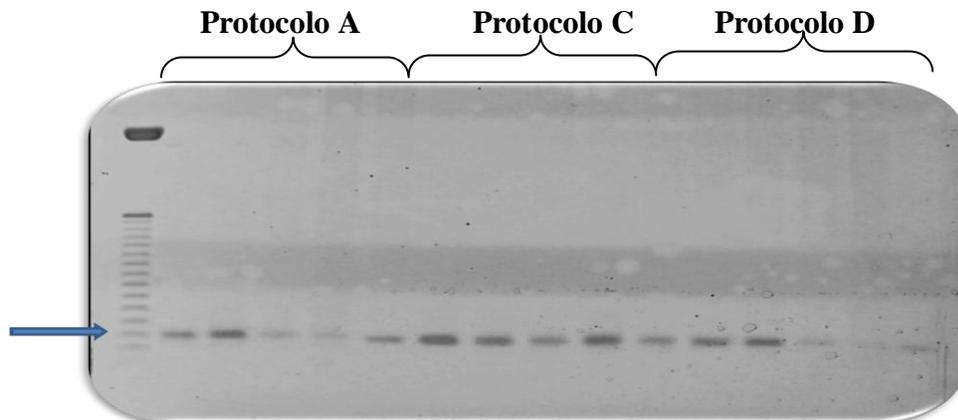


Figura 8. Visualización de las prueba de los protocolos A, C, y D con temperatura de acoplamiento de 57°C.

Aunque hubo diferencias en las bandas obtenidas entre los protocolos utilizados estas no estuvieron suficiente intensidad, por lo cual los protocolos C y D (cuadro 7) fueron descartados dado que en ambos se utilizan grandes cantidades de reactivos que no son necesarios. En las siguientes pruebas solo se utilizó el protocolo A haciendo variaciones en la temperatura de acoplamiento.

Tomando en cuenta que a bajas temperaturas (55 a 58°C) no se logró el acople de los cebadores para los marcadores al mismo tiempo se aumentó la temperatura de acoplamiento hasta llegar a 65°C, temperatura en la cual se obtuvieron las bandas para los marcadores SAP 6 de 820 pb y SU 91 de 700 pb, implementando el protocolo A (figura 8) y siendo este el protocolo optimizado para PCR múltiple de los marcadores SAP 6 y SU 91. Los genotipos utilizados fueron los controles positivos para estos marcadores Amadeus 77 y VAX 6.

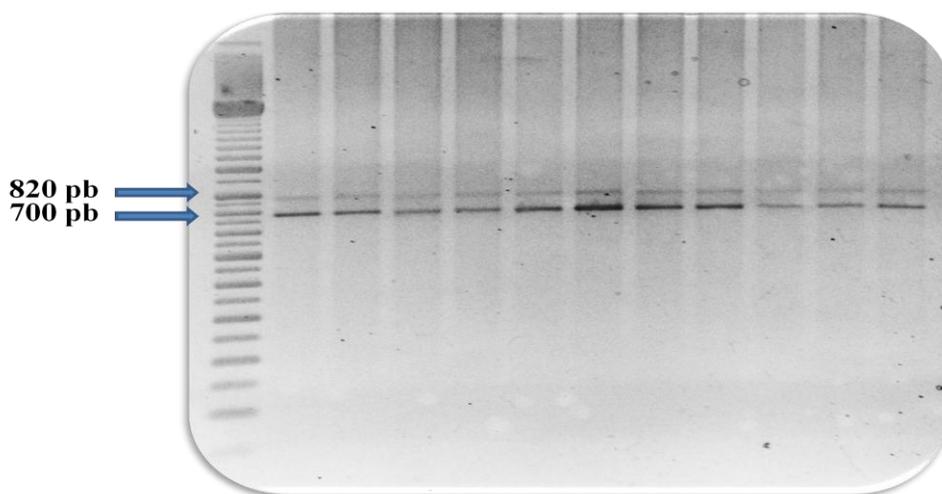


Figura 9. Vizualización de la prueba del protocolo A con temperatura de acoplamiento de 65°C.

#### 4. CONCLUSIONES

- Se optimizó el protocolo para el marcador molecular SCAR BAC 6, utilizando una temperatura de acoplamiento de 73°C y 25 ciclos.
- Se validó el protocolo para el marcador molecular BAC 6, con una temperatura de acoplamiento de 73°C, utilizando 35 genotipos de frijol de reacción conocida de resistencia y susceptibilidad a bacteriosis común en frijol (CCB).
- Se optimizó el protocolo para PCR múltiple de los marcadores SAP 6 y SU 91, utilizando dos variedades genotipos de frijol de reacción conocida de resistencia a bacteriosis común en frijol (CBB).
- Se aumentó la capacidad de selección asistida con marcadores del laboratorio de Biotecnología Aplicada del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) con la optimización del protocolo para PCR del marcador BAC 6, y el protocolo para PCR múltiple de los marcadores SAP 6 Y SU 91.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Utilizar el marcador BAC 6 con el protocolo validado en la selección asistida con marcadores (SAM).
- Implementar el uso de PCR múltiple con los marcadores SAP 6 y SU 91 para la SAM en la identificación de QTL asociados a bacteriosis común en frijol, con el protocolo validado para ello.
- Validar el protocolo de PCR múltiple de los marcadores SAP 6 y SU 91.
- Desarrollar un protocolo de PCR múltiple utilizando los marcadores BAC 6, SU 91 Y SAP 6 para aumentar la capacidad de SAM en un menor tiempo y a un menor costo.
- Implementar los datos obtenidos de la SAM con los marcadores BAC 6, SU 91 Y SAP 6 en el desarrollo de variedades resistentes a CBB.

## 6. LITERATURA CITADA

Barrera, C. 2001. Uso de técnicas convencionales y moleculares para el mejoramiento de la resistencia a la Bacteriosis Común y al Virus del Mosaico Dorado Amarillo del frijol común. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras 45p.

Beaver, J; Osorno, J. 2009. Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. *Euphytica*. 168 (2): 145-175.

Coyne, DP; Schuster ML.1974. Differential reaction of pods and foliages of bean (*Phaseolus vulgaris*) to *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Disease Report* 58:278-282.

Goss, RW. 1940. The relation of temperature to common and halo blight of beans. *Phytopathology* 30(12): 258-264.

Jung, G; Skroch, PW; Nienhuis, J; Coyne, DP; Arnaud-Santana, E; Ariyaratne, HM y Marita, JM. 1999. Confirmation of QTL associated with common bacterial blight resistance in four different genetic backgrounds in common bean. *Crop Science* 39: 1448-1455.

Mack, AR; Wallen, VR. 1974. Effects of various field levels of soil temperature and soil moisture on the growth of beans infected with bacterial blight. *Canadian J. Soil Sci.* 54 (2): 149-158.

Mahuku, GS; Jara, C; Henriquez, MA; Castellanos, G; Cuasquer, J. 2006. Genotypic characterization of common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR-RFLP of ribosomal genes. *Journal of Phytopathology* 154 (1): 35-44.

Mendez, S; Perez, E. 2004. PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22 (3): 183 – 192.

Miklas, PN; Smith, JR; Riley, R; Grafton, KF; Singh, SP; Jung, G; Coyne, DP. 2000b. Marker-assisted breeding for pyramided resistance to common bacterial blight in common bean. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 43:39-40.

Mullis, k; Faloona, F; Scharf, S; Saiki, R; Horn, G; Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 (1): 263-273.

Nodari, RO; Tsai, SM; Guzman, P; Gilbertson, RL; Gepts, P. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* 134: 341-350.

Löffert, D; Karger, S; Tweigling, G; Ulber, V; Kan, J. 1999. Optimization of multiplex PCR. *Qiagen News* 2: 5-8.

Pedraza, F; Gallego, G; Beebe, S; Tohme, J. 1997. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis común (CBB). p.130-134. En Singh, S.P. y O. Voysest (eds.). *Taller de mejoramiento de frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina*. 559 pp. CIAT, Cali, Colombia.

PRIAG (Programa Regional de Reforzamiento de la Investigación Agronómica sobre los Granos Básicos en Centro América). 1993. El cultivo de frijol, *Boletín Técnico*, Tegucigalpa, Honduras 28 p.

Rosas, J.C. 1998. *El Cultivo del Frijol Común en América Tropical*. Zamorano, Honduras, Zamorano Academia Press. 52 p.

Singh, SP; Muñoz, CG. 1999. Resistance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvement. *Crop Science* 39:80-89.

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

Sutton, MD; Wallen, VR. 1970. Epidemiological and ecological relation of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* on beans in southwestern Ontario. *Can. J. Botany* 48 (7): 1329-1334.

Urrea CA; Miklas PN; Beaver JS. 1999. Inheritance of resistance to common bacterial blight in four tepary bean lines. *J. Am. Soc. Hortic. Science* 124:24-27.

Voysest, O. 1983. *Variedades de frijol en América Latina y su origen*. CIAT, Cali, Colombia. 87 p. Yu, K; Park, SJ; Poysa, V. 2000. Marker assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breeding* 119: 411- 415.

Zabala, F. 2003. Resistencia genética del frijol común a aislamientos de *Xanthomonas axonopodis* pv, *phaseoli* de Honduras. Proyecto Especial del Programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 31p.

