

Caracterización morfo-agronómica y molecular de frijoles criollos de color rojo claro en Nicaragua y de frijoles negros en Ipala, Guatemala

IICA/Red SICTA-CIAT

INFORME DE AVANCE

Gerardo Gallego - Harold Suárez

**Proyecto de Agrobiodiversidad y
Biotecnología**

CIAT

Septiembre 8 de 2009

Informe Técnico

1.0 Extracción y cuantificación de ADN total

Se colectaron hojas trifoliadas en el invernadero y las muestras fueron conservadas en viales de 1.5 ml debidamente marcados y conservados en hielo hasta el traslado del material al laboratorio para la extracción del ADN total (Figuras 1 y 2), inicialmente se maceró el tejido colectado con nitrógeno líquido y posteriormente se siguió el protocolo de extracción de ADN reportado por Mahuku (2004) (Anexo A).



Figura 1.: a) Plantas de frijol correspondientes a las accesiones de Guatemala (502) y Nicaragua (505), ubicadas en el invernadero del CIAT., b) Colecta del material biológico (hojas trifoliadas) para cada una de las accesiones.

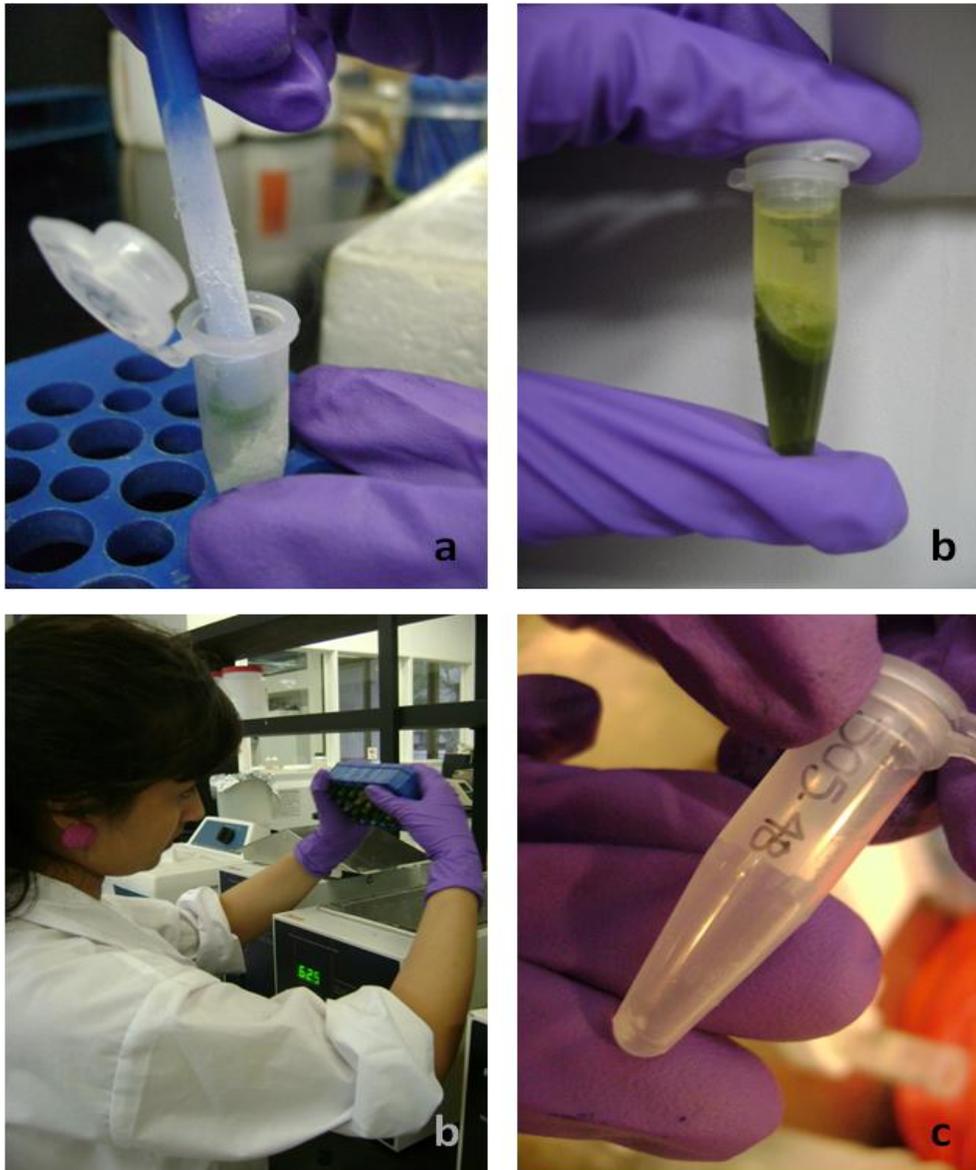


Figura 2.: a) Pulverización (macerado) del tejido utilizando nitrógeno líquido; b) proceso de extracción de ADN; c) ADN resuspendido en buffer TE para cada una de las accesiones.

La cuantificación de las muestras de ADN se realizó en geles de agarosa al 1%, teñidos con SYBR Safe (DNA gel stain – Invitrogen) (Figura 3), cada muestra contenía 2 ul de ADN y 3 ul de buffer de carga 3X. Las muestras se sirvieron en el gel y se compararon con ADN comercial del Bacteriógafo Lambda, el cual presenta concentraciones conocidas que oscilan entre 50 ng/ ul y 250 ng/ ul. Después de obtener las concentraciones de cada una de las muestras éstas fueron diluidas hasta una concentración de 4 ng/ ul.

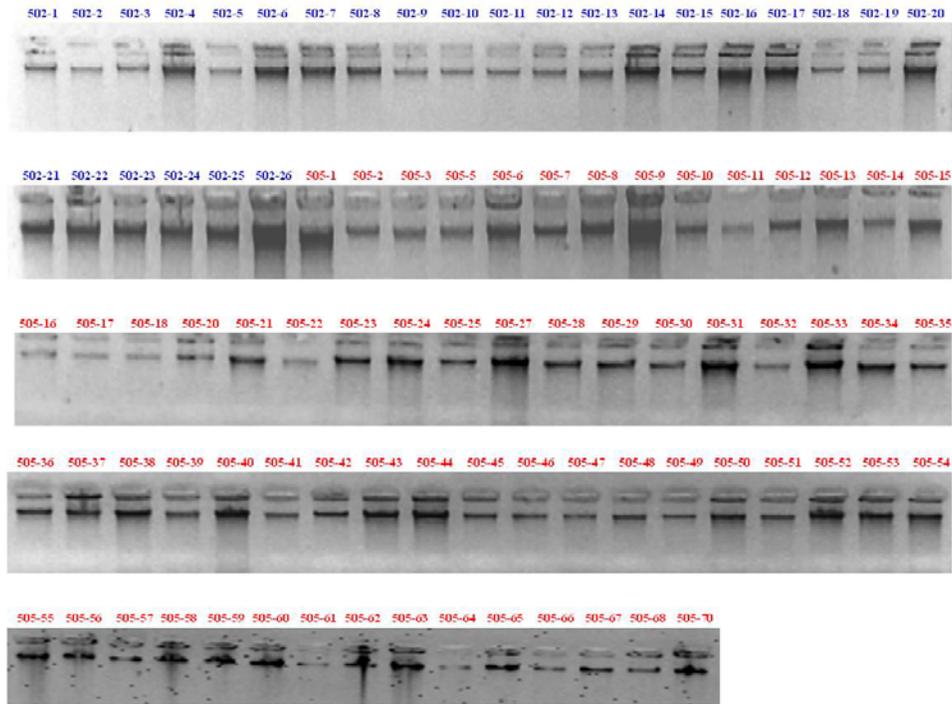


Figura 3. Cuantificación de ADN total, en geles de agarosa al 1%, para las 92 muestras incluidas en el estudio.

2.0 Selección y evaluación de marcadores microsatélites

Se evaluaron 20 *loci* microsatélites descritos previamente por Gaitán-Solis *et al.* (2002) para el género *Phaseolus*. Estos marcadores fueron seleccionados inicialmente teniendo en cuenta que los marcadores estuvieran ampliamente distribuidos a través del genoma de *Phaseolus vulgaris*, para lo anterior se eligieron marcadores distribuidos en diferentes cromosomas, tomando como base el mapa genético propuesto por Blair *et al.* (2003).

Las condiciones de amplificación fueron evaluadas y estandarizadas para cada microsatélite, así, como la determinación del posible tamaño de los alelos del marcador (Figura 4).



Figura 4. Estandarización de las condiciones de amplificación para cada uno de los microsatélites, empleando 8 individuos como muestra (geles de poliacrilamida, visualizados mediante tinción con plata).

Para una reacción de amplificación por PCR de 20 μ L de volumen final; se utilizaron 5 μ L de ADN a una concentración de 4 ng/ μ L, 2 μ L de Buffer (10X), 2 μ L de $MgCl_2$ (25mM), 0,25 μ L de dNTPs (20 mM cada uno), 0,2 μ L de cada cebador microsatélite (20 μ M cada uno), 0,1 μ L de Taq-ADN polimerasa y 5,25 μ L de agua ultra pura Gibco. Cada cóctel de PCR se sirvió en placas de 96 pozos, que contenían el ADN de cada uno de los individuos. El programa de amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100TM (Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc.) (Figura 5).



Figura 5. Perfil térmico utilizado para la amplificación de los marcadores microsatélites

A partir de los resultados obtenidos en la estandarización, se seleccionaron 9 marcadores moleculares tipo microsatélite para la evaluación de cada una de las accesiones incluidas en el estudio (Tabla 1; Figura 6).

Tabla 1. Microsatélites utilizados para la evaluación en accesiones de Nicaragua y Guatemala.

Nombre	Motivo SSR	(5'-3')	Secuencia cebador	T(°C)
AG1	(GA) ₈ GGTA(GA) ₅ GGGGACG(AG) ₄	Adelantado	GAGCGTCGTCGTTTCGAT	52
		Retrasado	CATGCAGAGGAAGCAGACTG	
BM183	(TC) ₁₄	Adelantado	TCTTACAGCCTTGCAGACATC	52
		Retrasado	CTCAAATCTATTCCTGGTCAGC	
GATS91	(GA) ₁₇	Adelantado	GAGTGC GGAAGCGAGTAGAG	55
		Retrasado	TCCGTGTTCTCTGTCTGTG	
BM152	(GA) ₃₁	Adelantado	AAGAGGAGGTCGAAACCTTAAATCG	50
		Retrasado	CCGGGACTTGCCAGAAGAAC	
BM189	(CT) ₃₅	Adelantado	CTCCCACTCTACCCCTACT	55
		Retrasado	GCGCCAAGTGAAGTAAGTAGA	
BM188	(CA) ₁₈ (TA) ₇	Adelantado	TCGCCTGAAACTCTTGTA TC	58
		Retrasado	CCCTCCAGTTAAATCAGTCG	
BM 205	(GT) ₁₁	Adelantado	CTAGACCAGGCAAAGCAAGC	50
		Retrasado	TGAGCTGGATTTCATTTCTTCTG	
BM175	(AT) ₅ (GA) ₁₉	Adelantado	CAACAGTTAAAGGTCGCAATT	50
		Retrasado	CCACTTTCAGTCAACTGGA	
BM210	(CT) ₁₅	Adelantado	ACCACTGCAATCCTCATCTTTG	52
		Retrasado	CCCTCATCTCCATTCTTATCG	

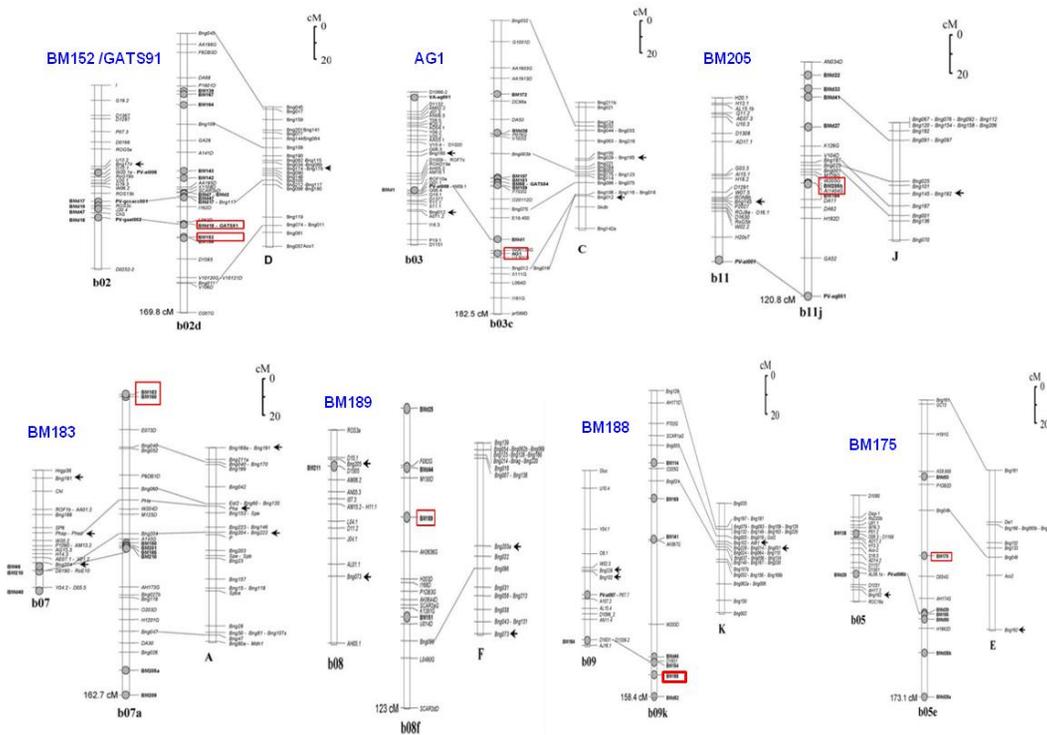


Figura 6. Distribución de los 9 marcadores microsatélites (cuadros en rojo) en 7 de los cromosomas del mapa genético de *Phaseolus vulgaris* L., evidenciando una amplia cobertura del genoma con estos marcadores (Cromosomas obtenidos del mapa genético propuesto por Blair *et al.* 2003).

Los productos amplificados en todos los individuos y para cada uno de los 9 cebadores, se separaron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6 % (Figura 7) (Anexo B) y su visualización se llevó a cabo utilizando la técnica de tinción con plata (Figura 8) y empleando un marcador de tamaño molecular de 10 pb (10 bp DNA Ladder, Invitrogen – life technologies).

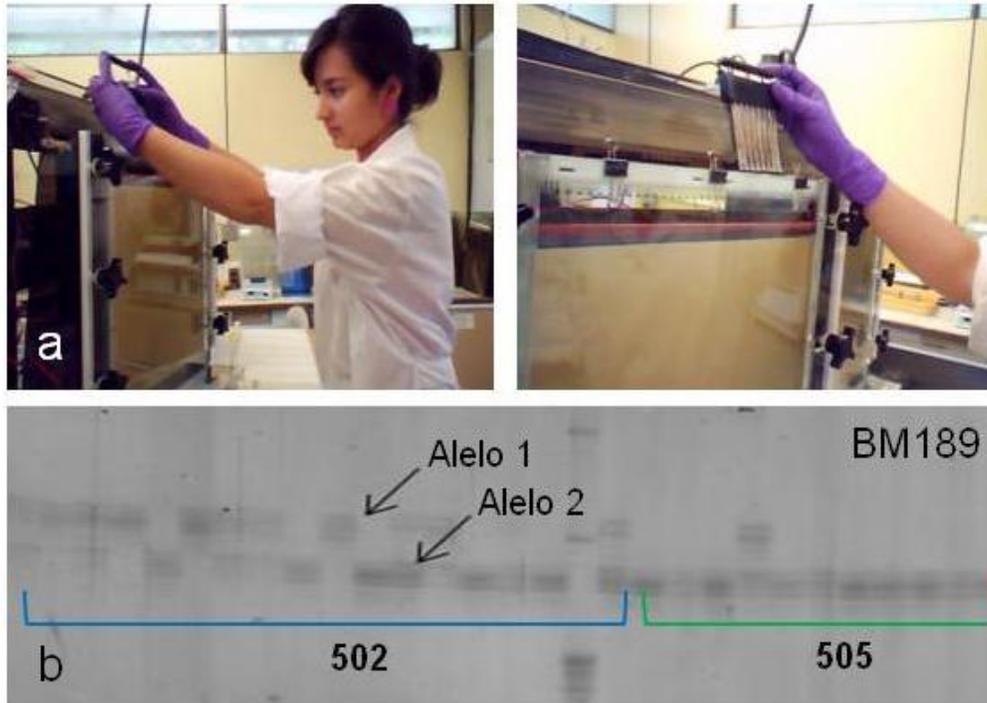


Figura 7. a: Electroforesis vertical en geles de acrilamida; b. visualización de los marcadores microsatélites utilizando la técnica de tinción con plata.



Figura 8. Marcador microsatélite BM205 evaluado en todas las accesiones de frijol de Nicaragua y Guatemala y visualizado empleando la técnica tinción con nitrato de plata.

3.0 *Análisis de datos*

Los análisis de datos se hicieron a partir de los resultados obtenidos para cada uno de los microsatélites, la información obtenida fue organizada en un matriz que contenía los tamaños en pares de bases de cada uno de los alelos pertenecientes a un individuo específico. Para observar la estructura poblacional y las características diferenciales de cada uno de los grupos, así como las posibles relaciones genéticas de los individuos y su dispersión, se utilizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM). El análisis de correspondencia múltiple relaciona diferentes variables, para ayudarnos a comprender cuál es la tendencia principal de los individuos observados, respecto a cada una de las variables evaluadas. Esto se logra debido a la generación de una representación gráfica, ubicada sobre un plano multidimensional, el cual permite observar las diferencias y similitudes más significativas encontradas con una variable determinada. Estos análisis fueron realizados usando el procedimiento CORRESP de SAS v.8.2.