

**Aplicaciones de marcadores moleculares en
la selección por resistencia a los virus del
mosaico común y necrótico en frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L)**

**Leslie Alejandra Aviles Lopez
Ricardo José Escobar Flores**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Octubre, 2014**

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONOMÍA

**Aplicaciones de marcadores moleculares en
la selección por resistencia a los virus del
mosaico común y necrótico en frijol común
(*Phaseolus vulgaris L*)**

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

Presentado por

**Leslie Alejandra Aviles Lopez
Ricardo José Escobar Flores**

Zamorano, Honduras
Octubre, 2014

Aplicaciones de marcadores moleculares en la selección por resistencia a los virus del mosaico común y necrótico en frijol común (*Phaseolus vulgaris L*)

Presentado por:

Leslie Alejandra Aviles Lopez
Ricardo José Escobar Flores

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

Renan Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Iveth Rodriguez, Ing. Agr.
Asesora

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Aplicaciones de marcadores moleculares en la selección por resistencia al virus del mosaico común necrótico en frijol común (*Phaseolus vulgaris*.L).

Leslie Alejandra Aviles Lopez
Ricardo José Escobar Flores

Resumen. El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las leguminosas de mayor importancia en Centro América, por ser un alimento primordial en la dieta diaria consumida por su fuente de proteína, siendo este cultivo generador de ingresos y empleo rural. Las variedades nativas de frijol cultivadas en esta región son susceptibles a todas las cepas de diversos virus. Las enfermedades virales más difundidas son el mosaico común (VMC) y el mosaico común necrótico (VMCN). Ambos virus son transmitidos por áfidos de forma no persistente y rápida, y es diseminado por la semilla infestada. Una forma eficiente del control es el uso de variedades resistentes con una combinación de los genes *I* y *bc-3*; pero cabe resaltar que solo la combinación alélica homocigota recesivo (*elF4E²/elF4E²*) del gen *bc-3* confiere resistencia al VMCN. El objetivo del estudio fue validar la selección asistida con marcadores (SAM) moleculares SCAR para desarrollar líneas resistentes al VMC y al VMCN para la prevención y la reducción de las pérdidas de estos virus en la producción del frijol común, contribuyendo en la agricultura y a los productores en la seguridad alimentaria y nutricional de los consumidores. La validación de los marcadores se realizó utilizando 63 plantas F3 de las poblaciones MER 2222 y 14 de la población MEN 2201 de frijol común fueron evaluados con los marcadores moleculares SW13 del gen *I* y CAPS ENM del gen *bc3* y las formas alélicas *elF4E* (ENM + la enzima *Rsal*). Las plantas F3 de las poblaciones MER2222 y MEN2201 con el marcador molecular SW13 del gen *I*, los resultados del *Chi Cuadrado* (X^2) indicaron que los datos observados se ajustan estadísticamente a los esperados ($P= 0.25 > 0.05$ y $P= 0.85 > 0.05$, respectivamente). En los análisis de las F3 de las Poblaciones MER2222 y MER2201 con los marcadores moleculares CAPS ENM del gen *bc-3*, los datos se ajustan estadísticamente a los esperados ($P= 0.95 > 0.05$ y $P= >0.05$, respectivamente). Y con el marcador molecular CAPS ENM + enzima *Rsal* de los alelos del gen *bc-3* para las plantas F3 de MER2222 y MEN2201, los datos observados se ajustan estadísticamente a los esperados ($P=0.86 > 0.05$ y $P= 0.33 > 0.05$, respectivamente). La SAM es una herramienta útil para el mejoramiento genético de la resistencia al VMC y VMCN del frijol en Centro América y El Caribe.

Palabras clave: Combinaciones alélicas, *Phaseolus vulgaris*, SCAR variedades resistentes.

Abstract. Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is one of the most important legumes in Central America because is the main protein source of protein in daily diet and it generates employment and income for rural economy. Native bean cultivars in the region are susceptible to all strains of diverse virus. The most common viral diseases are: Bean Common Mosaic virus (BCMV) and Bean Common Mosaic Necrosis Virus (BCMNV). Both virus are transmitted through aphids in a non-persistent and fast way

and is widespread by infested seeds of beans. An efficient way of control is to use of resistant cultivars which have a combination of genes *I* and *bc-3*; it must be pointed that only the allelic combination homozygous recessive ($elF4E^2/elF4E^2$) of gen *bc-3* provides resistance to BCMNV. This study objective was to validate the marker assisted selection with molecular (MAS) markers SCAR in the development of cultivars resistant to BCMV and BCMNV to prevent and decrease of yield losses caused because of these viruses in bean crops, therefore making a contribution to agriculture, food security and nutrition quality of the consumers. Validation of these markers was carried using 63F3 plants of MER 2222 population and 14 plants of MEN 2201 population of *Phaseolus vulgaris* which were evaluated with molecular markers SW13 of gene *I* and CAPS ENM of gene *bc-3*, allelic forms *elF4E* (ENM + *Rsal* enzyme). Plants F3 of MER2222 and MEN2201 populations were evaluated with molecular marker SW13 of gene *I*, the results from *Chi square* analysis (X^2) indicate that observed data statistically adjust to expected values ($P=0.25>0.05$ and $P=0.85>0.05$, respectively). In the analysis of F3 plants of the populations MER2222 and MEN2201 with molecular markers CAPS ENM of gene *bc-3*, data statistically adjust to expected values ($P= 0.95 >0.05$ y $P= >0.05$, respectively). In the same way with molecular marker CAPS ENM + *Rsal* enzyme of gene *bc-3* allele used for F3 plants of populations MER2222 and MEN2201, observable data statistically adjust to expected values ($P=0.86 >0.05$ y $P= 0.33 >0.05$, respectively). MAS is a useful tool for genetic improvement of beans with resistance to BCMV and BCMNV in Central America and the Caribbean.

Key Words: Allelic combinations, *Phaseolus vulgaris*, resistant varieties, SCAR

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	15
5. RECOMENDACIONES	16
6. LITERATURA CITADA	17
7. ANEXOS.....	19

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Protocolo para la amplificar el marcador SW13 del gen <i>I</i>	4
2. Protocolo para amplificar el marcador ENM del gen <i>bc-3</i>	5
3. Protocolo para amplificación de los alelos <i>elF4E</i> del gen <i>bc-3</i>	5
4. Resultados del análisis molecular de 63 plantas F3 de la población MER 2222 (Amadeus 77/Raven) con los marcadores Scar Sw13 del gen <i>I</i> y CAPS ENM con la enzima <i>Rsal</i> del gen <i>bc-3</i> y sus alelos <i>elF4E</i> ²	7
5. Análisis estadístico de <i>Chi Cuadrado</i> (X^2) para la presencia del marcador SCAR SW13 del gen <i>I</i> en la población F3 MER2222 (Amadeus 77 /Raven)	9
6. Análisis estadístico de <i>Chi cuadrado</i> para la presencia del marcador ENM del gen <i>bc-3</i> en la población F3 MER2222 (Amadeus/Raven).....	10
7. Análisis estadístico de <i>Chi cuadrado</i> para la presencia del marcador ENM con la enzima <i>Rsal</i> de los alelos <i>elF4E</i> del gen <i>bc3</i> en la población F3 MER2222 (Amadeus 77/ Raven).....	11
8. Resultados del análisis de las poblaciones F3 del MEN 2201 (Amadeus77/ICTA Ligero). Muestras que presentaron presencia (+) o ausencia (-) del gen <i>I</i> (marcador SW13); gen <i>bc-3</i> y alelos <i>elF4E</i> , utilizando marcador CAPSENM	12
9. Análisis estadístico de <i>Chi Cuadrado</i> para la presencia del marcador SW13 gen <i>I</i> en la población F3 MEN 2201 (Amadeus 77/Raven)	13
10. Análisis estadístico de <i>Chi cuadrado</i> para la presencia del marcador ENM con enzima <i>Rsal</i> de los alelos en la población F3 MEN 2201 (ICTA ligero/Raven..	14
Figuras	Página
1. Presencia (+) y ausencia (-) del gen <i>I</i> en plantas F3 de la población MER 2222. A la izquierda el control positivo (C+) y negativo (C-)	9
2. Representación de la presencia (+) y ausencia (-) del marcador CAPS ENM del gen <i>bc-3</i> en plantas F3 de la población MER 2222. A la izquierda el control positivo (C+) y el control negativo (C-).....	9
3. Presencia de los alelos <i>elF4E</i> ² / <i>elF4E</i> ² y <i>elF4E</i> ¹ / <i>elF4E</i> ² en plantas de F3 de la Población MER 2222. A la izquierda los controles positivo (C+) y negativo (C-).....	10
4. Presencia del gen <i>I</i> en plantas de F3 MEN 2201, 1.14	13
5. Presencia del gen <i>bc-3</i> en plantas F3 de la Población MEN 2201.....	13
6. Presencia de alelos <i>elF4E</i> ² / <i>elF4E</i> ² , <i>elF4E</i> ¹ / <i>elF4E</i> ² , <i>elF4E</i> ¹ / <i>elF4E</i> ¹ en plantas de F3 de la Población MEN 2201, 1-14.....	14

Anexos	Página
1. Presencia del marcador CAPS ENM del gen bc-3 en plantas de F3 de la Población MER 2222	19
2. Presencia del gen I en plantas de F3 MER 2222, 19-68.....	19
3. Presencia de los alelos eIF4E2/ eIF4E2, eIF4E1/ eIF4E2, eIF4E1/ eIF4E1 en plantas de F3 MER 2222, 1-56.....	20
4. Protocolo de extracción de ADN para el análisis de RAPD (Método de la Universidad de Wisconsin, UW – Madison).....	20
5. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores tipo SCAR	21
6. Protocolo de Cuantificación de ADN con el Promega® Quantus™ Fluorometer.	22

1. INTRODUCCIÓN

Dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol común es una de las más importantes. Actualmente se encuentra distribuido en los cinco continentes y es un componente esencial de la dieta, especialmente en Centro y Sudamérica (Ramirez 2008). En Centro América, el cultivo es seriamente afectado por encontrarse en una zona propicia para el desarrollo de plagas, incluyendo los virus y sus agentes vectores (Morales 1999).

La producción de frijol es afectada por el virus del mosaico común necrótico (VMCN) del frijol, o virus del mosaico común – serotipo A (McKern *et al.*, 1992; Vetten *et al.*, 1992) del género Potyvirus. El VMCN se encuentra ampliamente distribuido a escala mundial y es tal vez el virus más común y destructivo de los 34 virus conocidos que infectan naturalmente el frijol (McKern *et al.*, 1992), ocasionando pérdidas considerables en el rendimiento del cultivo y una baja calidad del grano (Drijfhout 1978). Este virus es transmitido por áfidos de forma no persistente y rápida, sin necesidad de colonización. Este virus es portado por la semilla que le permite una rápida diseminación de la enfermedad (Drijfhout 1978).

La mayoría de variedades de frijol sembradas en Centro América y el Caribe poseen el gen *I* para resistencia al virus del mosaico común (VMC) (Fernandez *et al.*, 1985). Estas líneas con el gen *I* producen una reacción de hipersensibilidad reflejado en necrosis vascular y muerte de la planta con las cepas necróticas del VMCN (Pierce 1934). La identificación de fuentes recesivas de resistencia al virus del VMCN, mostraron que la mejor estrategia de control para el daño de este virus es la combinación del gen *I* y el gen *bc-3* (Drijfhout 1978). Cabe resaltar que la resistencia otorgada por el gen *bc-3* depende de la combinación de los alelos dominantes o recesivos de los genes implicados (Drijfhout 1978).

La resistencia al VMC y VMCN, es actualmente un enfoque importante en las actividades de mejoramiento genético del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, en colaboración con investigadores de la Universidad de Puerto Rico. Debido a que el VMCN no ha sido reportado en Centro América, se requiere el uso de marcadores moleculares para llevar a cabo los procesos de selección para la identificación de la resistencia a este virus en frijol común (Rosas 2011).

La presente investigación tuvo como objetivo el desarrollo de líneas resistentes al VMC y al VMCN para la prevención y la reducción de las pérdidas causadas por estos dos virus en la producción del frijol común, favoreciendo a los productores y contribuyendo a la seguridad alimentaria y nutricional de los consumidores. El estudio se condujo utilizando

los marcadores moleculares SCAR SW13 y CAPS ENM en familias F3 de las poblaciones MER 2222 y MEN 2201 de frijol común, con la finalidad de identificar las que poseen las combinaciones genotípicas de los genes *I* y *bc-3*, recomendada como estrategia de resistencia genética al VMC y VMCN del frijol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) en la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano, ubicado en el valle de Yeguaré, Km 30 carretera a Danlí.

Material experimental. Se utilizaron 63 plantas F3 derivadas de plantas F2 de la población MER 2222 (Amadeus 77/Raven) seleccionadas por presencia de gen *bc-3* y 14 plantas F3 de la población MEN 2201 (ICTA Ligero/Raven). Los progenitores ICTA Ligero y Amadeus 77 poseen el genotipo homocigoto dominante *II* que confiere resistencia al VMC. El progenitor Raven posee el genotipo homocigoto recesivo *bc3bc3* y sus alelos *elF4E* que confieren resistencia al VMCN (Montejo y Pantigoso 2013).

Extracción de ADN. Se utilizó el protocolo de la Universidad de Wisconsin- Madison para la extracción de ADN (Skroch *et al.* 1998). El ADN se extrajo de brotes jóvenes del tercer trifolio a los 25 días después de la siembra. Las muestras se recolectaron e identificaron en micro tubos de 1.5 mL (anexo 1).

Cuantificación del ADN. Para realizar la cuantificación del ADN se utilizó el protocolo QuantiFluor® Dye del Quantus Fluorometer Modelo E6150, Se hizo una solución de 1 µL de ADN estándar + 99 µL de Buffer TE1X + 100 µL de solución de trabajo y se colocó cada muestra en el fluorómetro, con el objetivo de conocer la concentración de ADN en todas las muestras.

Dilución de ADN. Las muestras de ADN se diluyeron con buffer TE 0.1X para una concentración final de 30 ng/mL con la misma capacidad de amplificación en la PCR y para observar polimorfismos de ADN bien definidos.

Amplificación del ADN. Para amplificar los genes *I*, *bc-3* y las combinaciones alélicas se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utilizando el marcador molecular SCAR, el cual requiere una concentración de ADN (30 ng/mL).

Los reactivos que se utilizaron para llevar a cabo la PCR: buffer 5X Green Go Taq®, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's) (4 µM) sin cloruro de magnesio, cloruro de magnesio (MgCl₂) (10 Mm/µL), enzima Go Taq® Flexi DNA polymerase, agua destilada y esterilizada, y ADN de los genotipos seleccionados (30 ng/mL) (Cuadros 1 y 2).

Amplificación del gen *I*. Para amplificar el gen *I* se utilizó como control positivo Tío Canela 75 siguiendo el protocolo SW13, amplificando las bandas a 690 pb. La secuencia de los primers que se utilizaron para la amplificación del gen *I* es:

SW13 (F): “5’-CACAGCGACATTAATTTTCCTTTC-3’ y
 SW13 (R) “5’ CACAGCGACAGGAGGAGCTTATTA-3’” (Melotto, *et al.*1996)

Cuadro 1. Protocolo para amplificar el marcador SW13 del gen *I*.

Reactivos	<i>IX</i>	
dd H2O	8.0	μL
PCR Buffer	2.5	μL
MgCl2	0.0	μL
dNTP's sin MgCl2	1.2	μL
Primer(F)	SW13 (F)	0.5 μL
Primer(R)	SW13 (R)	0.5 μL
Taq (Enzima)	0.3	μL
ADN Template	2.0	μL
Total	15.0	

Fuente: Nardepour *et al.*, (2010); Montejo y Pantigoso (2013).

Amplificación del gen *bc-3*. Para amplificar el gen *bc-3* se utilizó como control positivo la variedad Widusa siguiendo el protocolo ENM, y se utilizaron los primers o cebadores ENM-R y ENM-F (10 ng/μL). La secuencia de los primers que se utilizaron para la amplificación del gen *bc-3* es:

ENM-R: (5'CAACCAACTGGTATCGGA'3)
 ENM-F: (5'ACCGATGAGCAAAACCCT'3) (Nardepour *et al.*, 2010).

Primero se amplificó la banda del gen recesivo *bc-3* que se expresa a 541 pb. El gen *bc-3* puede contener tres combinaciones alélicas, homocigota recesivo resistente (*elF4E²/elF4E²*) que presenta las bandas 381 y 160 pb; homocigota dominante susceptible (*elF4E¹/ elF4E¹*) que presenta las bandas 541 y 160 pb; y heterocigota susceptible (*elF4E¹/ elF4E²*) que presenta las bandas de 541, 160 y 381 pb.

Cuadro 2. Protocolo para amplificar el marcador ENM del gen *bc-3*.

Reactivos		1X	
dd H2O		12.1	μl
PCR Buffer		3.0	μl
MgCl		1.5	μl
dNTP's sin MgCl2		2.0	μl
Primer(F)	ENM-F (F)	2.5	μl
Primer(R)	ENM-R (R)	2.5	μl
Taq (Enzima)		0.4	μl
ADN Template		1.0	μl
Total		25.0	μl

Fuente: Montejo y Pantigoso (2013).

Amplificación de los alelos *elF4E*. Luego de la amplificación del gen *bc-3* (541pb), se utilizó el protocolo optimizado por Montejo y Pantigoso (2013) y se realizó la PCR para observar las combinaciones alélicas *elF4E* de genotipos susceptibles y resistentes al VMCN utilizando la enzima de restricción *Rsal*[®] de Promega[®] (Naderpour *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Protocolo para la amplificación de los alelos *elF4E* del gen *bc-3*.

Reactivos		1X	
dd H2O		7.3	μl
PCR Buffer 10X		2.0	μl
MgCl		1.5	μl
BSA		0.2	μl
Enzima <i>Rsal</i> (10μ/μl)		0.5	μl
Producto PCR		10.0	μl
Total		21.5	μl

Fuente: Montejo y Pantigoso (2013).

Visualización del ADN. Se analizó el producto de la PCR mediante la técnica de electroforesis, utilizando geles de agarosa al 1.2% en solución tampón TE 0.5X (Tris-HCL, con un pH de 7.5; ácido butírico, EDTA), para verificar el tamaño de las bandas se utilizó la escalera molecular de 100 pb. El corrido electroforético se hizo a 110 voltios durante 1 hora y 30 minutos. Luego se tiñó el gel de agarosa en una solución 1:10 de bromuro de etidio para que este se intercalara entre las bases nitrogenadas y observar los fragmentos de ADN, para luego ser visualizadas en el transluminador Bench Top UVP que emite luz ultravioleta (260-280 nm) y tomar una fotografía para verificar la presencia o ausencia de las bandas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Evaluación de plantas F3 de la Población MER 2222 con marcadores moleculares de los genes *I*, *bc3* y alelos *elF4E*.

Un total de 63 plantas F3 de la Población MER 2222 (Amadeus 77/Raven) fueron evaluadas con el marcador molecular SCAR SW13 del gen *I* de resistencia al VMC, y el marcador CAPS ENM del gen *bc3* y las formas alélicas *elF4E* (ENM + la enzima *Rsal*) de resistencia al VMCN. Estas plantas F3 provienen de plantas F2 seleccionadas en el estudio de Montejó y Pantigoso (2013), quienes aplicaron selección por presencia del gen *bc3* en la misma población MER 2222. Los resultados de los análisis moleculares se presentan y discuten a continuación.

Presencia del gen *I*. El análisis con el marcador molecular SW13, asociado con el gen dominante *I* de resistencia al VMC, indica que la mayoría de las plantas F3 (59 de 63) de la población MER 2222 presentaron la banda de 690 pb asociada a los genotipos resistentes *I/I* e *I/i*. Por otro lado, la ausencia de esta banda indica el genotipo susceptible *i/i* (Cuadro 4). Una representación de la expresión por presencia y ausencia del marcador SW13 del gen *I*, se observa en la Fig. 1. De acuerdo al proceso de selección asistida con marcadores (SAM), las plantas con ausencia del marcador SW13 deben ser descartadas porque son susceptibles al VMC. El proceso de selección por resistencia al VMC debe continuarse con las plantas que presentaron el marcador SW13 hasta fijar el genotipo resistente homocigota dominante *I/I* en una generación más avanzada (>F6).

Ambos progenitores de esta población, Amadeus 77 y Raven, poseen el gen dominante *I*, por lo que se esperaba que las plantas F3 de la población MER 2222 presentaran el marcador SW13. Al realizar el análisis de *Chi cuadrado* (X^2), los valores obtenidos fueron $X^2=1.28$ y un valor de probabilidad (P)= 0.25 (P>0.05) con un grado de libertad (GL) (Cuadro 5). Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula (H_0), que indica que los datos observados se ajustan estadísticamente a los datos esperados. Esto sugiere que la SAM usando el marcador SW13 puede ser utilizada con confianza para la selección por la resistencia (gen *I*) al VMC del frijol (Beaver *et al.*, 2003), cuando no hay suficiente presión natural del virus o no se dispone de la técnica de infección artificial.

Presencia del gen *bc3*. El análisis con el marcador CAPS ENM del gen *bc-3*, indicó la presencia del marcador ENM en 62 de las 63 plantas F3 de la Población MER 2222 (Cuadro 4). Este resultado era esperado ya que estas plantas F3 se derivan de plantas F2 homocigotas recesivas (*bc3/bc3*) previamente seleccionadas con este marcador por Montejó y Pantigoso (2013).

El análisis de X^2 confirma este resultado al obtenerse un valor de $X^2= 0.016$ y un valor $P= 0.95$ (>0.05), con 1 GL (Cuadro 6). Por lo tanto, los valores observados con el marcador ENM se ajustan estadísticamente a los esperados, y se acepta la H_0 . Estos resultados confirman la eficiencia en el uso del marcador ENM para la SAM por presencia del gen *bc3* de resistencia al VMCN del frijol. Una representación de la expresión por presencia y ausencia del marcador ENM del gen *bc3* (Figura 2).

Para el mejoramiento genético de la resistencia al VMCN del frijol en Centro América, esta herramienta molecular es muy importante. No se puede utilizar la técnica de inoculación artificial con la cepa necrótica de este VMCN para la selección de genotipos resistentes, ya que se asume que esta cepa necrótica no está presente en la región y no debe ser introducida para estos propósitos.

Cuadro 4. Resultados del análisis molecular de 63 plantas F3 de la población MER 2222 (Amadeus77/Raven) con los marcadores SCAR SW13 del gen *I* y CAPS ENM con la enzima *Rsal* del gen *bc-3* y sus alelos *elF4E*.²

Plantas F3	SW13 (<i>gen I</i>)	ENM (<i>bc-3</i>)	CAPS -ENM con enzima <i>Rsal</i>		
			<i>elF4E</i> ¹ / <i>elF4E</i> ¹ (541 y 160 pb)	<i>elF4E</i> ¹ / <i>elF4E</i> ² (160, 381 y 541pb)	<i>elF4E</i> ² / <i>elF4E</i> ² (160 y 381 pb)
MER2222- 1	+	+	0	+	-
MER2222- 2	+	+	0	+	-
MER2222- 3	+	+	0	+	-
MER2222- 4	+	+	0	+	-
MER2222- 5	+	+	0	0	0
MER2222- 6	+	+	0	0	0
MER2222- 7	+	+	0	0	0
MER2222- 8	+	+	0	0	0
MER2222- 9	+	+	0	0	0
MER2222- 10	+	+	0	0	0
MER2222- 11	+	+	0	+	-
MER2222- 12	+	+	0	+	-
MER2222- 13	+	+	0	0	0
MER2222- 14	+	+	0	+	-
MER2222- 15	+	+	0	+	-
MER2222- 16	+	+	0	0	0
MER2222- 19	+	+	0	+	-
MER2222- 20	+	+	0	+	-
MER2222- 21	+	+	0	0	0
MER2222- 22	-	+	0	0	0
MER2222- 23	+	+	0	-	+
MER2222- 24	+	+	0	-	+
MER2222- 25	+	+	0	+	-
MER2222- 26	+	+	0	0	0

MER2222- 27	+	+	0	+	-
MER2222- 28	+	+	0	+	-
MER2222- 29	+	+	0	+	-
MER2222- 30	+	+	0	+	-
MER2222- 31	-	-	0	0	0
MER2222- 32	+	+	0	0	0
MER2222- 33	+	+	0	0	0
MER2222- 34	-	+	0	+	-
MER2222- 35	+	+	0	+	-
MER2222- 36	+	+	0	+	-
MER2222- 37	+	+	0	0	0
MER2222- 38	+	+	0	-	+
MER2222- 39	-	+	0	0	0
MER2222- 40	+	+	0	-	+
MER2222- 42	+	+	0	-	+
MER2222- 43	+	+	0	+	-
MER2222- 44	+	+	0	-	+
MER2222- 45	+	+	0	+	-
MER2222- 46	+	+	0	-	+
MER2222- 47	+	+	0	0	0
MER2222- 48	-	+	0	+	-
MER2222- 49	+	+	0	-	-
MER2222- 51	+	+	0	0	0
MER2222- 52	+	+	0	+	-
MER2222- 53	+	+	0	-	+
MER2222- 54	+	+	0	-	+
MER2222- 55	+	+	0	-	+
MER2222- 56	+	+	0	-	+
MER2222- 57	-	+	0	-	+
MER2222-59	+	+	0	-	+
MER2222- 60	-	+	0	-	+
MER2222- 61	+	+	0	+	-
MER2222- 62	+	+	0	+	-
MER2222- 63	+	+	0	-	+
MER2222- 64	+	+	0	-	+
MER2222- 65	-	+	0	-	+
MER2222- 66	+	+	0	+	-
MER2222- 67	+	+	0	-	+
MER2222- 68	-	+	0	0	0
Presente	54	62	0	25	18
Ausente	9	1	0	19	26

Presencia (+), ausencia (-) y sin expresión (0) de las bandas polimórficas de los marcadores moleculares SCAR SW13 (gen *I*), ENM (gen *bc3*) y ENM + *Rsal* (alelos *elF4E*).



Figura 1. Presencia (+) y ausencia (-) del gen *I* en plantas F3 de la población MER 2222. A la izquierda el control positivo (C+) y negativo (C-).

Cuadro 5. Análisis estadístico de *Chi Cuadrado* (X^2) para la presencia del marcador SCAR SW13 del gen *I* en la población F3 MER2222 (Amadeus 77 /Raven).

Marcador	Observado	Esperado	(O-E)	(O-E) ² /E
Presente	54	63	-9	1.28
Ausente	9	0	9	0
Total	63	63	0	$X^2 = 1.28$

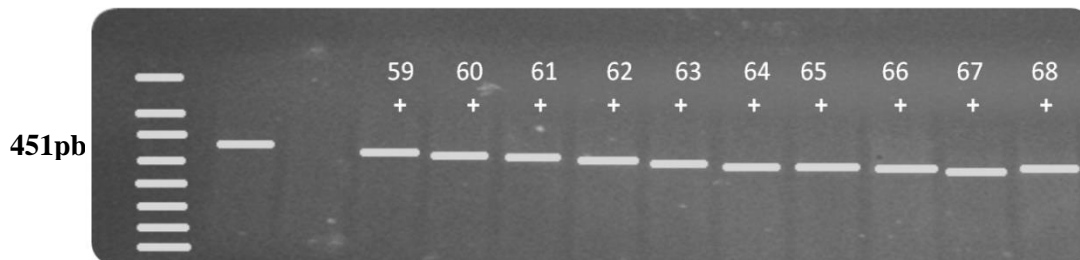


Figura 2. Presencia (+) y ausencia (-) del marcador CAPS ENM del gen *bc-3* en plantas F3 de la población MER 2222. A la izquierda el control positivo (C+) y el control negativo (C-).

Cuadro 6. Análisis estadístico de *Chi cuadrado* para la presencia del marcador ENM del gen *bc-3* en la población F3 MER2222 (Amadeus/Raven).

Marcador	Observado	Esperado	(O-E)	(O-E) ² /E
Presente	62	63	-1	0.016
Ausente	1	0	1	0
Total	63	63	0	$\chi^2 = 0.016$

Valor de P=0.95 (>0.05), 1 GL.

Presencia de alelos *elF4E* en plantas con el gen *bc3*. Se logró observar las bandas polimórficas que indican la presencia de los alelos del homocigota recesivo (*elF4E²/elF4E²*) a 381 y 160 pb, y del heterocigota susceptible (*elF4E¹/elF4E²*) a 160, 381 y 541 pb (Narderpour *et al.*, 2010). Una representación de la expresión por presencia y ausencia del marcador en las formas alélicas *elF4E* se observa en la fig. 3. La presencia de las combinaciones alélicas *elF4E²/elF4E²* que se derivan de las combinaciones aportadas por los padres, y la selección previa de plantas individuales F2 por la presencia del gen *bc-3*. Las plantas F3 a seleccionar son las que presentan la combinación alélica *elF4E²/elF4E²*, que confiere la resistencia al virus VMCN.

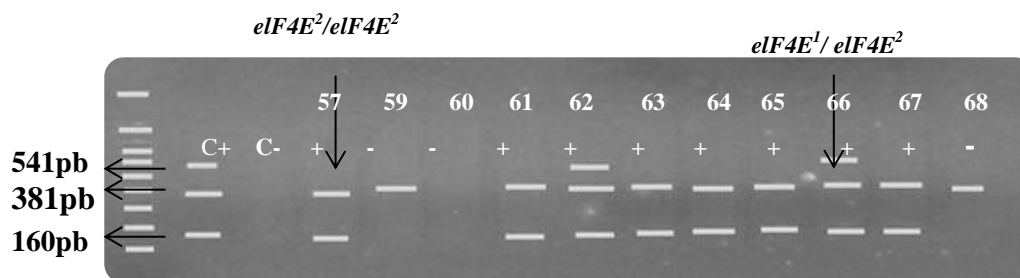


Figura 3. Presencia de las formas alélicas *elF4E²/elF4E²* y *elF4E¹/elF4E²* en plantas de F3 de la Población MER 2222. A la izquierda los controles positivo (C+) y negativo (C-).

Los valores resultantes del análisis de *Chi Cuadrado* para las combinaciones alélicas *elF4E²/elF4E²* y *elF4E¹/elF4E²* observadas en plantas de F3 de la Población MER 2222, presentan un valor de $\chi^2 = 1.44$, y un valor de probabilidad P= 0.30 (P>0.05) con grados de libertad =1 (Cuadro 7). Por lo tanto, se acepta la hipótesis Ho que indica que los datos esperados se ajustan estadísticamente a los observados, debido a la incorporación de la combinación alélica *elF4E²/elF4E²* que confiere resistencia al VMCN, proveniente del progenitor Raven a la descendencia F3. El avance por autofecundación de las plantas F3 heterocigotas susceptibles *elF4E¹/elF4E²* puede generar individuos F4 resistentes por la segregación de las formas alélicas.

Cuadro 7. Análisis estadístico de *Chi Cuadrado* para la presencia del marcador ENM con la enzima *Rsal* de los alelos *elF4E* del gen *bc-3* en la población F3 MER2222

(Amadeus 77/ Raven).

Relación Esperada	Observado	Esperado	(O-E)	(O-E) ² /E
1/2	26	22	4	0.72
1/2	18	22	-4	0.72
Total	44	44	0	$\chi^2 = 1.44$

Valor de P=0.25 (>0.05), 1 GL.

B. Evaluación de plantas F3 de la Población MEN 2201 con marcadores de los genes *I* y *bc3* y alelos *elF4E*²

Un total de 14 plantas F3 de la población MEN 2201 (ICTA Liger/Raven) fueron evaluadas con los marcadores moleculares SW13 del gen *I* de resistencia al VMC, y el marcador molecular CAPS ENM del gen *bc3* y las formas alélicas del *elF4E* (ENM + enzima *Rsal*) de resistencia al VMCN. Estas plantas F3 provienen de las F2 seleccionadas por la presencia del gen *bc3*. A continuación se presentan los resultados de la investigación.

Presencia del gen *I*. El análisis con el marcador molecular SCAR SW13, asociado con el gen dominante *I* de resistencia al VMC, indica que la mayoría de las plantas F3 (13 de 14) de la población MEN 2201 presentaron la banda de 690 pb asociada a los genotipos resistentes *I/I* e *I/i* (Cuadro 8). Por otro lado, la ausencia de esta banda indica el genotipo susceptible *i/i*. Una representación de la expresión por presencia y ausencia del marcador SW13 del gen *I*, se observa en la Fig. 4. De acuerdo al proceso de selección asistida con marcadores (SAM), las plantas con ausencia del marcador SW13 deben ser descartadas porque son susceptibles al VMC. El proceso de selección por resistencia al VMC debe continuarse con las plantas F3 que presentaron el marcador SW13 hasta fijar el genotipo resistente homocigota dominante *I/I* en una generación más avanzada (>F6).

Ambos progenitores de esta población, ICTA Liger y Raven, poseen el gen dominante *I*, por lo que se esperaba que las plantas F3 de la población MEN 2201 presentaran el marcador SW13. Al realizar el análisis de *Chi cuadrado* (X^2), los valores obtenidos fueron $X^2=0.07$ con una probabilidad (P)= 0.85 (P>0.05) con un grado de libertad (GL) (Cuadro 9). Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula (H₀), que indica que los datos observados se ajustan estadísticamente a los esperados. Esto sugiere que la SAM usando el marcador SW13 puede ser utilizada con confianza para la selección por la resistencia (gen *I*) al VMC del frijol (Beaver *et al.*, 2003) en poblaciones tempranas, cuando no hay suficiente presión natural del virus o no se dispone de la técnica de infección artificial.

Presencia del gen *bc3*. El análisis con el marcador CAPS ENM del gen *bc-3*, indicó la presencia del marcador en 14 de 14 plantas F3 de la Población MEN 2201

(Cuadro 8). Este resultado era esperado ya que estas plantas F3 se derivan de plantas F2 homocigotas recesivas (*bc3/bc3*) previamente seleccionadas con este marcador por Montejo y Pantigoso (2013). Una representación de la expresión por presencia y ausencia del marcador ENM del gen *bc3*, se observa en la Fig. 5. Al encontrarse la expresión del marcador en todas las plantas, no fue necesaria una prueba de *Chi Cuadrado*.

Estos resultados confirman la eficiencia en el uso del marcador ENM para la SAM por presencia del gen *bc-3* de resistencia al VMCN del frijol.

Cuadro 8. Resultados del análisis de plantas F3 de la Población MEN 2201 (ICTA Ligero/Raven) con presencia (+) o ausencia (-) del marcador SW13 del gen *I* y del marcador CAPS ENM + enzima *Rsal* del gen *bc-3* y alelos *eIF4E*.

Plantas F3	SW13 (gen <i>I</i>)	ENM (gen <i>bc-3</i>)	ENM + enzima <i>Rsal</i>		
			eIF4E ¹ /eIF4E ¹ (541 y 160 pb)	eIF4E ¹ /eIF4E ² (160, 381 y 541pb)	eIF4E ² /eIF4E ² (160 y 381 pb)
MER2201- 1	+	+	0	+	-
MER2201- 2	+	+	0	0	0
MER2201- 3	-	+	0	+	-
MER2201- 4	+	+	0	-	+
MER2201- 5	+	+	0	-	+
MER2201- 6	+	+	0	0	0
MER2201- 7	+	+	0	-	+
MER2201- 8	+	+	0	+	-
MER2201- 9	+	+	0	+	-
MER2201- 10	+	+	0	+	-
MER2201- 11	+	+	0	-	+
MER2201- 12	+	+	0	+	-
MER2201- 13	+	+	0	+	-
MER2201- 14	+	+	0	0	0
Presente	13	14	0	7	4
Ausente	1	0	0	4	7

Presencia (+), ausencia (-) y sin expresión (0) de las bandas polimórficas de los marcadores moleculares SW13 (gen *I*), ENM (gen *bc3*) y ENM + enzima *Rsal* (alelos *eIF4E*).

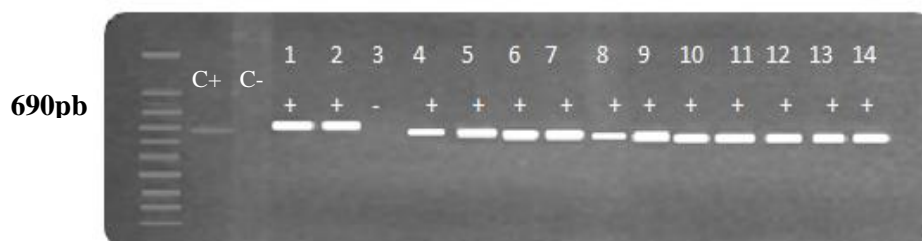


Figura 4. Presencia (+) y ausencia (-) del marcador SW13 del gen *I* en plantas F3 de la Población MEN 2201. A la izquierda los controles positivo (C+) y negativo (C-).

Cuadro 9. Análisis estadístico de *Chi Cuadrado* para la presencia del marcador SW13 gen *I* en la población F3 MEN 2201 (Amadeus 77/Raven).

Marcador	Observado	Esperado	(O-E)	(O-E) ² /E
Presencia	13	14	-1	0.07
Ausencia	1	0	1	0
Total	14	14	0	$X^2 = 0.07$

Valor de P=0.25 (>0.05), 1 GL.

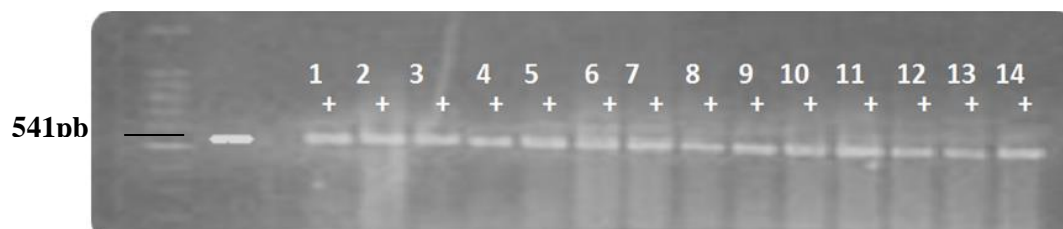


Figura 5. Presencia (+) y ausencia (-) del marcador ENM del gen *bc-3* en plantas F3 de la Población MEN 2201. A la izquierda los controles positivo (C+) y negativo (C-).

Presencia de alelos *elF4E* en plantas con el gen *bc3*. Se logró observar la presencia las bandas polimórficas que indican la presencia de los alelos del homocigota recesivo (*elF4E*²/*elF4E*²) a 381 y 160 pb y del heterocigota susceptible (*elF4E*¹/*elF4E*²) presente a 160, 381 y 541 pb (Narderpour *et al.*, 2010). Una representación de la expresión por presencia y ausencia del marcador ENM del gen *bc3*, se observa en la Fig. 6. La presencia de las combinaciones alélicas *elF4E*²/*elF4E*², se derivan de las combinaciones aportadas por los padres, y la selección previa de plantas individuales F2 por la presencia del gen *bc-3*. Las plantas F3 a seleccionar son las que presentan la combinación alélica *elF4E*²/*elF4E*², que confiere la resistencia al virus VMCN.

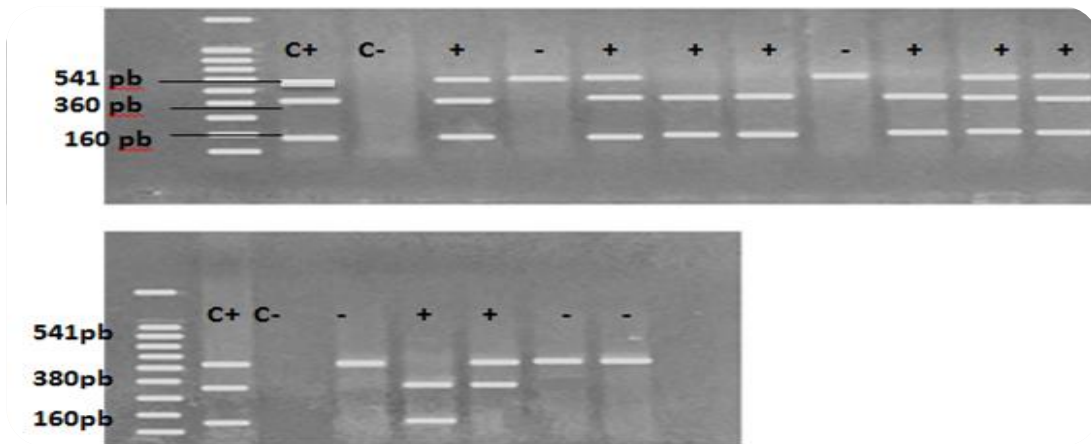


Figura 6. Presencia (+) y ausencia (-) de bandas polimórficas de las combinaciones alélicas $elF4E^2/elF4E^2$, $elF4E^1/elF4E^2$, $elF4E^1/elF4E^1$ en plantas de F3 de la Población MEN 2201.

Los valores resultantes del análisis de *Chi Cuadrado* para las combinaciones alélicas $elF4E^2/elF4E^2$ y $elF4E^1/elF4E^2$ observadas en plantas de F3 de la Población MEN 2201, presentan un valor de $X^2 = 0.80$ y un valor de probabilidad $P = 0.25$ ($P > 0.05$) con grados de libertad = 1 (Cuadro 10). DE acuerdo a estos resultados, se acepta la hipótesis H_0 que indica que los datos esperados se ajustan estadísticamente a los observados. Esto es debido a la incorporación de la combinación alélica $elF4E^2/elF4E^2$ que confiere resistencia al VMCN, proveniente del progenitor Raven a la descendencia F3. El avance por autofecundación de las plantas F3 heterocigotas susceptibles $elF4E^1/elF4E^2$ puede generar individuos F4 resistentes por la segregación de las formas alélicas.

Cuadro 10. Análisis estadístico de *Chi Cuadrado* para la presencia del marcador ENM con enzima *Rsal* de los alelos en plantas F3 de la población MEN 2201 (ICTA Ligero/Raven).

Relación Esperada	Observado	Esperado	(O-E)	(O-E) ² /E
1/2	7	5.5	1.5	0.41
1/2	4	5.5	-1.5	0.41
Total	11	11	0	$\chi^2 = 0.82$

Valor de $P = 0.38$ (> 0.05), 1 GL.

4. CONCLUSIONES

- La aplicación de la selección asistida con marcadores (SAM) moleculares para la selección de plantas de frijol resistentes a los virus del mosaico común (VMC) con el marcador SCAR SW13 del gen I, y mosaico común necrótico (VMCN), con el marcador CAPS ENM y la adición de la enzima *Rsal*, respectivamente, permitió la identificación de plantas resistentes a ambos virus en las poblaciones evaluadas.
- La presencia de plantas resistentes usando la SAM se comportó según lo esperado, de acuerdo a la composición genotípica de los padres involucrados en los cruzamientos de los cuales se derivan las plantas de las poblaciones mencionadas.
- La SAM es una herramienta valiosa para complementar los procesos de selección por resistencia a los VMC y VMCN, en etapas en las cuales la presencia de estas enfermedades no se presentan en el campo, o en el caso del mejoramiento por resistencia al VMCN en Centro América (p.ej. en el Programa de Investigaciones en Frijol de Zamorano), en que no se puede utilizar las cepas necróticas para la selección usando inoculación artificial.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar la selección asistida con marcadores (SAM) para la selección de plantas resistentes al VMC y VMCN del frijol, con fines de la generación de germoplasma y variedades resistente a ambos virus para Centro América, El Caribe y África.
- Complementar el uso de la SAM con evaluaciones de campo en presencia de las enfermedades causadas por los VMC y VMCN, en condiciones donde se presenten en forma natural (El Caribe), o en colaboración son programas donde se pueda usar la inoculación artificial (Universidad de Puerto Rico).
- Continuar el proceso de selección con las plantas F3 de las Poblaciones MER 2222 y MEN 2201 que presentaron los marcadores de los genes de resistencia *I* y *bc3* hasta generar líneas avanzadas (>F6) y proceder a su validación en finca.

6. LITERATURA CITADA

Beaver J.S., J.C. Rosas, J. Myers, J. Acosta, J.D. Kelly, S. Nshimbe-Msolla, R. Misangu, J. Bokosi, S. temple, E. Arnaud-Santana y D.P. Coyne. 2003. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. *Field Crops Research* 82:87-102.

Drijfhout, E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. (Doctoral thesis, Wageningen) (en línea). Consultado 15 de mayo de 2014. Disponible en: <http://edepot.wur.nl/202002>

Escoto, N. D., R.A. Cerrato, E. Fúnez, M.T. Rodríguez, M Villeda. 2011. EL Cultivo del Frijol. Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria DICTA, Secretaria de Agricultura y Ganadería. Tegucigalpa. Honduras, 43 p.

Erazo Villegas, E.V. 2001. Uso de marcadores moleculares SCAR para la selección por resistencia múltiple a enfermedades virales en frijol común. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 53 p.

CIAT. 1985. Frijol: investigación y producción: referencia de los cursos de capacitación sobre frijol dictados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical. Eds. M. Lopez, F. Fernández y A. V. Schoonhoven. Cali. Colombia, 417 P

Narderpour, M., O., Sogaard Lund, R., Larsen and E., Johansen. 2010. Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated *eIF4E* allele. *Molecular Plant Pathology* 11(2):255-263.

Melotto M., Afanador. L, y Kelly . J.D. 1996. Development of a SCAR marker linked to the *I* gen in common bean. *Canada. Genome* 39: p1216.

Montejo L., Pantigoso H. 2013. Optimización del protocolo para el marcador molecular de los alelos *eIF4E* del gen *bc-3* de resistencia al virus del mosaico necrótico en frijol. Tesis Ing. Agr. Tegucigalpa. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 28 p.

Morales. F., 1999. Situación de las enfermedades virales del frijol común en América Central, México y El Caribe. Guatemala. Hojas de PROFRIJOL 6:2-3.

Mc Kern, N. M., G.I., Mink, O.W., Barnett, A., Mishra, L.A., Whittaker, M.J., Silbernagel, C.W., Ward and D.D. Shukla. 1992. Isolates of Bean Common Mosaic Virus Comprising Two Distinct Potyviruses. (en línea). Consultado 2 de agosto de 2014.

Disponible en:

<http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n09923.pdf>

Pierce, W.H. 1934. Viruses of the bean. *Phytopathology* 24: 87-115.

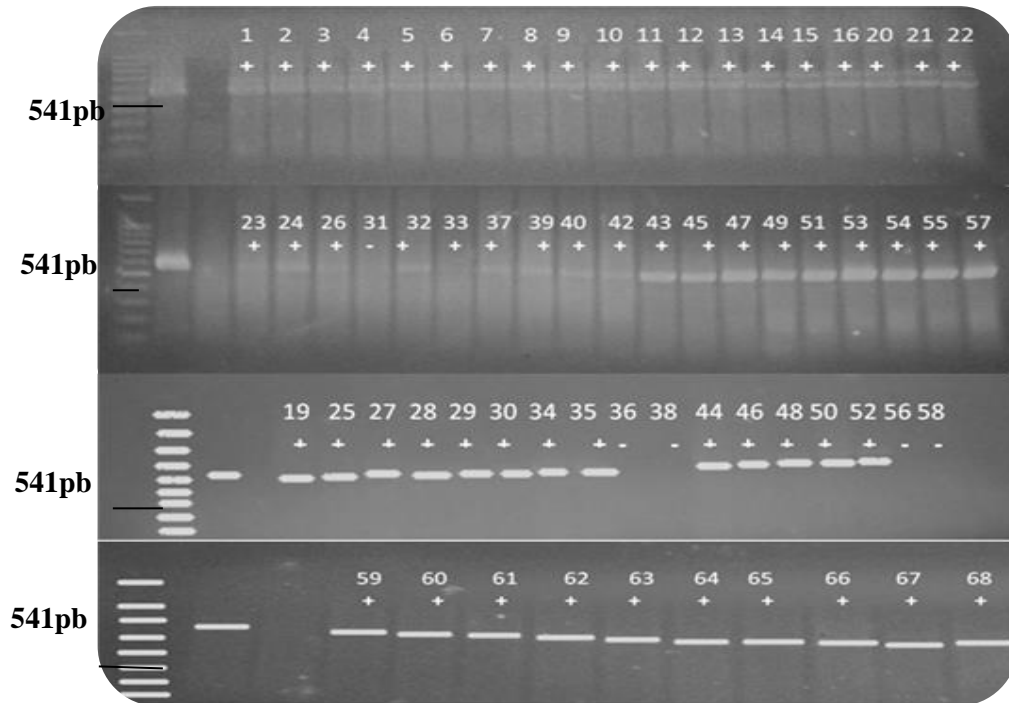
Ramirez, D.J. 2008. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional. Centro de Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Nayarit. Nayarit. 5 pag. No. 3. Consultado el 27 de febrero de 2014. Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/>.

Rosas, J.C. 2011. Contribuciones del Programa de Investigaciones en Frijol en Centro América y El Caribe. *Ceiba* 52(1):65-73.

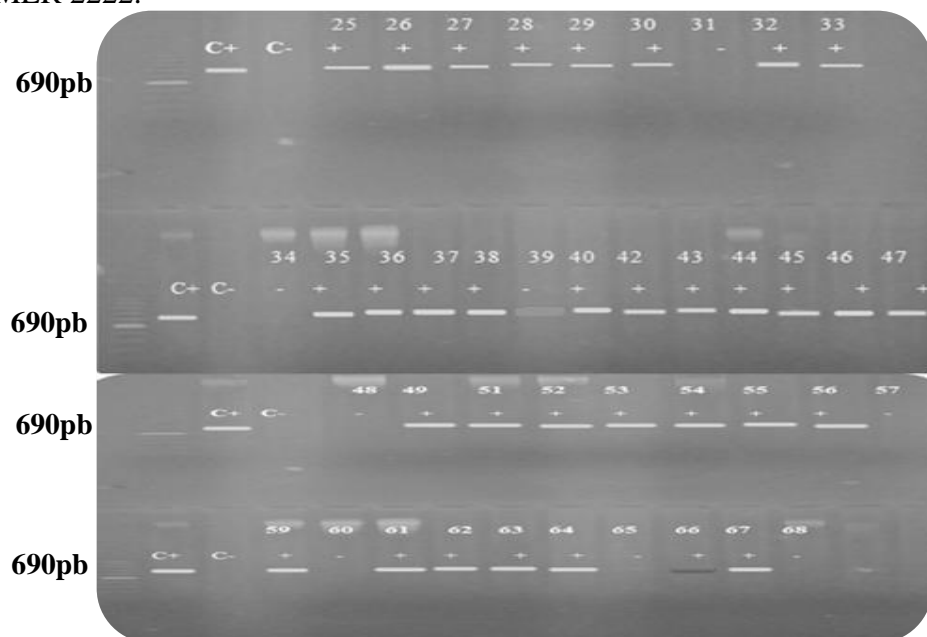
Skroch, P.W., J., Nienhuis, S., Beebe, J., Tohme, F., Pedraza. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collections. *Crop Sci.* 38 (2): 488-496.

Ulloa J.A, P.R. Ulloa, J.C. Ramirez, B.E, Ulloa. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Centro de Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Nayarit 3(8): 5p.

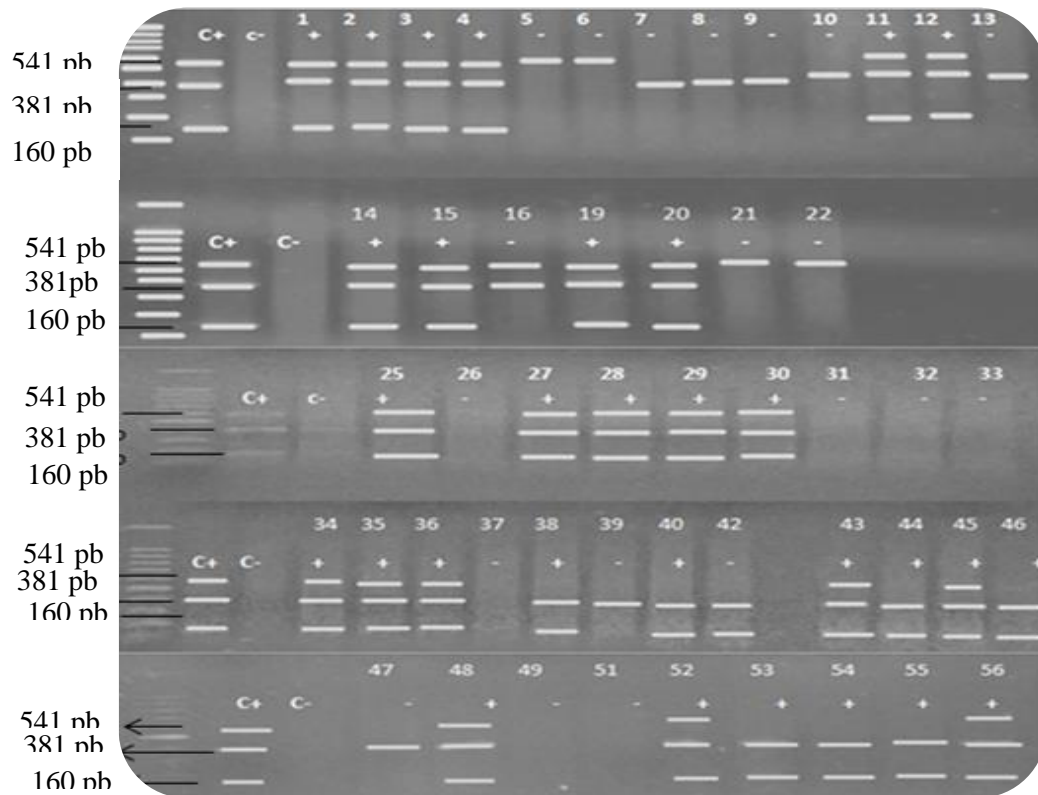
7. ANEXOS



Anexo 1. Presencia del marcador CAPS ENM del gen *bc-3* en plantas de F3 de la Población MER 2222.



Anexo 2. Presencia del gen *I* en plantas de F3 MER 2222, 19-68



Anexo 3. Presencia de los alelos $elF4E^2/elF4E^2$, $elF4E^1/elF4E^2$, $elF4E^1/elF4E^1$ en plantas de F3 MER 222, 1-56.

Anexo 4: 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 μ L del *buffer* de extracción (PEX) en un tubo para micro centrífuga *ependorf* de 1.5 mL. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (*pestle*) de *plexiglass* de laboratorio. Agregar 450 μ 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 *ependorf* 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. Peletizar 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 μ L de RNAasa A (concentración de 100 μ g/mL) + buffer TE^a 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 al peletizado. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
12. Vaciar el etanol/acetato de sodio^b 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 μ 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.

^a Buffer TE (TRIS HCl 1 M, pH=7.5 ; EDTA 0.5 M, pH=8.0)

^b Usar acetato de sodio 3H₂O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

Anexo 5: 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/ μ 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 µl de la mezcla maestra por cada celda en platos con fondo V. Agregar 1 µl 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.

Anexo 6. Protocolo de Cuantificación de ADN con el Promega® Quantus™ Fluorometer.

1. Prepare la solución de trabajo teniendo en cuenta que se necesitan 100 µL de solución por cada muestra, por motivos de error se sugiere añadir 4 muestras al total de muestras. La solución de trabajo estará compuesta por buffer TE 1X y el tinte Quantifluor® Dye.

La cantidad de tinte Quantifluor® Dye a utilizar estará dada por la siguiente fórmula, y la cantidad de buffer TE 1X estará dada por la diferencia del total de solución de trabajo y la cantidad de tinte a utilizar:

$$(x \mu\text{L de solución de trabajo} \times 17 \mu\text{L de Tinte}) / 3400$$

*Donde x es la cantidad total de la solución de trabajo.

2. Prepare el buffer TE 1X teniendo en cuenta que para cada muestra a analizar se necesitará 100 µL de buffer TE 1X y 99µL de solución de trabajo. La cantidad total de buffer TE 1X estará dada por la suma de la cantidad de buffer total para las muestras y la cantidad de buffer TE 1X a utilizar para preparar la solución de trabajo. El buffer TE 1X será preparado a partir de Buffer TE 20X y agua Libre de Nucleasa. La cantidad de Buffer TE 20X estará determinada por

$$(x \mu\text{L} \times 200 \mu\text{L}) / 4000 \mu\text{L}$$

*Donde x es la cantidad total de buffer TE 20X a utilizar

3. Para realizar la cuantificación mezclar en microtubos de 500 µL: 99 µL de Solución de trabajo, 100 µL de buffer TE 1X y 1 µL de ADN.
4. Para introducir el volumen de la muestra, presione los botones arriba o abajo hasta encontrar el volumen deseado. Seleccione de 1-10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 o 200µl.

5. Para seleccionar las unidades de concentración que se mostraran en los datos, presione el botón de arriba o abajo. Seleccione entre ng/ μ l, ng/ml, μ g/ml, mg/ml o automático.

Nota: si automático esta seleccionado el aparato asignará unidades automáticamente para colocar la concentración en un rango de 1.0 a 1000.0.

6. Cuando las unidades deseadas estén resaltadas presione “enter”.

Coloque las muestras dentro del soporte para tubos y cierre la tapa. El aparato medirá automáticamente la fluorescencia cuando la tapa esté cerrada, y la concentración calculada de ácidos nucleicos será mostrada en la pantalla.