



**Selecció assistida mitjançant marcadors
moleculars per a la introducció de gens de
resistència i creixement determinat en la
mongeta del Ganxet.**

Marta Borràs Fernández.

Martín Ezpeleta Maugeri.

Juliol 2006.

Selecció assistida mitjançant marcadors moleculars per a la introducció de gens de resistència i creixement determinat en la mongeta del Ganxet.

Autors: Marta Borràs Fernández.

Martín Ezpeleta Maugeri.

Tutora: Esther Sánchez Bell.

Especialitat: Explotacions Agropecuàries.

Barcelona, Juliol 2006.

TÍTOL: Selecció assistida mitjançant marcadors moleculars per a la introducció de gens de resistència i creixement determinat en la mongeta del Ganxet.

TUTORA: Esther Sánchez Bell

ESTUDIANTS: Marta Borràs Fernández, Martín Ezpeleta Maugeri.

ESPECIALITAT: Explotacions Agropecuàries.

RESUM:

Per a millorar agronòmicament la varietat tradicional de mongeta catalana Ganxet (*Phaseolus vulgaris* L.) s'estan introduint gens de resistència a antracnosi (*Colletotrichum lindemuthianum*) i Virus del Mosaic Comú de la Mongeta (BCMV) en la línia pura L67 o Montcau. També es vol introduir el gen *fin*, d'hàbit de creixement determinat. S'està treballant amb donadors diferents, introduint-se el gens per retroencreuament i aplicant-se selecció assistida per marcadors (MAS): Widusa (gens *Co-6* i *Co-4²*), A-493 (gen *Co-9*), Sanilac (gens *fin*, *I* i *Co-2*). Per ampliar el procés de millora de Montcau, es va fer la caracterització dels donadors Amanda (*bc-1²*) i IVT7214 (*bc-1*), validant-se el marcador molecular ROBD05-1300 per *bc-1²* i el ROH14-1100, per *bc-1* i, per tant, es recomana iniciar almenys un nou procés de retroencreuament per a obtenir la combinació que dona resistència a BCMV i BCMNV (virus necròtic): *bc-1² + I*. A la generació BC4 de Widusa x Montcau, 2 de 8 plantes es van seleccionar amb els al·lels *Co-6* i *Co-4²* simultàniament, amb els marcadors ROZ04-560 i ROAS13-950 respectivament. A la generació BC3 de A493 x Montcau, 5 de 7 plantes presentaven l'al·lel *Co-9*. seleccionades amb el marcador SB12-350. A la generació BC1 de Sanilac x Montcau, 3 de 6 plantes presentaven els al·lels *I* i *Co-2* simultàniament, amb els marcadors SW13-690 i ROQ04-1440, respectivament. Cap dels marcadors descrits per els al·lels *bc-u* i *fin* van resultar útils per a seguir la seva introducció en Montcau.

PARAULES CLAU: mongeta, gens de resistència, marcadors moleculars, varietats tradicionals, selecció assistida por marcadors.

TITULO: Selección asistida mediante marcadores moleculares para la introducción de genes de resistencia al virus del mosaico común (BCMV) y antracnósis en la Judía del Ganxet.

TUTORA: Esther Sánchez Bell.

ESTUDIANTES: Marta Borràs Fernández, Martín Ezpeleta Maugeri.

ESPECIALIDAD: Explotaciones Agropecuarias.

RESUMEN:

Para la mejora agronómica de la variedad tradicional de judía catalana Ganxet (*Phaseolus vulgaris* L), se están introduciendo genes de resistencia a antracnósis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y Virus del mosaico Común de la judía (BCMV) en la línea pura L67 o Montcau. También se quiere introducir el gen *fin* para hábito de crecimiento determinado. Se está trabajando con varios donadores, introduciéndose los genes por retrocruzamiento y aplicándose selección asistida mediante marcadores (MAS): Widusa (genes *Co-6* i *Co-4*²), A-493 (gen *Co-9*), Sanilac (genes *fin*, *I* i *Co-2*). Para ampliar el proceso de mejora genética de Montcau, se caracterizaron los donadores Amanda (*bc-1*²) y IVT7214 (*bc-1*), validándose los marcadores ROBD05-1300 para *bc-1*² y ROH14-1100 para *bc-1*. Se recomienda, pues, iniciar un nuevo proceso de retrocruzamiento para obtener la combinación de resistencia a BCMV i BCMNV (virus necrótico): *bc-1*² + *I*. En la generación BC4 de Widusa x Montcau, 2 de 8 plantas se seleccionaron con los alelos *Co-6* i *Co-4*² simultáneamente, con los marcadores ROZ04-560 y ROAS13-950 respectivamente. En la generación BC3 de A493 x Montcau, 5 de 7 plantas presentaban el alelo *Co-9*, seleccionadas con el marcador SB12-350. En la generación BC1 de Sanilac x Montcau, 3 de 6 plantas presentaban los alelos *I* y *Co-2* simultáneamente, con los marcadores SW13-690 y ROQ04-1440, respectivamente. Ninguno de los marcadores recomendados para los alelos *bc-u* i *fin*, resultaron útiles para seguir su introducción en Montcau.

PALABRAS CLAVES: judía, genes de resistencia, marcadores moleculares, variedades tradicionales, selección asistida por marcadores.

TITTLE: Marker Assisted Selection for the introduction of resistance genes and determinate growth habit genes into Ganxet bean.

TUTOR: Esther Sánchez Bell.

STUDENT: Marta Borràs Fernandez, Martín Ezpeleta Maugeri.

SPECIALTY: Explotacions Agropecuàries.

ABSTRACT:

To improve some agronomical traits of the Ganxet Catalan common bean landrace (*Phaseolus vulgaris* L.), some resistance genes to anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) and Bean Common Mosaic Virus (BCMV) are being introduced into the inbred line L67 (Montcau). Also *fin* genes determining bush growth habit will be introduced. Different donors are used and marker assisted selection (MAS) is applied to select segregants in backcrosses: Widusa (genes *Co-6* and *Co-4*²), A-493 (gene *Co-9*), Sanilac (genes *fin*, *I* and *Co-2*). In this work, new donors Amanda (with *bc-1*² gene) and IVT7214 (*bc-1*) were characterized. Molecular markers ROBD05-1300 for *bc-1*² and ROH14-1100 for *bc-1* result useful for MAS in the new back-cross that will be started. It will allow to obtain the combination that gives resistance to BCMV and BCMNV (necrosis mosaic virus): *bc-1*² + *I*. In generation BC4 of Widusa x Montcau, 2 of 8 plants were selected with genes *Co-6* and *Co-4*² at the same time, according to markers ROZ04-560 and ROAS13-950. In generation BC3 of A493 x Montcau, 5 of 7 plants were selected with gene *Co-9*, according to marker SB12-350. In generation BC1 of Sanilac x Montcau, 3 of 6 plants were selected with genes *I* and *Co-2* at the same time and according to markers SW13-690 and ROQ04-1440. All markers linked to genes *bc-u* and *fin* tested were useless to assist their introduction into Montcau.

KEYWORDS: common bean, resistance genes, molecular markers, marker assisted selection.

ÍNDEX.

1. INTRODUCCIÓ.	7
1.1. La mongeta del Ganxet.	7
1.2. Caràcters d'interès agronòmic d'herència mendeliana.	10
1.2.1. Antracnosi.	10
1.2.2. Virus del mosaic.	11
1.2.3. Hàbit de creixement.	12
1.3. Amplificació d'ADN per PCR.	13
1.3.1. Amplificació inespecífica del polimorfisme de l'ADN: RAPDs	17
1.3.2. Amplificació de fragments específics: SCARs.	19
1.4. Programa de millora genètica del cultivar Montcau (L67).	21
2. OBJECTIUS.	26
2.1. Objectius generals.	26
2.2. Objectius específics.	26
3. MATERIAL I MÈTODES.	27
3.1. Material vegetal.	27
3.2. Extracció d'ADN.	30
3.3. Gel per l'avaluació de la qualitat de l'ADN extret.	31
3.4. Marcadors RAPDs.	33
3.4.1. pel gen <i>Co-4</i> ² de resistència a l'antracnosi.	34
3.4.2. pel gen <i>Co-6</i> de resistència a l'antracnosi.	35
3.4.3. pel gen <i>Co-2</i> de resistència a l'antracnosi.	35
3.4.4. pel gen <i>Co-9</i> resistència a l'antracnosi.	36
3.4.5. pel gen <i>bc-1</i> ² de resistència al BMCV.	36
3.4.6. pel gen <i>Bc-u</i> de resistència al BMCV.	36
3.4.7. pel gen <i>Bc-1</i> de resistència al BMCV.	37
3.4.8. pel gen <i>fin</i> de creixement determinat.	37
3.5. Marcadors SCARs.	38
3.5.1. Per al gen <i>Co-9</i> de resistència a l'antracnosi.	39
3.5.2. Per al gen <i>I</i> de resistència a BCMV.	40

3.5.2.1. En la primera generació	
Backcross de Sanilac x Montcau.	40
3.5.2.2. En els possibles donadors	
Amanda i IVT 7214.	41
3.5.3. Per al gen $bc-1^2$ de resistència a	
BMCV (SBD05-1300).	41
3.6. Visualització dels fragments derivats de la PCR.	42
3.7. Tractament estadístic dels resultats.	44
3.8. Recerca bibliogràfica de marcadors pels gens	
<i>bc-1</i> , <i>bc-u</i> i <i>fin</i> .	45
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.	47
4.1 Extracció d'ADN.	47
4.2. Quarta generació de retroencreuament	
Widusa x Montcau (BC4).	49
4.2.1. Identificació de les plantes 50-57, amb l'al·lel <i>Co-4</i> ² .	49
4.2.2. Identificació de les plantes 50-57 amb l'al·lel <i>Co-6</i> .	50
4.3. Tercera generació de retroencreuament de	
A493 x Montcau. (BC3).	52
4.3.1. Identificació de les plantes 60a-63b amb l'al·lel <i>Co-9</i> .	52
4.4. Primera generació de retroencreuament	
Sanilac x Montcau (BC1).	54
4.4.1. Identificació de les plantes 70-77 amb l'al·lel <i>l</i> .	54
4.4.2. Identificació de les plantes 70-77 amb l'al·lel <i>Co-2</i> .	55
4.4.3. Possible donador de l'al·lel <i>fin</i> .	57
4.4.3.1. Amb el marcador RAPD A04-1100.	57
4.4.3.2. Amb el marcador RAPD D08-1150.	58
4.4.3.3. Amb el marcador RAPD OI19-375.	59
4.5. Possibles donadors. Amanda i IVT7214.	59
4.5.1. Possibles donadors de l'al·lel <i>l</i> .	59
4.5.2. Possibles donadors de l'al·lel <i>bc-1</i> ² .	60
4.5.3. Possibles donadors de l'al·lel <i>bc-1</i> .	63
4.5.4. Possibles donadors de l'al·lel <i>bc-u</i> .	64

5. CONCLUSIONS.	65
6. BIBLIOGRAFIA.	66

1. INTRODUCCIÓ

Un dels objectius d'aquest treball és el de contribuir a la introducció de gens de resistència, sobre les nombroses malalties a les que s'exposa la mongeta del Ganxet (*Phaseolus vulgaris* L.), com són l'antracnosi i el virus del mosaic (BCMV). Les malalties provocades per fongs i pels virus, són la principal font de disminució de rendiments en aquest cultiu.

1.1. La mongeta del Ganxet

La mongeta és probablement la llegum més apreciada actualment a Espanya des del punt de vista gastronòmic. El fet que encara existeixin varietats locals, tradicionals o de gran renom, ha provocat que es sol·licitin sistemes de valoració i protecció per a la comercialització de productes d'excel·lent qualitat. Aquesta dinàmica ha recuperat sota les Denominaciones Específicas (ley 25/1970 de 2 de diciembre) las mongetes de El Barco (Orden de 5 de enero de 1989) i Faba Asturiana (Orden del 6 de julio de 1990).

A Catalunya, persisteixen diferents varietats tradicionals pel seu consum en gra, entre les quals destaca la mongeta del Ganxet per la seva importància econòmica.

El grup de millora genètica de l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona (ESAB), treballa des de fa temps amb aquesta varietat. Per a una de les seves obtencions vegetals (Bosch et al., 1998a), ha tramitat el seu registre sota la denominació Montcau i per valoritzar la varietat s'ha sol·licitat la Denominació d'Origen "Mongeta del Ganxet Vallès-Maresme". El registre espanyol d'aquesta varietat és NRVP 20014342, i l'europeu CPVO 20010377.

Es desconeix quan va arribar a Catalunya, però la distribució actual de les zones de cultiu permet suposar que va arribar a través d'algun emigrant que tornava d'Amèrica expandint-se des d'algun port del Maresme (*Figura 1.1.1.*)(Sánchez, 2003).

Actualment no es cultiven més d'unes 70 ha. de mongeta del Ganxet, superfície que segons el Cens Agrari de 1999 (Idescat, consulta 24/04/2003), es distribueixen entre les comarques citades a la *Figura 1.1.1.* al cultiu de mongeta en gra en regadiu. Els productors, generalment, combinen el cultiu amb una



Figura 1.1.1. Zona de distribució actual del cultiu de la mongeta del Ganxet. Destaquen les comarques de La Selva, Vallès Oriental, Maresme i Vallès Occidental, principalment. Fuente: Sánchez (2003)

activitat ramadera, aprofitant l'elevat preu de venda d'aquesta mongeta (2,5-8,5 €/kg). Es ven a granel, tant a restaurants com en botigues particulars (Baldi, 1997), però actualment es pot trobar ja en el mercat la forma envasada (Figura 1.1.2.).



Figura 1.1.2. Mongetes del Ganxet cuinades i envasades per MAR-TRET^R. Font: <<http://mar-tret.com/images/ganxet.jpg>> (Productes alimentaris MAR-TRET^R, consulta: 13/07/2003).

Els treballs del grup de millora genètica de l'ESAB, van permetre després de la caracterització del germoplasma que es cultiva sota la denominació Ganxet (Casañas *et al.*, 1998 i 1999; Bosch *et al.*, 1998b) seleccionar els millors cultivars (Casañas *et al.*, 1998 i 1999). Fruit d'aquest treball sintetitzat per Sánchez *et al.* (2000) i Sánchez (2003), es va reconèixer la mongeta del Ganxet com a nova classe comercial europea (Santalla *et al.*, 2001).

Es va constituir una col·lecció de 69 entrades de germoplasma cultivat sota la denominació Ganxet. Les entrades inequívocament reconeixibles com Ganxet presenten plantes tardanes, amb hàbit de creixement indeterminat enfiladís de tipus IV, entrenussos llargs, fulles i beines verd fosc i flors blanques. Presenten beines de 13,9 a 17 cm de longitud amb de 3,7 a 5,8 llavors per beina i produccions de 36,3 a 51,9 g/planta. Les llavors són de tamany mitjà-gran (38.8 a 61,9 g/100 llavors), aplanades i arronyonades (grau de curvatura entre 1,5 i 2,8 sobre 3) amb un 23,26% a 27,63% de proteïna, 1.48% a 2,10% de greix i 7.45% a 8.9% d'episperm. Les llavors absorbeixen entre un 42,73% i 48.12% d'aigua durant el remull. S'han seleccionat set línies pures prototípiques del tipus varietat Ganxet amb un nivell de polimorfisme equivalent al que es troba dins de la classe comercial. Presenten beines de 14.7 a 65.9 g/planta. Les llavors són de tamany gran (50.3 a 52.3 g/100 llavors), aplanades i arronyonades (grau de curvatura entre 2.1 i 2.9, sobre 3) amb un 27.14% a 29.32% de proteïna, 21.77% a 23.41% de fibra dietètica, 0.067% a 0.082% de glucosa, 24.72% a 27.50% de midó i 8.9% a 9.6% d'episperm. La línia pura seleccionada L67 ja ha estat registrada sota la denominació Montcau. El germoplasma Ganxet, avaluat mitjançant marcadors RAPD, es d'origen genètic mesoamericà de la raça Mesoamèrica amb introgressions, almenys, de la raça Durango (Sánchez, 2003).

En el context agrícola europeu actual, les varietats tradicionals, poden ocupar un lloc significatiu si són avaluades i sotmeses a un procés de selecció i millora genètica. A més, els consumidors demanden qualitat, variació i valor organolèptic als productes alimentaris. Amb aquesta finalitat, l'equip de millora genètica de l'ESAB, va iniciar uns processos de retroencreuament per introduir gens de resistència a malalties en aquests nous cultivars Ganxet i assegurar així una bona resposta agronòmica. El seguiment d'aquests progressos es realitza mitjançant selecció assistida per marcadors (MAS) (Paran *et al.*, 1991).

1.2. Caràcters d'interès agronòmic d'herència mendeliana

1.2.1. Antracnosi.

És una de les malalties fúngiques que més afecten a la mongeta (*Taula 1.2.1.1*), i és causada per *Colletotrichum lindemuthianum*. Aquesta malaltia ataca a les parts aèries de la planta i també pot afectar a la llavor. Els símptomes són l'aparició de taques vermelles, que finalment fa que les fulles fins i tot es tornin negres. En casos greus, provoca necrosi foliar, defoliació i malformació de la llavor. Aquest fong habita en els residus de la collita i es propaga a través de la pluja, els treballadors i les llavors infectades transmeten la malaltia d'un any per l'altre. La millor manera de combatre aquesta malaltia és mitjançant l'ús d'una llavor saludable (Cano y Serrano, 2003).

Taula 1.2.1.1. Principals malalties que afecten a la mongeta.

Tipus	Malaltia
Vírica	Virus del mosaic comú i necrosis de la mongeta (BCMV i BCMNV)
Fúngica	Fusiarosia
Fúngica	Rizoctonia
Fúngica	Esclerotina (<i>Sclerotinia Sclerotiorum</i>)
Fúngica	Antracnosis (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)
Fúngica	<i>Alternaria</i> (<i>Alternaria</i> spp)
Fúngica	Mildiu (<i>Phytophthora Phaseoli</i>)
Fúngica	Cendra o odió (<i>Shaerotheca fuligiane</i>)
Fúngica	Roya (<i>Uromyces Appendiculatus</i>)
Bacteriana	Grasa de la mongeta (<i>Pseudomonos syringae</i> pv. <i>Phaseolicola</i>)

L'antracnosi pot arribar a produir pèrdues del 100%, quan afecta a la llavor. Normalment les zones més propenses són les que tenen una humitat alta i temperatures suaus; aquestes condicions es troben majoritàriament en zones de clima mediterrani. En aquest moment, pràcticament en tot Europa, es cultiva la mongeta resistent a l'antracnosi, fet que ha reduït la malaltia a una importància secundària.

En mongeta, s'han descrit almenys 8 loci dominants a antracnosi, a més d'alguns mecanismes de resistència recessiva (Cardenas *et al.*, 1964). La major part d'aquests loci són presents en varietats diferencials proposades per la caracterització de les varietats patògens del fong (Pastor-Corrales, 1991). Però només algunes han estat genèticament caracteritzades per aquesta

resistència (Veure revisió de Young et al., 1998; Melotto et al., 1999). Aquests loci i les varietats portadores són:

Co-1, present en MDRK (Michigan DR Kidney), Perry Marrow i Kaboon.

Co-2, present en Cornell 49-242. Gen mesoamericà.

Co-3, present en México 222.

Co-4, present en To y Co-4², en SEL1308. Gen mesoamericà.

Co-5, present en la varietat diferencial Tu i a la línia SEL1360. Gen mesoamericà.

Co-6, present en AB136 y Catrachita. Gen mesoamericà.

Co-7, present en la varietat diferencial G2333 que sembla disposar dels loci Co-4².

Co-5. També present en G2338 (Kelly *et al.*, 2003).

Co-9, present en BAT93 (origen colombià, mesoamericà segons Johnson *et al.*, 1997).

1.2.2. Virus del mosaic.

El virus del mosaic comú (BCMV) de la mongeta, del gènere Potyvirus, es troba àmpliament distribuït a escala mundial, ocasionant pèrdues en el rendiment de les collites, de fins a un 80% (Drijfhout, 1978), i una baixa qualitat del producte (Klein i Wyatt, 1989), pel fet que són considerats com els més virulents dels que infecten, naturalment, a aquest cultiu.

Es transmet per àfids, de forma no persistent i ràpida, sense necessitats de colonització, fet que fa que els insecticides no els controlin. A més, es transmet per llavor, constituint aquesta última, una de les principals fonts d'inoculació, i es determina per la infecció inicial del cultiu i en la seva àmplia distribució geogràfica.

El percentatge de transmissió per llavor varia en funció del genotip infectat i del virus (Takken y Joosten, 2000) que afavoreixen la caracterització de les soques dels mateixos, mitjançant cultius diferencials.

Quan la planta és infectada pel virus del mosaic comú de la mongeta (BCMV), a les fulles apareixen taques en mosaic verd clar/verd fosc, acompanyat a

vegades de rugositat de color vermell. A altes temperatures, algunes soques produeixen nanisme i necrosi de l'arrel.

La resistència genètica al BCMV (virus del mosaic comú de la mongeta), està controlada per una sèrie de loci multial·lèlica. El gen dominant *I*, localitzat en el grup de lligament B2, és independent dels tres loci *bc* recessius, actualment en fase de mapatge. Sembla que són independents: *bc-3*, en B6, *bc-12* en B3 i al·lel inespecífic *bc-u* també en B3 però amb un lligament molt dèbil amb l'anterior (Kelly *et al.*,2003).

Els milloradors saben que el gen *I* funciona bé combinat amb alguns gens recessius *bc*, fet que dona una àmplia resistència, combinada a BCMV i BCMNV (virus necròtic). El motiu és que el mecanisme de resistència és diferent. Mentre que *I* confereix hipersensibilitat (necrosis aguda davant la infecció vírica), els gens recessius retarden el moviment del virus dins de la planta, probablement restringint el moviment de les proteïnes víriques. La combinació del gen *I* i *bc-3*, presenta una problema, ja que la interacció entre ambdós emmascara la presència del gen *I*, si es fan proves de resistència amb inoculació vírica, de forma que fa falta utilitzar marcadors per a fer la selecció del gen *I*. En zones on la presència del BCMNV és elevada, el gen *I* no està recomanat, ja que pot provocar hipersensibilitat greu que pot provocar la mort de la planta. Aquest efecte es veu reduït amb la combinació del gen *I*, i amb qualsevol dels recessius. S'ha arribat a fer millora eliminant el gen *I*, en aquests casos, però la protecció només amb algun gen recessiu no resulta completa a BCMV. Actualment ha aparegut una soca molt virulenta de BCNV NL-3 K del grup patogènic 6 que supera la resistència combinada de *I* i *bc-3* (Kelly *et al.*, 2003).

1.2.3.Hàbit de creixement.

En mongeta, es diferencien dos hàbits de creixement bàsics: determinat i indeterminat (determinate growth habit/climbing habit). Tot i així, com hi participen diferents elements anatòmics independents, una visió més detallada permet subdividir més els hàbits per si les plantes són més o menys arbustives, tenen cirrells per enganxar-se o no, etc.

La gran diversitat observable a les mongetes permet classificar les diferents varietats de mongetes d'acord a molts criteris, tal com resumeix Voysest (2000). D'acord a l'hàbit de creixement, una de les característiques més importants des d'un punt de vista agronòmic, hi ha diverses classificacions empíriques que es sobreposen unes a altres (taula 1.2.3.1).

Segons Soon O. Park *et.al.*, 1999, les mongetes amb creixement indeterminat són les que predominen a moltes regions del planeta. Aquest tret característic va ser descrit per Lamprecht (1935), el qual va afirmar que aquest hàbit era controlat únicament per un sol gen. La maduració va donar la informació de que el gen (*fin*) estava lligat a determinar l'hàbit de creixement de les mongetes (Coyne & Schuster, 1974). El creixement de les plantes es troba associat també a trets quantitius.

Taula 1.2..3.1. Diferents criteris de classificació de l'hàbit de creixement de la mongeta. Fonts: Voysest (2000); International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI, 2001).

Genètica	CIAT		Popular		
	Simplificad a		Acurad a	Acurada	Simplificad a
Determinat	I	Determinat arbusti	Ia Ib	Arbusti erecte	Arbusti o nan
Indeterminat	II	Indeterminat arbusti	Ila Ilb	Semi-enfiladís	Enfiladís
		Indeterminat at	Illa IIIb	Enfiladís	
	III	Indeterminat at semi-enfiladís	IIIa IIIb		
IV	IV	Indeterminat at	IVa		
		enfiladís	IVb		

1.3. Amplificació d'ADN per PCR.

La reacció de polimerització en cadena o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), és una tecnologia que s'utilitza per a sintetitzar *in vitro* fragment específics d'ADN amb la finalitat de detectar una seqüència o un gen d'interès en el genoma d'un individu. Aquesta tècnica ha permès desenvolupar els denominats marcadors moleculars (RAPDs, SCARs, etc.) que resulten ser efectius i útils per identificar la presència de gens de resistència a diverses malalties, com antracnosi i BCMV (Kelly *et al.*, 2003).

Això permet realitzar una selecció assistida mitjançant aquests marcadors (MAS) (Paran *et al.*, 1991), durant un procés tradicional de retroencreuament (Sánchez-Monge, 1974). Aquesta tecnologia s'ha estat utilitzant amb bastant èxit des que va ser patentada al 1985 i s'ha utilitzat en diferents camps del coneixement, tal com la medicina, taxonomia, biologia, etc. Té diversos requeriments, entre els quals, és indispensable un motlle d'ADN, molècules iniciadores anomenades "*primers*", un enzim d'ADN polimerassa resistent a fluctuacions de temperatura, una barreja de desoxirribonucleòtids trifosfats (dADP, dCTP, dGTP i dTTP), un tampó apropiat i un equip anomenat "termociclador", que té la capacitat de canviar les temperatures depenent del ciclatge programat. La PCR consisteix en tres passos essencials: el primer és la desnaturalització i serveix per a separar mitjançant temperatura (94 °C) la molècula d'ADN en cadenes senzilles, que serveixin com a motlles per a la síntesi del (o dels) fragments respectius. En el segon pas, la temperatura es redueix per permetre l'arreglament (o reconeixement) de les molècules iniciadores a la seqüència diana de l'ADN motlle. Les molècules iniciadores poden variar en longitud, composició de bases nitrogenades i especificitat per a aparellar-se amb la seqüència diana i depenent d'això, la temperatura d'arreglament pot variar des de 25°C a 65 °C. En el tercer, es porta a terme l'allargament o extensió de la molècula iniciadora mitjançant l'enzim ADN polimerassa a 72°C. El més recomanable és que l'ADN polimerassa seleccionada toleri les temperatures de desnaturalització i es mantingui activa durant el nombre de cicles que es requereixi, per exemple, en moltes investigacions s'utilitza l'ADN polimerassa Taq, que prové de la bactèria termòfila *Thermus aquaticus*, degut a que tolera la temperatura de desnaturalització sense alterar la seva funció de polimerització. Aquests tres passos (cicles) es repeteixen en el termociclador, permetent obtenir de forma exponencial el fragment o fragments discrets sintetitzats a partir del motlle d'ADN.

Per exemple, en una reacció de 30 a 35 cicles, s'acumularan al voltant de 10^6 a 10^8 molècules d'ADN, aquestes seqüències amplificades (sintetitzades de *novo*), poden ser visualitzades en un gel d'agarosa amb tècniques de tinció convencionals (*Figura 1.3.1.*) (Valadez i Kahl, 2000)

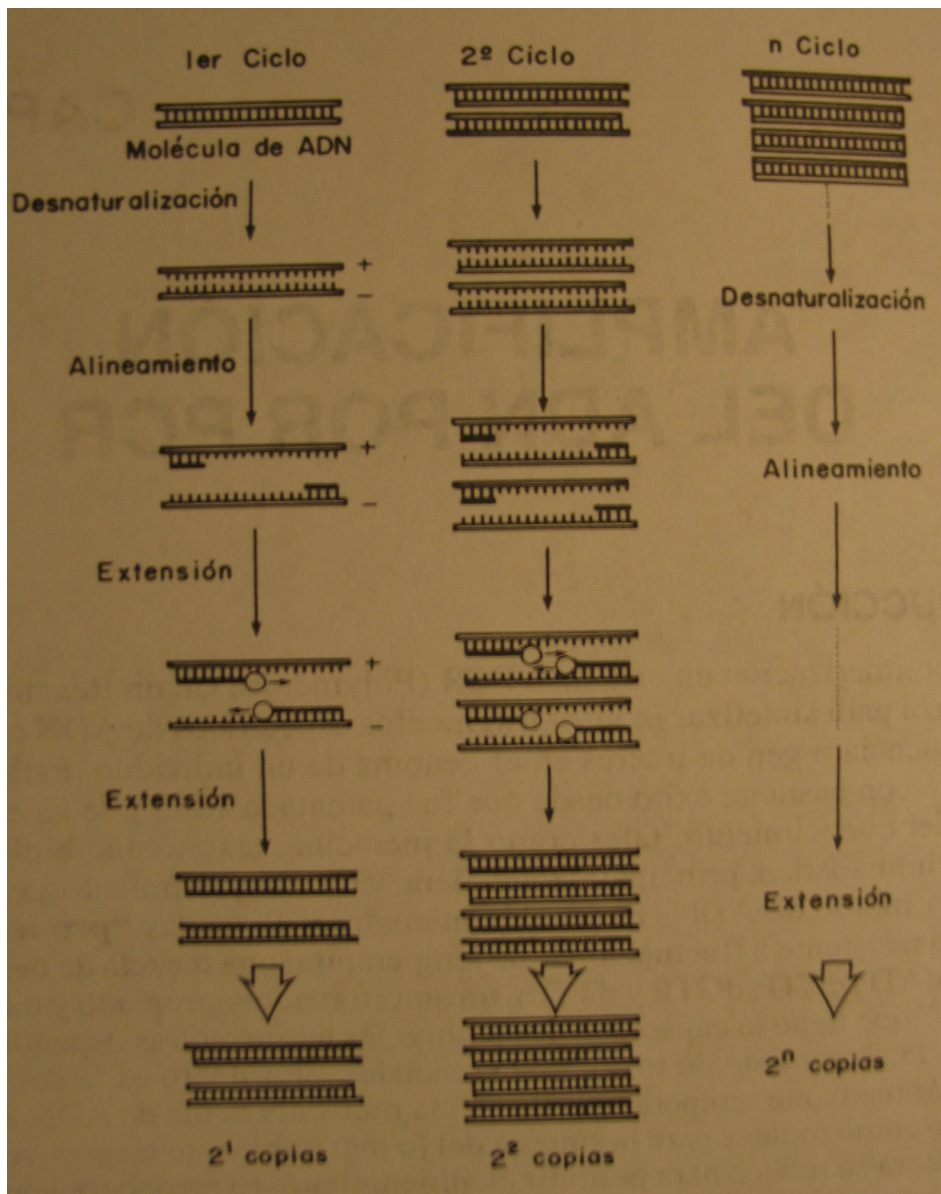


Figura 1.3.1. Seqüència de passos que es realitzen en la tècnica de la reacció de polimerització en cadena (PCR).

El fet de que existeixin contaminants en la reacció d'amplificació, tal com espores o ADN que provenen d'altres organismes en els tubs o puntes que s'utilitzaran per a preparar la reacció, té una important implicació, tant per a la seva aplicació en investigació com pel diagnòstic. Degut a que l'ADN original pot permetre la síntesi de milions de còpies mitjançant la PCR, la contaminació en la mostra de reacció amb productes d'una reacció prèvia o amb material que prové d'una font exògena, és un problema de contaminació potencial. En general, el procediment cautelós de laboratori en aquest sentit, consisteix principalment en: aliqüotes prèvies dels reactius, separar físicament els reactius

i utilitzar material nou i estèril. Aquestes són algunes de les precaucions que redueixen el risc (Valadez i Kahl, 2000).

Degut al complex d'interaccions entre els components de la PCR i l'àmplia varietat d'aplicacions en les que aquesta tècnica s'ha utilitzat, no existeix un llistat únic de condicions que puguin ser les òptimes per a totes les possibles reaccions; de totes maneres, aquí citem els components més utilitzats de forma general.

La majoria dels oligonucleòtids utilitzats com a iniciadors per a la PCR, tenen una longitud de 10 a 30 bases. S'utilitzen generalment, a concentracions d'entre 0.2 a 1.0 μM , però la concentració òptima, així com la concentració de l'ADN es determina empíricament.

El tampó estàndard per a la PCR conté 50 mM de KCl, 10 mM de tris-HCl i 1.5 mM de MgCl_2 . En particular la concentració de MgCl_2 pot tenir un efecte marcat sobre l'especificitat i els productes que s'amplifiquen.

L'enzim d'ADN polimerassa-Taq, o la que es requereix en la reacció de PCR, es pot adquirir de molts proveïdors i la concentració típicament utilitzada és del voltant de 2.5 unitats per 100 μl de reacció. Els desoxirribonucleòtids trifosfats s'utilitzen normalment de 50 a 200 μM , cada un però si les concentracions són altes, és possible que es promoguin falses incorporacions per la polimerassa, fet que cal evitar. El segment d'ADN que s'amplificarà a partir del motlle pot tenir fins a 10 Kb de longitud, tot i que el més freqüent i senzill són amplifícacions de 100 a 1000 pb.

Una important propietat de la PCR en aplicacions de diagnòstic, és la capacitat per ampliar una seqüència diana a partir d'una preparació d'ADN; és a dir, ADN obtingut amb un mètode estàndard d'extracció sense recórrer a un protocol sofisticat de purificació; així com a partir d'un motlle d'ADN degradat; a més, potser la justificació més important és que per a l'anàlisi amb PCR, es requereix una quantitat extremadament petita d'ADN, normalment de l'ordre de nanograms, fet que fa que la tècnica sigui bastant útil, sobre tot en àrees com la criminalista o taxonomia d'espècimens estranys.

El grau d'especificitat de la PCR és variable.

Diversos factors afecten l'especificitat de l'amplificació. És possible controlar aquest factor en el pas d'hibridació i d'extensió mitjançant l'ajust de la temperatura, ja que al minimitzar el temps d'incubació durant aquests passos,

podrien veure's limitades les oportunitats d'error en la incorporació feta per l'enzim polimerassa.

Al reduir la concentració de l'iniciador i de l'enzim, també es limita aquest error i l'amplificació d'altres seqüències no desitjades. Finalment, el canvi dels nivells de $MgCl_2$, la selecció de les condicions òptimes per a la reacció i l'efecte directe de la pròpia polimerassa, milloren l'especificitat (Valadez i Kahl, 2000).

1.3.1. Amplificació inespecífica del polimorfisme de l'ADN: RAPDs

La tècnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, per les seves sigles en anglès), ha estat la metodologia més àmpliament utilitzada en la PCR, per a diferents propòsits (William *et al.*, 1993). Utilitza petits iniciadors de nucleòtids de seqüències aleatòries (per exemple, iniciadors 10-mers de la companyia OPERON); que normalment té un contingut de GC major al 50%. Aquests iniciadors no contenen seqüències repetides inverses internes ("auto complementaries") i s'enganxen a diferents llocs en un genoma, si és que existeixen diferents llocs en blanc per això. Aquesta unió és reconeguda pel l'enzim ADN polimerassa (ADN polimerassa Taq), que inicia l'allargament de l'iniciador a partir de l'extrem 3'. L'allargament resultant produeix una cadena d'ADN, que la seva base és complementaria de la cadena motlle (*Figura 1.3.1.1*). El producte de l'amplificació, s'acumularà en un gran nombre de còpies ($\approx 10^6$) i pot ser visualitzat amb electroforèsi després de tenyir el gel amb bromur d'etidi. Una amplificació és exitosa, només si el lloc en blanc per a l'iniciador es troba localitzar en les dues cadenes de l'ADN motlle en polaritat oposada i a una distància de 50 a 6000 parells de bases de promig (Valadez i Kahl, 2000).

El procediment de RAPDs és relativament ràpid (*Figura 1.3.1.1*), només requereix petites quantitats d'ADN i no cal que aquest sigui exactament pur, (és a dir, que es pot utilitzar ADN obtingut amb qualsevol tècnica comuna), a més, no involucra radioactivitat ni requereix transferència de tipus Southern.

Usualment aquesta tècnica proveeix marcadors dominants, ja que els polimorfismes es detecten amb la presència o absència de bandes. Aquests

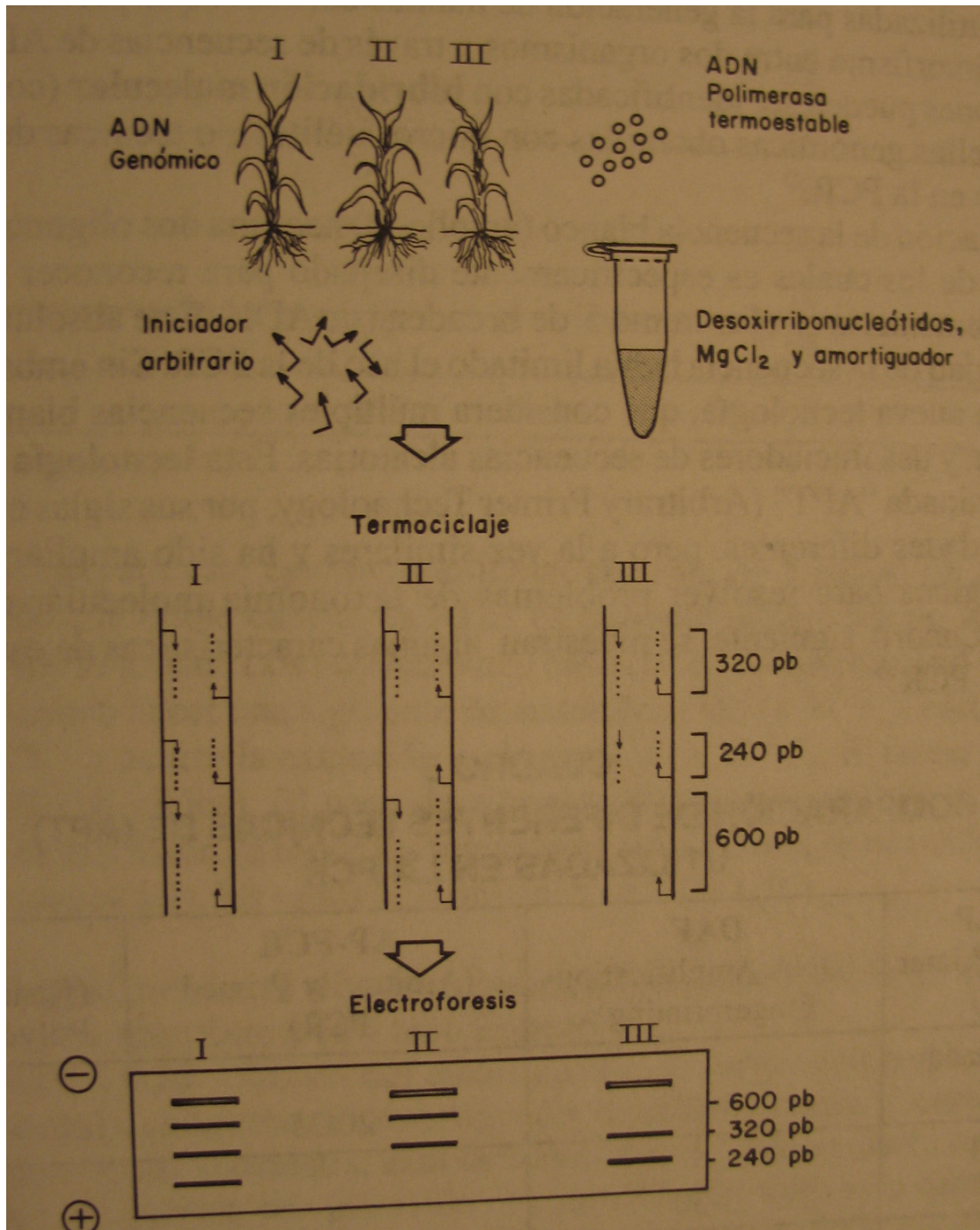


Figura 1.3.1.1. Tècnica de RAPDs

últims resulten d'insercions o delecions en les regions amplificades, o a partir de canvis de bases amb els que s'alterna la unió de l'iniciador. De totes maneres, per a la reproducció dels patrons de RAPD és absolutament necessari optimitzar les concentracions de l'ADN, $MgCl_2$ i de dNTPs. També la classe (i fins i tot, la font) d'ADN polimerasa termoestable s'ha de mantenir constant durant l'experimentació, així com l'utilització del mateix termociclador.

Qualsevol canvi en la polimerassa o en el termociclador, pot afectar inevitablement a la reproducció dels patrons. Per aquesta raó, aquells patrons de RAPDs que no són constants no són factibles de publicació si els autors no poden provar les condicions d'optimització per a la reacció. Un cop que tots els paràmetres es coneixen, els patrons de RAPDs es poden reproduir.

Els marcadors RAPDs, proporcionen un mètode ràpid per a generar mapes genètics i analitzar poblacions provinents de diferents cultivars de plantes, espècies d'un gènere o diferents gèneres d'una família (Valadez i Kahl, 2000)

Es mostra un exemple en la *Figura 1.3.1.2*.

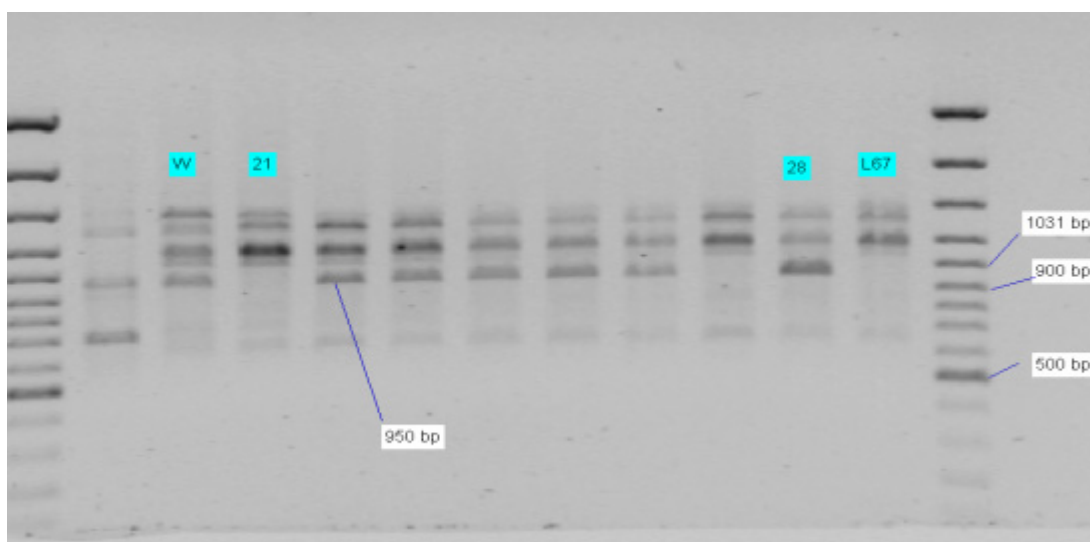


Figura 1.3.1.2. Gel d'electroforèsi procedent d'una PCR, amb un iniciador de 10 nt (tècnica RAPD). S'indica una banda en concret polimòrfica de 950 parells de bases (bp) de longitud.

1.3.2. Amplificació de fragments específics: SCARs

Aquesta tècnica consisteix en l'ús de molècules iniciadores específiques en la PCR per a identificar un gen o seqüències particulars d'ADN. Per exemple, per a identificar la presència del gen quitinassa en diferents espècies, s'han dissenyat les molècules iniciadores que reconeixen aquesta seqüència d'oligonucleòtids específica, de manera que al utilitzar-les en una reacció PCR sintetitzaran el gen respectiu en cas de trobar la complementarietat corresponent. La seqüència d'aquest gen es coneix a partir de diverses plantes i les molècules iniciadores es van dissenyar com a complementaries a regions altament conservades.

El gen de la quitinassa forma part del sistema de defensa contra els fongs fitopatogènics, i codifica en un enzim que degrada la quitina (polímer de les parets cel·lulars de fongs i de la cutícula dels insectes), per això l'identificació en diferents plantes indica al fitomillorador la presència d'una possible font de fitopatògens. Un altre exemple d'amplificació específica són els marcadors SCARs.

Un marcador (anteriorment descrit) RAPD pot convertir-se en un marcador específic per a PCR, d'utilització més fàcil. Així, els fragments d'ADN procedents d'un marcador RAPD pot ser clonat, seqüenciat i transformat en marcadors més específics que permetran l'amplificació per PCR de la banda RAPD d'interès (*Figura 1.3.2.1*). Aquest tipus de marcadors és conegut com a SCAR (*Sequence Characterised Amplified Region*) (Paran i Michelmore, 1993). Freqüentment es dissenyen cebadors iguals al decàmere original utilitzat pel RAPD, més 8-10 nucleòtids addicionals en la zona 3' del cebador, específics de la seqüència del RAPD clonat. Les avantatges de l'ús de SCAR sobre els RAPD són múltiples: la detecció d'un únic locus, una amplificació menys sensible a les condicions de reacció de PCR, etc.

Cal destacar aquí que pot considerar-se com a SCAR la conversió en marcador de PCR d'un marcador AFLP o RFLP, si bé originalment es va proposar el nom de SCAR únicament per a referir-se a la conversió a partir d'un RAPD (García-Mas *et al.*, 2000).

Per obtenir el marcador SCAR la banda RAPD d'interès ha de ser clonada. Un cop visualitzat el fragment d'ADN en l'electroforèsi d'agarosa es procedeix a retallar un trosset d'agarosa que contingui la banda amb un bisturí. L'ADN s'extreu de l'agarosa utilitzant nombrosos mètodes. A continuació el fragment d'ADN és clonat en un vector plasmídic. A partir de la seqüència es localitza el cebador RAPD en ambdós extrems dels fragments i es dissenyen nous cebadors de 20-23 bases que contenen el cebador original en l'extrem 5'. El marcador SCAR és amplificat en una reacció de PCR en condicions estàndard en un termociclador. El producte de la PCR és separat mitjançant electroforèsi en gel d'agarosa.

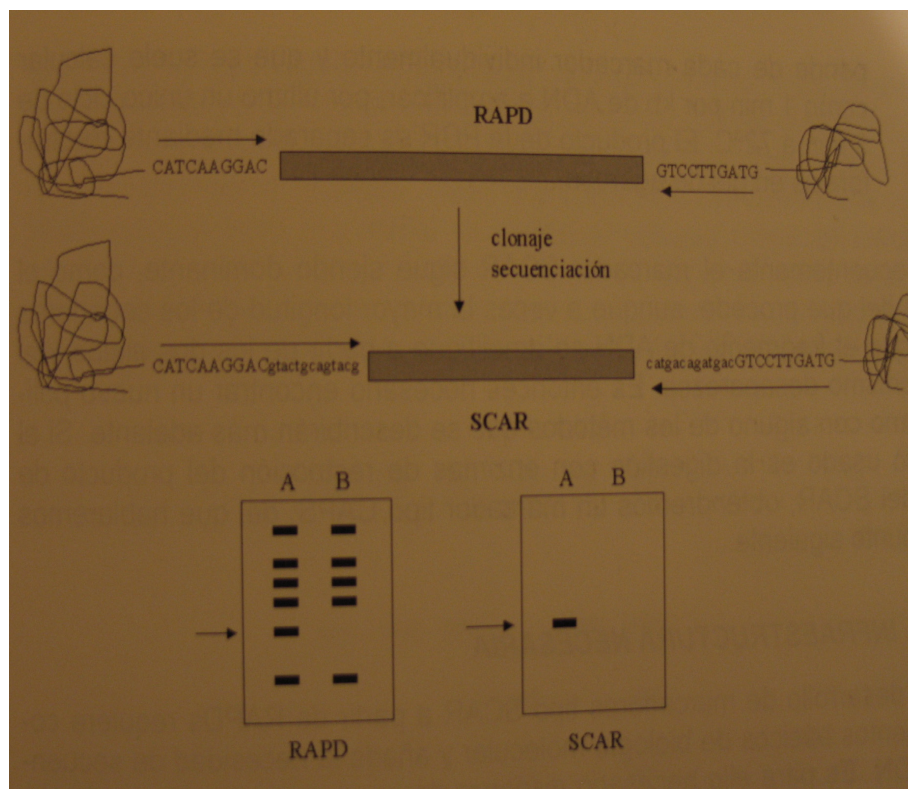


Figura 1.3.2.1. Esquema representatiu de la base molecular dels marcadors tipus SCAR. Les fletxes inferiors indiquen bandes polimòrfiques entre individus.

Freqüentment, el marcador SCAR segueix essent dominant, com el RAPD del que procedeix, tot i que a vegades la major longitud dels cebadors fa que el fragment d'ADN s'amplifiqui a partir dels dos al·lels i el polimorfisme desapareixi. Llavors és necessari trobar un nou polimorfisme amb algun mètode nou.

El desenvolupament de marcadors tipus SCAR a partir de RAPDs requereix coneixements bàsics de biologia molecular i afegeix la necessitat de seqüenciar l'ADN. Per això, és necessari disposar d'un aparell de seqüenciació manual o automàtic, o bé utilitzar un servei de seqüenciació extern. Per la resta, l'equip utilitzat és el mateix que pels RAPDs (García-Mas *et al.*, 2000)

1.4 Programa de millora genètica del cultivar Montcau (L67)

Tal i com s'ha indicat en l'*apartat 1.1*; el grup de millora genètica de l'ESAB va seleccionar un cultivar de tipus varietal Ganxet denominat Montcau o L67 (Bosch *et al.*, 1998 a).

Els assajos agronòmics realitzats amb el germoplasma i línies pures seleccionades del tipus varietal de mongeta del Ganxet (*Phaseolus vulgaris* L.) han posat de manifest la seva susceptibilitat a diverses malalties víriques i fúngiques presents a Catalunya, que en comprometen la producció i l'expansió d'aquest cultiu (Campa *et al.*, 2003; Sánchez, 2003).

Per a corregir aquesta situació, l'Equip de Millora Genètica de l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona (ESAB) va iniciar en el 2002 un procés d'introducció de gens de resistència a antracnosi (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn) Scrib) i Virus del Mosaic Comú de la Mongeta (BCMV) en la línia seleccionada Montcau del tipus varietal Ganxet, (registre Europeu CPVO20010377, registre Espanyol NRVP 20014342).

La resistència genètica descrita enfront al virus del mosaic comú i enfront a l'antracnosi és raça específica, de manera que un determinat gen o al·lel protegeix davant determinades varietats patogèniques. Pel BCMV s'han descrit cinc loci de resistència (Drijfhout, 1978). El gen dominant *I*, proporciona protecció davant les soques no necròtiques de virus. En canvi, els genotips dominants per aquest locus poden presentar una resposta d'hipersensibilitat en presència de soques necròtiques. Les combinacions recessives del locus inespecífic *bc-u* amb els loci *bc-1*, *bc-2* o *bc-3*, també proporcionen protecció davant d'aquest virus. Combinat amb el gen *I*, amb el gen *bc-3* o el gen *bc-u*, *bc-1*, i *bc-3* pot aconseguir-se resistència a totes les soques conegudes del virus sense resposta hipersensible letal (Kelly *et al.*, 2003).

Pel que fa a la resistència genètica davant antracnosi, s'han descrit almenys vuit loci independents i dominants de resistència, a més d'algun mecanisme de resistència recessiva. El coneixement de la variació patogènica local, així com l'elecció dels gens i al·lells (*Co-1*, *Co-3* i *Co-4*, són loci multial·lèlics), és important per a la millora davant d'aquest patògen, de manera que, per exemple, combinar gens andins (*Co-1*) amb mesoamericans (*Co-2*, *Co-4*², *Co-5* o *Co-6*) podria millorar els resultats, ja que confereix un ventall de major protecció a raçes del patògen. Els marcadors moleculars, tant RAPD com SCAR, han resultat ser molt efectius en gran varietat de germoplasma de mongeta per a la introducció de gens de resistència a malalties (Kelly *et al.*, 2003), fet que permet abordar fases d'un programa de millora sense necessitat

d'utilitzar patògen, seguint l'introducció del gen mitjançant la denominada Selecció Assistida a través de Marcadors (MAS) (Paran *et al.*, 1991).

El germoplasma recurrent utilitzat és la línia pura Montcau o L67 del tipus varietal Ganxet, seleccionada a l'ESAB a partir de característiques morfoagronòmiques, físicoquímiques i sensorials (Bosch *et al.*, 1998 a; Sánchez, 2003). Els materials donadors presenten llavor blanca, resistència a BCMV i resistència a antracnosi proporcionada per diferents gens: Widusa (Ferreira *et al.*, 2003); A-493 (Méndez de Vigo *et al.*, 2000) i Sanilac (Aylesworth *et al.*, 1983).

Fins ara, ja s'ha realitzat la caracterització molecular dels parentals donants i recurrent, així com diferents generacions de retroencreuament obtingudes mitjançant extracció d'ADN de fulles joves pel mètode *Doyle y Doyle* (1990). La presència del gen *Co-4*² es determina mitjançant el marcador RAPD OAS13-950, que es troba a una distància de lligament de 0 cM (Young *et al.*, 1998). El gen *Co-6* es determina a través del marcador RAPD OZ04-560, lligat entre 1.7 i 8.5 cM (Gonçalves *et al.*, 2001). El gen *Co-2* es determina mitjançant el marcador RAPD OQ04-1440, a 2-5.5 cM de distància de lligament (Young y Kelly, 1996). Les amplificacions a través de la reacció en cadena de la polimerassa (PCR) es va realitzar en acord a Skroch *et al.*, (1998) però en 40 cicles i a una temperatura d'hibridació de 42°C. El gen *Co-9* es determina mitjançant el marcador SCAR SB12-350 realitzant-se la PCR d'acord a Méndez de Vigo *et al.*, (2002). La determinació de la presència del gen *l* es fa a través del SCAR SW13-690, que es troba lligat al gen a una distància d'entre 1.3-1.5 cM (Kelly y Miklas, 1998). L'amplificació es realitza mitjançant la PCR segons Melotto *et al.* (1996).

A la *Taula 1.4.1.*, es mostra la caracterització dels parentals donants i recurrent Montcau per a tots els gens de resistència avaluats mitjançant marcadors moleculars. En tots els casos els marcadors seleccionats aporten els resultats esperats, resultant els donants portadors dels gens descrits prèviament en aquests materials i absents en la línia Montcau.

Pel creuament Sanilac x Montcau i pel gen *Co-2*, el marcador OQ04-1440 resulta excessivament proper a una banda, OQ04-1512 present en Montcau, motiu pel qual el seu ús pràctic queda compromès per la dificultat de discriminació d'ambdues bandes.

Taula 1.4.1. Resultats obtinguts en les amplificacions desenvolupades pels diferents marcadors moleculars descrits com lligats a gens específics de resistència en els parentals donants i el recurrent (Ganxet). +/- = presència/absència del fragment.

CULTIVAR	SW13-690 Gen <i>I</i>	OAS13-950 Gen <i>Co-4</i> ²	OZ04-560 Gen <i>Co-6</i>	SB12-350 Gen <i>Co-9</i>	OQ04-1440 Gen <i>Co-2</i>
Sanilac	+				+
Widusa		+	+		
A-493				+	
Montcau (Ganxet)	-	-	-	-	-

Entre els mètodes més utilitzats per a la incorporació d'un gen en una varietat, el més utilitzat és el retroencreuament (Sánchez-Monge, 1974). Aquest mètode planteja problemes per treballar amb diversos loci a la vegada en quan al nombre mínim de creuaments necessaris. Per això, el desenvolupament de diversos programes de retroencreuament paral·lels ofereix la possibilitat d'obtenir de diverses isolínies del tipus varietal Ganxet amb diferents gens de resistència a partir de les quals, es poden piramidat aquests gens en una sola línia a través de creuaments senzills (*Figura 1.4.1*).

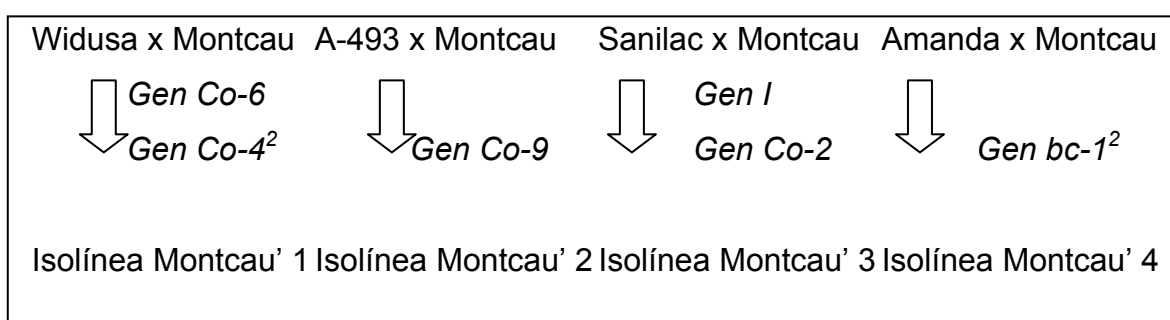


Figura 1.4.1. Programa per a la introducció de gens de resistència a antracnosi i BCMV en el cultivar Montcau del tipus varietal Ganxet.

El gen *Co-4*² aporta un espectre de protecció contra antracnosi molt ampli per si mateix (Kelly *et al.*, 2003) i donat que es troba en un grup de lligament diferent *Co-6* (grups de lligament B8 i B7, respectivament) s'està seguint la línia d'introducció del primer gen prioritàriament, a partir del donant Widusa, però

intentant arrossegar també el gen *Co-6*, per obtenir una línia Ganxet resistent a antracnosi amb dos gens (*Figura 1.5.1.*). En el creuament A-493 x Montcau es segueix l'introducció del gen *Co-9* (*Figura 1.5.1.*). Degut al fet que la raça 9 d'antracnosi present a Catalunya (Campa *et al.*, 2003) supera la resistència aportada pel gen *Co-2*, del creuament Sanilac x Montcau (*Figura 1.5.1.*), s'hauria de prioritzar la introducció del gen *I*, tot i que sense descartar arrossegar el gen *Co-2* si això és possible ja que protegeix en front a altres races identificades a la Península Ibèrica. Però aquesta línia no s'ha de prioritzar a la nova que s'iniciï, ja que el gen *I* funciona bé en combinació amb algun dels gens recessius *bc*, aportant una resistència ampla i combinada a BCMV i BCMNV (virus necròtic), degut a que els mecanismes de resistència són diferents. Sánchez (2005), va avaluar amb el possible donador C8 tots els marcadors publicats lligats a *bc-3*, de manera que no era possible fer selecció assistida amb el recurrent Ganxet.

Cal doncs, plantejar-se la necessitat d'iniciar una nova línia de creuaments alternatius amb donadors d'algun dels gens recessius (*bc-1*, *bc-1²* o *bc-u*).

Així doncs, es proposa un procés de retroencreuament per obtenir la segona combinació més recomanada, *bc-1² + I*. Aquest possible donador seria l'Amanda, material diferencial (Drijthout 1978; Drijthout *et al.* 1978).

A banda dels gens de resistència a malalties, l'Equip de Millora Vegetal de l'ESAB també es planteja introduir l'hàbit de creixement determinat, per exemple a partir del donador Sanilac (genotip *fin fin*), el que, de no afectar les característiques organolèptiques, facilitaria el cultiu de la varietat en no haver de tutorar les plantes.

Amb la racionalització dels creuaments i priorització dels objectius discutits, es planteja un programa amb quatre línies de creuament paral·leles. Obtenint dues generacions de retroencreuament al any, mitjançant la selecció assistida a través de marcadors moleculars per a tots els gens implicats, i la verificació de la resistència en les línies obtingudes, seria possible posar a disposició dels agricultors, a curt termini, cultivars resistents a antracnosi i BCMV que millorin els seus rendiments.

2. OBJECTIUS.

2.1. Objectius generals.

L'objectiu general del treball és continuar amb la selecció assistida de gens de resistència al Virus del Mosaic Comú (BCMV) i Antracnosi, en segregats de diversos retroencreuaments, que s'intenten introduir en el cultivar Montcau del tipus varietal Ganxet, i la caracterització de nous possibles donadors de gens recessius de resistència al virus necròtic (BCMNV). Paral·lelament, avaluar la viabilitat de la selecció assistida dels gens que determinen l'hàbit de creixement en mongeta.

2.2. Objectius específics.

1. Seleccionar les plantes portadores dels al·lels dominants *Co-4*² y *Co-6* simultàniament, en la quarta generació de retroencreuament, (BC 4) de Widusa x Montcau, mitjançant marcadors moleculars de tipus RAPDs.
2. Seleccionar les plantes portadores del al·lel dominant *Co-9*, en la tercera generació de retroencreuament (BC3) de A493 x Montcau mitjançant marcadors moleculars de tipus RAPD i SCAR.
3. Seleccionar les plantes portadores dels al·lels dominants *I* i *Co-2* simultàniament, en la primera generació de retroencreuament, (BC 1) de Sanilac x Montcau mitjançant marcadors moleculars de tipus RAPD i SCAR.
4. Avaluació de la possible introducció del gen recessiu *bc-1*² (present al donador Amanda) per complementar el gen *I*, amb l'objectiu de donar resistència simultània al BCMV i BCMNV, mitjançant marcadors moleculars de tipus RAPD i SCAR ja descrits en anteriors treballs.
5. Avaluació de la possible introducció dels gens recessius, *bc-1* o *bc-u*, (presentes al donador IVT7214) mitjançant marcadors moleculars RAPDs.
6. Avaluació de la possible introducció del gen recessiu *fin* (present al donador Sanilac) que determina creixement determinat, mitjançant marcador moleculars RAPDs.

3. MATERIAL I MÈTODES.

3.1. Material vegetal.

Per tots els assajos es van fer servir varietats de mongeta procedent de creuament seguint els plans de millora genètica de l'ESAB, depenent del gen i del tipus de generació que s'està estudiant.

L'ADN va ser extret, per mètodes descrits més endavant, (*apartat 3.2.*) dels següents materials vegetals, només en el cas dels materials Widusa (W), A493 (A) i Sanilac (S) es va treballar amb ADN prèviament extret.

Material vegetal:

- **Montcau o L67:** Línea pura de la varietat tradicional de la Mongeta del Ganxet (*Phaseolus vulgaris* L.) registrada amb el nom Montcau, N° de Registre Espanyol: NRVP 20014342. N° de Registre Europeu: CPVO 20010377. (denominació L67 en el banc de llavors de L'ESAB) (Bosch *et al.*, 1998 a ; Sánchez, 2003).
- **Widusa:** (W) que té els gens *Co-6* i *Co-4²* de resistència a l'antracnosi (*Colletothichum lindemuthianum*). Va ser cedida per J. J. Ferreira, SERIDA, Villaviciosa, Astúries. Varietat d'origen Mesoamericà amb un cicle de 45 dies i de creixement determinant, (alçada elevada però no enfiladissa). A més dels gens *Co-6* i *Co-4²* té gens de resistència al BCMV i un gen recessiu per la raça 38 (antracnosi). Segons Ferreira *et al* (2003) es confirma que té dos gens dominants que poden ser *Co-6* i *Co-4²* i segons Geffroy *et al.*, (1999) el gen *Co-6* es troba al grup de lligament B7 i el gen *Co-4²* es troba al grup de lligament B8, per tant es poden introduir simultàniament i s'haurien de complir les lleis de segregació de Mendel.

- **A493:** (A) té els gens *I* (BMCV) i *Co-9*, probablement al·lèlic de *Co-3*, (antracnosi) segons Rodriguez *et al.* (2002). Va ser cedida per J. J. Ferreira, SERIDA, Villaviciosa, Astúries. Varietat d'origen Andí, amb un cicle de 50 dies i de creixement determinant de tipus II. Procedent del CIAT (Cali, Colòmbia) (Méndez de Vigo *et al.*, 2000) i és el resultat del encreuament Alubia x BAT93, essent Alubia un material altament susceptible a l'antracnosi (Méndez de Vigo *et al.*, 2000), de llavor blanca amb un tipus de creixement I, procedent de selecció individual d'una població local de grup gènic andí (Galvan *et al.*, 2001). El gen *Co-9* es troba en el grup de lligament B4 (Geffroy *et al.*, 1999). Estudis de segregació indiquen que aquest gen *Co-9* es troba també al cultivar diferencial PI207262, que segons S. Singh, era efectivament un parental de BAT93 tot i que segons Alzate-Marin *et al.* (2003) tindria l'al·lel *Co-9* mentre BAT93 tindria l'al·lel *Co-9*².
- **Sanilac:** (S) té els gens *I* (BCMV) i *Co-2* (antracnosi) (Aylesworth *et al.*, 1983). Va ser cedida per J.J. Ferreira, SERIDA, Villaviciosa, Astúries. Varietat d'origen Mesoamericà, amb un cicle de 50 dies i de creixement fin fin (determinat). És un cultivar de la classe comercial Navy (altres cultivars són Michigan, Canela, etc. segons Galvan *et al.* (2001), mesoamericana de la raça Mesoamèrica (Miklas *et al.*, 1993). Llavor blanca, rodona i petita. Possiblement és la línia S22 derivada de Sanilac (Méndez de Vigo *et al.*, 2000). El gen *Co-2* procedeix de Cornell (Cornell 49-242) (Ferreira *et al.*, 2000). Aquest encreuament es troba aturat ja que el gen *Co-2* no dona resistència a les races d'antracnosi detectades a Catalunya (raça 9 i potser 38). Segons Drijfhout (1978) i Drijfhout *et al.*,

1978) a més dels anteriors Sanilac té els gens *bc-u* i *bc-2* de resistència a BCMV.

- **BC4 Widusa x Montcau:** quarta generació de retroencreuament (Back Cross, BC) de Widusa x Montcau, plantes 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57.
- **BC3 A493 x Montcau:** tercera generació de retroencreuament (Back Cross, BC) de A493 x Montcau, plantes 60a, 60b, 61a, 61b, 62a, 63a, 63b.
- **BC1 Sanilac x Montcau:** primera generació de retroencreuament (Back Cross, BC) de Sanilac x Montcau, plantes 70, 72, 73, 74, 76, 77.

Possibles nous donadors de gens de resistència al BCMV:

- **Amanda:** té els gens de resistència a BCMV, *bc-u*, *bc-3* i *bc-1²*, es desconeix si té el gen dominant I. Va ser cedida pel banc de germoplasma SERIDA, Villaviciosa, Astúries, amb registre 2005 C113 en el banc de llavors de l'ESAB. Creixement de tipus I. Llavors de color blanc, mida gran i sense curvatura, pes de 100 llavors = 41,33 g. (*Figura 3.1.1.*)
- **IVT 7214:** té els gens de resistència a BCMV recessius, *bc-u*, *bc-3*, *bc-1* i es desconeix si té el gen dominant I. Va ser cedida pel banc de germoplasma SERIDA, Villaviciosa, Astúries, amb registre 2005 C112 en el banc de llavors de l'ESAB. Creixement de tipus IV (indeterminat), llavors de color blanc, mida petita i forma esfèrica, sense curvatura, pes de 100 llavors = 24,01 g. (*Figura 3.1.2.*)



Figura 3.1.1. Amanda

Figura 3.1.2. IVT 7214

3.2. Extracció d'ADN.

El protocol d'extracció de DNA utilitzat va ser una modificació del mètode de Doyle i Doyle (1990), optimitzat al Departament de Biotecnologia de la UPV. Es trituraren en Eppendorfs amb micropistils individuals 60 mg de teixit vegetal, procedent de fulles veritables recent expandides, i submergides en nitrogen líquid. El DNA es va aïllar afegint 700 μ l de tampó d'extracció autoclavat i preescalfat a 65°C que contenia 2% CTAB, 20 mM EDTA, 100mM Tris-HCl, 1,42 M NaCl i β -mercaptoetanol a raó de 20 μ l per cada 10 ml de tampó, afegit en el moment d'ús i ajustat a pH 8. Abans d'incubar 30 minuts a 65°C, es van afegir 100 μ l de cloroform: alcohol isoamílic (24:1) i posteriorment, temperats els tubs, 500 μ l més de cloroform: alcohol isoamílic (24:1) fins omplir el tub. Es van centrifugar a 13.000 rpm durant 5 minuts. El DNA es va precipitar afegint a la fase aquosa recuperada 700 μ l d'etanol absolut fred, agitant els tubs fins la formació del precipitat i mantenint els tubs a -20°C durant 10 minuts. Es van centrifugar a 13.000 rpm durant 10 minuts, eliminant-se l'etanol i rentant una vegada el precipitat amb 500 μ l d'etanol 70% fred. Una darrera centrifugació a 13.000 rpm durant 5 minuts va permetre recuperar el pèl·let net i sec, després de 20 minuts d'evaporació a l'aire lliure. Les mostres es van resuspendre amb 100 μ l de tampó TE 1x (10mM Tris HCl i 1 mM EDTA ajustat a pH 8). El DNA extret es conservà a -20°C fins el moment d'anàlisi.

3.3. Gel de qualitat d'agarosa per l'avaluació de la qualitat de l'ADN extret.

Per visualitzar l'ADN extret de cada mostra es van utilitzar gels d'agarosa al 0,8 % p/v. Els gels d'agarosa es van preparar amb TBE 0,5X (10X tris/borato/EDTA 51 BIO-RAD 1610770) i agarosa en pols. Un cop dissolta l'agarosa es va afegir bromur d'etidi (Ethidium bromide solution 10 ML 5 ml BIO-RAD 1610433) a raó de 0,5 µg de pols de bromur d'etidi per cada ml de barreja TBE-agarosa. La mescla es va abocar en la cubeta portagels BIO-RAD 10x15 cm. on es va deixar refredar una hora per aconseguir la consistència desitjada.

Es va carregar el gel amb 10 µl de cada mostra a cada pouet del gel i 10 µl de cada marcador de pesos a cada extrem, amb les dissolucions que mostra la *Taula 3.3.1.*

Taula 3.3.1. Dilucions dels patrons i del ADN.

Composició de patrons				Composició de mostres d'ADN.	
	Patró 1µl	Patró 2µl	Patró 2,5µl		
6X Loading Dye Solution	2 µl	2 µl	2 µl	6X Loading Dye Solution	2 µl.
H₂O destil·lada	7 µl	6 µl	5,5 µl	H₂O destil·lada	7 µl.
λ DNA Hind III	1 µl	2 µl	2,5 µl	Mostra de DNA	1 µl.

A l'hora de realitzar l'electroforesi es van omplir les cubetes d'electroforesi amb tampó TBE 0,5X.

El voltatge es va regular a 115 Volts seguint les instruccions del fabricant de les cubetes (BIO-RAD). El temps en què es va fer córrer el gel va estar al voltant dels 45 minuts.

La visualització dels gels es va realitzar a través de la càmera digital Gel Doc 2000 BIO-RAD i el programa d'anàlisi Band Analyze (Bio-Rad).

L'estimació dels resultats es va fer amb els patrons col·locats al gel prèviament descrits i que es caracteritzà a la *Taula 3.3.2.*

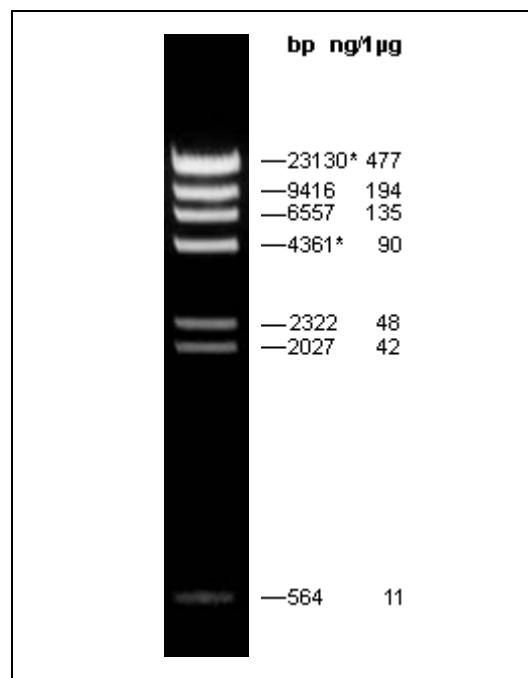
A la *Figura 3.3.1.* es va descriure com seria la visualització al gel de les bandes dels patrons.

Les bandes 7 i 8 van ser descartades per la mala visualització i varem treballar només amb les primeres 5 bandes.

A partir de la foto feta vàrem calcular la quantitat d'ADN per a cada mostra comparant-les visualment amb les intensitats de les bandes de cada patró.

Taula 3.3.2. Bandes del marcador comercial λ DNA Hind III (Fermentas). Mida i quantitat de ADN que conté cada banda.

	Mida del fragment en bp ₍₁₎	Quantitat de DNA en ng de μ g de marcador comercial (2 μ l)	Dilució 2: Quantitat de DNA en ng de 1.25 μ g de marcador comercial (2,5 μ l)	Dilució 3: Quantitat de DNA en ng de 0.5 μ g de marcador comercial (1 μ l)
Banda 1	23130	476,9	596.3	238.5
Banda 2	9416	194,1	242.5	97
Banda 3	6557	135,2	168.8	67.5
Banda 4	4361	89,9	112.5	45
Banda 5	2322	47,9	60	24
Banda 6	2027	41,8	52.5	21
Banda 7	564	11,6	13.75	5.5
Banda 8	125	2,6	3.8	1.5



1.0% agarosa; 0.5 μ g/línia; 8cm longitud del gel; 1X TAE, 17V/cm
Figura 3.3.1 Lambda DNA/HindIII Marker, 2 (Fermentas)

3.4. Marcadors RAPDs per a gens de resistència al virus del mosaic comú de la mongeta (BCMV) i a l'antracnosi.

El mètode utilitzat per la PCR amb marcadors RAPDs difereix de la dels marcadors SCARs, per la composició del Mix de PCR i del programa utilitzat en el termociclador, que en aquest cas és un únic programa (*Taula 3.4.2.*) i es fa servir només un sol iniciador.

Pel Mix de la PCR varem fer servir tubs *PuReTaqTMReady-To-GoTMPCR beads* amb codi 27-9557-01 de l'empresa Amersham Biosciences, els quals porten liofil·litzat els següents elements necessaris per a la reacció: Tris-HCl i KCl (tampó d'alta qualitat), dNTPs (nucleòtids), MgCl₂ i puReTaq polimerasa. Només vàrem afegir 20 µl. d'H₂O milique (autoclavada), 0,5 µl. de MgCl₂ 25 mM per arribar a una concentració final total de 2mM, 3 µl. del *primer* 5 µM i 1 µl. de mostra d'ADN 20 ng/µl. amb l'objectiu d'arribar a un volum final de 25 µl. amb unes concentracions adequades pel procés de la PCR.

Les concentracions inicial dels components dels tubs beads ja estan calculades per tal que en un volum final de 25 µl. la reacció PCR, tingui les següents concentracions finals: Tris-HCl 10 mM i KCl 50 mM (tampó d'alta qualitat). dNTPs (nucleòtids) 200 µM. MgCl₂ (tenint en comte l'afegit) 2 mM. 2,5 unitats de puReTaq polimerasa, *primer* 0,6 µM. i mostra d'ADN 20 ng.

El mix de la PCR queda detalladament explicat a la *Taula 3.4.1.*

Taula 3.4.1. Components de la PCR per a iniciador tipus RAPDs

Components dels c/tub beads.	Concentració Stock.	Concentració final de la reacció en 25µl.	
Tris-HCl (tampó)		10 mM	
KCl (tampó)		50 mM	
dNTPs (nucleòtids)		0,2 mM.	
puReTaq polimerasa		2,5 unitats	
MgCl ₂		1,5 mM*	
Components afegit/tub bead			Volum afegit/bead (µl)
H ₂ O milique (autoclavada)			20,5
MgCl ₂	25 mM.	0,5 mM.*	0,5
<i>Primer</i>	5 µM.	0,6 µM.	3
Mostra ADN	20 ng/µl.	20 ng.	1
TOTAL			25

La concentració final total de MgCl₂ en els 25 µl de la reacció és de 2 mM.

Els *primers* o iniciadors van ser canviats segons els gens que es volia amplificar. Així doncs els iniciadors que varem utilitzar pels gens *I*, *Co-4²*, *Co-6*, *Co-2*, *Co-9*, *bc-1²*, ja havien estat trobats per altres autors i en stock al laboratori LAMB, excepte els marcadors per els gens *Bc-u*, *Bc-1* i *fin*, que varem cercar a la bibliografia, (*veure apartat 3.8*), demanats a la casa comercial Operon i incorporats a l'stock del laboratori per l'anàlisi en els corresponents materials.

La llista de marcadors RAPDs utilitzats al treball es mostren a la *Taula 3.4.3*.

Taula 3.4.2 Programa del termociclador LAMB.

Etapa	Nº de cicles	Temperatura (°C)	Temps (minuts)
Desnaturalització inicial	1	95	5
Desnaturalització	40	95	1
Hibridació	40	42	1
Extensió	40	72	2
Extensió final	1	72	5
Refredament	1	4	Indefinit

Taula 3.4.3. Relació dels gens i els *primers* o iniciadors RAPDs que vàrem utilitzar.

Gens	<i>Primers</i>	Marcadors
<i>Co-4²</i>	ROAS13	ROAS13-950 bp.
<i>Co-6</i>	ROZ04	ROZ04-560 bp.
<i>Co-2</i>	ROQ04	ROQ04-1440 bp.
<i>Co-9</i>	ROY17	ROY17-1100 bp.
<i>bc-1²</i>	ROBD05	ROBD05-1300 bp.
<i>Bc-u</i>	ROC16	ROC16-1000 bp.
<i>Bc-1</i>	ROH14	ROH14-1100 bp.
<i>fin</i>	ROA04	ROA04-1100 bp.
	ROD08	ROD08-1150 bp.
	ROI19	ROI19-375 bp.

bp: parells de bases

3.4.1. Per al gen *Co-4²* de resistència a l'antracnosi (RAS13-950)

A les plantes 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, (BC4 de Widusa x Montcau), varem cercar el gen *Co-4²* amb el marcador RAPD, AS13-950 bp. Lligat a 0 cM segons Young *et al.*, (1998).

La PCR es va fer segons la *Taula 3.4.1*, amb el *primer* corresponent i amb el programa de termociclador segons la *Taula 3.4.2*.

També es van incloure el donador Widusa pel control positiu, el recurrent Montcau com a control negatiu, el control de PCR (fet de la mateixa manera que la resta de las mostres però sense ADN.)

Un cop feta la electroforesi, les bandes, en aquest cas de 950 parells de bases, havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *Co-4*² i al control positiu Widusa, però no al recurrent Montcau.

3.4.2. Pel gen *Co-6* de resistència a l'antracnosi (ROZ04-560 bp.)

A les plantes 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, (BC4 de Widusa x Montcau), varem cercar el gen *Co-6* amb el marcador RAPD, ROZ04-560 bp. Lligat entre 1,7 a 8,5 cM segons Gonçalves *et al.*, (2001).

La PCR es va fer segons la *Taula 3.4.1*, amb el *primer* corresponent i amb el programa de termociclador segons la *Taula 3.4.2*.

També es van incloure el donador Widusa per al control positiu i el recurrent Montcau com a control negatiu i el control de PCR (fet de la mateixa manera que la resta de las mostres però sense ADN.)

Un cop feta l'electroforesi, les bandes, en aquest cas de 560 parells de bases, havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *Co-6* i al control positiu Widusa, però no al recurrent Montcau.

3.4.3. Pel gen *Co-2* de resistència a l'antracnosi (ROQ04-1440 bp.)

A les plantes 60a, 60b, 61a, 61b, 62a, 63a, 63b, (BC3 de A493 x Montcau), varem cercar els gen *Co-2* amb el marcador RAPD, ROQ04-1440 bp. Lligat a 2-5,5 cM en fase d'acoplament, trobat al material diferencial Cornell 49-242 mesoamericà (Kelly i Miklas, 1998). Desenvolupat per Young i Kelly (1996).

La PCR es va fer segons la *Taula 3.4.1*, amb el *primer* corresponent i amb el programa de termociclador segons la *Taula 3.4.2*.

També es van incloure el donador A493 pel control positiu, el recurrent Montcau com a control negatiu i el control de PCR (fet de la mateixa manera que la resta de les mostres però sense ADN.)

Un cop feta l'electroforesi, les bandes, en aquest cas de 1440 parells de bases, havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *Co-2* i al control positiu A493, però no al recurrent Montcau.

3.4.4. Pel gen *Co-9* resistència a l'antracnosi (ROY17-1100 bp.)

A les plantes 60a, 60b, 61a, 61b, 62a, 63a, 63b, (BC3 de A493 x Montcau), varem cercar el gen *Co-9* amb el marcador RAPD, ROY17-1100 bp. lligat a 1,4 cM segons Méndez-Vigo *et al.* (2005).

La PCR es va fer segons la *Taula 3.4.1.* amb el *primer* corresponent i amb el programa de termociclador segons la *Taula 3.4.2.*

També es van incloure el donador A493 pel control positiu, el recurrent Montcau com a control negatiu i el control de PCR (fet de la mateixa manera que la resta de les mostres però sense ADN.)

Un cop feta l'electroforesi, les bandes, en aquest cas de 1100 parells de bases, havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *Co-9* i al control positiu A493, però no al recurrent Montcau.

3.4.5. Pel gen *bc-1²* de resistència al BMCV (ROB05-1300 bp.)

Als possibles donadors Amanda, plantes 83 i 86, i en IVT 7214 plantes 90, 91, 92, 93, varem cercar el gen *bc-1²* de resistència a BMCV amb el marcador RB05-1300 (iniciador GTGCGGGAG) desenvolupat per Miklas *et al* (2000).

La PCR es va fer segons la *Taula 3.4.1.*, amb aquest marcador i amb el programa de termociclador segons la *Taula 3.4.2.*

També es van incloure el recurrent Montcau com a control negatiu i el control de PCR (fet de la mateixa manera que la resta de les mostres però sense ADN.)

Un cop feta l'electroforesi, les bandes, en aquest cas de 1300 parells de bases, havien de sortir en les plantes que tinguin el gen *bc-1²*, però no al recurrent Montcau.

3.4.6. Pel gen *Bc-u* de resistència al BMCV (ROC16-1000 bp.)

A les plantes CO8 (material de Sánchez 2005), Sanilac, Widusa, A493, Amanda, IVT 7214 i Montcau varem cercar el gen *Bc-u* amb el marcador RAPD, ROC16-1000 bp. lligat a 4,5 cM del gen *Bc-u* segons Strausbaugh *et al.* (1999). Aquest marcador va ser buscat en la bibliografia, demanat a la casa comercial Operon que fins aleshores no s'havia provat.

La PCR es va fer segons la *Taula 3.4.1.* amb el *primer* corresponent i amb el programa de termociclador segons la *Taula 3.4.2.*

També es van incloure el control de PCR (fet de la mateixa manera que la resta de les mostres però sense ADN.)

Un cop feta l'electroforesi, les bandes, en aquest cas de 1000 parells de bases, havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *Bc-u* i al control positiu Montcau. Segons la informació de l'apartat 3.1. s'esperava no trobar la banda a Amanda i IVT7214 (genotips *bc-u bc-u*).

3.4.7. Pel gen *Bc-1* de resistència al BMCV (ROH14-1100 bp.)

A les plantes CO8 (material de Sánchez 2005), Sanilac, Widusa, A493, Amanda, IVT 7214 i Montcau varem cercar el gen *Bc-1* amb el marcador RAPD, ROH14-1100 bp. lligat a 10,9 cM segons Strausbaugh *et al.* (1999). Aquest marcador va ser buscat en la bibliografia, demanat a la casa comercial Operon i que fins aleshores no s'havia provat.

La PCR es va fer segons la *Taula 3.4.1,* amb el *primer* corresponent i amb el programa de termociclador segons la *Taula 3.4.2.*

També es van incloure el control de PCR (fet de la mateixa manera que la resta de las mostres però sense ADN.)

Un cop feta l'electroforesi, les bandes, en aquest cas de 1100 parells de bases, havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *Bc-1* i al control positiu Montcau. Segons l'informació de l'apartat 3.1., s'esperava que la banda fos absent a IVT7214 (genotip *bc-1 bc-1*).

3.4.8. Pel gen *fin* de creixement determinat (ROA04-1100 bp.) (ROD08-1150 bp.) (ROI19-375 bp.)

En les plantes 70, 72, 73, 74, 76, 77, (BC1 de Sanilac x Montcau), vàrem cercar

el gen *fin* de creixement determinat amb tres marcadors trobats a la bibliografia, demanats a la casa comercial Operon, i que, fins ara no s'havien provat: ROI19-375 i ROA04-1100 bp. en repulsió amb *Fin* (Pañeda, 2001). i ROD08-1150 bp. també en repulsió amb *Fin*. Els resultats d'aquest darrer marcador encara no estan publicats, però ho indica Pañeda *et al* (2004).

La PCR es va fer segons la *Taula 3.4.1*, amb el *primer* corresponent i amb el programa de termociclador segons la *Taula 3.4.2*.

També es van incloure el donador Sanilac per al control positiu, el recurrent Montcau com a control negatiu i el control de PCR (fet de la mateixa manera que la resta de las mostres però sense ADN).

Un cop feta l'electroforesi, les bandes, en aquest cas de 1100 bp., 1150 bp., i 375 bp., corresponentment havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *fin* i al control positiu Sanilac, però no al recurrent Montcau.

3.5. Marcadors SCARs per a gens de resistència al virus del mosaic comú de la mongeta (BCMV) i a l'antracnosi.

Els marcadors SCARs deriven dels marcadors RAPDs, de forma que quan s'identifica un RAPD lligat a un gen concret s'aïlla el fragment RAPD, es seqüència i se'n dedueixen dos iniciadors, un per cada extrem, més llargs que els RAPD.

Al laboratori vàrem treballar amb SCARs (*Taula 3.5.2*) trobats i publicats per altres autors. El procediment de preparació del Mix de PCR en el cas de marcadors SCARs difereix de alguns components (s'han de posar dos iniciador) i en concentració al fet per els iniciador RAPDs. Igualment vàrem fer servir els tubs beads *PuReTaqTMReady-To-GoTMPCR beads* amb còdig 27-9557-01 de l'empresa Amersham Biosciences, canviant alguns components i els seus volums. A més a més el programa del termociclador també es diferent per a cada iniciador. Els tubs *PuReTaqTMReady-To-GoTMPCR beads* porten liofil·litzat els següents elements necessaris per la reacció: Tris-HCl i KCl (tampó d'alta qualitat), dNTPs (nucleòtids), MgCl₂ i puReTaq polimerasa. Només vàrem afegir 18 µl. d'H₂O milique (autoclavada), 3,5 µl. de MgCl₂ 25 mM, 1,25 µl. de *primer 1* 10 µM, 1,25 µl. de *primer 2* 10 µM. Segons el gen que

es vulgui amplificar i 1 μ l. de mostra d'ADN 20 ng/ μ l. Així s'arriba a un volum final de 25 μ l. amb unes concentracions adequades pel procés de la PCR.

Les concentracions inicials dels components dels tubs beads ja estan calculades per tal que en un volum final de 25 μ l. la reacció PCR, tingui les següents concentracions finals: Tris-HCl 10 mM i KCl 50 mM (tampó d'alta qualitat), dNTPs (nucleòtids) 200 μ M., MgCl₂ (tenint en compte el afegit) 2 mM., 2,5 unitats de puReTaq polimerasa, els dos *primers* 0,5 μ M. cada un d'ells i mostra d'ADN 20 ng.

El Mix de la PCR queda detalladament explicat a la *Taula 3.5.1*.

Taula 3.5.1. Components de la PCR per iniciadors tipus SCARs.

Components dels c/tub beads.	Concentració Stock.	Concentració final de la reacció en 25 μ l.	
Tris-HCl (tampó)		10 mM	
KCl (tampó)		50 mM	
dNTPs (nucleòtids)		0,2 mM.	
puReTaq polimerasa		2,5 unitats	
MgCl ₂		1,5 mM*	
Components afegit/tub bead			Volum afegit/bead (μ l)
H ₂ O milique (autoclavada)			18
MgCl ₂	25 mM.	3,5 mM.*	3,5
<i>primer 1</i>	10 μ M.	0,5 μ M.	1,25
<i>primer 2</i>	10 μ M.	0,5 μ M.	1,25
Mostra ADN	20 ng/ μ l.	20 ng.	1
TOTAL			25

* La concentració final total de MgCl₂ en els 25 μ l de la reacció es de 5 mM.

Taula 3.5.2. Relació dels gens i els *primers* o iniciadors SCARs que es van utilitzar.

Gens	<i>primers</i>	Marcadors
<i>I</i>	SW13	SW13-690 bp.
<i>Co-9</i>	SB12	SB12-350 bp.
<i>bc-1²</i>	SBD05	SBD05-1300 bp.

bp: parells de bases

3.5.1. Pel gen *Co-9* de resistència a l'antracnosi (SB12-350)

A les plantes 60a, 60b, 61a, 61b, 62a, 63a, 63b, (BC3 de A493 x Montcau),

varem cercar els al·lels amb el marcador SB12-350 desenvolupat per Méndez de Vigo *et al.* (2002).

Els iniciadors de la PCR per aquest marcador són els següents:

- iniciador 1: 5' –CCT TGA CGC ACC TCC ATG-3'
- iniciador 2: 5' –TTG ACG CAT GGG TTG GCC-3'

La PCR es va fer segons la *Taula 3.5.1.* i un cop preparades totes les mostres, més el control positiu del donador A493, el control negatiu del recurrent Montcau, i el control de PCR, es van posar al termociclador amb el programa recomanat per Méndez de Vigo *et al.* (2002) segons la *Taula 3.5.1.1.*

Taula 3.5.1.1. Programació del Termociclador MENDEZ.

Etapa	Nº de cicles	Temperatura (°C)	Temps (minuts)
Desnaturalització inicial	1	94	2
Desnaturalització	35	94	1
Hibridació	35	68	1
Extensió	35	72	1
Extensió final	1	72	7
Refredament	1	4	Indefinit

Un cop feta l'electroforesi, les bandes de 350 parells de bases havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *Co-9* i al control positiu A493, però no al recurrent Montcau.

3.5.2. Pel gen *I* de resistència a BCMV (SW13-690)

3.5.2.1. En la primera generació Backcross de Sanilac x Montcau.

En les plantes 70, 72, 73, 74, 76, 77, (BC1 de Sanilac x Montcau), vàrem cercar el gen *I* de resistència al BCMV amb el marcador SW13-690 desenvolupat per Melotto *et al* (1996).

Els iniciadors de la PCR per aquest marcador són els següents:

- iniciador 1: 5' CACAGCGACATTAATTTTCCTTTC3'
- iniciador 2: 5' CACAGCGACAGGAGGAGCTTATTA 3'

La PCR es va fer segons la *Taula 3.5.1* i un cop preparades totes les mostres, més el donador Sanilac, el recurrent Montcau, i el control negatiu de PCR sense ADN, es van posar al termociclador amb el programa recomanat per Melotto *et al.* (1996) segons la *Taula 3.5.2.1.1*.

Taula 3.5.2.1.1. Programació del Termociclador d'acord al programa MELOTTO.

Etapa	Nº de cicles	Temperatura (°C)	Temps (minuts)
Desnaturalització inicial	1	94	5
Desnaturalització	40	94	1
Hibridació	40	67	1
Extensió	40	72	2
Extensió final	1	72	5
Refredament	1	4	Indefinit

Un cop feta l'electroforesi, les bandes de 690 parells de bases havien de sortir en les plantes que tinguessin el gen *I* i al control positiu Sanilac, però no al recurrent Montcau.

3.5.2.2. En els possibles donadors Amanda i IVT 7214.

Als possibles donadors Amanda, plantes 83 i 86, i en IVT 7214 plantes 90, 91, 92, 93, vàrem cercar el gen *I* de resistència a BCMV amb el marcador SW13-690 desenvolupat per Melotto *et al.* (1996).

Iniciadors de la PCR, tampó i programa de termociclador ídem apartat 3.5.2.

Un cop feta l'electroforesi, les bandes de 690 parells de bases podien sortir tant a Amanda com a IVT7214, però no al recurrent Montcau. Amb l'informació disponible d'aquests materials (apartat 3.1) no sabíem si tindrien o no el gen *I*

3.5.3. Pel gen *bc-1²* de resistència a BCMV (SBD05-1300)

En el possible donador Amanda (plantes 83 i 86), vàrem cercar el gen *bc-1²* de resistència a BCMV amb el marcador SBD05-1300 desenvolupat per Miklas *et al.* (2000). Disposàvem del material IVT7214 (plantes 90, 91, 92, 93) com a control de l'al·lel recessiu *bc-1*, del mateix locus.

Els iniciadors per la PCR per aquest marcador són els següents:

- iniciador 1: 5'GTG CGG AGA GGC CAT CCA TTG GTG 3'

- iniciador 2: 5'GTG CGG AGA GTT TCA GTG TTG ACA 3'

La PCR es va fer segons la *Taula 3.5.1* i un cop preparades totes les mostres, més el recurrent Montcau, i el control negatiu de PCR (sense ADN) es van posar al termociclador amb el programa descrit a la *Taula 3.5.3.1*. La bibliografia només recomana la temperatura d'hibridació 65° C, Miklas *et al.* (2000b)

Taula 3.5.3.1. Programació del Termociclador d'acord al programa Miklas.

Etapa	Nº de cicles	Temperatura (°C)	Temps (minuts)
Desnaturalització inicial	1	94	5
Desnaturalització	40	94	1
Hibridació	40	65	1
Extensió	40	72	2
Extensió final	1	72	5
Refredament	1	4	Indefinit

Un cop feta l'electroforesi les bandes de 1300 parells de bases havien de sortir en les plantes Amanda que tenen el gen *bc1*², però no al recurrent Montcau, ni a IVT7214 que té el genotip *bc-1 bc-1*.

3.6. Visualització dels fragments derivats de la PCR (electroforesi amb gel d'agarosa).

Per visualitzar els fragments de PCR es van utilitzar gels d'agarosa al 1,4 %. Els gels d'agarosa es van preparar amb TBE 0,5X (10X tris/borat/EDTA 51 BIO-RAD 1610770) i agarosa en pols. Un cop dissolta l'agarosa en el TBE escalfat, es va deixar refredar fins als 60°C per afegir bromur d'etidi (Ethidium Bromide solution 10 ML 5 ml BIO-RAD 1610433) a raó de 0,5 µg de pols de bromur d'etidi per cada ml de barreja TBE-agarosa. La mescla es va abocar a la cubeta portagels BIO-RAD 10x15 cm on es va deixar refredar per aconseguir la consistència desitjada.

A l'hora de realitzar l'electroforesi es van omplir les cubetes d'electroforesi amb tampó TBE 0,5X.

Amb l'objectiu de dipositar les mostres derivades del la PCR en els pouets del gel, vàrem afegir 6X Loading Dye Solution a raó de 5 µl per cada tub

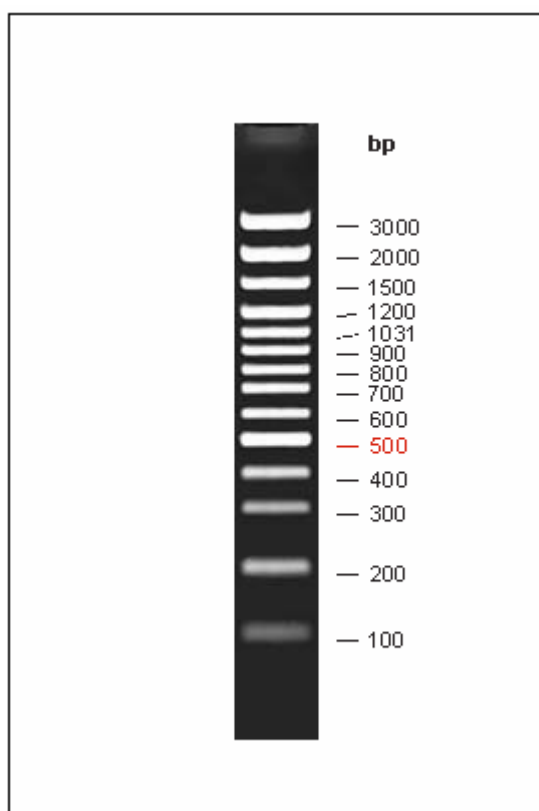
PuReTaqTMReady-To-GoTMPCR beads aconseguint un volum final de 30 μ l per tub.

Vàrem carregar el gel amb 16 μ l de mostra a cada pouet del gel i 10 μ l de marcador de pesos a cada extrem.

Els patrons de pesos que es van utilitzar, es van preparar segons la *Taula 3.6.1.* eren marcadors del tipus Gene RulerTM 100 bpDNA Ladder Plus de la casa comercial Fermentas (Gene Ruler 100bpDNA Ladder Plus Quimigranel SM0321 per a 0,05 mg. (*Figura 3.6.1.*).

Taula 3.6.1. Dilució dels patrons de pesos de DNA

Dilució del marcador Gene RulerTM 100bpDNA Ladder Plus amb Loading Dye Solution	
	6x
H ₂ O milique (autoclauada)	7 μ l
Loading Dye Solution	1,5 μ l
Gene Ruler TM 100bpDNA Ladder Plus*	1,5 μ l
TOTAL	10 μ l



1.7% agarosa, 0.5 μ g/linia, 8cm longitud del gel, 1X TBE, 12V/cm.

Figura 3.6.1. Gene RulerTM 100bp Ladder Plus (Fermentas).

El voltatge es va regular a 115 V seguint les instruccions del fabricant de les cubetes (Bio-Rad). El temps en què es va fer córrer el gel va dependre de la PCR, de la banda d'interès que s'havia fet amplificar. Les bandes més curtes, al voltant de 300-400 bp., es deixaven córrer menys temps, al voltant de 45 minuts, en canvi, les bandes més grans estaven més d'una hora i quart.

La visualització dels gels es va realitzar a través de la càmera digital Gel Doc 2000 BIO-RAD i el programa d'anàlisi Band Analyze (Bio-Rad). Només en una ocasió, per tall de corrent, es va visualitzar de forma tradicional amb el transil·luminador de UV (Vilber Lourmat TFX-20M), realitzant una fotografia amb una càmera Polaroid (GELCAM PolaroidDS-34 amb cartutx GHJ20 de 20x15).

3.7. Tractament estadístic per l'estudi de les freqüències observades en front de les esperades.

Amb l'objectiu de fer la comparació dels resultats obtinguts amb els esperats, per a cada cas de gen estudiat varem fer l'estudi estadístic χ^2 (chi quadrada) per veure si la probabilitat de les freqüències observades en front de les esperades s'ajustaven a les lleis de Mendel en la segregació de caràcters de pares a fills. (*Figura 3.7.1*)

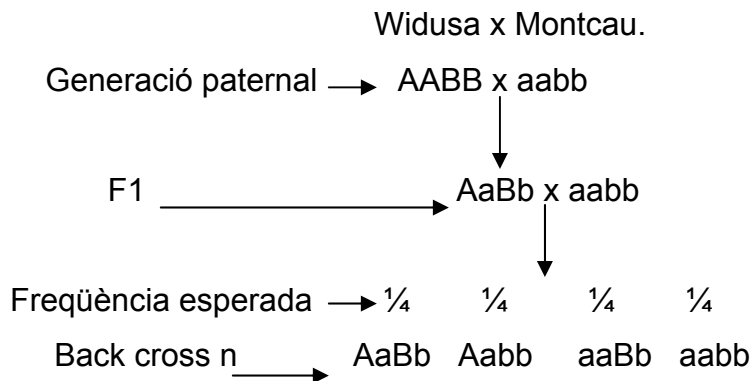
Després de l'anàlisi de cada gen mitjançant marcadors moleculars, les freqüències observades haurien de ser les mateixes que les freqüències esperades, per tal de comprovar-ho matemàticament, fem servir el test estadístic de la Ji-quadrada mitjançant la fórmula de càlcul de la χ^2 , (*Figura 3.7.2*) i contrastant el resultat amb la taula de valors de la distribució χ^2 amb la probabilitat desitjada ($p \leq 0,05$) i els graus de llibertat corresponents (Moore, 1995).

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{freqüència observada} - \text{freqüència esperada})^2}{\text{freqüència esperada}}$$

Figura 3.7.2 calculo de la χ^2

Retroencreuement Widusa x Montcau

Widusa x Montcau.

 $Co-6\ Co-6\ Co-4^2\ Co-4^2 \times co-6\ co-6\ co-4^2\ co-4^2$ $Co-6 = A$ $Co-4^2 = B$ $co-6 = a$ $co-4^2 = b$ AaBb= numero de plantes amb els dos gens dominats, $Co-6$ i $Co-4^2$.Aabb= numero de plantes amb un sol gen dominat, $Co-6$.aaBb= numero de plantes amb un sol gen dominat, $Co-4^2$.

aabb= numero de plantes sense gens dominats.

Figura 3.7.1. Exemple de la introducció de dos gens a la vegada i la seva segregació al Back Cross.**3.8. Recerca bibliogràfica de nous marcadors pels gens *bc-1*, *bc-u* i gen *fin*.**

Es va voler ampliar el coneixement sobre l'existència, o no, de marcadors moleculars publicats per poder fer selecció assistida, en el futur, dels al·lells recessius *bc-1* i *bc-u* de resistència a BCMV i del gen *fin* que aporta creixement determinat.

Es va fer una recerca bibliogràfica a la base de dades de la biblioteca de l'Universitat Politècnica de Catalunya mitjançant la pàgina web www.biblioteca.upc.es. Es va buidar la base de dades CAB abstracts (de 1991 a maig de 2006), buscant-se per paraules claus "molecular

maker* (on * permet truncar per buscar tant el singular com el plural), “BCMV”, “common bean”, “bc-1”, “bc-u”.

Per el que fa a marcadors per a l'al·lel *fin* es va buscar amb les paraules claus, “molecular maker*” (truncat per incloure singular i plural), “growth habit”, “common bean”, i “fin”.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

4.1 Extracció d'ADN.

Al finalitzar el procés d'extracció d'ADN, es van preparar tres gels de qualitat, per determinar la quantitat d'ADN, de cada una de les mostres amb l'objectiu de poder-les dissoldre totes elles a la mateixa concentració de 20 ng / μ l (*figures 4.1.1, 4.1.2, i 4.1.3*).

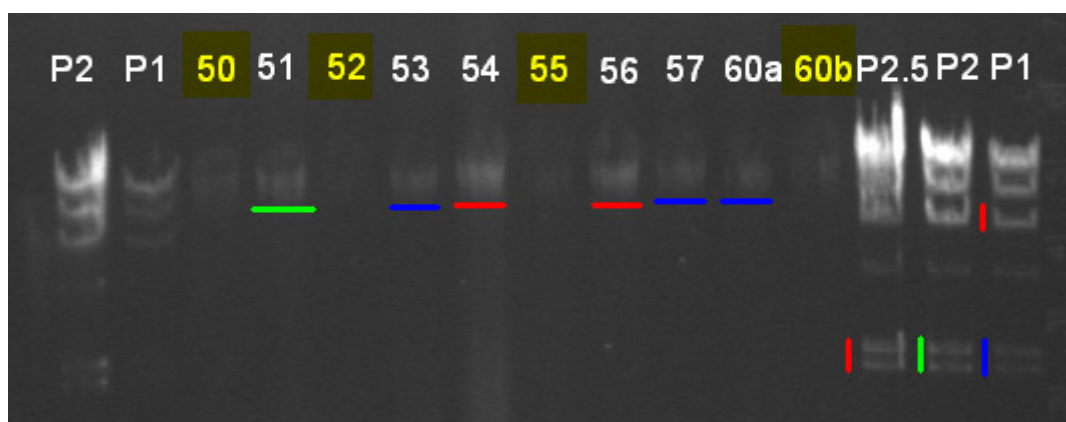


Figura 4.1.1. Gel d'electroforèsi. Mostres de la 50 a la 60b.

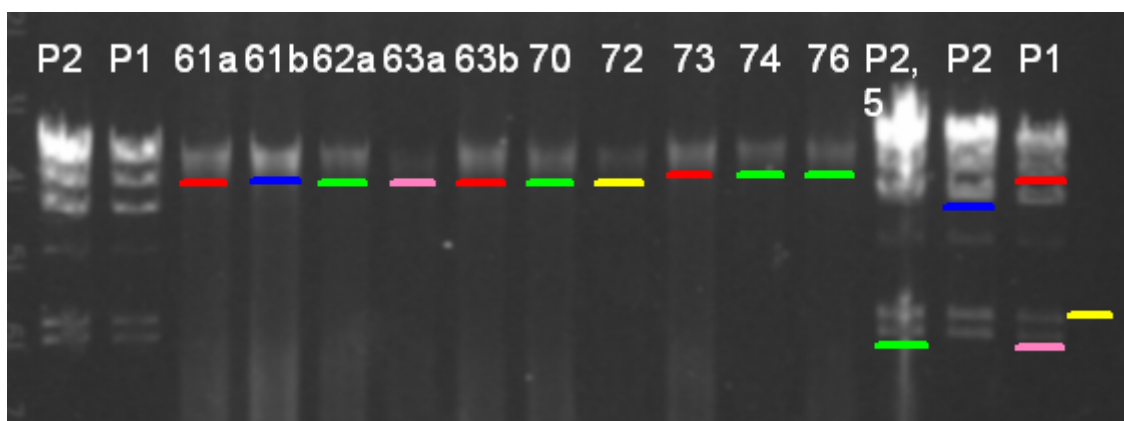


Figura 4.1.2. Gel d'electroforèsi. Mostres de la 61a a la 76.

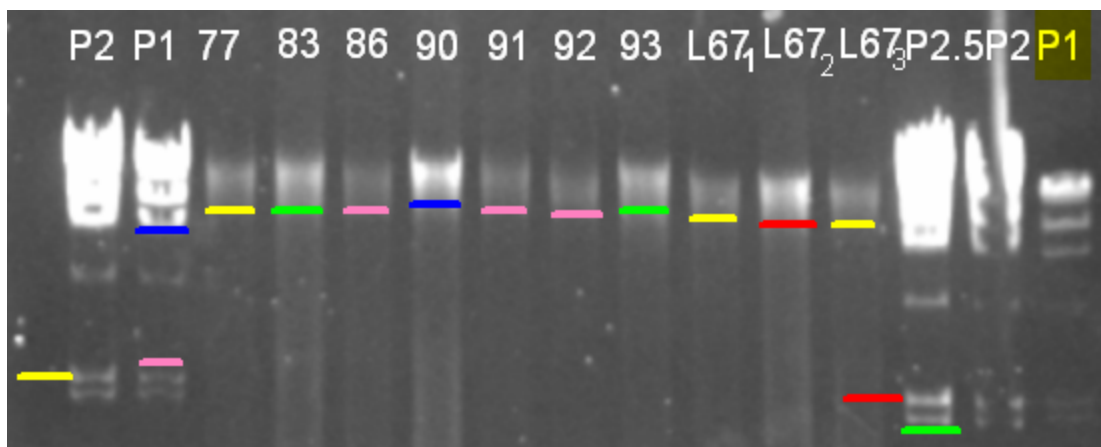


Figura 4.1.3. Gel d'electroforèsi. Mostres de la 77 a la L67₃ (Montcau).

Les mostres 50, 52, 55, 60a, 60b, 63a i 72, van ser repetides en un quart gel, per problemes de visualització (Figura 4.1.4.)

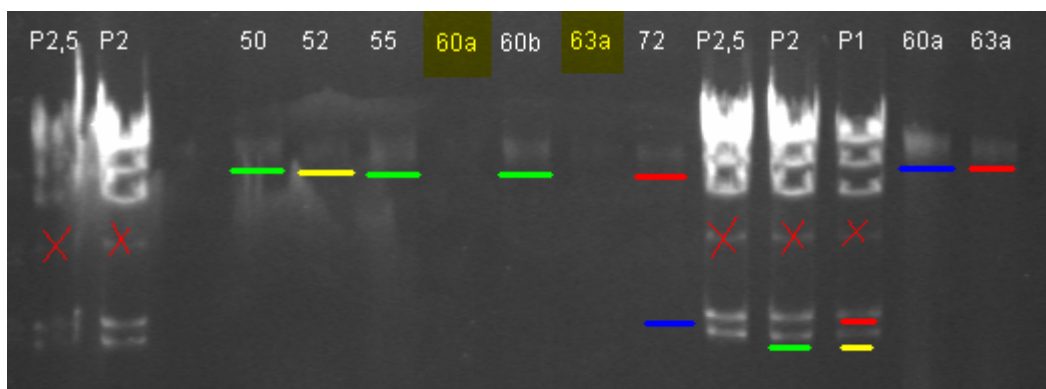


Figura 4.1.4. Gel d'electroforèsi. Repetició de mostres.

La coloració de cada una de les fotografies, correspon a una classificació que vàrem fer, segons la intensitat de cada mostra, i tenint com a model els patrons, estimant la quantitat en ng/ μ l d'ADN que contenia cada una d'elles, a fi de dissoldre-les a 20 ng/ μ l (Taula 4.1.1).

Taula 4.1.1. Quantitat d'ADN en ng/μl estimada i solució tampó afegida per unificar la concentració de totes les mostres a 20 ng/μl.

Mostra	ng/μl estimats	TE 1x afegit (μl.)	Mostra	ng/μl estimats	TE 1x afegit (μl.)
50	40	100	83	52	160
51	44,85	124,5	86	24	-
52	20	-	90	67	235
53	22,5	-	91	24	-
54	60	200	92	24	-
55	40	100	93	52,5	160
56	60	200	L671	48	140
57	22,5	-	L672	60	200
60a	52	160	L673	48	140
60b	40	100			
61a	97	385			
61b	135	575			
62a	52	160			
63a	20	-			
63b	97	385			
70	52	160			
72	25	-			
73	97	385			
74	52	160			
76	52	160			
77	48	140			

4.2. Quarta generació de retroencreuament Widusa x Montcau (BC4)

4.2.1. Identificació de les plantes 50-57, amb l'al·lel *Co-4*²

Per identificar les plantes amb l'al·lel *Co-4*², es va utilitzar el marcador ROAS13-950 (*Figura 4.2.1.1*).

Les bandes pintades de color corresponen a les de 950 parells de bases, per tant les mostres que contenen aquest al·lel són: 51, 52, 54, 56.

La mostra 55 va ser repetida en els primers "pouets" del gel de l'al·lel *Co-6*, ja que la visualització en aquesta *Figura 4.2.1.1* no era bona, probablement per algun error humà de pipeteig, el resultat però va ser negatiu, com podem veure en la *Figura 4.2.1.2*.

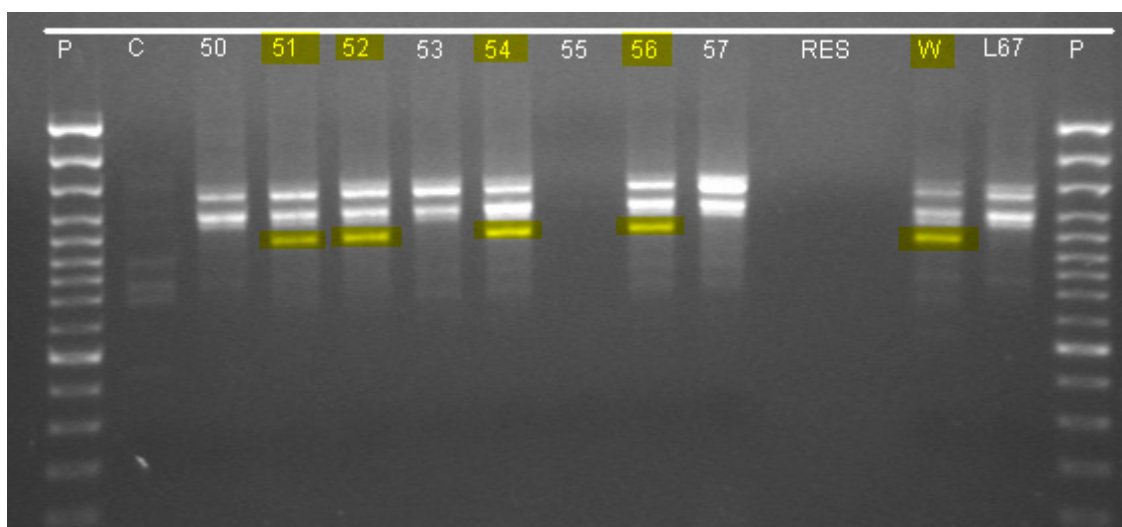


Figura 4.2.1.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 950 pb (ROAS13-950)

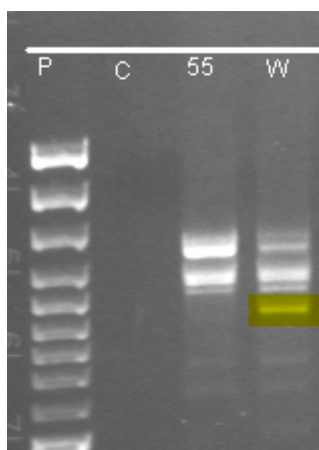


Figura 4.2.1.2. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 950 pb (ROAS13-950) a la mostra 55.

Segons la segregació, en un retroencreuament en què es creuen una planta heterozigota de la generació anterior (BC 3), $Co-4^2 co-4^2$ amb el recurrent Ganxet $co-4^2 co-4^2$ s'esperaria un 50% de plantes amb l'al·lel dominant. El resultat va ser que de 8 plantes, 4 presentaven l'al·lel i 4 no. El valor de la χ^2 és 0, valor inferior al tabulat per a 1 grau de llibertat; que és 3.84. Això significa que els resultats s'ajusten a les freqüències esperades segons una segregació mendeliana, amb una significació del 5 %.

4.2.2. Identificació de les plantes 50-57 amb l'al·lel Co-6.

Per identificar les plantes amb l'al·lel Co-6, es va utilitzar el marcador ROZ04-560 (Figura 4.2.2.1) i (Figura 4.2.2.2).

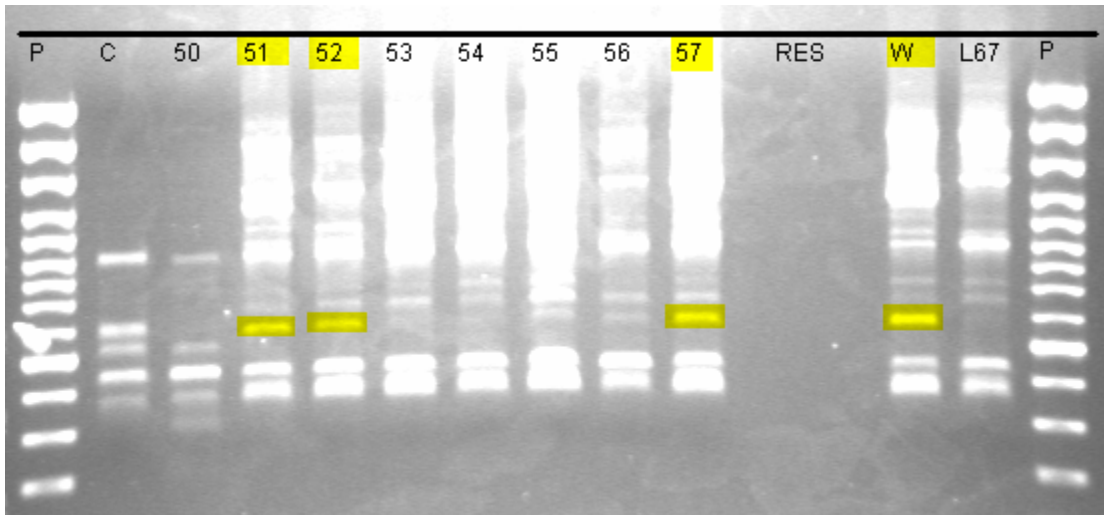


Figura 4.2.2.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 560 pb (ROZ04-560).

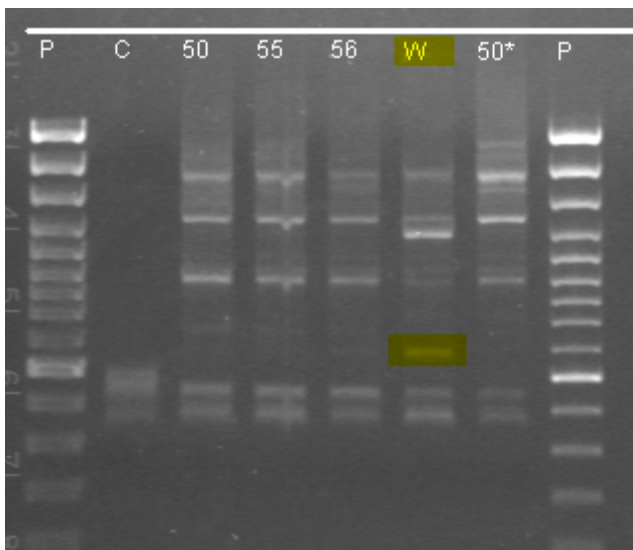


Figura 4.2.2.2. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 560 pb (ROZ04-560). Repetició de mostres dubtoses del gel de la figura 4.2.2.1..

Les mostres 50, 55 i 56 van ser repetides en un segon gel per a sortir dels dubtes que teníem en el primer. En aquest segon gel es va repetir també la mostra 50, ja que a l'hora de carregar el gel no vam estar segurs d'haver-ho fet correctament.

Així doncs, les mostres 51, 52 i 57 eren les que tenien l'al·lel Co-6.

Segons la segregació, en un retroencreuament en què es creuen una planta heterozigota de la generació anterior (BC 3), Co-6 co-6 amb el recurrent Ganxet co-6 co-6 s'esperaria un 50% de plantes amb l'al·lel dominant. El resultat va ser que de 8 plantes, 3 presentaven l'al·lel i 5 no. El valor de la χ^2 és

0.5, valor inferior al tabulat per a 1 grau de llibertat; que és 3.84 això significa que els resultats s'ajusten a les freqüències esperades segons una segregació mendeliana amb una significació del 5 %.

Per tant les plantes 51 i 52, presentaven simultàniament els dos al·lels dominants $Co-4^2$ i $Co-6$, mentre que les plantes 50, 53 i 55 no en presentaven cap dels dos. Les plantes 54 i 56, únicament tenien l'al·lel $Co-4^2$,i la 57 exclusivament el $Co-6$. En total 8 plantes amb caracterització inequívoca. Tots aquests resultats es mostren esquematitzats en la taula següent:

Taula 4.2.2.1. Resum de les plantes amb el gen que contenen.

Mostres	$Co-4^2$	$Co-6$
50		
51	✓	✓
52	✓	✓
53		
54	✓	
55		
56	✓	
57		✓

D'acord a una segregació mendeliana esperaríem obtenir un 25% de cada genotip, o el que és el mateix, 2 plantes de cada genotip.

El valor de la χ^2 és 1, valor inferior al tabulat per a 3 graus de llibertat; que és 7.81 això significa que els resultats s'ajusten a les freqüències esperades segons una segregació mendeliana amb una significació del 5%.

4.3. Tercera generació de retroencreuament de A493 x Montcau. (BC3)

4.3.1. Identificació de les plantes 60a-63b amb l'al·lel $Co-9$.

Per identificar les plantes amb l'al·lel *Co-9*, es van utilitzar 2 marcadors, el SB12-350 (*Figura 4.3.1.1.*) i el ROY17-110 (*Figura 4.3.1.2.*) Fins ara s'havia utilitzat el primer, però es volia provar el ROY17-110 ja que és actualment el marcador més proper trobat al locus *Co-9* (a només 1,4 cM segons Méndez de Vigo *et al.*, (2005), front als 2,8 cM de SB12-350, també segons aquests autors.

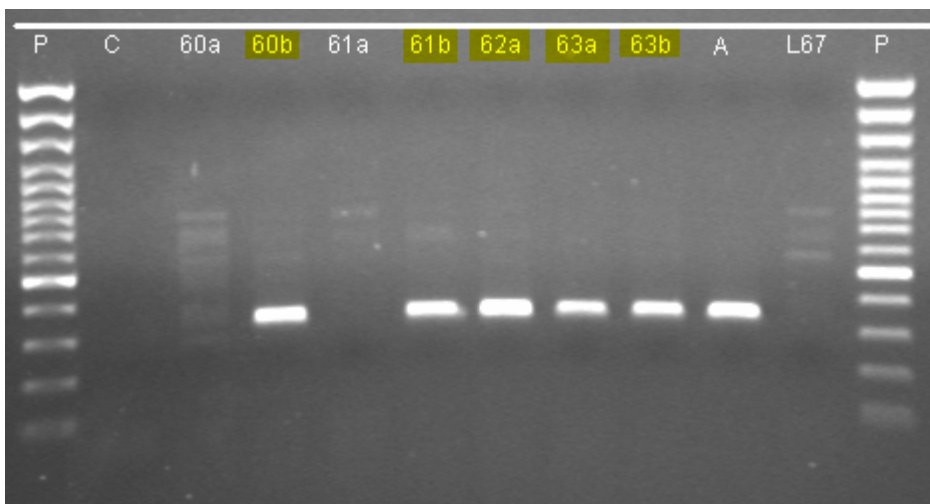
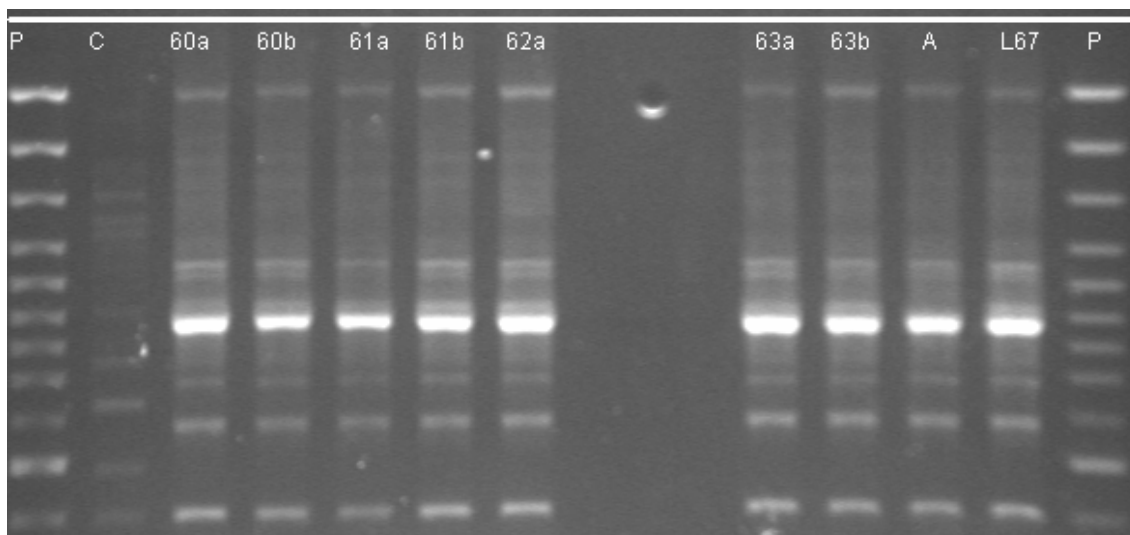


Figura 4.3.1.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 350 pb.(SB12-350).

La figura del gel (figura 4.3.1.1) mostra clarament que les mostres 60b, 61b, 62, 63a i 63b, eren les que tenien l'al·lel *Co-9*.

Aquesta informació no la vam poder contrastar amb el segon marcador, el ROY17-1100, ja que no ens va funcionar. Com es pot veure a la *Figura 4.3.1.2*, el patró de bandes del donador i del recurrent és el mateix, això és sinònim de que no hi ha polimorfisme entre donador i recurrent i per tant el marcador no és útil.

Segons el valor de la χ^2 , que és 1.28, valor inferior al tabulat per a 1 grau de llibertat; que és 3.84 això significa que els resultats s'ajusten a les freqüències esperades segons una segregació mendeliana amb una significació del 5%.



Fotografia 4.3.1.2.. Gel d'electroforèsis per a visualitzar la banda de 1100 pb (ROY17-1100).

4.4. Primera generació de retroencreuament Sanilac x Montcau.(BC 1)

4.4.1. Identificació de les plantes 70-77 amb l'al·lel *I*.

Per identificar les plantes amb l'al·lel *I* , es va utilitzar el marcador SW13-690 (Figura 4.4.1.1).

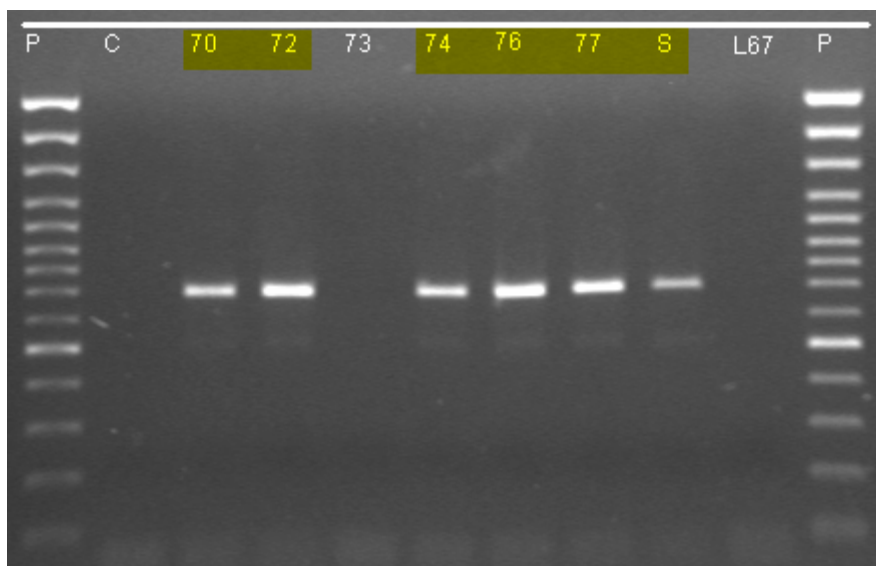


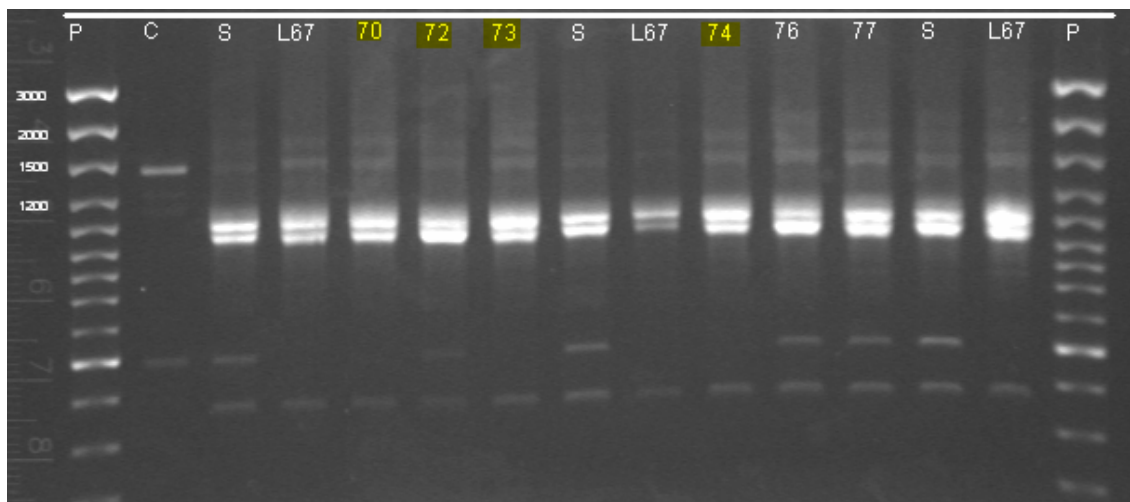
Figura 4.4.1.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 690 pb. (SW13-690).

Les mostres amb coloració indiquen les que contenen la banda de 690 parells de bases, de la mateixa manera que el donador Sanilac. Aquestes són: 70, 72, 74, 76 i 77.

Segons la segregació, en un retroencreuament en què es creuen una planta heterozigota de la generació anterior (F1),al·lel *I i* amb el recurrent Ganxet (genotip *i i*) s'esperaria un 50% de plantes amb l'al·lel dominant. El resultat va ser que de 6 plantes, 5 presentaven l'al·lel i 1 no. El valor de la χ^2 que és 2.66, valor inferior al tabulat per a 1 grau de llibertat; que és 3.84 això significa que els resultats s'ajusten a les freqüències esperades segons una segregació mendeliana amb una significació del 5%, tot i que aparentment pugui semblar massa desajustat, però és normal en mostres petites.

4.4.2. Identificació de les plantes 70-77 amb l'al·lel *Co-2*.

Per identificar les plantes amb l'al·lel *Co-2*, es va utilitzar el marcador ROQ04-1440.(Figura4.4.2.1). Aquest presenta el problema que la banda és gran i cal força temps per l'electroforèsi i que en el material L67 o Montcau apareix una banda molt propera d'unes 1550 pb que tot i ser una mica més lenta no és fàcil de discriminar, i menys si el gel no corre totalment horitzontal.



Fotografia 4.4.2.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 1440 pb (ROQ04-1440).

Vam fer una primera PCR i un gel, que ens donaren una lectura provisional i un xic dubtosa de les mostres que contenien la banda.(Figura 4.4.2.1.) Aquestes eren: la 70, 72, 73 i 74; dubtant sobretot de la 73. Es va repetir amb el material que sobrava d'aquesta PCR, però aquesta vegada afegint 10 μ l de bromur d'etidi enlloc de 8 μ l, com fèiem en la resta de gels.

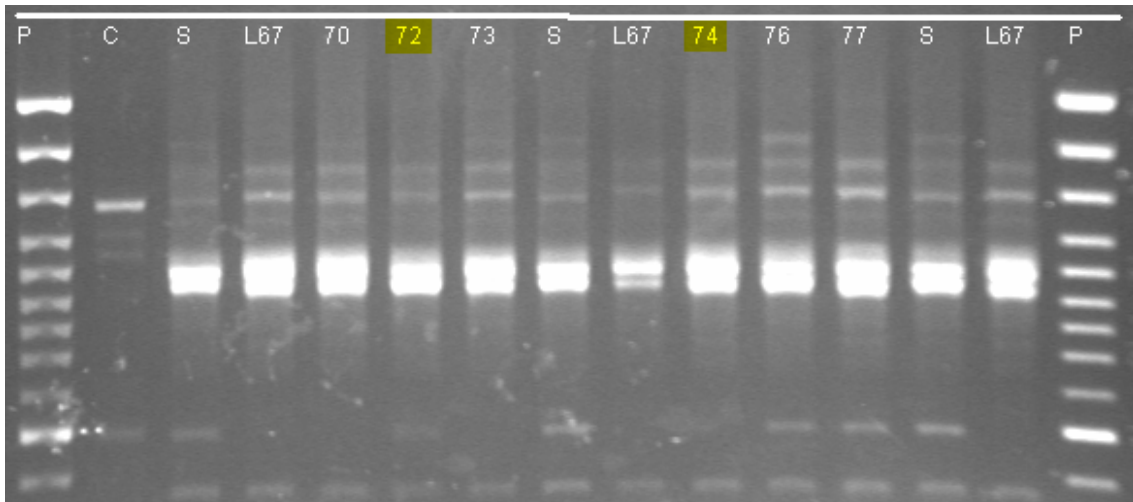


Figura 4.4.2.2. Gel d'electroforèsi repetit. (ROQ04-1440)

Aquest cop la fotografia (*Figura 4.4.2.2.*) sortia més clara però no ens treia de cap dubte. Per això vam tornar a fer una nova PCR i vam fer córrer un altre gel, aquest cop al 2% d'agarosa (utilitzat per a detectar bandes complicades), fet que ens va permetre descartar la planta 73 com a portadora de l'al·lel Co-2 (*Figura 4.4.2.3*). Ja per últim vam retallar el gel, per aprofitar-ne l'ADN i fer-ne córrer un de nou, però aquesta vegada la fotografia no es veia gens clara. (*Figura 4.4.2.4*). Per tant, semblaria que les mostres que contenen la banda eren 70, 72 i 74.

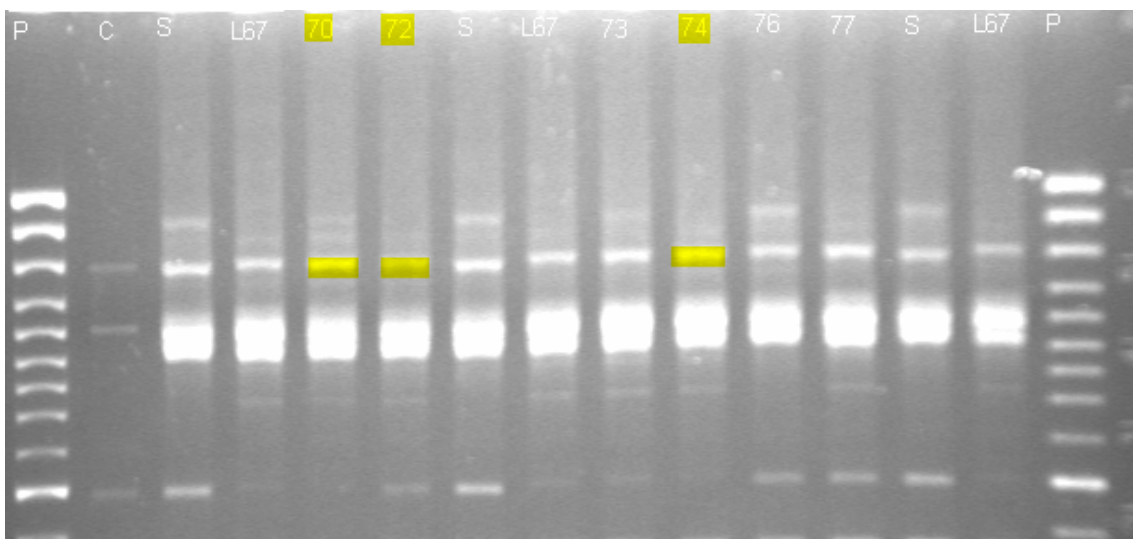


Figura 4.4.2.3. Gel d'electroforesi (2% d'agarosa) per a visualitzar la banda de 1440 pb (ROQ04-1440)

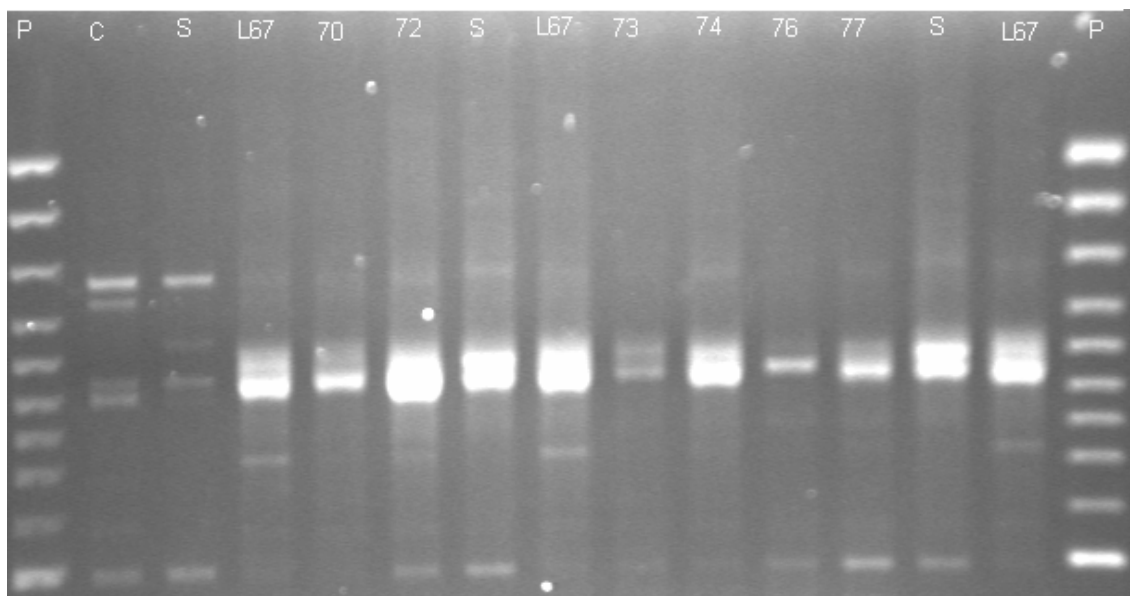


Figura 4.4.2.4. Gel retallat per a visualitzar la banda de 1440 pb (ROQ04-1440)

Segons la segregació, en un retroencreuament en què es creuen una planta heterozigota de la generació anterior (F1), *Co-2 co-2* amb el recurrent Ganxet *co-2 co-2* s'esperaria un 50% de plantes amb l'al·lel dominant. El resultat va ser que de 6 plantes, 3 presentaven l'al·lel i 3 no. El valor de la χ^2 que és 0, valor inferior al tabulat per a 1 grau de llibertat; que és 3.84 això significa que els resultats s'ajusten a les freqüències esperades segons una segregació mendeliana amb una significació del 5%.

Aquest marcador, doncs no serveix massa ja que crea molts dubtes i el fa poc pràctic; caldria buscar-ne un altre que ens facilités més la tasca.

4.4.3. Possible donador de l'al·lel *fin*.

Es van provar els tres marcadors RAPD's que va obtenir de la literatura, acoplats a l'al·lel *fin*. Només aquests marcadors permetien aplicar selecció assistida i discriminar, a cada generació de retroencreuament, entre homozigots (*Fin Fin*) i heterozigots (*Fin fin*).

4.4.3.1. Amb el marcador RAPD A04-1100.

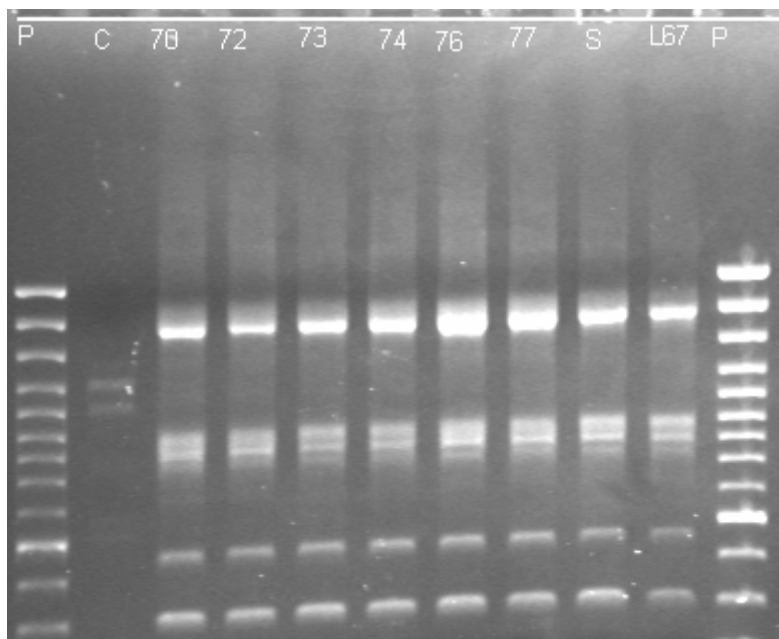


Figura 4.4.3.1.1. Gel d'electrofoerèsi per a la visualització de la banda de 1100 pb (A04-1100)

El que esperàvem era que no aparegués la banda a Montcau (es tracta d'un marcador molecular de l'al·lel *fin*), ja que és de creixement indeterminat (*Fin Fin*), però sí que hauria d'aparèixer a Sanilac que és de creixement determinat (*fin fin*).

Com es veu a la *Figura 4.4.3.1.1* del gel, apareixen totes les mostres iguals, per tant descartem aquest marcador ja que no ens serveix.

4.4.3.2. Amb el marcador RAPD D08-1150.

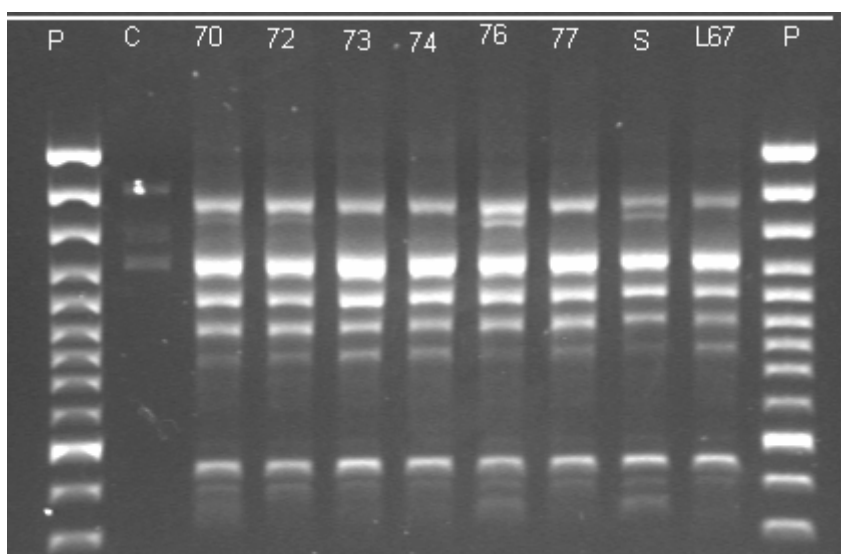


Figura 4.4.3.2.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 1150 pb (D08-1150)

En aquest cas tampoc serveix el marcador perquè no existeix polimorfisme entre donador i recurrent. Almenys Montcau i Sanilac haurien de mostrar diferència en les seves bandes, ja que, com s'ha dit anteriorment, tenen diferent creixement.

4.4.3.3. Amb el marcador RAPD OI19-375.

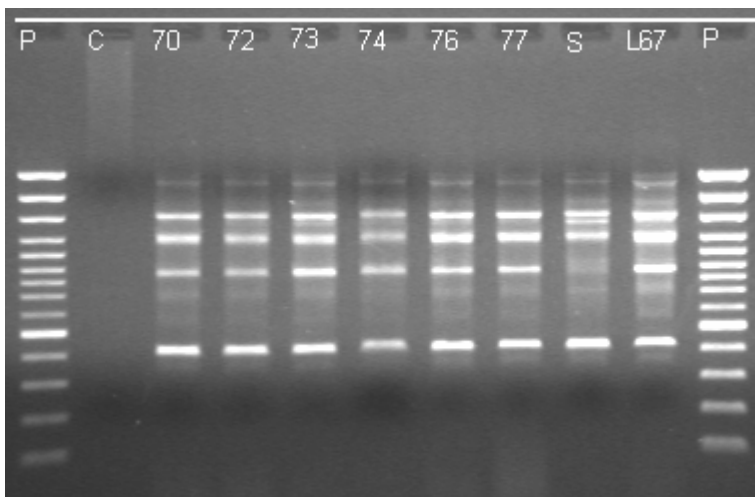


Figura 4.4.3.3.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 375 pb (OI19-375).

Aquest últim marcador tampoc va funcionar; un cop més el polimorfisme era la causa de que visualitzéssim totes les mostres exactament igual.

4.5. Possibles donadors Amanda i IVT7214.

Partiem de dues línies pures, Amanda i IVT214, com a possibles donadors de gens de resistència recessius al BCMV.

4.5.1. Possibles donadors de l'al·lel *I*.

Les mostres 83-86, corresponents a Amanda i 90-93, a IVT214, van ser objectes d'estudi com a possibles nous donadors de l'al·lel *I*, amb el marcador SW13-690. (Figura 4.5.1.1).

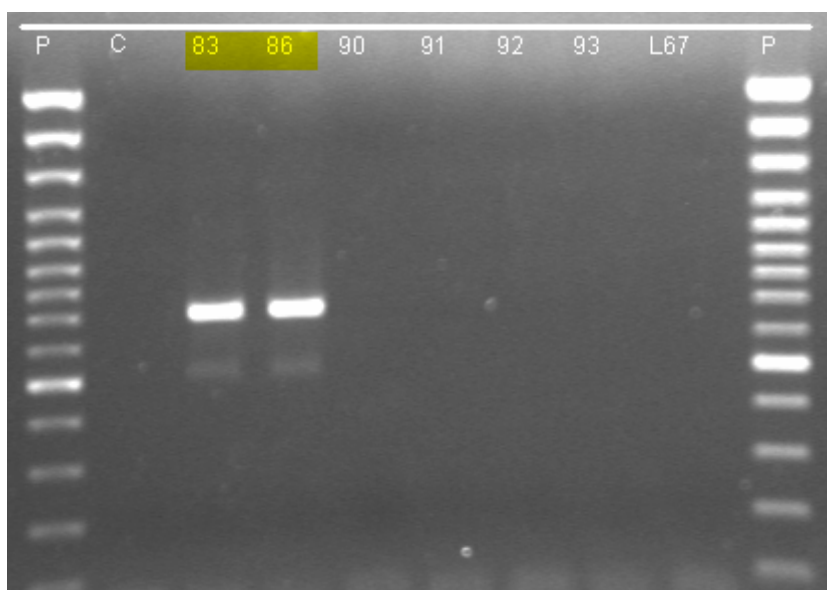


Figura 4.5.1.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 690 pb (SW13-690).

Només Amanda presentava la banda, el que possiblement indica que la línia pura Amanda (mostres 83 i 86), podria ser donadora de l'al·lel *I*, tal com mostra la *Figura 4.5.1.1*.

Calia veure si Amanda tenia aquest gen, ja que la combinació d'aquest amb el *bc-1²*, a part d'oferir resistència al BCMV, no dona sensibilitat al virus necròtic (BCNMV), i d'aquesta manera a través d'un retroencreuament es podria introduir els dos gens a la vegada.

4.5.2. Possibles donadors de l'al·lel *bc-1²*.

Vam treballar amb les mateixes línies que en el cas anterior, Amanda i IVT7214, i amb dos marcadors moleculars.

El primer marcador que vam provar va ser el ROBD05-1300, però en el gel no es visualitzava res en cap de les mostres (ni tampoc en el patró). (*Figura 4.5.2.1*).

Tenint la certesa que la PCR no va funcionar correctament ens debatiem entre dues possibilitats: que el material autoclavat hagués estat contaminat amb lleixiu per un problema que havia patit el material del laboratori unes setmanes abans, o que l'iniciador no hagués funcionat per haver estat mal sintetitzat. Per sortir de dubtes vam repetir la prova, però canviant ara l'aliquota de l'iniciador,

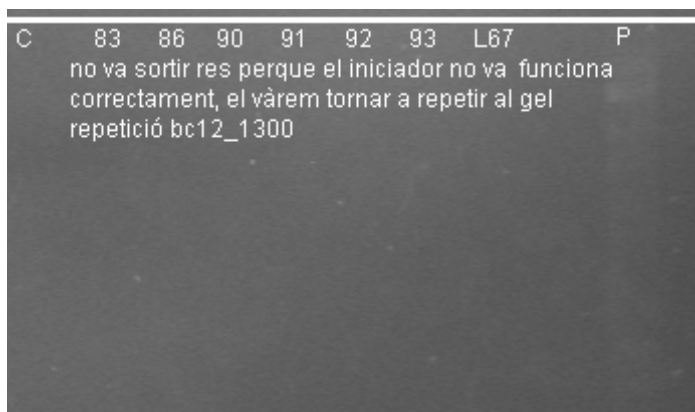


Figura 4.5.2.1. Gel d'electroforèsi per a la visualització de la banda de 1300 pb (ROBD05-1300).

prenent-lo directament de l'stock del laboratori, per poder descartar la possibilitat de contaminació amb lleixiu, però la resposta va ser un cop més negativa. (Figura 4.5.2.2.)

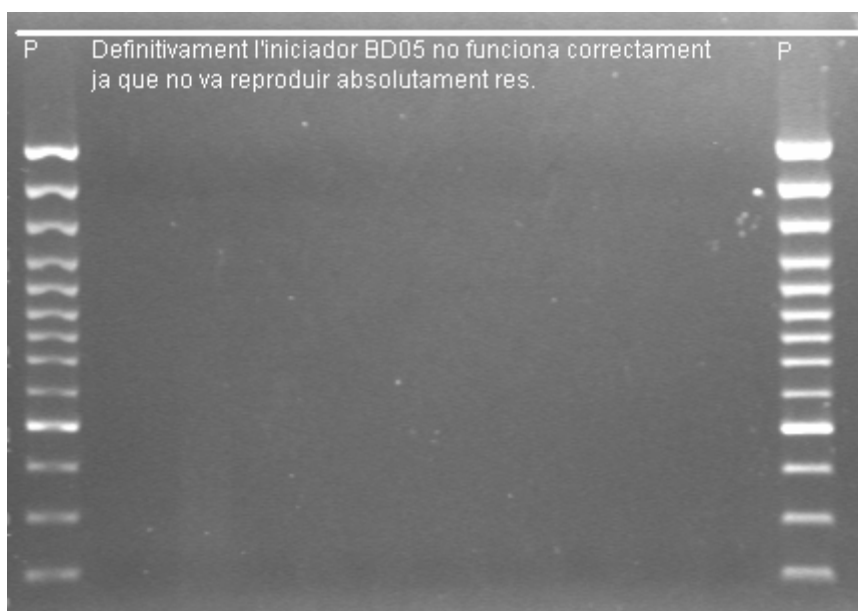


Figura 4.5.2.2. Gel d'electroforèsi per a la visualització de la banda de 1300 pb (ROBD05-1300).

La nostra conclusió davant d'aquests resultats era que l'iniciador no funcionava perquè no amplificava res durant la PCR. A més disposàvem del patró teòric esperable publicat per Micklas *et al.*,(2000).

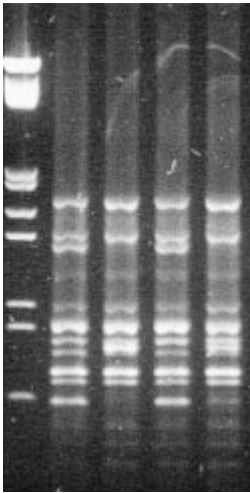
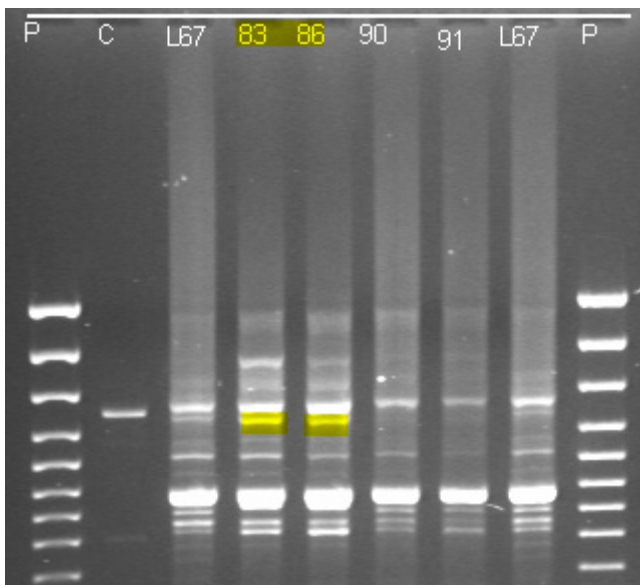


Figura 4.5.2.3. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 1300 pb (ROBD05-13300), Micklas et al. (2000).

Finalment vam tornar-ho a repetir, aquest cop amb el mateix marcador acabat d'estrenar, i el resultat va ser satisfactori. Presentaven la banda de 1300 parells de bases les mostres 83 i 86, corresponents a Amanda.



Fotografia 4.5.2.4. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 1300 pb (ROBD05-1300)

També vam provar el marcador SBD05-1300, amb les mateixes mostres (Figura 4.5.2.5.).

La nostra sorpresa va ser que el recurrent Ganxet també presentava la banda de 1300, de la mateixa manera que el donador. Aquest fet demostra que els marcadors SCAR, al ser més llargs els iniciadors poden donar lloc a la mateixa banda al recurrent i al donador a la vegada, però a l'obtenir un bon resultat amb

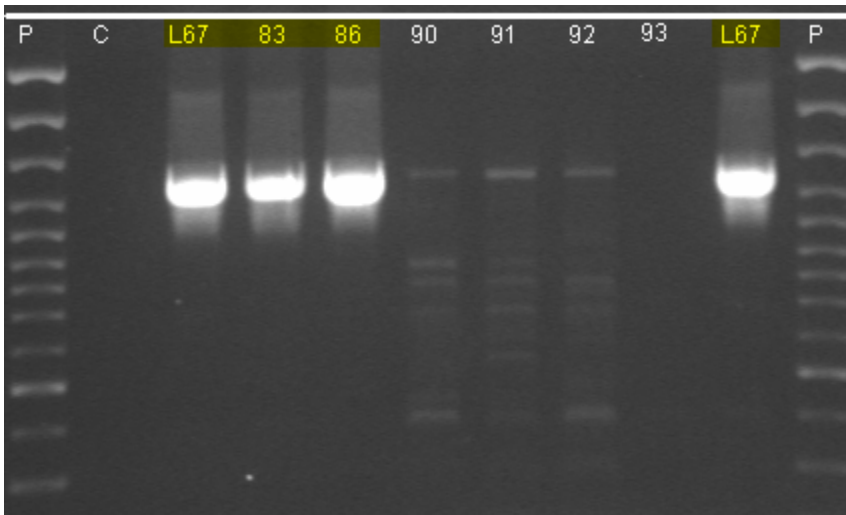
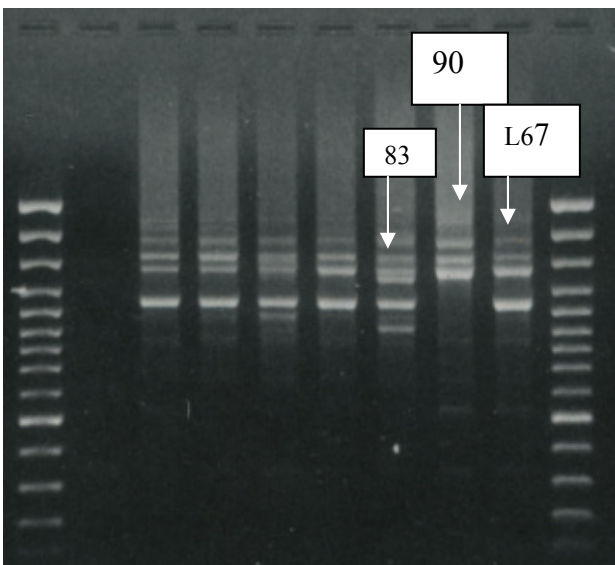


Figura 4.5.2.5. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 1300 pb (SBD05-1300).

el marcador ROBD05-1300, és suficient per iniciar el procés de retroencreuament amb Amanda com a donador simultani de *I* i *bc-1*² i fer el seguiment amb els marcadors moleculars SW13-690 i ROBD05-1300, respectivament.

4.5.3. Possibles donadors de l'al·lel *bc-u* i *bc-1*

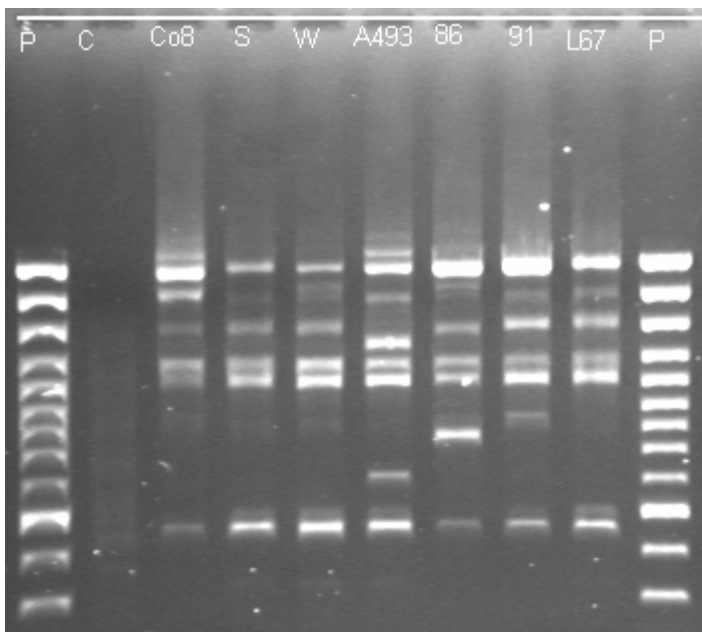
Segons Strausbaugh *et al.* (1999) el marcador de tipus RAPD, Roh14-1100 està en acoplament amb l'al·lel dominant, *Bc-1*, per el que en principi, no hauria d'aparèixer la banda en IVT7214 i si a Montcau o Amanda. En la *Figura 4.5.3.1.*, vam poder confirmar aquest fet. Totes les mostres presenten la banda de 1100 parells de bases excepte la 90 (IVT7214), per tant el marcador serveix.



Fotografia 4.5.3.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 1100 pb (H14-1100).

4.5.4. Possibles donadors de l'al·lel *bc-u*

Segons Strausbaugh *et al.* (1999) el marcador de tipus RAPD ROC16-1000 està a 10,9 cM en acoplament amb l'al·lel dominant, *Bc-u*, per el que en principi, no hauria d'aparèixer la banda ni en IVT7214 ni a Amanda i si l'hauria de tenir Montcau, però la resposta en el laboratori va ser que la banda no apareixia en cap de les mostres. Un dels possibles motius d'aquest fet és que el marcador és trobi a una distància notable del gen que li impedeixi detectar-lo correctament. Per tant el marcador no ens serveix (*Figura 4.5.4.1*).



Fotografia 4.5.4.1. Gel d'electroforèsi per a visualitzar la banda de 1000 pb (C16-1000).

5. CONCLUSIONS.

- Dues plantes (51 i 52) de la quarta generació de retroencreuament (BC4) de Widusa x Montcau, porten simultàniament, els al·lells dominants *Co-4²* y *Co-6*, de resistència a antracnosi.
- Les plantes 60b, 61b, 62, 63a i 63b, tercera generació de retroencreuament (BC3) de A493 x Montcau, porten l'al·lel dominant *Co-9* de resistència a antracnosi.
- Les plantes 70, 72 i 74, primera generació de retroencreuament (BC1) de Sanilac x Montcau, porten simultàniament, els al·lells dominants *I* y *Co-2*, de resistència a BCMV i antracnosi, respectivament.
- El marcador molecular RAPD, ROBD05-1300 bp. resulta útil per la selecció assistida del gen recessiu *bc-1²* present al donador Amanda, obrint la possibilitat de piramidar posteriorment i obtenir la segona millor combinació (*I + bc-1²*) contra els virus del mosaic (BCMV) i necròtic (BCMNV) en mongeta, que no requereix la presència de *bc-u*.
- El marcador molecular RAPD, ROH14-1100 bp. resulta útil per a la selecció assistida del gen *bc-1* present al donador IVT7214, tercera combinació més recomanada i que tampoc requereix la presència de *bc-u*.
- El marcador molecular RAPD, ROC16-1000 bp. pel gen *bc-u* no es útil per a la selecció assistida amb el recurrent Montcau.
- Els marcadors moleculars RAPD, ROA04-1100 bp., ROD08-1150 bp., i ROI19-375 bp. pel gen *fin*, no resulten útils per a la selecció assistida amb el recurrent Montcau.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALZATE-MARIN, A.L.; M.G. DE MORAIS; E.J. DE OLIVEIRA; M.A. MOREIRA; E.G. BARROS (2003) *Identification of the second anthracnose resistant gene present in the common bean cultivar PI 207262*. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 46:177-178.
- AYLESWORTH, J.W.; J.C. TU; R.I. BUZZELL (1983) *Sanilac BC6-Are white bean breeding lines*. HortScience 18:115.
- BALDI, M. (1997) *La Mongeta Ganxet*. Catalunya Rural i Agrària 31:35-38.
- BOSCH, L.; CASAÑAS, F.; SÁNCHEZ, E.; PUJOLÀ, M.; NUEZ, F. (1998a) *Selecion L67, a Pure Line with True Seed Type of the Ganxet Common Bean (Phaseolus vulgaris L.)* HortScience 33:905-906.
- BOSCH, L.; CASAÑAS, F.; SÁNCHEZ, E.; PUJOLÀ, M.; ROMERO DEL CASTILLO, R.; VALERO, J.; NUEZ, F. (1998b) *la mongeta Ganxet: millota genètica d'una varietat tradicional*. Arxiu de l'ESAB sèrie cinquena 2:7-14.
- CAMPA, A; J. GUAL; F. CASAÑAS; J.J. FERREIRA (2003) *Búsqueda de fuentes de resistencia frente a las variantes patogénicas de antracnosis aisladas en Cataluña para la mejora genética de la judía tipo Ganxet*. III Seminario de Judía de la Península Ibérica, Lorenzá (Lugo), octubre de 2003. Actas de la AEL 2: 131-134
- CANO, M. I SERRANO, S. (2003) *Recerca de marcadors de fons genètic i de gens de resistència a Colletotrichum lindemuthianum d'encreuaments entre donadors de resistència a l'antracnosi i recurrent Ganxet (Phaseolus vulgaris L.) i avaluació de la generació F₁*, Treball de Fi de Carrera, ESAB, Barcelona.

CARDENAS, F.; M.W. ADAMS; A. ANDERSEN (1964) *The genetic system for reaction of field bean (Phaseolus vulgaris L.) to infection by three physiologic races of Colletotrichum lindemuthianum*. Euphytica 13:178-186.

CASAÑAS, F.; BOSCH L.; SÁNCHEZ E.; ROMERO R.; VALERO J.; BALDI M.; MESTRES J.; NUEZ F. (1998) *Características de la alubia Ganxet (Phaseolus vulgaris L.) y acciones para su conservación*. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 13:43-55.

CASAÑAS, F.; BOSCH, L.; PUJOLÀ, M.; SÁNCHEZ, E.; SORRIBAS, X.; BALDI, M.; NUEZ, F. (1999) *Charcteristics of common bean ladrace (Phaseolus vulgaris L.) of greta culiary value and selection of a commercial inbred line*. Journal of Food and Agriculture 79:693-698.

COINÉ, D.P.&M.L. SCHUSTER (1974). *Inheritance and linkage relations of reaction to Xanthomonas phaseoli (E.F.Smith) Dowson (common blight), stage of plant development and plant habit in Phaseolus vulgaris, L.*, Euphytica 23:195-204.

DOYLE, J. J. I DOYLE, J.L. (1990) *Isolation of plant DNA from fresch tissue*. Focus 12:1325.

DRIJFHOUT, E. (1978) *Genetic interaction between Phaseolus vulgaris L and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands, 98p.

DRIJFHOUT, E.; SILBERNAGEL, M.J.; BURKE, D.W. (1978) *Differentiation of strains of bean common mosaic virus*. Nederlands Jorunal of Plant Pahology 83:1-25.

FERREIRA, J.J.; C. RODRÍGUEZ; R. GIRÁLDEZ (2000) *Identificación, mediante tests de alelismo, de los genes de resistencia a antracnosis presentes en líneas mejoradas de faba granja asturiana*. II Seminario de Judía de la Península Ibérica: 123-128

FERREIRA, J.J.; C. RODRÍGUEZ; A. PAÑEDA; R. GIRÁLDEZ (2003) *Allelism test for resistance to race 38 of anthracnose in common bean differential cultivar 'Widusa'*. Annu. Rept. Bean Improv. Coop. 46:169-170.

GALVÁN, M.Z.; M.B. AULICINO; S. GARCÍA MEDINA I P.A. BALATTI (2001) *Genetic diversity among Northwestern Argentinian cultivars of common bean (Phaseolus vulgaris L.) as revealed by RAPD markers*. Genet. Resour. Crop Evol. 48:251-260.

GARCIA-MAS, J.; E GRACIANO,.; M.J ARANZANA,.; A MONFORTE,.; O OLIVER,.; J BALLESTER,.; M.A VIRUEL,.; P ARUS,.;(2000). *Marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos*. Nuez, F.; J.M.Carrillo. *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. UPV, Valencia.

GEFFROY, V.; SICARD D.; DE OLIVEIRA J.C.F.; SÉVIGNAC M.; COHEN S.; GEPTS P.; NEEMA C.; LANGIN T.; DRON M. (1999) *Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the co evolutionary process between Phaseolus vulgaris and its fungal pathogen Colletotrichum lindemuthianum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:774-784.

GONÇALVES, M.C.; N.S. SAKIYAMA; P.S. VIDIGAL; A.T. AMARAL; J. PARISOTTO; V.R. OLIVEIRA (2001) *Resistance of common bean cultivar AB136 to races 31 and 69 of Colletotrichum lindemuthianum: the Co-6 locus*. Crop Breed. Appl. Biotech. 1(2):99-104.

IPGRI [International Plant Genetic Resources Institute] (2001) *Descritores para Phaseolus vulgaris*. IPGRI, Roma, Italia.

JOHNSON, W.C.; GUZMAN, P.; MANDALA, D. MKANDAWIRE, A.B.C.; TEMPLE, S.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. (1997) *Molecular tagging of the bc-3 gene for introgression into Adean common bean*. Crop Sci. 37:248-254.

KELLY, J.D.; MIKLAS P.N. (1998) *The Role of RAPD Markers in Breeding for Disease Resistance in common Bean*. Mol. Breeding 4:1-11.

KELLY, J.D; GEPTS P.; MIKLAS P.N.; COYNE D.P. (2003) *Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and coupe*. Field Crops Research 82: 135-154.

KLEIN, R.E; S.D. WYATT (1989) *Influence of propagation on incidence of seed borne bean common mosaic virus in the USDA Phaseolus germoplasm collection*. Plant Dis. 73:759-761.

LAMPRECHT, H. (1935). Zur Genetic von *Phaseolus vulgaris*. X. Uber Infloreszenztypen und ihre Verebung. Hereditas 20:71-93.

MELOTTO, M.; AFANADOR, L.; KELLY, J.D. (1996) *Development of a SCAR marker linked to the I gene in common bean*. Genome 9:1216-1219.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. (1998) *SCAR Markers Linked to Major Disease Resistance Genes in Common Bean*. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 41:64-65.

MELOTTO, M.; L. AFANADOR; J.D. KELLY (1999) *An allelic series at the Co-1 locus for anthracnose resistance in common bean*. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 42:9-10.

MENDEZ DE VIGO, B.; A. PAÑEDA; C. RODRÍGUEZ; P. GARRE; J.J. FERREIRA, R. GIRÁLDEZ (2000) *Desarrollo de un mapa genético e identificación de nuevos marcadores ligados a genes de resistencia a*

antracnosis en Phaseolus vulgaris. A De Ron, A.M; M. Santalla (eds.) I Seminario de Mejora Genética Vegetal. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidade de Santiago de Compostela, Pontevedra.

MÉNDEZ DE VIGO, B.; RODRÍGUEZ C.; PAÑEDA A.; GIRÁLDEZ R.; FERREIRA J. J. (2002) *Development of a SCAR marker linked to Co-9 in common bean*. Annu. Rep. Bean improv. Coop. 45:116-117.

MENDEZ-VIGO, B.; C. RODRÍGUEZ-SUÁREZ; A. PAÑEDA; J.J. FERREIRA; R. GIRÁLDEZ (2005) *Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean*. Euphytica 141:237-245.

MIKLAS, P.N.; J.R. STAVELY; J.D. KELLY (1993) *Identification and potencial use of a molecular marker for rust resistance in common bean*. Theor. Appl. Genet. 85: 745-749.

MIKLAS, P.N., LARSEN, R.C; RILEY, R; KELLY, J.D. (2000) *Potential Marker-assisted selection for bc-1² resistance to bean common mosaic potyvirus in common bean*. Euphytica 116:211-219.

MOORE, D. (1995) *Estadística aplicada básica*. Antoni Bosch, Ed.S.A. Barcelona.

PASTOR-CORRALES, M.A. (1991) *Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de Colletotrichum lindemuthianum*. Phytopathology 81:985-993.

PARAN, I.; KESSELI R. V.; MICHELMORE R. W. (1991) *Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines*. Genome 34:1021-1027.

PARAN, I; R.W. MICHELMORE (1993) *Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce*. Theor. Appl. Genet. 85:985-993.

PAÑEDA, A. (2001) *Búsqueda de marcadores moleculares ligados al gen Fin en Phaeolus vulgaris*. Seminario de investigación. Universidad de Oviedo.

PAÑEDA, A.; RODRÍGUEZ C.; FERREIRA J. J.; MUKESHIMANA G.; KELLY J. D.; GIRÁLDEZ R. (2004) *Obtención de nuevos marcadores moleculares del gen Bc-3, bc-3, de resistencia al virus del mosaico común en judía*. Actas de Horticultura 41:329-332.

Productos alimenticios MAR-TRET^R (consulta: 13/07/2003) Alubias del ganxet [en línea]. MAR-TRET S L, Masia Can Cortadellas, Esparraguera. <http://www.mar-tret.com/alubias.html>.

RODRIGUEZ, C.; A. PAÑEDA; B. MÉNDEZ DE VIGO; R. GIRALDEZ, J.J. FERREIRA (2002) *Marcadores moleculares y alelismo de los genes de resistencia a antracnosis Co-9 y Co-3 en judía común*. Actas de Horticultura 34:681-686.

SANCHEZ-MONGE, E. (1974) *Fitogenética*. Colección Monografías INIA nº 12. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias-Ministerio de Agricultura, Madrid.

SÁNCHEZ, E.; BOSCH, LL.; CASAÑAS, F.; PUJOLÀ, M.; BALDI, M.; NUEZ, F. (2000) *Alubia Ganxet: una variedad local de reputado valor agronómico*. En: *II Seminario de judía de la Península Ibérica*. Villaviciosa, Asturias. Actas de la Asociación Española de Leguminosas, Nº 1. 91-97.

SÁNCHEZ, E. (2003) *Variabilitat de la mongeta Ganxet (Phaseolus vulgaris L.): determinació de tipologies i selecció de línies comercials*. Tesis

Doctoral. Departament de genética. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

SÁNCHEZ, A. (2005) *Evaluación de generaciones de retrocruzamiento para la introducción de genes de resistencia en el recurrente Ganxet Montcau mediante marcadores RAPDs y SCARs*. Treball final de Carrera, ESAB, Barcelona.

SÁNCHEZ, E. (2003) *Variabilitat de la mongeta Ganxet (Phaseolus vulgaris L.): determinació de tipologies i selecció de línies comercials*. Tesis Doctoral, Departamento de Genética, Universidad de Barcelona, Barcelona.

SANTALLA, M.; RON A.M.; VOYSEST O. (2001) *European bean market classes*. A Amurrio, M; M. Santalla ; A.M. de Ron (Eds.) Catalogue of Bean Genetic Resources. Fundación Pedro Barrié de la Maza/ PHASELIEU-FAIR-PL97-3463-MBG-CSIC, pg 79-94.

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. 38:488-496.

SOON O. PARK; DERMOT, P.C.; JAMES, M.B. & JAMES, R.S. (1999) *Molecular markers linked to genes for specific rust resistance and indeterminate growth habit common bean*. Euphytica, 105: 133-141.

TAKKEN, FLW; JOOSTEN HAJ (2000) *Plant resistance genes: their structure, function and evolution*. European J. Plant Pathology. 106: 699-713.

UPC. Universitat Politècnica de Catalunya. (Consulta: 09/06/2006). Base de dades Bibliotècnica, CAB Abstracts. www.bibliotecnica.upc.es

VALADEZ, E.; KAHL, G. (2000) *Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio)*. Ediciones Mundi-Prensa- Aedos, Barcelona.

VOYSEST, O. (2000) *Mejoramiento Genético del frijol (Phaseolus vulgaris L.): Legado de Variedades de América Latina 1930-1999*. CIAT, Cali, Colombia.

WILLIAM, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. (1993) *Genetic Analisis using random amplified polynorphic DNA Markers*. Methods Enzymol. 218:704740)

YOUNG, R. A.; KELLY J. D. (1996) *RAPD markers flanking the Are gene for anthracnose resistance in common bean*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121 (1):37-41.

YOUNG, R. A.; MELOTTO, M.; NODARI, R. O.; KELLY, J. D. (1998) *Marker assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in common bean cultivar, G 2333*. Theor. Appl. Genet. 96:87-94.