

**Optimización del protocolo para el marcador
molecular SR21 del gen *bgm-1* de resistencia
al virus del mosaico dorado amarillo del frijol**

Paola Gissel Alvarado García

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2009

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Optimización del protocolo para el marcado molecular SR21 del gen *bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Ciencia y Producción Agropecuaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Paola Gissel Alvarado García

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2009

Optimización del protocolo para el marcador molecular SR21 del gen *bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol

Presentado por:

Paola Gissel Alvarado García

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

Miguel Vélez, Ph.D.
Director
Carrera de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Marcelino Guachambala, Ing. Agr.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Ana Gabriela Vargas, Ing. Agr.
Asesor

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

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

RESUMEN

Alvarado, P. 2009. Optimización del protocolo para el marcador molecular SR21 del gen *bgm-1* de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol común. Proyecto Especial de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un componente importante de la dieta tradicional de América Latina y África. Una de las enfermedades más importantes que limita la producción de este cultivo en Centro América y el Caribe es el virus del mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF). La selección asistida con marcadores moleculares (SAM) es una herramienta ideal para determinar la resistencia monogénica. Un tipo de marcadores moleculares usados en la SAM, son los SCAR (siglas en inglés de Sequence Characterized Amplified Region) que son fragmentos de ADN amplificados por la técnica de PCR, que al estar ligados a una región génica, permiten diagnosticar la presencia de genes de interés. El estudio fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. El objetivo fue implementar el uso del marcador SR21 de manera complementaria con el marcador molecular SR2 usando la técnica PCR Multiplex, para actividades de selección de genotipos de frijol resistentes al VMDAF. La presencia del gen recesivo *bgm-1*, se determinó mediante el uso de estos dos marcadores de ADN en 23 variedades de frijol (9 criollas y 14 mejoradas). Para determinar el porcentaje de aceptabilidad de la presencia o ausencia de bandas del SCAR, se usó la prueba de X^2 (Chi-cuadrado) basada en la concordancia entre los valores esperados y los observados. Los marcadores SR2 y SR21 permitieron la identificación indirecta de la presencia del gen *bgm-1* en líneas mejoradas de dos ensayos regionales, y fueron usados en la generación de semilla genética de cinco variedades mejoradas. El marcador SCAR SR21, se puede utilizar de manera confiable para identificar la presencia del gen recesivo *bgm-1*, como complemento al uso del marcador SR2.

Palabras clave: ADN, fitomejoramiento, geminivirus, genotipos resistentes, SAM, SCAR.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	17
5. RECOMENDACIONES	18
6. LITERATURA CITADA.....	19
7. ANEXOS.....	21

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro

1. Genotipos mejorados y criollos de frijol resistentes y susceptibles al VMDFAF utilizados en el estudio.	4
2. Descripción de los primers (cebadores) utilizados en el estudio.	6
3. Protocolo de la mezcla maestra para el PCR del marcador molecular SR2.	6
4. Perfil térmico de PCR para el marcador molecular SR2.	6
5. Pruebas de mezclas maestras para PCR sin MgCl ₂	8
6. Pruebas de mezclas maestras para PCR con MgCl ₂	8
7. Protocolo optimizado del marcador molecular SR21 en ADN de la variedad resistente al VMDFAF Tío Canela 75.	10
8. Modificaciones en el perfil térmico del Protocolo 2 para el PCR.	10
9. Perfil térmico del marcador SR21 para el Protocolo 2 de la PCR.	11
10. Integración de los Protocolos de los marcadores moleculares SR21 y SR2 para el PCR Multiplex.	12
11. Pruebas de mezclas maestras para el PCR Multiplex con MgCl ₂	13
12. Protocolo optimizado del marcador molecular SR21 (PCR multiplex)	13
13. Prueba de Chi Cuadrado (χ^2)	16

Figura

14. Visualización de las pruebas de mezclas maestras para PCR sin MgCl ₂	9
15. Pruebas de mezclas maestras para PCR con MgCl ₂	10
16. Protocolo P2 optimizado para el marcador SR21.	11
17. Protocolos de los marcadores SR2 y SR21 integrados.	12
18. Pruebas de mezclas maestras para PCR con MgCl ₂ (P1-P4: protocolos).	13
19. Protocolo PCR Multiplex optimizado en la variedad resistente al VMDFAF Tío Canela 75 (TC 75) en gel de agarosa al 1.3%.	14
20. Validación del protocolo P2 en PCR, gel de agarosa al 1.3%	15
21. Validación del protocolo P2 en PCR Multiplex, gel de agarosa al 1.3%	15

Anexo

1. Protocolo para la extracción de ADN (Universidad de Wisconsin).....	21
2. Protocolo Cuantificación de ADN.....	22
3. Protocolo Dilución de ADN (Modificado).....	22
4. Rehidratación de primers.....	23

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 (Voyssest 1983). 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).

En Honduras y Centro América la producción de frijol es afectada por diferentes virus, uno de ellos es el Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol (VMDAF), cuya enfermedad causa pérdidas severas en el rendimiento de este cultivo (Brown *et al.* 1992). El agente causal de esta enfermedad es un geminivirus, el cual es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabacci*) de la cual existen muchos biotipos en Centroamérica (Bush 1993; Caballero *et al.* 1993), el más común es el biotipo A que ha sido reportado en Honduras (Guachambala 2007).

El VMDAF está ampliamente distribuido en Centro América, incluyendo el suroriente de Guatemala y los valles medios y bajos de El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. En Honduras apareció en los años 80, pero es a partir de 1990 que la enfermedad se considera una limitante importante para la producción del cultivo (Morales 2000).

Durante los últimos 20 años se ha desarrollado una intensa actividad de mejoramiento genético del frijol común en Centro América, México y el Caribe (Voyssest 2000). El VMDAF es la enfermedad viral más importante en América Latina. La manera más efectiva de prevenir la ocurrencia de esta enfermedad es desarrollar cultivares genéticamente resistentes al virus (Kelly 1995, Urrea *et al.* 1996).

La selección asistida con marcadores moleculares es una herramienta ideal para determinar, transferir y combinar la resistencia mono-génica (Kelly y Miklas 1998; 1999). Uno de los marcadores moleculares usados en el fitomejoramiento son los SCAR (en inglés “Sequence Characterized Amplified Region”), que son fragmentos de ADN amplificados por la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR, siglas en inglés), y que por estar ligados a una región génica permiten diagnosticar la presencia de genes de interés durante el mejoramiento (Pedraza *et al.* 1997; Urrea *et al.* 1996).

El gen *bgm-1* de resistencia al VMDF y sus marcadores moleculares SR2 y SR21, permiten la selección indirecta para este gen, utilizado ampliamente en programas de mejoramiento. La presencia del gen recesivo *bgm-1* se determina mediante las etapas de extracción, cuantificación, dilución, amplificación, separación y visualización del ADN (Aranda 2000). La presencia o ausencia de los marcadores SCAR SR2 y SR21 corresponden a la presencia (+) o ausencia (-) del gen *bgm-1*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Implementar el uso del marcador molecular SR21 en actividades de selección de genotipos de frijol resistentes al VMDAF.

1.1.2 Objetivos específicos

- Optimizar el protocolo del marcador SR21 (gen *bgm-1*) para condiciones del laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano.
- Validar el protocolo en genotipos de reacción conocida al VMDAF (susceptibles y resistentes).
- Implementar el marcador SR21 en procesos de Selección Asistida por Marcadores (SAM) en variedades mejoradas *bgm1/bgml* (homocigotas recesivas).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Programa de Investigación del Frijol (PIF) de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria (CCPA) en la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano, ubicado en el valle del Yeguare a 30 km de Tegucigalpa.

2.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

Se utilizaron 23 variedades de frijol, nueve criollas y 14 mejoradas. El criterio de selección para las variedades se estableció con base en la presencia o ausencia de genes de resistencia al VMDAF.

Cuadro 1. Genotipos mejorados y criollos de frijol resistentes y susceptibles al VMDAF utilizados en el estudio.

Mejorados		Criollos	
Resistentes	Susceptibles	Resistentes	Susceptibles
CENTA Pipil	BAT 93	Garrapato	Rojo Lila
Don Silvio RR	SEL 1309		Rojo de Seda
Tío Canela 75	Catrachita		Paraisito
Macuzalito	Jalo EEP 558		Seda
A429			Marciano
Cardenal			Desarrural
INTA Precoz			Cuarenteño
Carrizalito			
Amadeus 77			
DEORHO			
Dorado			

Los marcadores SCAR usados en el estudio fueron el SR2 y SR21. El marcador SCAR SR2 se deriva del marcador RAPD R2. El SR2 indica la presencia del gen *bgm-1* resistente al VMDAF. Posee un tamaño de 530/570 pares de bases (pb) por lo que es codominante, y expresa resistencia en 530 pb (homocigota recesivo *bgm-1/bgm-1*), susceptibilidad en 570 pb (homocigota dominante *Bgm-1/Bgm-1*) y en las dos bandas (heterocigota *Bgm-1/bgm-1*).

El marcador SCAR SR21 se ha propuesto como complementario al uso del marcador SR2 para incrementar la eficiencia y efectividad en la selección por resistencia al VMDAF, debido a la presencia del gen recesivo *bgm-1*.

2.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de la Universidad de Wisconsin-Madison (Skroch *et al.* 1998) (Anexo 1). El ADN se extrajo de los primeros brotes de plantas con cinco días de germinación. Las muestras se cosecharon y recolectaron en microtubos de 1.5 mL.

2.4 CUANTIFICACIÓN DE ADN

La cuantificación se realizó para determinar la cantidad de ADN que poseía cada una de las muestras y así poder llevarlas a la misma concentración. Se siguió el protocolo sugerido en el Manual del Módulo de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP) (Anexo 2). Se utilizó un fluorómetro Hoefer TKO-100, $\lambda_{ex} + 365\text{nm}$, $\lambda_{em} + 460\text{ nm}$, calibrado con ADN estándar concentrado a 100 ng/mL. Se mezcló 2 mL de buffer de cuantificación (10 μL de solución para tinción concentrada + 100 mL de buffer TNE 1X; pH= 7.4) con 2 μL de muestra de ADN, colocados en una cubeta de cuarzo puro para minimizar el margen de error al momento de la lectura.

2.5 DILUCIÓN DE ADN

Las muestras de ADN se diluyeron a 30 ng/mL con 100 μL de Buffer TE 0.1x para estandarizarlas y que tengan así, la misma oportunidad de amplificarse en PCR.

2.6 AMPLIFICACIÓN DE ADN

La amplificación se realizó con el Método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la reacción se utilizaron los primers o cebadores SR21 F y SR21 R (Cuadro 2); los cuales se llevaron a una concentración inicial de 1 μM y a un volumen final de 500 μL (Anexo 4), utilizando el buffer PCR 5X Green Go Taq®, DesoxiNucleotidos Trifosfatos (dNTP's) con y sin cloruro de magnesio (MgCl_2), enzima Go Taq® Flexi DNA Polymerase y ADN de los genotipos seleccionados. El volumen final de la mezcla maestra fue 15 μL . Como referencia se utilizó el protocolo del marcador SR2 (Cuadro 3). Se realizaron cambios en el perfil térmico para encontrar el tiempo y temperatura de acoplamiento adecuada para el marcador SR21, se tomó como referencia el perfil térmico del marcador SR2 (Cuadro 4).

Cuadro 2. Descripción de los primers (cebadores) utilizados en el estudio.

Secuencias de Primer		Gen	Tamaño (pb)	Referencia
Orientación 5' a 3'				
SR2 F:	CACAGCTGCCACAGGTGGGA	<i>bgm-1</i>	530/570	Urrea <i>et al.</i> 1996
SR2 R:	CACAGCTGCCCTAACAAAAT			
SR21 F:	CATGAGGGGCATGAGATGCG	<i>bgm-1</i>	230/270	Blair <i>et al.</i> 2006
SR21 R:	CACAGCTGCCCTAACAAAAT			

Cuadro 3. Protocolo de la mezcla maestra para el PCR del marcador molecular SR2.

Reactivos	Protocolo (µL)
dd H ₂ O	9.4
Buffer 5X	2.0
dNTP's con MgCl ₂	0.7
Primer SR2 F	0.3
Primer SR2 R	0.3
Taq polimerasa	0.3
ADN templete	2.0
Volumen final	15.0

Cuadro 4. Perfil térmico de PCR para el marcador molecular SR2.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	0.30 s	1
Desnaturalización	94	1 min	35
Acoplamiento	60	1 min	35
Extensión	72	3 min	35
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento final	15	5 min	1

2.7 VISUALIZACIÓN DE ADN

La visualización de ADN se realizó a través de la técnica de electroforesis. El ADN obtenido en las extracciones y los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa con diferentes concentraciones (1.2, 1.3, 1.4 y 1.6%), en solución tampón TBE 0.5X (Tris-HCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA) en tanques de electroforesis. Fueron separados a 140 V durante 60 min en geles pequeñas y 90 min en geles grandes, teñidas en una solución 1:10 de bromuro de etidio: agua destilada durante 15 min; luego se visualizaron las bandas de ADN en el transluminador y se fotografiaron bajo luz ultravioleta. Se utilizó una escalera molecular de ADN con un rango de 100-1500 pb, para verificar la presencia o ausencia de bandas.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar el porcentaje de aceptabilidad de presencia o ausencia de bandas del SCAR, se aplicó la Prueba de ajuste de χ^2 (Chi-cuadrado), para determinar la concordancia entre los valores esperados y los observados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO

Se realizaron pruebas de cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la mezcla maestra para PCR (Cuadro 5 y 6). Los reactivos de mayor control fueron: los dNTP's sin y con MgCl₂, la Taq polimerasa y el primer SR21 F y SR21 R, ya que estos son los más sensibles y costosos. En las pruebas realizadas con dNTP's sin MgCl₂ (Cuadro 5), no se seleccionó ningún protocolo debido a que ninguno presentó amplificación de la banda con la resolución esperada (Figura 1).

Cuadro 5. Pruebas de mezclas maestras para PCR sin MgCl₂.

Reactivos PCR	Protocolos (μL)					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
dd H ₂ O	9.4	10.0	15.0	12.5	10.0	12.0
PCR Buffer	2.0	4.1	5.0	4.0	5.0	4.5
dNTP's sin MgCl ₂	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7
Primer SR21 F	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.4
Primer SR21 R	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.4
Taq (Enzima)	0.3	0.3	0.5	0.5	0.4	0.4
ADN	2.0	4.0	3.5	3.0	3.0	2.6
Volumen Total	15.0	20.0	26.0	21.6	20.0	21.0

Cuadro 6. Pruebas de mezclas maestras para PCR con MgCl₂

Reactivos PCR	Protocolos (μL)					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
dd H ₂ O	9.4	10.0	15.0	12.5	10.0	12.0
PCR Buffer	2.0	4.1	5.0	4.0	5.0	4.5
dNTP's con MgCl ₂	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7
Primer SR21 F	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.4
Primer SR21 R	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.4
Taq (Enzima)	0.3	0.3	0.5	0.5	0.4	0.4
ADN	2.0	4.0	3.5	3.0	3.0	2.6
Volumen Total	15.0	20.0	26.0	21.6	20.0	21.0

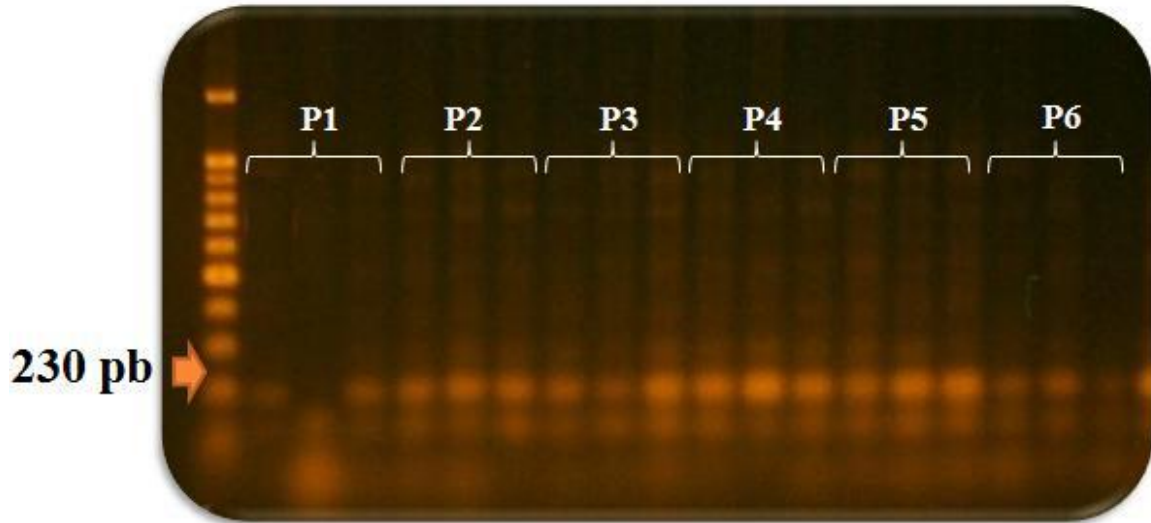


Figura 1. Visualización de las pruebas de mezclas maestras para PCR sin $MgCl_2$.

Los protocolos realizados con dNTP's con $MgCl_2$ (Cuadro 6), presentaron amplificación de la banda de 230 pb esperada (Figura 2). Se seleccionó el Protocolo 2 como el mejor por su nitidez y bajo contenido de la enzima. Así se generó un nuevo protocolo para el marcador molecular SR21; sin embargo, éste protocolo aún presentaba acoplamiento fuera de la secuencia específica del marcador (Cuadro 7).

Se procedió a modificar el perfil térmico del marcador SR2 para crear un nuevo perfil para el marcador SR21 (Cuadro 8). Los cambios realizados fueron en el número de ciclos, tiempo y temperatura de cada una de las etapas de la PCR, ya que estos determinan la efectividad y cantidad de veces que será replicado el ADN. Una de las etapas más importantes es la de acoplamiento, ya que aquí es donde se adhieren los primers y se identifica el sitio a duplicar, esta etapa es la que sufre la mayor modificación del perfil. Se obtuvo el nuevo perfil térmico para el marcador SR21 (Cuadro 9), que garantiza una buena amplificación de banda para el marcador SR21, a una temperatura de acoplamiento de $64^{\circ}C$. Se validó el protocolo P2 y el perfil térmico para el marcador SR21 utilizando ADN de Tío Canela-75 (TC-75), material resistente al VMDAF. La electroforesis que mejor resultado mostró fue al 1.3% de agarosa en TBE 0.5X teñido en solución 1:10 de bromuro de etidio: agua destilada.

Cuadro 7. Protocolo optimizado del marcador molecular SR21 en ADN de la variedad resistente al VMDFAF Tío Canela 75.

Reactivos PCR (μL)	P2 (μL)
dd H ₂ O	10.0
Buffer 5X	4.1
dNTP's con MgCl ₂	1.0
Primer SR21 F	0.3
Primer SR21 R	0.3
Taq polimerasa	0.3
ADN	4.0
Volumen final	20.0

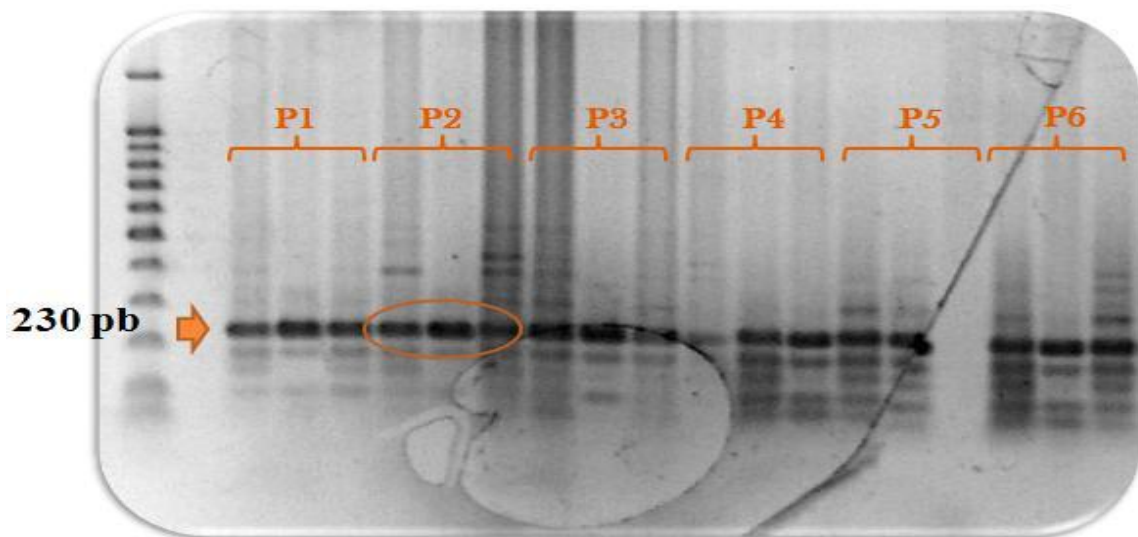


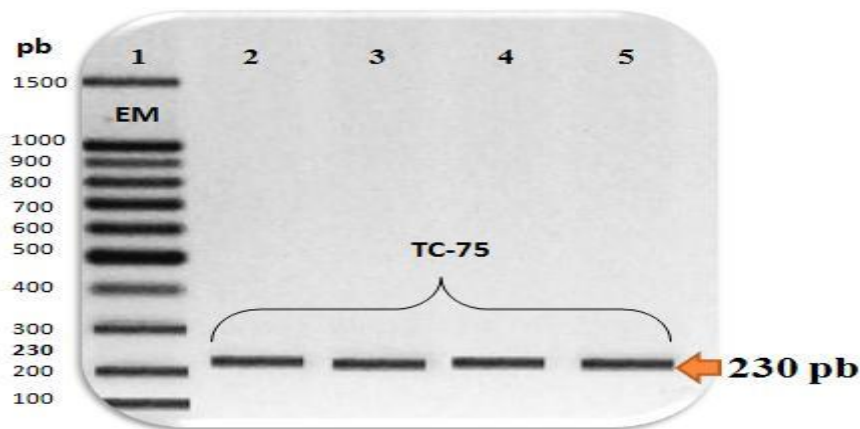
Figura 2. Pruebas de mezclas maestras para PCR con MgCl₂.

Cuadro 8. Modificaciones en el perfil térmico del Protocolo 2 para el PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos (No.)	
Desnaturalización inicial	90	1	1	
	91	2	1	
	92	3	1	
	93	4	1	
	94	5	1	
Desnaturalización	94	1	1	
	Acoplamiento	58	1	33
		60	1	34
		62	1	35
		64	1	32
Elongación	66	1	30	
	68	1	30	
	72	3	30	

Cuadro 9. Perfil térmico del marcador SR21 para el Protocolo 2 de la PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	30
Acoplamiento	64	1 min	30
Extensión	72	3 min	30
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento final	15	5min	1

**Figura 3.** Protocolo P2 optimizado para el marcador SR21.

El protocolo optimizado P2 del marcador molecular SR21 se integró con el protocolo del marcador molecular SR2 para formar un nuevo protocolo de PCR Multiplex (Cuadro 10). Para formar el nuevo protocolo para PCR Multiplex se sumaron las concentraciones de reactivos de ambos protocolos exceptuando los primers, se amplificó el protocolo obtenido, donde no se presentaron bandas simultáneas para los dos marcadores, pero sí acoplamiento fuera de las secuencias específicas de los marcadores (Figura 4).

Cuadro 10. Integración de los Protocolos de los marcadores moleculares SR21 y SR2 para el PCR Multiplex.

Reactivos (μL)	Protocolo SR2	Protocolo SR21	PCR Multiplex
dd H ₂ O	9.4	10.0	19.4
Buffer 5X	2.0	4.1	6.1
dNTP's con MgCl ₂	0.7	1.0	1.7
Primer SR21 F	0.0	0.3	0.3
Primer SR21 R	0.0	0.3	0.3
Primer SR2 F	0.3	0.0	0.3
Primer SR2 R	0.3	0.0	0.3
Taq polimerasa	0.3	0.3	0.6
ADN	2.0	4.0	6.0
Volumen final	15.0	20.0	35.0

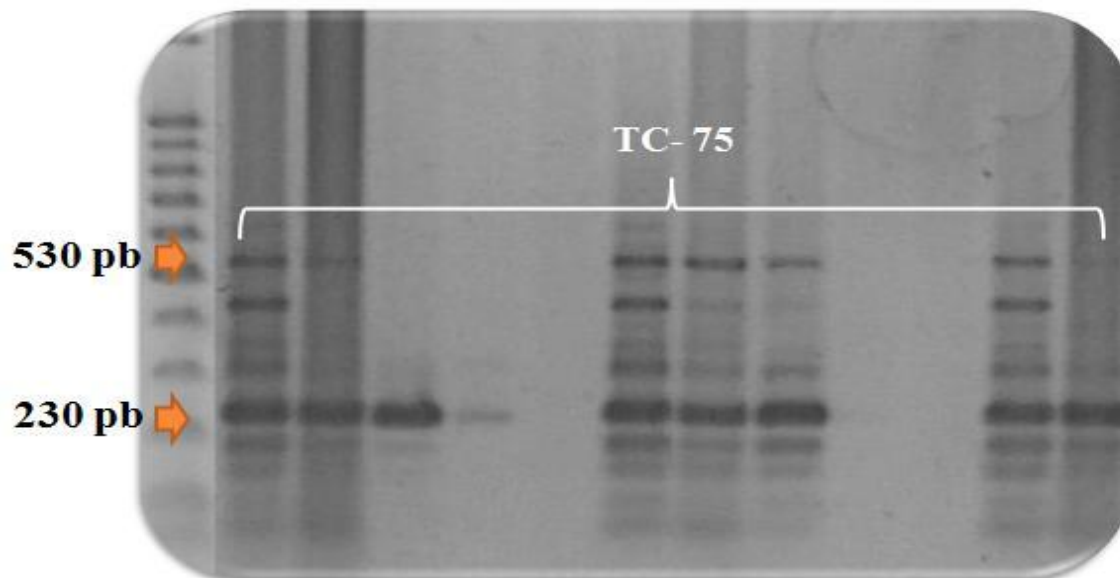


Figura 4. Protocolos de los marcadores SR2 y SR21 integrados.

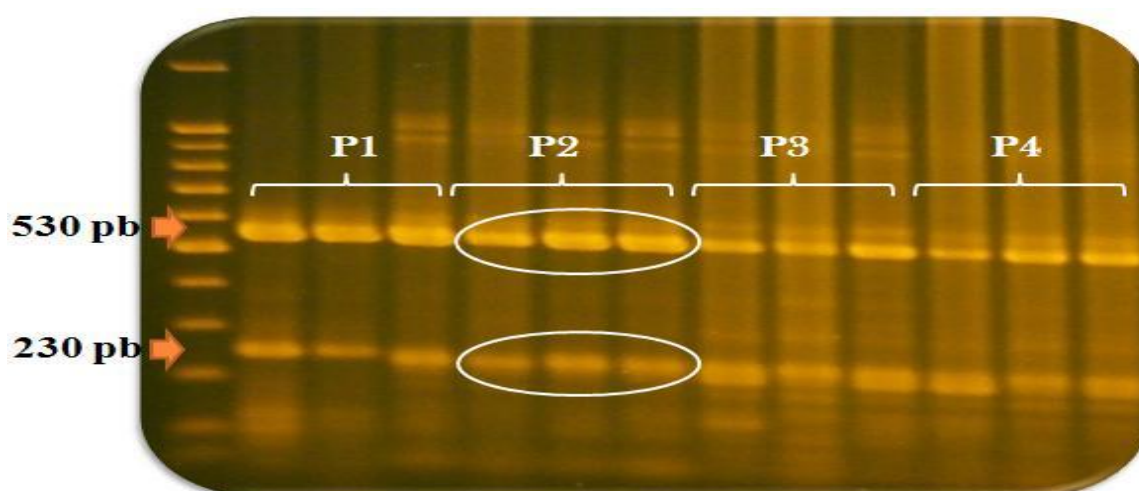
En el protocolo para PCR Multiplex se realizaron diferentes pruebas de cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la mezcla maestra; los reactivos de mayor control fueron los dNTP's con MgCl₂ y la Taq polimerasa (Cuadro 11). El protocolo P2 presentó la mejor amplificación de bandas para los marcadores SR2 y SR21 (Figura 5), generando un nuevo protocolo P2 para PCR Multiplex donde se amplifican las bandas correspondientes a cada marcador, pero aún con acoplamientos fuera de las secuencias específicas de los marcadores (Cuadro 12).

Cuadro 11. Pruebas de mezclas maestras para el PCR Multiplex con MgCl₂.

Reactivos PCR Multiplex	Protocolos (μL)			
	P1	P2	P3	P4
dd H ₂ O	19.4	12.3	12.0	9.0
PCR Buffer	6.1	5.0	5.0	3.1
dNTP's con MgCl ₂	1.7	2.0	1.7	1.0
Primer SR2 F	0.3	0.3	0.3	0.3
Primer SR2 R	0.3	0.3	0.3	0.3
Primer SR21 F	0.3	0.3	0.3	0.3
Primer SR21 R	0.3	0.3	0.3	0.3
Taq (Enzima)	0.6	0.5	0.6	0.3
ADN	6.0	5.0	4.5	4.0
Volumen Total	50.1	40.4	34.2	18.6

Cuadro 12. Protocolo optimizado del marcador molecular SR21 (PCR multiplex)

Reactivos	Protocolo 2 (μL)
dd H ₂ O	12.3
Buffer 5X	5.0
dNTP's con MgCl ₂	2.0
Primer SR21 F	0.3
Primer SR21 R	0.3
Primer SR2 F	0.3
Primer SR2 R	0.3
Taq polimerasa	0.5
ADN	5.0
Volumen final	21.0

**Figura 5.** Pruebas de mezclas maestras para PCR con MgCl₂ (P1-P4: protocolos).

Con el fin de corregir y evitar acoplamiento a secuencia no específicas de los marcadores, se hicieron incrementos de un grado en la temperatura de acoplamiento, en donde a 66 °C la banda amplificada fue clara y sin acoplamiento inespecífico. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1.3%, donde la separación y visualización de la banda fue bastante clara (Figura 6).

El protocolo P2 para PCR multiplex para el marcador SR2 y SR21 fue optimizado utilizando Tío Canela-75 (TC-75), una variedad resistente al VMDF. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.3% en TBE 0.5X teñido en solución 1:10 de bromuro de etidio en agua destilada. Las muestras fueron colocadas de la siguiente manera: celda 1: EM, celda 2: control positivo (C+), celda 3: Control negativo (C-), celda 4-17: muestras de TC-75 (Figura 6).

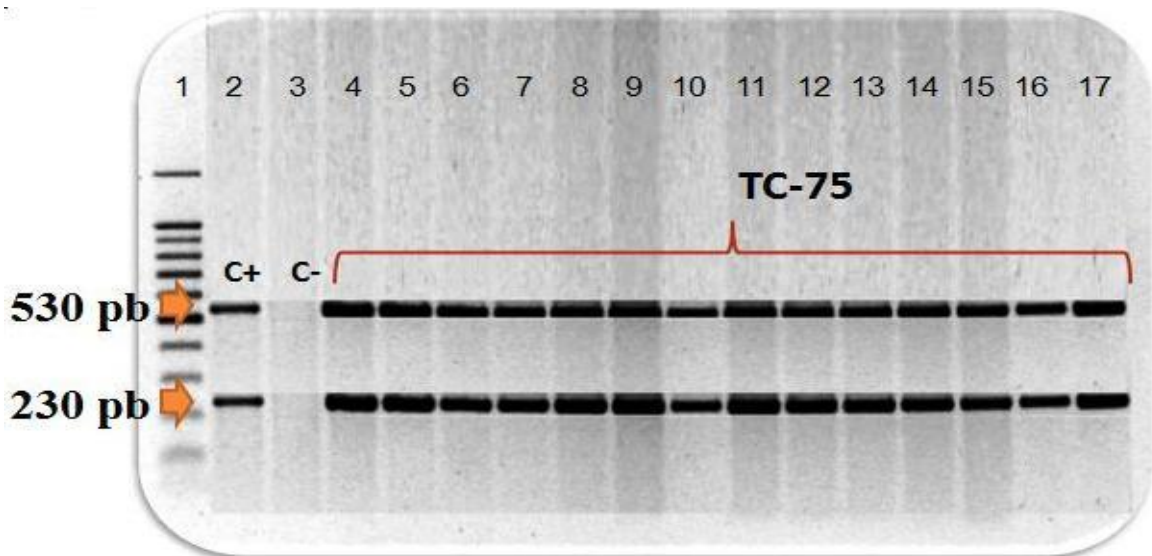


Figura 6. Protocolo PCR Multiplex optimizado en la variedad resistente al VMDF Tío Canela 75 (TC 75) en gel de agarosa al 1.3%.

3.2 VALIDACIÓN DE LOS PROTOCOLOS OPTIMIZADOS

Se validó el protocolo P2 para el marcador SR21 utilizando variedades mejoradas resistente al VMDF y con variedades criollas susceptibles al VMDF. Todas las variedades amplificaron bandas para el marcador SR21 tanto para el marcador del alelo susceptible como para el alelo resistente. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.3% en TBE 0.5X teñido en solución 1:10 de bromuro de etidio en agua destilada. Las muestras se ubicaron de la siguiente manera: Celda 1: escalera molecular (EM); 2-7: Tío Canela 75; 8: Rojo Lila; 9: Garrapato; 10: Rojo Seda; 11: Paraisito; 12: Seda; 13: Marciano; 14: Desarrural; 15: Catrachita; 16: Cuarenteño.

El marcador SR21 amplifica una banda de 230 pb mostrando su resistencia (+) y en 270 su susceptibilidad (-) al VMDF debido a la presencia del gen *bgm-1* (Figura 7).

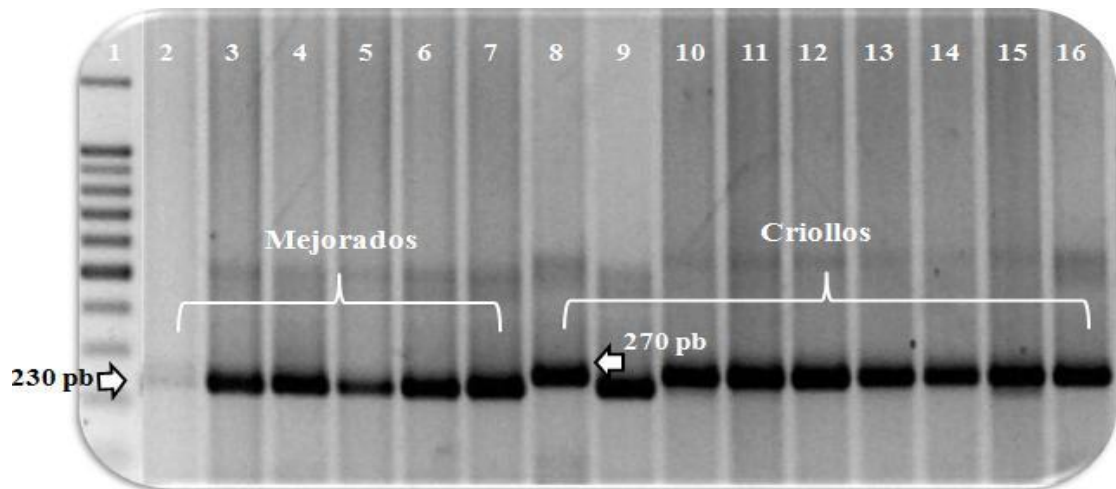


Figura 7. Validación del protocolo P2 en PCR, gel de agarosa al 1.3%

Se validó el protocolo P2 para PCR Multiplex utilizando variedades mejoradas resistente al VMDAF y variedades criollas susceptibles al VMDAF. Todas las variedades amplificaron las bandas para el marcador SR2 y SR21 de los alelos dominante y recesivo. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.3% en TBE 0.5X teñido en solución 1:10 de bromuro de etidio en agua destilada. Las muestras se ubicaron de la siguiente manera: Celda 1: escalera molecular (EM); 2-7: Tío Canela 75; 8: Rojo Lila; 9: Garrapato; 10: Rojo Seda; 11: Paraisito; 12: Seda; 13: Marciano; 14: Desarrural; 15: Catrachita y 16: Cuarenteño, 17: EM. El marcador SR2 amplifica una banda de 530 pb mostrando su resistencia (+) y en 570 su susceptibilidad (-), El marcador SR21 amplifica una banda de 230 pb mostrando su resistencia (+) y en 270 su susceptibilidad (-) (Figura 8).

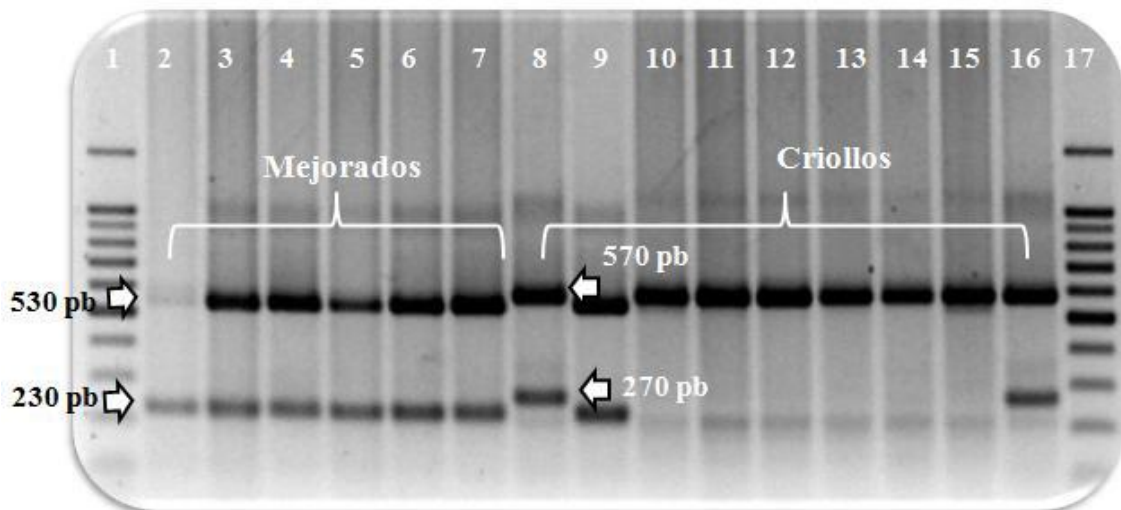


Figura 8. Validación del protocolo P2 en PCR Multiplex, gel de agarosa al 1.3%

Se realizó la prueba de Chi Cuadrado (χ^2) para las variedades susceptibles y resistentes tomando los valores esperados y observados, obteniéndose un valor de χ^2 altamente significativo ($P>0.95$) (Cuadro 13).

Cuadro 13. Prueba de Chi Cuadrado (χ^2)

Genotipo	Observado (O)	Esperado (E)	O-E	$[(O-E)-(0.5)]^2/E$
		Modelo 1:1		
Susceptibles	39	40	-1	0.03
Resistentes	75	75	0	0.00
Total	114	115	-1	$\chi^2 = 0.03^{**}$

** Altamente significativo ($P>0.95$)

4. CONCLUSIONES

- Se optimizó el protocolo del marcador SCAR SR21 ajustando las cantidades de reactivos de la mezcla maestra para el PCR, el perfil térmico y el porcentaje de agarosa en la electroforesis.
- El marcador SR21 fue validado en 23 genotipos de una reacción conocida (resistencia o susceptibilidad) al VMDAF, y la prueba χ^2 demostró que la reacción del marcador (presencia o ausencia) se ajusta a la reacción conocida de estos genotipos al VMDAF.
- El protocolo para el marcador SCAR SR21 se puede utilizar de manera confiable para identificar la presencia del gen *bgm-1*, de manera complementaria al marcador SR2.
- La PCR Multiplex para los dos marcadores puede ser utilizada en la Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM) para identificar genotipos resistentes al VMDAF.

5. RECOMENDACIONES

- Implementar el uso del marcador SR21 de manera complementaria al SR2 para la detección del gen *bgm-1* de manera rutinaria en el laboratorio de Biotecnología Aplicada y en la selección asistida para la resistencia al VMDAF.
- Utilizar la técnica de PCR Multiplex en la aplicación de los marcadores SR2 y SR21 para un uso más efectivo de los recursos en el laboratorio.
- Complementar la SAM con SR2 y SR21 con evaluaciones de campo en presencia del VMDAF y su agente transmisor.

6. LITERATURA CITADA

Aranda, L. 2000. Uso de marcadores moleculares SCAR para el mejoramiento de la resistencia al virus del mosaico amarillo en frijol común. Tesis Ing. Agr. Valle del Yeguaire, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 24 p.

Blair, MW; Muñoz, C; Garza, R; Cardona, C. 2006. Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common bean. *Theor Appl Genet* 112:913–923.

Brown, J; Bird, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin: Past and present. *Plant Disease* 76: 220-225.

Bush, G. 1993. *Bemisia tabaci*; Biotype or species complex. In Memoria II Taller Latinoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Managua, Nic. p. 17-26.

Caballero, R; Rueda, A. 1993. Las moscas blancas en Honduras. Las moscas blancas (Homóptera: Aleirodidae) en América Central y el Caribe. Memoria del Taller Centroamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus. CATIE. Turrialba. C.R. 53 p.

Guachambala Cando, M. 2007. Identificación de biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y la especie *Trialeurodes vaporariorum*, en zonas de producción hortícola de Honduras. Tesis Ing. Agr. Valle del Yeguaire, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 7 p.

Invitrogen, 2009. Certificate Analysis. s.n.t. 2 p.

Kelly, JD. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA marker in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *Hort Science* 39(3):461-465.

Kelly, JD; Miklas, PN. 1998. The role of RAPD marker in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular Breeding* 4:1-11.

Kelly, JD; Miklas, PN. 1999. Marker- Assisted Selection. p. 93-123. En: Singh, S.P. *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London. 450 p.

Morales, FJ. 1999. Situación actual de las enfermedades virales del frijol común en América Central, México y El Caribe. *Hojas de PROFRIJOL (Guatemala)*, No. 6:2-3.

Morales, FJ. 2000. El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en América Latina. Ed. Morales, FJ. CIAT, Palmira, Colombia. 144 p.

Pedraza, F; Gallego, G; Beebey, S; Tohme, J. 1997. Marcadores SCAR y RAPD para la resistencia a la bacteriosis común (CBB). Eds. Singh, SP; Voysest, O. Taller de mejoramiento de frijol para el Siglo XXI: Bases para una estrategia para América Latina. CIAT, Cali, Colombia. 559 p.

PIF (Programa de Investigación en Frijol, HN). 2008. Módulo de Diagnóstico Molecular: Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada. Valle del Yeguaré, HN. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.14-17p.

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

Urrea, CA; Miklas, PN; Beavery, JS; Riley, RH. 1996. A codominant randomly amplified DNA (RAPD) marker useful for in direct selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. J. Amer. Soc. Hort.Sci.121:1035-1039.

Voysest, O. 1983. Variedades de frijol en América Latina y su origen. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 87p.

Voysest, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de variedades de América Latina 1930-1999. CIAT, Cali, Colombia. 195 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN (Universidad de Wisconsin).

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 microcentrífuga eppendorf de 1.5 mL.
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 microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejido (pellet).
5. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
6. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.
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 microcentrífuga de 1.5 mL.
10. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol: acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
11. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletearlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
12. Vaciar el etanol/acetato de sodio^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).

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).

15. Rehidratar los pellets agregando 100-200 μL 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.

Anexo 2. Protocolo Cuantificación de ADN

1. Colocar 2 mL de buffer de cuantificación en un recipiente cúbico (cuvette) limpio y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 μL de muestra de ADN al buffer cuantificador.
3. Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.
4. Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/mL.
5. Vaciar el cubo, enjuagarlo con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

Anexo 3. Protocolo Dilución de ADN (Modificado)

1. Agregar 100 μL de buffer TE 0.1 X + Tartrazine en platos con fondo redondeado (MicroplateTM 96, Polypropylene, MJ Research, INC.).
2. Agregar el volumen inicial de la muestra de ADN extraído del tejido, estimado mediante la fórmula $V_i = 3000 / C_i - 30$.

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$C_i * V_i = C_f (V_{TE} + V_i)$$

$$C_i * V_i = C_f * V_{TE} + C_f * V_i$$

$$C_i * V_i - C_f * V_i = C_f * V_{TE}$$

$$V_i (C_i - C_f) = C_f * V_{TE}$$

Fórmula general de dilución ADN:

$$V_i = (C_f * V_{TE}) / (C_i - C_f)$$

$$V_i = (30 * 100) / (C_i - 30)$$

Fórmula dilución ADN (30 ng/ μL)

$$V_i = 3000 / (C_i - 30)$$

Donde:

V_i = Volumen del ADN Stock para adicionar a 100 μL de buffer TE para hacer una solución a 30 ng/ μL

C_i = concentración inicial (ng/mL)

V_i = volumen inicial (μL)

Cf = concentración final (ng/mL)

Vf = volumen final (μ L)

V_{TE} = volumen de buffer TE (μ L)

- Cubrir las celdas del plato con tapa selladora, y almacenarlo en el congelador (o refrigerador si se va a usar en los siguientes días). Guardar el resto de ADN en el congelador.

Anexo 4. Rehidratación de primers.

- Encontrar la concentración inicial de los primers en μ M:
 - Multiplicar el valor OD por el valor de nanomol (nmol) por OD, estos valores son característicos de cada primer. El valor resultante es la cantidad de nanomoles en el pellet que contiene el primer.
 - El resultado dividirlo para el valor de ug's (μ L de agua). Se obtienen nanomoles por microlitro.
 - Convertir el resultado a picomoles/ μ L \approx μ M
- Reemplazar en la ecuación $C_i V_i = C_f V_f$ para conocer el volumen inicial de primer rehidratado que se va a depositar en 500 μ L de agua destilada y desionizada. Sabiendo que la concentración final buscada es 1 μ M.

Secuencia de Primer	Nanomoles por		
Orientación 5' a 3'	OD's	OD	ug's
SR21 F:CATGAGGGGCATGAGATGCG	3.56	5.01	111.26
SR21 R:CACAGCTGCCCTAACAAAAT	4.27	5.20	133.86

Fuente: Invitrogen (2009)