# ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE FRÍJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) EN 202 GENOTIPOS POR MEDIO DE SSR FLUORESCENTES

**JORGE MARIO LONDOÑO CAICEDO**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**ARMENIA QUINDÍO**

**2011**

# ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE FRÍJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) EN 202 GENOTIPOS POR MEDIO DE SSR FLUORESCENTES

**JORGE MARIO LONDOÑO CAIDEDO**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

**MATTHEW W. BLAIR** Ph.D.

DIRECTOR

**NHORA CECILIA RODRIGUEZ CASTILLO** Ms.C

CODIRECTORA

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**ARMENIA QUINDÍO**

**2011**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado **"ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE FRÍJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) EN 202 GENOTIPOS POR MEDIO DE SSR FLUORESCENTES"**, presentado por el estudiante **JORGE MARIO LONDOÑO CAIDEDO**, para optar al título de Biólogo, fue revisado y calificado como:

Aprobado

_____

Matthew W. Blair Ph.D.
Especialista en Germoplasma
LCGF – CIAT

_____

Nohra Cecilia Rodríguez Castillo Ms.C
Codirectora
Universidad Del Quindío

_____

Firma de jurado

_____

Firma de jurado

**Armenia, Julio de 2011**

**AGRADECIMIENTOS**

De manera muy especial le agradezco de corazón a mis padres por todo el esfuerzo y la dedicación que han tenido para conmigo y poderme brindar la oportunidad de formarme como profesional y como persona.

Dr. Matthew W. Blair, por brindarme la gran oportunidad de realizar el trabajo de grado en el Centro de Investigación junto a su grupo de trabajo.

Álvaro Soler Garzón, un gran amigo y gran persona que fue fundamental para la realización de este estudio, le agradezco mucho por su paciencia y apoyo en todo momento.

Natalia Franco Herrera, una excelente compañía en la que siempre encontré confianza, fuerza y sabiduría.

Lara Ramaekers por el gran apoyo hacia nuevos horizontes y grandes aportes a nivel personal

Nohra Cecilia Rodríguez por su buen espíritu colaborativo y gran aporte de conocimiento en el tema desarrollado

Héctor Fabio Buendía, por su vasta experiencia y conocimiento, quien siempre me aconsejó de la mejor manera tanto para los procesos del laboratorio como a nivel personal.

Víctor Manuel Mayor, un ejemplo de conocimiento y paciencia, gracias por su valiosa ayuda en los momentos que lo necesité.

Lucy Milena Díaz por su paciencia e indicaciones necesarias para el proceso de desarrollo del proyecto

Federico Velásquez por sus buenos apuntes en cada momento, hacía del ambiente laboral un buen lugar.

A los amigos de CIAT Ana María Leiva y Cesar Iván Murcia por su gran y valiosa compañía y los buenos deseos que me han brindado.

A la fundación GATES, Melinda Y Bill Gates por su apoyo al programa TL 1 que hizo posible el desarrollo del proyecto.

**TABLA DE CONTENIDO**

1. INTRODUCCIÓN ..... 11
2. MARCO TEÓRICO ..... 14
2.1. Origen ..... 14
2.2. Generalidades ..... 16
2.2.1. Clasificación del fríjol según Gepts (2001). ..... 16
2.3. Importancia económica y nutricional ..... 18
2.4. Citogenética ..... 20
2.5. Marcadores genéticos ..... 20
2.5.1. Microsatélites ..... 22
2.5.2. Microsatélites fluorescentes ..... 23
2.5.3. Primer universal M13 ..... 24
2.6. Estudios de diversidad genética en fríjol común ..... 26
2.7. Estudios genéticos realizados por medio de primer universal M13 ..... 30
3. OBJETIVOS ..... 33
3.1. Objetivo general ..... 33
3.2. Objetivos específicos ..... 33
4. MATERIALES Y MÉTODOS ..... 34
4.1. Obtención del material vegetal y extracción de ADN ..... 34
4.2. Amplificación de microsatélites Fluorescentes ..... 35
4.3. Análisis de datos ..... 39
4.3.1 Análisis de la estructura de población ..... 40
4.3.2 Análisis de diversidad genética ..... 40
5. RESULTADOS ..... 42
5.1. Número de alelos y diversidad genética ..... 42
5.2. Estructura de la población en fríjol común con 88 microsatélites ..... 45
5.3. Análisis de estructura poblacional para el grupo de 40 SSR ..... 48
5.4. Análisis de estructura poblacional para el grupo de 36 SSR ..... 49
5.5. Análisis de coordenadas principales para 88 SSR ..... 51

5.6. Análisis de coordenadas principal para el grupo de 40 SSR ..... 51
5.7. Análisis de coordenadas principales para el grupo de 36 SSR ..... 52
5.8. Análisis de diversidad *Neighbor-Joining* ..... 54
5.9. Análisis molecular de varianza en el grupo de 88 SSR ..... 55
6. DISCUSIÓN ..... 57
6.1. Metodología M13 ..... 58
6.2. Estructura poblacional de la colección referencia de fríjol común ..... 59
6.3. Diversidad genética en frijol común ..... 62
6.4. Análisis de los grupos de marcadores evaluados ..... 64
7. CONCLUSIONES ..... 66
8. RECOMENDACIONES ..... 67
9. BIBLIOGRAFÍA ..... 68
ANEXOS ..... 82

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Hábitos de crecimiento de fríjol según los estudios realizados por el programa de fríjol del CIAT. ..... 18

Fig. 2: Diagrama del funcionamiento del *ABI 3730*..... 26

Fig. 3: Diagrama del procedimiento de amplificación y marcaje del cebador universal M13..... 27

Fig. 4: Software GeneMapper usado para la visualización de los picos obtenidos a partir de los marcadores microsatélite fluorescentes ..... 28

Fig. 5: Genotipos Controles ..... 34

Fig. 6: Marcadores empleados en el estudio donde se observa su distribución a través de los 11 Grupos de ligamiento ..... 36

Fig. 7: Fotografías en transiluminador (UV) de los marcadores ..... 38

Fig. 8: Picos obtenidos a partir de las lecturas con GeneMapper ..... 39

Fig. 9: Análisis de la estructura poblacional con K = 2 a K = 6 ..... 47

Fig. 10: Comportamiento del logaritmo de probabilidad en función del número *K* de poblaciones para el grupo de 40 SSR. ..... 48

Fig. 11: Análisis de la estructura poblacional en 202 genotipos cultivables de la colección referencia de fríjol común, evaluados con 40 SSR (K = 7) ..... 49

Fig. 12: Comportamiento del logaritmo de probabilidad (Ln PD) en función del número *K* de poblaciones para el grupo de 36 SSR. ..... 50

Fig. 13: Análisis de la estructura poblacional en 202 genotipos cultivables de la colección referencia de fríjol común, evaluados con 36 SSR (K = 8) ..... 50

Fig. 14: Representación gráfica en tres dimensiones de la distribución y ubicación espacial de 202 genotipos cultivables a partir del análisis de coordenadas principales (PCoA) ..... 53

Fig. 15: Árbol *Neighbor-Joining* obtenido a partir del software Darwin. ..... **¡Error! Marcador no definido.**

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Set de colorantes estándar para aplicaciones de genotipificación por medio de marcadores moleculares fluorescentes. ..... 24

Tabla. 2: Evaluación de 202 genotipos por medio de 88 SSRs fluorescentes analizados en Powermarker..... 44

Tabla 3: Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA), comparando las poblaciones derivadas del análisis con el programa *STRUCTURE* para 88 SSR. ..... 55

Tabla 4: Rangos Interpretación planteada por Wright 1978 ..... 55

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. 121 Genotipos pertenecientes al Acervo Mesoamericano ..... 83

Anexo 1. 81 Genotipos pertenecientes al Acervo Andino. ..... 83

Anexo 2. Grupo A. 40 Cebadores con marcaje terminal fluorescente conformados por 10 paneles. ..... 84

Anexo 3. Diversidad genética en 202 genotipos analizados por medio de 88 marcadores microsatélites, 77 con marcaje terminal fluorescente y 12 con la metodología de marcaje fluorescente M13. ..... 87

Anexo 4. Grupo de marcadores A. Diversidad genética en 202 genotipos analizados con 40 marcadores microsatélites fluorescentes génicos y genómicos. ..... 90

Anexo 5. Grupo de marcadores B. Diversidad genética en 202 genotipos analizados con 36 marcadores microsatélites fluorescentes génicos y genómicos. ..... 91

Anexo 6. Extracción de ADN de fríjol por medio de CTAB (Dellaporta *et al*. 1983)..... 92

## RESUMEN

El germoplasma de fríjol común es una fuente importante de información para los procesos de domesticación y flujo de genes que se han llevado a cabo dentro y entre los acervos Mesoamericano y Andino. La previa clasificación de las razas en cada uno de los acervos ha ayudado a proveer un mejor uso del germoplasma cultivable, de esta misma manera los marcadores moleculares han sido una gran herramienta para analizar grupos de genotipos representativos que puedan conllevar a la obtención de características de interés agronómico, además de ayudar a comprender los procesos de diversificación que se han llevado a cabo en la especie. El objetivo de este estudio fue analizar la estructura poblacional y la diversidad genética de los acervos Mesoamericano y Andino, usando 202 genotipos arbustivos de la colección referencia del programa de germoplasma de fríjol del CIAT, por medio de 88 marcadores moleculares fluorescentes tanto génicos como genómicos, e implementar la metodología de marcaje fluorescente por medio del cebador universal M13. Se identificó un total de 960 alelos con un promedio de 10 por marcador. La diversidad genética promedio fue de 0.65 y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) de 0.60. Por medio del programa *STRUCTURE* se identificaron seis poblaciones, tres para el acervo Mesoamericano (Mesoamérica, Complejo Durango-Jalisco, y Líneas avanzadas), y tres para el Andino (sub-raza Nueva Granada1, Nueva Granada2 y Líneas avanzadas). Se observó que algunos individuos presentaban introgresión entre razas debido tal vez a un alto flujo génico. También se analizaron grupos de marcadores por separado donde se reflejó el grado de discriminación que se puede generar a nivel de razas de acuerdo al grupo de marcadores evaluados. La comparación entre los diferentes grupos evaluados generó diferencias entre ellos, por lo que los marcadores del grupo B presentaron mayor discriminación entre las poblaciones dando una estructura poblacional mas diferenciada, contrario en lo observado para los marcadores del grupo A, sin embargo en el análisis unificado de los marcadores se observó una buena estructura poblacional de acuerdo a las clasificaciones realizadas en estudios previos.



**Palabras clave:** cebador universal M13, colección referencia, diversidad genética, fluorescencia, *Phaseolus vulgaris* L., SSR.

# 1. INTRODUCCIÓN

El fríjol común es la tercer leguminosa más importante para el consumo humano a nivel mundial (Broughton *et al*. 2003, FAO 2011), ya que presenta alto contenido de proteínas, vitaminas, fibra dietética y minerales. El género *Phaseolus,* y específicamente su especie económica más importante, *P. vulgaris* L., provee interesantes características para el estudio del proceso de domesticación. De las 70 especies que han sido reconocidas en el género, cinco han sido domesticadas y pocas especies adicionales muestran signos de domesticación incipiente (Debouck 1991; Blair *et al.* 2009a).

El fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más antiguos del nuevo mundo. Junto con el maíz y la yuca, ha sido de suma importancia en bajas, medias y hasta grandes altitudes de las Américas por milenios. Es un cultivo extremadamente diverso en términos de métodos de cultivo, usos, rango de ambientes a los cuales ellos han sido adaptados (Broughton *et al*. 2003). Son encontrados desde el nivel del mar hasta 3000 m.s.n.m, cultivados en monocultivos e intercalados con otros sistemas de cultivos (Broughton *et al*. 2003; Chacón *et al*. 2005).

El fríjol común presenta dos centros de origen que constituyen los acervos genéticos, el Mesoamericano que comprende América central y México y el Andino que incluye las montañas Andinas de sur América (Singh *et al.* 1991). Las diferencias entre acervos están determinadas por el tamaño de la semilla, morfología de la planta (Singh *et al.*1991), patrones de faseolina (Gepts *et al.* 1986) y alelos de varios tipos de marcadores moleculares incluyendo microsatélites (Díaz & Blair 2006; Blair *et al.* 2007,2009).

Los microsatélites son conocidos como Secuencias Simples Repetidas (SSR) o secuencias hipervariables que son organizaciones de pequeños motivos repetidos en tándem de 1 a 6 pares de bases en longitud. Estos marcadores que pueden ser de único *locus* o mutilocus, son caracterizados por su hipervariabilidad, abundancia, reproductibilidad, modo de herencia mendeliana y naturaleza codominante (Gaitán *et al*. 2002; Blair *et al.* 2009b). Los marcadores microsatélites han sido desarrollados para un amplio rango de especies de plantas de interés humano y han sido muy usados para análisis de genomas de los cultivos agronómicos (Hancock 1999). Además, se ha encontrado que los SSR están bien distribuidos a lo largo de la mayoría de los cromosomas y regiones genómicas y génicas de eucariotas, haciendo de ellos muy apropiados para mapeo genético (Varsney *et al.* 2005). Los SSR pueden ser usados en

evaluaciones de diversidad dentro de germoplasma estrechamente relacionado y para Selección Asistida por Marcadores (MAS) de características ligadas. (Blair *et al.* 2009a).

La genotipificación con marcadores microsatélite es una técnica que ha sido amplia y exitosamente usada en diversas áreas de investigación en genética de plantas, incluyendo mapeo genético, genética de poblaciones, análisis de QTL, ciencia forense y diagnostico (Schuelke 2000; Missiaggia *et al.* 2006). En la actualidad los SSR han sido automatizados, debido a que los SSR son marcados con fluorocromos, lo que permite la precisión en el tamaño de los alelos amplificados en PCR. Este aspecto es particularmente importante en el análisis poblacional de plantas para minimizar errores de genotipificación (Missiaggia *et al.* 2006). Sin embargo el elevado costo de esta marcación también limita el desarrollo de proyectos basados en análisis de gran número de *loci* (Schuelke 2000; Missiaggia *et al.* 2006; Arruda *et al*. 2010).

Para reducir el costo de genotipaje con marcadores microsatélite marcados fluorescentemente, Oetting *et al*. (1995) han propuesto una estrategia de PCR, con cebadores de "*cola*", los cuales emplean un cebador *forward*, un cebador *reverse* y un tercer cebador universal marcado con fluorescencia M13. En esta estrategia de tres cebadores, la detección es así basada en la adición de una secuencia que no tiene homología con el genoma objetivo, al extremo 5' del cebador *forward* del marcador microsatélite (Missiaggia *et al.* 2006; Arruda *et al*. 2010). Este cebador de "*cola*" provee una secuencia complementaria al cebador universal fluorescente, generando un producto que puede ser detectado en un secuenciador automático de ADN (Missiaggia *et al.* 2006).

La colección *Core* o núcleo del CIAT contiene 1.719 genotipos que representan la variabilidad genética de la diversidad del fríjol común (Unidad de Recursos Genéticos http://isa.ciat.cgiar.org/urgbsearchparam2.do, consultado 23 Mayo 2011). A partir de esta colección, el programa de fríjol, bajo auspicio del proyecto especial TL 1 del GCP, comenzó los primeros análisis sobre estructura poblacional. Blair *et al.* (2009a) seleccionaron el 42% de los genotipos de la colección *Core* para su análisis. Posteriormente este mismo grupo seleccionó 202 genotipos cultivables para realizar evaluaciones con énfasis en sequía; esta colección fue denominada colección referencia. Esta colección se caracterizó principalmente por la selección de genotipos con hábitos de crecimiento tipo I, II y III, y ausencia de los genotipos con hábito de crecimiento tipo IV. Dentro de este grupo también se seleccionaron Líneas avanzadas y/o mejoradas que presentan características agroecológicas de interés, así como resistencia a factores de estrés tanto biótico como abiótico.

Las colecciones referencia son importantes ya que permiten explorar en diferentes aspectos las colecciones con un mínimo de genotipos y así disminuir costos, además sirven para evaluar los genes donantes y alelos, descripción de la estructura de muestras, identificación de controles significativos para los mejoramientos, y fenotipos extremos conocidos. Todo esto ayuda a seleccionar genotipos estándares para el conocimiento del control genético de variación de caracteres mediante la formación de paneles para estudios de asociación lo cual hace realidad un camino para fomentar el uso de la diversidad genética (Glaszmann *et* al. 2010). El objetivo de este trabajo fue analizar la estructura y la diversidad genética de la colección referencia que contiene 202 genotipos de fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivables arbustivos, seleccionados por el Laboratorio de Caracterización de Germoplasma de Fríjol (LCGF) para el proyecto TL 1, a partir de microsatélites fluorescentes con y sin la metodología del cebador universal M13 marcado con fluorocromo.

# 2. MARCO TEÓRICO

## 2.1. Origen

El fríjol común cultivado fue domesticado del silvestre *P. vulgaris*, una planta con crecimiento indeterminado de la media altitud del neotrópico y subtrópico que tiene un alto rango de distribución desde el norte de México hasta el noroccidente de Argentina (Gepts & Debouck 1991). En este rango de distribución *P. vulgaris* coloniza muchas variedades de nichos ecológicos, usualmente en hábitats distribuidos con vegetación secundaria (Delgado *et al.* 1988). La genealogía intraespecífica y orígenes geográficos de fríjol común son ahora bien entendidos (Gepts 1998; Chacón *et al*. 2005), como es la filogenia del género *Phaseolus* (Delgado *et al*. 1988) y hasta cierto punto los centros de diversificación primaria (Debouck 1986; Kami *et al*. 1995; Chacón *et al.* 2005; Kwak & Gepts 2009).

Los acervos geográficamente distintos, Mesoamericano y Andino, califican como subespecies basadas en la existencia de aislamiento parcial reproductivo entre ellos (Broughton *et al.* 2003). Preliminarmente los estimados muestran un tiempo de divergencia de unos 500.000 años entre estos acervos, o sea antes de la domesticación (Coulibaly 1999). En fríjol silvestre se han propuesto dos acervos mas como centros de diversificación, uno en Colombia y otro en el norte de Perú y sur de Ecuador (Díaz *et al*. 2011). Estudios filogenéticos que incluyen especies tanto silvestres como domesticadas de *Phaseolus* usando datos morfológicos, bioquímicos y moleculares (proteínas de semilla, isozimas y ADN nuclear, mitocondrial y cloroplástico etc.) han confirmado que el género es monofilético (Debouck 1999).

El fríjol común silvestre esta amplia pero discontinuamente distribuido a través de las altas tierras de Mesoamérica (región que se extiende desde México a Panamá), y Suramérica (la región que se extiende desde el noreste de Colombia hasta Argentina). Este rango ha sido también fragmentado recientemente por actividades humanas tales como agricultura, urbanización y deforestación (Debouck *et al.* 1993; Jones *et al*. 1997a). *P. vulgaris* silvestre pudo haber alcanzado su rango de distribución por al menos tres veces, dos desde Mesoamérica al norte de Suramérica y uno desde los Andes a Centroamérica (Chacón 2001). Relativamente reciente en la historia de las especies (probablemente hace un poco más de 4.000 años) (Kaplan *et al.* 1999), los humanos comenzaron su domesticación

independientemente en Mesoamérica y sur de los Andes de Suramérica (Gepts *et al.* 1986). Siguiendo la domesticación, el fríjol común se dispersó entre Mesoamérica y Suramérica y, después del descubrimiento de las Américas por los europeos, a Europa y África. (Gepts & Bliss 1986; Gepts *et al*. 1986; Gepts & Bliss1988; Gepts & Bliss 1998).

Actualmente los acervos domesticados parecen estar organizados en cuatro razas Mesoamericanas y tres Andinas (Singh *et al.* 1991; Beebe *et al.* 2000, 2001; Díaz *et al.* 2006, Blair *et al.* 2009). El origen de estas razas es aún controversial. No se conoce si son el resultado de múltiples domesticaciones independientes dentro de cada región o el resultado de una única domesticación en cada región seguida por diversificación bajo cultivo.

El hecho de que cuatro razas Mesoamericanas, (Durango, Jalisco, Mesoamérica y Guatemala) difieren en adaptación ecológica, rango geográfico, características morfo-agronómicas, alelos de alozimas y marcadores RAPD (Amplificación al Azar de ADN Polimórfico) (Singh *et al*. 1991; Beebe *et al*. 2000) soportan múltiples domesticaciones. Sin embargo la presencia de un tipo electroforético de faseolina, tipo S, y patrones de AFLP (Amplificación de Fragmentos de Longitud Polimórfica) entre razas Mesoamericanas sugieren una única domesticación en este acervo (Gepts *et al.* 1986; Papa *et al.* 2003). Las tres razas Andinas, (Nueva Granada, Perú y Chile) también difieren en características morfo-agronómicas, alozimas y tipos de faseolina (Singh *et al*. 1991), los cuales soportan múltiples domesticaciones. Sin embargo sus rangos geográficos se sobrelapan, y esto parece ser similar en patrones de (AFLP) (Beebe *et al*. 2001), pero no en microsatélites (Blair *et al*. 2007) los cuales soportan un único origen con introgresión de diversidad posteriormente a la domesticación.

Dentro de la gran diversidad del fríjol común, además del fríjol silvestre y cultivado, existe un grupo intermedio llamado en inglés “weedy form” o “weedy type” frecuentemente denominado como poblaciones híbridas, producto de la cruza entre fríjol silvestre y variedades domesticadas. Papa *et al.* (2003), mediante marcadores moleculares, confirmaron que existe flujo genético entre las dos formas principales y que el fríjol intermedio podría presentar más relación con la forma silvestre. La forma tipo híbrida se ha observado en los Andes y también en Mesoamérica (Delgado *et al.* 1988; Debouck *et al.* 1993); produce pocas semillas por vaina (4.2 *vs*. 5.8) pero más grandes (11.9 *vs*. 6.3 g en 100 semillas) que la forma silvestre (Delgado *et al.* 1988; Zizumbo *et al.* 2005).

## 2.2. Generalidades

Con aproximadamente 20.000 especies (Gepts *et al.* 2005), 643 géneros agrupados en 40 tribus (Broughton *et al.* 2003), las legumbres son la tercer gran familia de plantas superiores que presentan una distribución en ambientes templados y tropicales (Polhill 1981; Lavin *et al.* 1990; Polhill 1994; Mabberley 1998; Gepts *et al.* 2005). La tribu *Phaseolae* [fríjol común (*P. vulgaris*), caupí (*Vigna unguiculata*) y soya (*Glycine* max)] es el más importante grupo económico y contiene el 75% de las legumbres comerciales en el mundo. *Phaseolus vulgaris* L. es la tercer leguminosa más importante, después de Soja y Maní, en términos financieros en el mundo (Broughton *et al.* 2003), y es el alimento más importante entre estos. Presenta un área de producción de 18 millones de hectáreas con grandes regiones de producción en Latinoamérica, el este y el sur de África donde las cosechas son críticas para la seguridad nutricional y generación de ingresos (Broughton *et al.* 2003).

### 2.2.1. Clasificación del fríjol según Gepts (2001).

| | |
|---|---|
| Orden | Rosales |
| Familia | Leguminosae |
| Subfamilia | Papilionoidae |
| Tribu | Phaseolae |
| Subtribu | Phaseolinae |
| Género | *Phaseolus* |
| Especie | *Phaseolus vulgaris* L. |

A nivel morfológico el fríjol común presenta un tallo herbáceo con sección cilíndrica o levemente angular, debido a pequeñas corrugaciones de la epidermis. Las ramas se desarrollan a partir de un complejo axilar que generalmente está formado por tres yemas visibles desde el inicio de su desarrollo (Debouck *et al.* 1985); presenta hojas simples o cotilodenales una vez, que aparecen en el segundo nudo del tallo y se forman en la semilla durante la embriogénesis. Las hojas son compuestas, siendo las que durante toda su vida se generarán (Debouck *et al.* 1985).

La inflorescencia se presenta comúnmente como pseudo-racimo con diversas flores en donde solo unas pocas producen vainas, una excepción a ello es la habichuela que produce abundantes vainas. Las flores de Papilionáceas pueden ser de color rosa, purpúreas, blancas o

bicolor con o sin rayas y en la base exterior lleva un estandarte muy pronunciado. Las bractéolas sésiles a menudo son más grandes en genotipos Mesoamericanos que en Andinos y pueden ser cordado, ovado, o lanceolado. El cáliz bilabiado es pequeño (<5 mm) con los dos dientes superiores unidos. Las flores son mayormente cleistógamas y normalmente se autopolinizan (< 1% es por cruzamiento) (Miklas & Singh 2007).

Según el hábito de crecimiento, las plantas de fríjol pueden ser de crecimiento determinado o indeterminado, de acuerdo con las características de la parte terminal del tallo y de las ramas. Si al inicio de la fase reproductiva el tallo y las ramas terminan en un racimo, la planta es de hábito determinado; si termina en un meristemo vegetativo, es de hábito indeterminado (Ríos-Betancour & Quirós-Dávila 2002).

Según estudios hechos por el programa de fríjol en el CIAT, se consideró que los hábitos de crecimiento podrían ser agrupados en cuatro tipos principales (Fig. 1). Tipo I, determinado arbustivo; Tipo II, indeterminado arbustivo; Tipo III, indeterminado postrado; Tipo IV, indeterminado trepador (Debouck *et al.* 1985).

Las semillas presentan una amplia variación de color (blanco, crema, amarillo, rosado, rojo, púrpura, negro y marrón, más un sin fin de tonalidades) así como de forma (cilíndrica, de riñón, esférica, redonda, elíptica u ovoide) y brillo (brillante, semibrillante y opaco). La combinación o patrón de colores también es muy frecuente (jaspeado, moteado, punteado, rayado y venación). La variabilidad de los caracteres externos de la semilla se tienen en cuenta para la clasificación de las variedades de fríjol (Ríos-Betancour & Quirós-Dávila 2002).

Durante el proceso de domesticación han surgido una gran variedad de cambios morfológicos en la planta de fríjol común. Los cambios morfológicos más notables ocurridos durante el proceso son: de raíz fibrosa fasciculada a fibrosa de diferentes tamaños; de tallo trepador con 20-30 nudos a arbustivo con 5-12 nudos; de entrenudos largos de 10-20 cm a cortos de 2-5 cm; de foliolos pequeños o intermedios a foliolos pequeños a grandes; de inflorescencia lateral a terminal, en fríjol de hábito determinado; de vainas fuertemente dehiscentes de 6-8 cm de longitud y 5-8 óvulos, a dehiscentes o indehiscentes, de 4-30 cm y 2-9 óvulos; de semillas pequeñas de 6-14 g en 100 semillas, a pequeñas y grandes de 20-100 g en 100 semillas (Gepts *et al.* 1991).

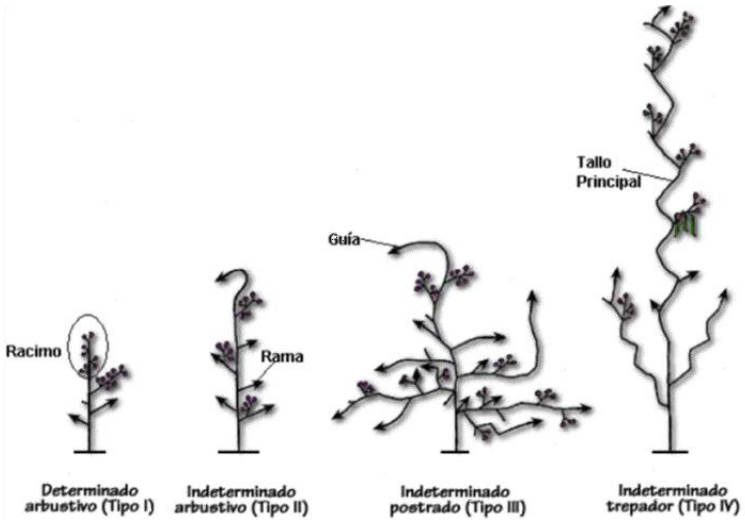



**Fig. 1: Hábitos de crecimiento de fríjol según los estudios realizados por el programa de fríjol del CIAT.**

Las semillas de las formas cultivadas germinan rápidamente después de entrar en contacto con suficiente humedad, contrario a lo que sucede con las formas silvestres las cuales presentan latencia debido a la impermeabilidad temporal de la testa que impide la penetración del agua. Adicionalmente, las formas silvestres reaccionan al fotoperiodo y florecen solamente en fotoperiodo cortos (10-12 h), mientras que los materiales domesticados pertenecientes a las razas Mesoamérica y Nueva Granada, son insensibles a la duración del día, pero por otra parte los individuos de la raza Perú son muy sensibles al fotoperiodo igual que otras variedades de fríjol voluble de raza Guatemala (Singh *et al*. 1991; Gepts *et al.* 1991).

## 2.3. Importancia económica y nutricional

La producción total excede los 23 millones de toneladas métricas de los cuales 7 millones son producidos en Latinoamérica y África (Broughton *et al.* 2003), y una producción promedio de 700Kg $ha^{-1}$, aunque la producción en ciertos países alcanzan 2000 – 3000 Kg $ha^{-1}$ (Gepts 2001).

Los factores sociales y limitaciones ecológicas determinan si el fríjol está creciendo en una región en particular. Como la agricultura y los sistemas sociales han evolucionado juntos, el

estado actual de sistemas de granjas es el resultado de la interacción climática, edáfica, biótica y factores sociales. Una gran parte de la producción de fríjol en Latinoamérica toma lugar en pequeñas granjas que varían desde 1 a 10 hectáreas en tamaño, también en tierras inclinadas de baja fertilidad. Algunos estimados sugieren que el 80% del área plantada con fríjol común en Latinoamérica es encontrado en laderas. Además estos minifundios están dispersos, dificultando la delimitación de las principales áreas de producción. (Broughton *et al.* 2003). Colombia es uno de los principales productores de frijol común del norte de Suramérica, la producción de frijol esta sobre un área de cultivo aproximada de 120.000 hectáreas plantadas por año, donde los departamentos de Antioquia, Santander, Norte de Santander, Huila, Tolima, Boyacá, Cundinamarca y Nariño, en orden decreciente de producción, son la principales áreas de cultivo del país (Rios-Betancour & Quirós-Dávila 2002).

El fríjol es consumido como grano maduro, como semilla inmadura, también como vegetales (hojas y vainas) (Gepts 2001; Broughton *et al.* 2003). Cuando se consume como semilla constituye un importante recurso de proteína dietaria (22% del peso de la semilla) (Broughton *et al.* 2003; Miklas *et al.* 2006), que complementa los cereales por encima de medio millón de personas principalmente en Latinoamérica (Gepts 2001). También se encuentran glucósidos (55-65%), fibra (3-8%), lípidos (1-5%) y sustancias minerales (3-5 %) (Rodrigo M. 2000), tales como contenido de Hierro (Fe), Zinc (Zn), Calcio (Ca), y vitaminas como tiamina (B) y acido fólico (Rodrigo M. 2000; Broughton *et al.* 2003).

Algunas propiedades del fríjol han mostrado que contribuyen de manera positiva para controlar los principales problemas de salud, tales como la diabetes tipo II. En este respecto, las características positivas de la semilla de fríjol incluyen la presencia de minerales esenciales, alta fibra y contenidos fenólicos. Típicamente, el consumo de semillas de fríjol conlleva a bajos índices de ciertos tipos de glicemia y colesterol (Andersen *et al*. 1984; Hangen & Bennink 2003). En países del primer mundo los beneficios nutricionales y contribución del fríjol a la dieta en salud humana es reconocido por organizaciones sin ánimo de lucro orientados a la alimentación, además de limitar la ocurrencia y probabilidad de enfermedades como el cáncer, diabetes y del corazón. (Hangen & Bennink 2003).

## 2.4. Citogenética

*P. vulgaris* y una gran mayoría de otros cultivos y especies silvestres de *Phaseolus* son verdaderos organismos diploides con 11 cromosomas (2n = 2X= 22 cromosomas). Los cromosomas de *P. vulgaris* son extremadamente pequeños y de similar morfología entre ellos mismos (Broughton *et al* 2003; Miklas *et al.* 2007). Los cromosomas mitóticos y meióticos miden aproximadamente entre 1±3 µm y suelen ser metacéntricos y submetacéntricos (Gepts. 2001). El fríjol común posee uno de los genomas más pequeños de la familia Leguminosae con 635 Mpb (Miklas *et al.* 2007). El fríjol tiene un mapa genético bien desarrollado (Freyre *et al.* 1998; Pedrosa *et al*. 2002; Blair *et al*. 2003; Broughton *et al.* 2003; Grisi *et al*. 2007) y un gran número de marcadores moleculares que han sido usados para mostrar que *Phaseolus* y *Vigna*; ambos miembros de la subtribu Phaseolinae*,* están estrechamente relacionados, presentando amplia similaridad entre sus genomas (Broughton *et al*. 2003).

## 2.5. Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos representan las diferencias entre organismos individuales o especies. Generalmente ellos no representan los genes objetivo en sí mismos pero actúan como señales o etiquetas ya que son secuencias específicas (Collard *et al.* 2005).

Para realizar estudios de diversidad genética se tiene actualmente herramientas moleculares en la determinación de las características de interés en un genotipo determinado (Collard *et al*. 2005). Entre ellas encontramos diversas metodologías que ayudan a establecer las características de interés dentro de un genoma; tales como Secuencias Simples Repetidas (SSR), Amplificación de Fragmentos de Longitud Polimórfica (AFLP), Amplificación Polimórfica al Azar de DNA (RAPD) y Polimorfismos en Único Nucleótido (SNP). Estas herramientas son usadas en biología molecular para observar la variantes que se presentan dentro de una población, o las características de interés que se requieren, las cuales pueden ser necesitadas por fisiólogos, patólogos o científicos de las plantas (Collard *et al*. 2005).

Existen tres tipos de marcadores genéticos: (1) Morfológicos (también “clásicos” o “visibles”) los cuales en sí mismos son características fenotípicas o caracteres tales como color de la flor,

forma de la semilla, habito de crecimiento o pigmentación; (2) Bioquímicos, los cuales incluyen variantes alelicas de enzimas llamadas isozimas, y (3) Marcadores de ADN (o moleculares), los cuales revelan sitios de variación en el ADN (Jones *et al*. 1997b; Winter & Kahl 1995). Las principales desventajas de los marcadores morfológicos y bioquímicos es que ellos pueden estar limitados en número y son influenciados por factores ambientales o el estado de desarrollo de la planta. (Winter & Kahl 1995).

Los marcadores de ADN son el tipo de marcador más ampliamente usado debido a su abundancia. Estos marcadores surgen de diferentes clases de mutaciones de ADN tales como mutaciones de sustitución (puntos de sustitución), reordenamientos (inserciones o deleciones) o errores en la replicación de ADN repetido en tándem (Paterson 1996). Estos marcadores son selectivamente neutrales porque ellos están localizados usualmente en regiones no codificantes del ADN. Diferente a los marcadores morfológicos y bioquímicos, los marcadores de ADN son prácticamente ilimitados en número y no son afectados por factores ambientales y/o estado de desarrollo de la planta (Winter & Kahl 1995). A parte del uso de marcadores de ADN en la construcción de mapas de ligamiento, ellos tienen numerosas aplicaciones en el mejoramiento de plantas tales como la evaluación del nivel de la diversidad genética dentro de un germoplasma y la identidad de los cultivares (Weising *et al*. 1995; Winter & Kahl 1995; Baird *et al*. 1997; Henry 1997; Jahufer *et al*. 2003).

Esencialmente los marcadores de ADN pueden revelar diferencias genéticas que pueden ser visualizadas por diferentes técnicas, por ejemplo geles de poliacrilamida los cuales son teñidos con químicos, detección con pruebas colorimétricas con usos de sondas o sistemas automatizados (Fig. 2). Los marcadores de ADN son principalmente usados si ellos revelan diferencias entre individuos de la misma o diferentes especies. Estos marcadores son llamados marcadores polimórficos, mientras que los marcadores que no discriminan entre genotipos son llamados marcadores monomórficos (Collard *et al.* 2005).

### 2.5.1. Microsatélites

Los microsatélites también conocidos como secuencias simples repetidas (SSR) por sus siglas en inglés, o pequeñas repeticiones en tándem (STR), son regiones de ADN repetitivo no codificante compuestas de pequeños motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem los cuales están ampliamente distribuidos en el genoma de eucariotas y procariotas (Field & Wills 1998; Tóth *et al*. 2000). Ampliamente usados como marcadores genéticos, los microsatélites tienen un atributo particular debido a que sufren altas tasas de mutación en comparación con el resto de genoma (Jarne *et al.* 1996).

Aunque originalmente diseñados para la investigación en humanos, los análisis de microsatélites se han convertido en una poderosa herramienta para la investigación en animales (Schlötterer *et al.* 1991) y plantas (Dayanandan *et al*. 1997; White and Powell 1997; Steinkellner *et al*. 1997; Cipriani *et al*. 1999; Roa *et al*. 2000; Collevatti *et al*. 2001). Los microsatélites proveen información relevante para la identificación y conservación de unidades genéticas y para la investigación de procesos genéticos que tiene lugar en poblaciones tales como patrones de flujo de genes, generación de vecindarios genéticos y la incidencia de deriva genética (Heywood *et al.* 2003). En la actualidad, los microsatélites son comúnmente empleados para los análisis de estructura genética de poblaciones en plantas silvestres (Zucchi *et al*. 2002) y cultivables (Pinto *et al*. 2003a y b) por su naturaleza codominante y altamente informativos (Oliveira *et al.* 2006).

Una característica esencial de los microsatélites es su habilidad para detectar polimorfismos en paneles de diversos genotipos. Se ha reportado que los microsatélites varían en el polimorfismo que ellos detectan dependiendo algunas veces en la longitud y secuencia del motivo repetido que ellos contienen y su localización en segmentos codificantes y no codificantes del genoma. (Thoquet *et al.* 2002; Temnykh *et al*. 2000, 2001; Eujay *et al*. 2002).

En fríjol común, los marcadores microsatélites han sido usados para construir mapas genéticos basados en PCR (Yu *et al*. 2000; Blair *et al*. 2003), para evaluar diversidad intraespecífica dentro del género *Phaseolus* (Gaitán-Solís *et al.* 2002) y para determinar la diversidad genética en variedades comerciales de fríjol común de África (Asfaw *et al.* 2009; Blair *et al.* 2010) Europa (Métais *et al*. 2002; Masi *et al*. 2003), China (Zhang *et al.* 2008), Nicaragua (Gómez *et*

*al*. 2004) y Brasil (Burle *et al.* 2010), así como probados extensivamente en colecciones de germoplasma y usados para mapeo asociativo (Blair *et al.* 2009a).

### 2.5.2. Microsatélites fluorescentes

Aunque diversos métodos son usados para determinar los alelos generados por los microsatélites, los sistemas automatizados usan fragmentos con marcación fluorescente obtenidos en (PCR) que permiten un llamado preciso de los alelos; aspecto particular importante en análisis de población de plantas que evita errores de genotipificación (Schwengel *et al*. 1994; Bonin *et al.* 2004; Hoffman *et al.* 2005). En este método, uno de los cebadores usados en la PCR está marcado con un colorante fluorescente en su extremo 5'. Sin embargo, el costo de la síntesis de los cebadores marcados fluorescentemente es un factor limitante para muchos laboratorios, ya que el costo de los cebadores marcados presenta un incremento de entre cinco y diez veces más que los no marcados. Además, en análisis de genética de plantas, tales cebadores son frecuentemente necesarios para genotipar solo unas decenas o cientos de muestras, y son entonces almacenados por cantidades variables de tiempo durante los cuales la fluorescencia puede decaer rápidamente (Missiaggia *et al.* 2006).

Sin embargo el método de microsatélites fluorescentes es considerado la vía más aguda con este tipo de marcador (Diwan *et al.* 1997; Blair *et al*. 2009a; McCouch *et al.* 1997). En adición; los microsatélites con marcaje fluorescente y la organización de estos en varios colores ordenados en paneles tiene ventajas en evitar combinación durante la separación de las bandas; con ventaja para genotipificación de alto rendimiento y simultáneos análisis de múltiples *loci* (Reed *et al.* 1994; Schwengel *et al*. 1994; Coburn *et al*. 2002; Tommasini *et al*. 2003). La tecnología actual permite la separación de las bandas de microsatélites con paneles compuestos de cuatro colores de cuatro marcadores individuales marcados con diferentes colorantes evaluados a través de un único capilar con una separación del tamaño estándar, ocupando un rango de detección de longitud de onda, permitiendo estimados del tamaño de la banda (Tabla 1) (Coburn *et al*. 2002).

El kit de colorantes DS-33 fue utilizado en este estudio ya que ha sido diseñado para generar una mejor señal y definición de los picos obtenidos, además de presentar gran discriminación de los cebadores mezclados por cada panel; adicionalmente es utilizado por el *ABI 3730* usado

en este estudio. El colorante LIZ de color naranja, es el marcador de peso molecular de tamaño estándar, el cual es el necesario para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

**Tabla 1: Set de colorantes estándar para aplicaciones de genotipificación por medio de marcadores moleculares fluorescentes.**

| Applied Biosystems Standard Dye Sets for Genotyping Applications | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dye Set | DS-02 | DS-20[1] | DS-30 | DS-31 | DS-32 | DS-33 | DS-34 | DS-40 |
| Filter Set | E5 | A | D | D | F | G5 | C | S |
| Blue Dyes | dR110 | 5-FAM™ | 6-FAM™ | 6-FAM | 5-FAM | 6-FAM | 6-FAM | 6-FAM |
| Green Dyes | dR6G | JOE™ | HEX™ | VIC® | JOE | VIC | TET™ | dR6G |
| Yellow Dyes | dTAMRA™ | TAMRA™ | NED™ | NED | NED | NED | HEX | |
| Red Dyes | dROX™ | ROX™ | ROX | ROX | ROX | PET® | TAMRA | |
| Orange Dyes | LIZ® | | | | | LIZ | | LIZ |

### 2.5.3. Primer universal M13

La marcación de fragmentos de ADN, para una visualización exitosa, es llevada a cabo usando una variedad de tinciones o mediante la incorporación de fluorescentes, luminiscentes, o de otra manera, nucleótidos químicamente modificados. El análisis de fragmentos automatizado, basado en la detección de colorantes fluorescentes, permite la rápida selección de secuencias polimórficas a múltiples *loci* genómicos. Intrínseco a estos análisis son los cebadores específicos los cuales flanquean repeticiones variables y otras secuencias polimórficas. Los altos precios, sin embargo, de la producción de nuevos cebadores etiquetados fluorescentemente para cada uno de los cientos de *loci* potencialmente informativos se hace difícil debido a los precios elevados (Neilan *et al.* 1997).

Para reducir el costo de genotipificación con microsatélites marcados fluorescentemente, Oetting *et al.* (1995) han propuesto una estrategia de PCR llamada multiplex con cebadores o primers de cola, la cual emplea un cebador *forward* con una extensión adicional de 18 pb en su

extremo 5' idéntica a la secuencia del cebador M13 (TGTAAAACGACGGCCAGT), un cebador regular *reverse* y un tercer cebador universal M13 marcado con fluorescencia. En esta estrategia de tres cebadores, la detección es así basada en la adición de una secuencia que no tiene homología con el genoma objetivo, al extremo 5' del cebador *forward* del marcador microsatélite.

Este cebador "cola" provee una secuencia complementaria del cebador universal fluorescente, generando un producto que puede ser detectado en un secuenciador automático de ADN (Fig. 2). Por lo tanto, en lugar de sintetizar un cebador *forward* específico para cada marcador microsatélite, solamente un cebador universal marcado es necesario. Neilan *et al.* (1997) describe el mismo método; sin embargo, ellos proponen que el cebador marcado podría ser diseñado para tener una única secuencia, exhibiendo insignificante homología a cualquier secuencia encontrada en la base de datos. Schuelke (2000) usó la misma estrategia para un tipo de *locus* en el cromosoma X Humano usando el cebador de cola M13 y la marcación fluorescente 6-FAM (azul). Guo & Milewicz (2003) uso dos cebadores universales marcados con colorantes 6-FAM (azul) y HEX (verde), respectivamente para genotipar muestras de ADN Humano. Aunque la mayoría de estos estudios usaron la secuencia M13 como secuencia de cola, cualquier otra secuencia que no tenga una secuencia complementaria en el genoma objetivo bajo estudio podría potencialmente ser usada.

Arruda *et al.* (2010) proponen la estrategia de cebador universal M13 ya que no presenta homología con alguna secuencia conocida en la base de datos, esto para reducir amplificaciones inespecíficas principalmente para genomas pequeños, los cuales puedan resultar en interpretaciones erróneas de los resultados (Fig. 3). El cebador universal M13 es una secuencia derivada de un vector Bacterial (David *et al.* 1993). M13 tiene ventajas sobre otras técnicas porque este provee la habilidad de trabajar con una única secuencia de cola que evita la necesidad de usar diversas secuencias para el proceso de marcaje fluorescente. Así, para múltiples propósitos, la condición únicamente necesaria es cambiar los colores fluorescentes para marcar los diferentes productos de PCR de cada microsatélite. Además, los patrones de selección son ejecutados totalmente por automatización usando un software que permite la interacción entre los archivos de los picos generados y la genotipificación *per se*. Uno de los programas más utilizados es GeneMapper (Fig. 4). Esta técnica es indicada cuando grandes cantidades de datos deben ser analizados en el mismo tiempo (Oblessuc *et al.* 2009).

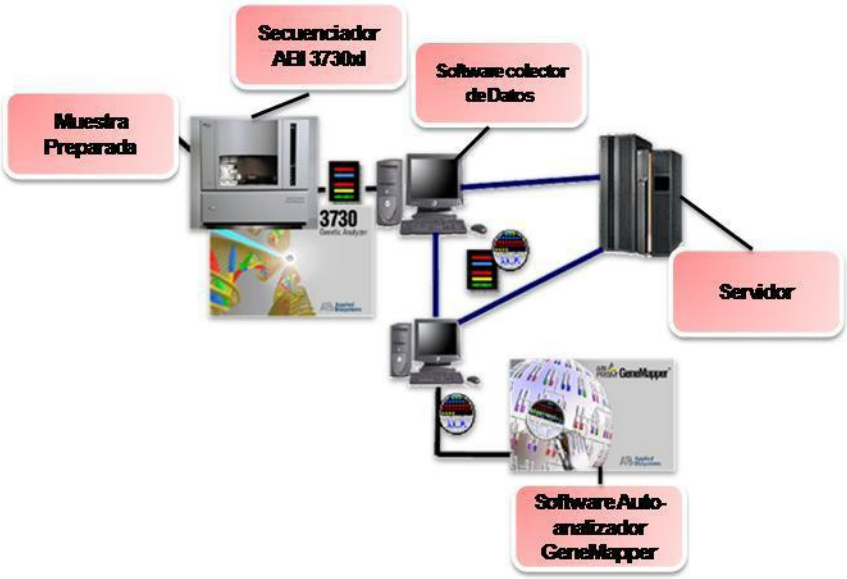



**Fig. 2: Diagrama del funcionamiento del *ABI 3730*.** Tomado de (Joe *et al.* 2004).

Debido a que el fríjol presenta un genoma pequeño y de característica diploide (Gepts *et al.* 2008) es una especie adecuada para trabajar con M13 ya que hay una gran disminución de la posibilidades de amplificar regiones inespecíficas.

## 2.6. Estudios de diversidad genética en fríjol común

La diversidad genética de *P. vulgaris* en América se ha caracterizado en diversos estudios y con diferentes metodologías. (Gepts *et al.* 1986) utilizaron faseolinas, (Koenig & Gepts 1989) y (Singh *et al.* 1991) utilizaron isozimas y características morfológicas; y (Becerra & Gepts 1994; Thome *et al.* 1996; Beebe *et al.* 2000 y 2001) entre otros han empleado técnicas moleculares con marcadores de ADN.

Becerra & Gepts (1994) mediante la técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) confirmaron la divergencia de los genotipos evaluados en los acervos genéticos Mesoamericano y Andino por medio de 55 accesiones silvestres y cultivables. Los valores de distancia genética de Nei (>0.10 y <0.8, respectivamente) sugirieron la existencia de un aislamiento reproductivo parcial, demostrado por la debilidad de hibrido F1 en cruces entre genotipos Meso Americano y Andino.

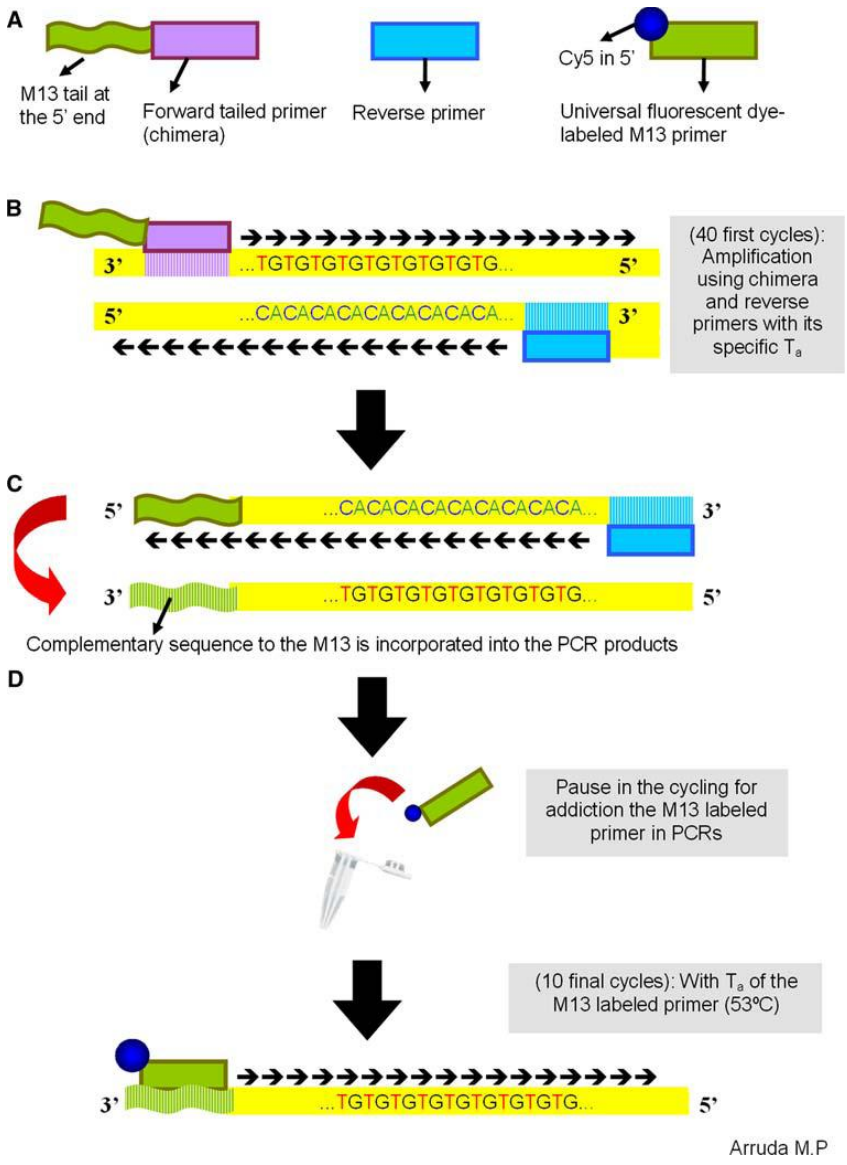



**Fig. 3: Diagrama del procedimiento de amplificación y marcaje del cebador universal M13.** Tomado de (Arruda *et al.* 2010).

Thome *et al.* (1996) evaluaron genotipos silvestres y reportaron que, además de los dos acervos mayores, Andino y Mesoamericano, y uno menor en Ecuador - Norte del Perú, otro acervo menor existe en Colombia. Ellos argumentaron que estos dos últimos son genéticamente únicos y no simplemente el producto de hibridación entre los acervos Mesoamericano y Andino.

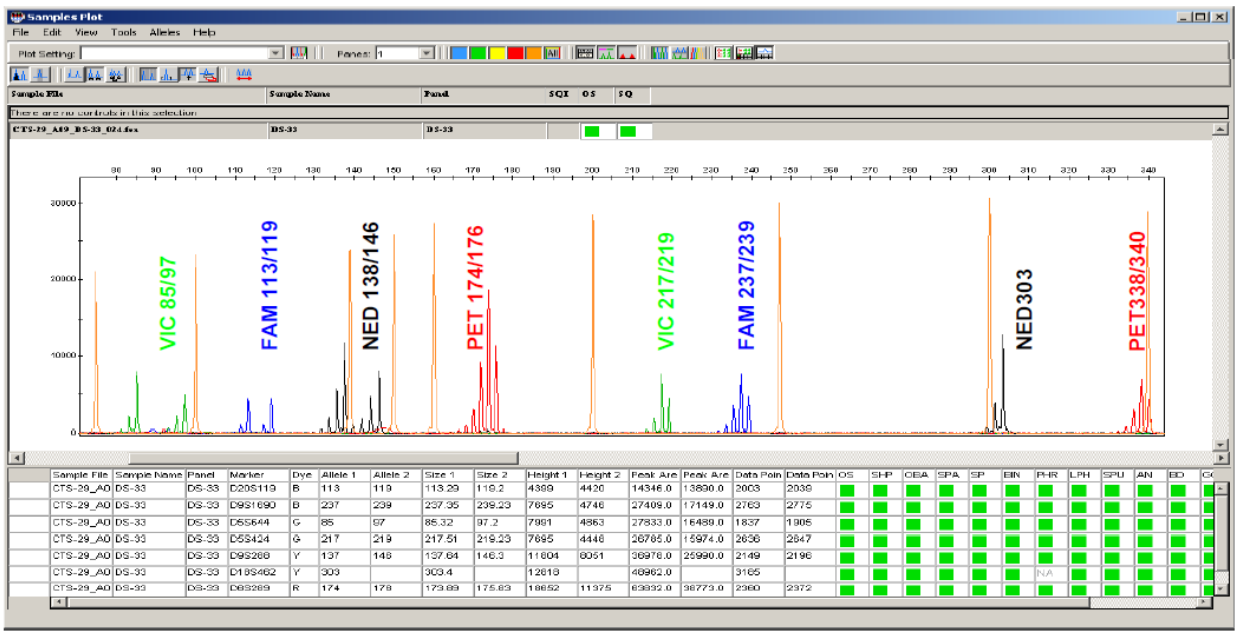



**Fig. 4: Software GeneMapper usado para la visualización de los picos obtenidos a partir de los marcadores microsatélite fluorescentes**, cada color corresponde a un marcador, azul (FAM), rojo (PET), verde (VIC) y amarillo (NED) quien se observa de color negro para una mejor definición; los picos de color naranja corresponden al marcador de peso LIZ. Cada panel está compuesto de cuatro colores lo que permite ordenar los marcadores de acuerdo al tamaño del fragmento para evitar solapamiento de las bandas al analizarlos con el secuenciador. Tomado de (Joe *et al.* 2004).

Beebe *et al.* (2000) estudiaron una colección de 269 cultivares mediante RAPD a fin de analizar la estructura del acervo genético del fríjol cultivado en América Central y México. Los análisis permitieron relacionar los grupos formados con las razas Durango, Jalisco y Mesoamérica, revelando una estructura y diversidad genética más compleja de lo que se creía.

Gaitán-Solis *et al.* (2002) aislaron, clonaron y secuenciaron fragmentos de ADN genómico que contenían los *loci* de microsatélites de tres librerías genómicas de *Phaseolus vulgaris*. Como resultado, casi todos los *loci* de microsatélites mostraron un gran poder de diferenciación y altos niveles de polimorfismo, para utilizarlos en estudios de diversidad y mapeo genético.

Blair *et al.* (2006) analizaron la diversidad genética con 129 marcadores microsatelites en 44 genotipos de fríjol común. Entre los microsatélites se evaluaron marcadores génicos y genómicos, arrojando como resultado un alto grado de polimorfismo dentro del acervo Andino, más que dentro del acervo Mesoamericano y la tasa de polimorfismo entre los genotipos fue consistente con el acervo y la identificación del genotipo.

Blair *et al* (2007) caracterizaron una colección de 123 genotipos representantes de la diversidad del fríjol Andino con 33 marcadores microsatélites los cuales han sido muy usados para la caracterización de la estructura de razas en fríjol común. Determinaron la predominancia de dos grupos, correspondientes a la raza Nueva Granada y Perú, mientras algunos representantes de la raza Chile formaron un grupo aparte. Entre los genotipos colombianos se observo una notable introgresión entre las razas Nueva Granada y Perú, de esta manera la diversidad genética dentro de los genotipos Colombianos fue alta, reafirmando la importancia de esta región como una importante fuente de germoplasma.

Blair *et al.* (2009a) trabajaron con la colección de germoplasma de fríjol cultivable de los dos centros de diversidad Mesoamericano y Andino. El objetivo fue determinar la estructura genética y la diversidad de 604 genotipos de la colección *Core* o núcleo la cual representa una amplia variabilidad genética de los acervos. Para tal fin, se seleccionaron los mejores 36 SSRs del estudio de (Blair *et al.* 2006). Basados en la estructura de la población, asociaciones significantivas fueron encontradas entre *loci* SSR y características de tamaño de semilla, algunos en los mismos grupos de ligamiento como el *locus* de faseolina el cual ha sido asociado con tamaño de semilla, o en otras regiones del genoma.

Mensack *et al.* (2010) realizaron la evaluación de la diversidad genética entre los dos centros de domesticación de fríjol común usando tecnologías “OMICAS” que se refiere a transcriptómica, proteómica y metabolómica, los cuales fueron enfocados a diversidad cualitativa de fríjol común. Los tres enfoques fueron capaces de clasificar el fríjol común de acuerdo a su centro de diversificación; estos hallazgos fueron consistentes con la hipótesis de que existen diferencias en la transcripción de genes, proteínas y síntesis y metabolismo de pequeñas moléculas entre los cultivares representativos de fríjol común de diferentes centros de diversificación. Análisis metabolómico de múltiples cultivares dentro de los dos acervos de fríjol común revelan diferencias de pequeñas moléculas que fueron de gran magnitud que permite la identificación de una única huella de los cultivables.

## 2.7. Estudios genéticos realizados por medio del cebador universal M13

La metodología llevada a cabo con el cebador universal M13 surgió con el fin de disminuir los costos generados a partir de SSR automatizados, ya que este sistema presenta gran número de resultados en menor tiempo y con alta fidelidad en los resultados.

Estos estudios han sido llevados a cabo en diferentes especies, tanto en plantas como en animales, e incluso seres humanos; sin embargo, en algunas metodologías llevadas a cabo en el proceso de estandarización se han obtenido amplificaciones inespecíficas, principalmente para grandes genomas, de esta manera se ha realizado un mejoramiento del proceso de amplificación y marcaje de los productos de PCR conllevando a una optimización de los resultados, obteniéndose hoy en día una metodología ampliamente usada con alto grado de fiabilidad.
Oetting *et al.* (1995) fue el primer grupo en usar el método fluorescente para propósitos de genotipificación y usó 5 pares de cebadores para ejecutar diferentes amplificaciones multiplex. La técnica fue basada en un cebador universal M13 marcado con fluorescencia, el cual permitió análisis de secuenciación automatizada de ADN y subsecuente genotipificación con alta precisión y tamaño de los alelos.

Corrêa *et al.* (2000) realizaron una investigación para la obtención de un gen de resistencia a la "roya" en fríjol, la cual es producida por el hongo *Uromyces appendiculatus*. Para ello utilizaron dos variedades de fríjol, OuroNegro quien posee el gen de resistencia y Pinto111, el vulnerable. Después de obtener el gen diseñaron marcadores microsatélites con la adición en el cebador *forward* de la secuencia de M13 para marcar los microsatélites amplificados y de esta manera generar datos acerca de la expresión génica, ya que se infería acerca de, si era un gen involucrado o varios genes los que conferían la resistencia.

Estudios realizados por Srnić *et al.* (2005) en trigo para determinar la resistencia a la enfermedad (oidio), que es producida por un hongo de género *Uncinula spp.*, la cual consiste en un cubrimiento del micelio del hongo en las partes aéreas de la planta, en forma de estrella, produciendo un amarillamiento y posterior senescencia de las hojas; trabajó con líneas de germoplasma de trigo NC96BGTA4 y NC99BGTAG11 que presentan la resistencia a la

enfermedad y se determino la herencia, la localización cromosomal y ligamiento con marcadores moleculares.

Horvath *et al.* (2009), realizaron estudios de diversidad genética y desequilibrio de ligamiento (LD) en trigo en materiales mejorados y silvestres de la colección referencia (272 + 242) respectivamente.

Entre tanto la metodología usada por Arruda *et al.* (2010), quienes trabajaron en la amplificación de 8 *loci* en dos especies de anfibios, 7 *loci* para *Rhinella schneideri* (Bufonidae) y 1 *loci* para *Hipsiboas raniceps* (Hylidae), obtuvieron que la secuencia utilizada, el cebador M13, amplificara secuencias inespecíficas, según Arruda *et al.* (2010) esto se debe a que los protocolos de PCR para esta metodología siempre utilizan tres tipos de cebadores, dos de ellos no fluorescentes, los cuales contienen un cebador *Forward* y un *Reverse* que reconoce una secuencia especifica del genoma de la especie a estudiar, y luego un cebador fluorescente con la secuencia la cual contiene el fluorocromo que le da la cualidad de la fluorescencia al producto amplificado. Este último cebador con secuencia M13 generó amplificaciones inespecíficas debido a la homología existente entre el cebador y el genoma de las especies estudiadas.

Sin embargo Arruda *et al.* (2010) modifican el proceso de amplificación; las condiciones consistieron en pausar el proceso de la PCR en los últimos 10 ciclos, momento en el cual se agrega a cada una de las reacciones el primer M13 con el fluorocromo (Fig. 4), resultando en un considerable incremento de la agudeza de la amplificación, por ello se obtienen amplificados de las regiones de interés dando una precisión del 94%, esto se logra debido a que en las reacciones finales existe poca competencia entre los cebadores y consiguientemente el poco tiempo que pueda tener el M13 para generar amplificaciones inespecíficas, por lo que su uso se limita solamente a marcar con fluorescencia los amplificados; adicionalmente el cebador M13 presenta poca homología con los genomas conocidos actualmente, y aún menos con genomas pequeños.

Oblessuc *et al.* (2009), fue el primer grupo en trabajar con microsatélites marcados con fluorescencia mediante el cebador M13 en fríjol común para propósitos de mapeo genético, para ello diseñaron 50 microsatélites IAC obtenidos de librerías. Para los propósitos de marcaje usaron 2 colores (FAM, azul) y (HEX, verde) los cuales fueron secuenciados en *ABI 3730*,

(Fig. 3) (Applied Biosystems), y analizados en el software GeneMapper v.3.7. Se estandarizó la metodología de amplificación y marcaje de los SSR, dicho proceso arrojo datos muy confiables en poco tiempo; menos de lo requerido cuando se realiza tinción en nitrato de plata con geles de poliacrilamida.

Kwak *et al.* (2009) plantearon dentro de sus objetivos elucidar como dos eventos de domesticación geográficamente distintos modificaron la estructura y el nivel de diversidad genética en fríjol común. Para ello analizaron la composición genética de 346 accesiones silvestres y domesticadas de fríjol provenientes de los acervos Mesoamericano y Andino con 26 marcadores microsatélites fluorescentes, marcados con la metodología de M13, distribuidos por todo el genoma. Identificaron nueve poblaciones, entre silvestres y domesticados, de fríjol común, las cuales incluían 4 de origen Mesoamericano y 4 de origen Andino. La novena población correspondió al putativo ancestral Silvestre de las especies, el cual fue calificado como una población Mesoamericana. Se presentó una gran congruencia con la implementación y comparación entre los software *STRUCTURE* y *DARWIN* los cuales confirmaron las relaciones genéticas entre las accesiones y poblaciones observadas. También se observó una baja diversidad genética y alto desequilibrio de ligamiento (LD) en las poblaciones domesticadas más que en las silvestres.

Burle *et al.* (2010) realizaron estudios en la diversidad de microsatélites y la estructura genética entre cultivables en fríjol común de Brasil, centro secundario de diversidad. La población de estudio comprendió 279 genotipos donde se usaron 67 microsatélites, distribuidos en los 11 grupos de ligamiento, por medio de la metodología económica de marcaje fluorescente M13. Los resultados mostraron una baja diversidad genética comparada a la diversidad en los centros de diversificación primaria. En este estudio se evaluaron genotipos de los acervos Mesoamericano y Andino como controles de diversidad los cuales fueron claramente distinguidos. El grupo Mesoamericano consistió de dos subpoblaciones con alto nivel de mezcla entre ellos conllevando a una gran proporción de híbridos establecidos no observados en los centros de domesticación, así Brasil puede ser considerado como un centro de diversificación secundaria de fríjol común (Burle *et al.* 2010).

# 3. OBJETIVOS

## 3.1. Objetivo general

- Analizar la estructura y diversidad genética de una colección referencia de 202 genotipos de fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L) a partir de SSRs fluorescentes.

## 3.2. Objetivos específicos

- Estandarizar la amplificación de 40 SSRs fluorescentes con marcaje terminal y 12 con el cebador universal M13 marcado con fluorocromo.

- Determinar la estructura y la diversidad genética de la muestra de estudio.

- Clasificar las agrupaciones encontradas en el estudio dentro de las razas establecidas para fríjol común.

- Realizar comparación de tres grupos de marcadores fluorescentes A, B y C en el comportamiento de estructura poblacional.

# 4. MATERIALES Y MÉTODOS

## 4.1. Obtención del material vegetal y extracción de ADN

Un total de 202 genotipos de fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) constituyen la Colección Referencia del programa de fríjol del CIAT los cuales fueron evaluados en este estudio (Anexo 1); además se incluyeron dos genotipos control, DOR364 (Dorado) del acervo Mesoamericano; y G19833 (Chauchachuga) del acervo Andino (Fig. 5). Estas accesiones hacen parte de la Colección *Core* de *Phaseolus vulgaris* L. del CIAT, las cuales fueron seleccionados con base en condiciones agro-ecológicas (variabilidad en la precipitación, suelo, temperatura y tiempo de floración) en su lugar de origen (Tohme *et al*. 1996).

**Acervo Genético Mesoamericano** **Acervo Genético Andino**

**A. DOR364 (Dorado)** **B. G19833 (Chauchachuga)**

**Fig. 5: Genotipos Controles.** A) DOR364 Mesoamericano; B) G19833 (Chauchacuga) Andino.

Para la obtención de ADN, el material vegetal fue cosechado en invernadero 3 semanas después de sembrada la semilla; se seleccionó 5 gramos de tejido foliar joven (trifolios) por cada genotipo y se maceró con nitrógeno líquido, luego se almacenó en *freezer* a -80°C para la posterior extracción de ADN la cual se realizó según la metodología propuesta por Dellaporta *et al*. (1983). El ADN fue resuspendido en Buffer TE; posteriormente las muestras fueron preparadas en una mezcla de 2 µl de ADN, 7µl de Blue Juice (2x) y 3µl de agua para un volumen final de 12µl, se evaluó en gel de calidad en agarosa a una concentración del 1%, las

muestras fueron teñidas con el intercalante de ADN GelRed (Biotium), el cual reacciona con luz Ultravioleta (UV) para la visualización de las bandas. La cuantificación de la concentración de ADN se llevó a cabo con el software Quantity One® v 4.0.3. Este programa calcula la cantidad de ADN en cada una de las bandas obtenidas en gel de agarosa de acuerdo a las extrapolaciones que realiza con los patrones de concentración de ADN lambda de 100, 200, 300 y 400ng/µl. Se realizó dilución de ADN a 5ng/µl para la amplificación en PCR.

### 4.2. Amplificación de microsatélites Fluorescentes

Se utilizó un total de 88 SSR, de los cuales 36 (Anexo 2 Grupo A) fueron previamente amplificados en un set de 604 genotipos cuyo grupo contiene el 90% de los genotipos de este análisis (Blair *et al*. 2009). Los SSR restantes corresponden a 40 SSR con marcaje terminal (Anexo 2 Grupo B) y 12 con cebador universal fluorescente M13 (Anexo 2 Grupo C), seleccionados de (Yu *et al.* 2000; Gaitán *et al.* 2002; y Blair *et al.* 2003). De este último grupo se seleccionaron parcialmente 24 SSR, sin embargo no se logró amplificación en el 50% de los SSR. La totalidad de los microsatélites en estudios previos (Diaz & Blair 2006; Blair *et al.* 2009) presentaron una alto contenido de información polimórfica (PIC) y se seleccionaron para conformar paneles de 4 marcadores con diferentes colores, para un total de 21 paneles. Estos marcadores están distribuidos a través de genoma de fríjol, el cual contiene 11 grupos de ligamiento, observándose así que el grupo de ligamiento 2 presenta 15 marcadores mientras el grupo de ligamiento 8 presenta 3 marcadores de todos los empleados en este estudio. Los marcadores (BMd03, BMd46, BM149, BM165, BM153, BM202 y BM213) no han sido mapeados, por lo tanto no se conoce acerca del grupo de ligamiento al que pertenecen (Fig. 6).

Las amplificaciones para los SSRs con marcaje terminal fueron llevadas a cabo en placas de 96 pozos en termocicladores PTC 100 (MJ Research) y Eppendorf (Mastercycler pro. Vapo. Project). El coctel para PCR empleado por reacción se llevo a cabo en un volumen final de 20µl mezclando 30ng de ADN; Buffer 1X (10 mM de Tris HCl pH 8.8, 50 mM de KCl, 0.1% de TritonX-100); Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) 2mM; dNTP's 0.4 mM; 2 pmol de cada cebador (*forward* y *reverse*); y 1 U de *Taq pol.* (dilución 1:8). Para la amplificación de los cebadores fluorescentes con marcaje terminal las condiciones de amplificación fueron: 93°C x 3min; 93°C

x 30seg; Temperatura de alineamiento (Ta) x 30seg; Repetir el paso 2 al 4 35 veces; 72°C x 45min; 10°C x 10min; Fin.

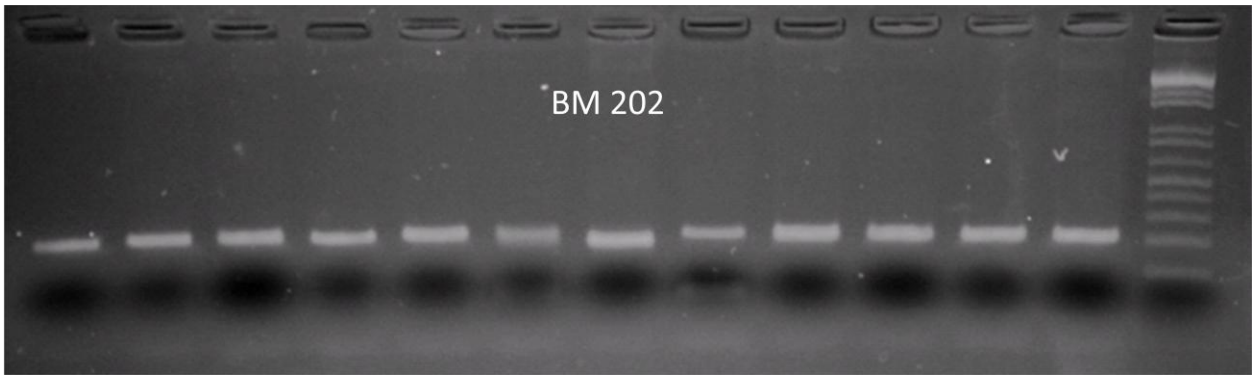
**Fig. 6: Marcadores empleados en el estudio donde se observa su distribución a través de los 11 Grupos de ligamiento**, es solo representativa y no equivale a la posición real de los marcadores dentro de cada cromosoma. Los marcadores que presentan el asterisco (*) son génicos, los que no lo presentan son genómicos, los de color azul pertenecen al grupo A, los de color verde al grupo B y los de color rojo grupo C.

La calidad del producto de amplificado se revisó en gel de agarosa a una concentración de 1.6%, el peso de cada amplificado se comparo con el marcador de peso molecular de 1Kb Plus BRL Markers & Standards Ladder. Se tomó 5µl de producto de amplificado y se mezcló con Blue Juice y GelRed (Biotium), posteriormente se visualizó en luz U.V. (Fig. 7).

Para la metodología de M13 se realizaron 2 reacciones de PCR independientes en placas de 96 pozos. En la primer reacción se amplificaron los cebadores (*forward* y *reverse*), el *forward* posee una secuencia adicional en su extremo 5' de 18 pares de bases, que pertenece al cebador M13 (TGTAAAACGACGGCCAGT), estos dos cebadores unidos reciben el nombre de cebador quimera, mientras que el *reverse* permanece inalterado; se realizó la PCR en un volumen final de 20µl por cada reacción que contenían 30ng de ADN; Buffer 1X (10 mM de Tris HCl pH 8.8, 50 mM de KCl, 0.1% de TritonX-100); Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) 2mM; 0.4 mM dNTP's; 2 pmol de cada cebador (*forward* y *reverse*); y 1 U de *Taq pol.* (dilución 1:8). Para la segunda PCR se tomó 3 µl de amplificado obtenidos en la primera reacción y se preparó un nuevo coctel que contenía, 3µl de amplificado; Buffer 1X (10 mM de Tris HCl pH 8.8, 50 mM de KCl, 0.1% de TritonX-100); 1.5 mM $MgCl_2$; 0.2 mM dNTP's; 0.06 pmol de cebador (*forward* y *reverse*), 0.75 pmol de cebador M13 marcado con fluorocromo (Fam, azul) (Pet, rojo) (Ned, amarillo) y (Vic, verde) (Tabla. 3) y 1 U de *Taq. Pol.* en un volumen final de 20µl.

Se realizaron dos reacciones de PCR en el proceso de amplificación y marcaje con M13 con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas. Para la primera reacción de PCR los pares de cebador *forward* y *reverse* fueron usados para amplificar los fragmentos de microsatélites. Así los fragmentos amplificados en la PCR primaria incluyen la secuencia de M13 en el extremo 5' de la secuencia de cebador *forward*. Las condiciones de PCR para esta primer reacción consisten de 94°C x 2 min; 94°C x 30seg, Temperatura de alineamiento (Ta) x 1min; se repite 35 ciclos del paso 2 al 4; y 40seg x 72°C, con una extensión final de 3min x 72°C. Para la reacción de PCR secundaria se adicionó el cebador M13 marcado con fluorocromo el cual se unió a la secuencia complementaria obtenida en la primer reacción, los ciclos consistieron de 94°C x 2min; 94°C x 30seg; 56°C x 45seg; 72°C x 45seg; repetir el paso 2 a 4, 30 veces; seguido por 8 ciclos de 94°C x 30seg; 53°C x 45seg; y 72°C x 45seg; y 72°C x 3min para extensión final.

**A.**




**B.**

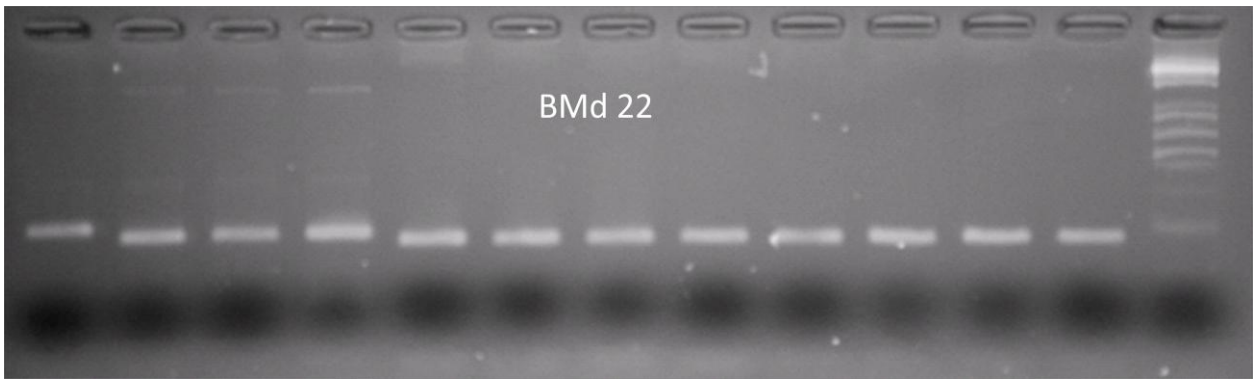



**Fig. 7: Fotografías en transiluminador (UV) de los marcadores** (A) BM 202 y (B) BMd 22 para control de calidad en gel de agarosa a una concentración de 1.6%. En el extremo derecho de la imagen se observa el marcador de peso molecular de 1Kb Plus BRL Markers & Standards Ladder.

Una vez obtenidos todos los productos de amplificado se realizó la mezcla de acuerdo a los paneles que están conformados por los marcadores, estas mezclas se llevaron a cabo en placas de 96 pozos donde se combinó el producto de PCR de los 4 cebadores, a partir de estas mezclas se tomó una alícuota de 1µl y se llevaron de nuevo a una placa de 96 pozos para ser enviadas a la Universidad de Cornell (Ithaca – NY. USA) para el análisis de los fragmentos de los microsatélites marcados con fluorocromo a través del secuenciador de ADN Applied Biosystem 3730xl (Applied Biosystem) (Fig. 2).

Para el proceso de detección de las muestras en el *ABI 3730* se alicuotó de cada muestra 0.5µl para adicionarlo con 9 µl de Formamida Hi Di mix, 0.06 µl del marcador de peso estándar GeneScan-500LIZ (Applied Biosystems) y 0.44 µl de ddH2O, para un volumen final de 10 µl por

reacción. La muestra en la nueva placa se denaturó a 94°C durante tres minutos para que finalmente fuese leída por capilaridad en el secuenciador *ABI 3730*xl.

### 4.3. Análisis de datos

El tamaño de los alelos, en pares de bases, fue estimado mediante el software GeneMapper® versión 3.7 (Applied Biosystems) (Fig. 8) el cual muestra picos del color correspondiente a cada uno de los marcadores. Después, se descargaron los datos de alelos para cada genotipo en cada uno de los *loci*, organizándose en un archivo Excel Microsoft® office. Subsiguientemente, se corrió el programa de AlleloBin (ICRISAT) para cada uno de los genotipos. Este programa comprueba, si los tamaños de fragmentos observados se ajustan al tamaño de alelos esperados basados en las unidades de longitud repetidas en el microsatélite (Idury & Cardon 1997).

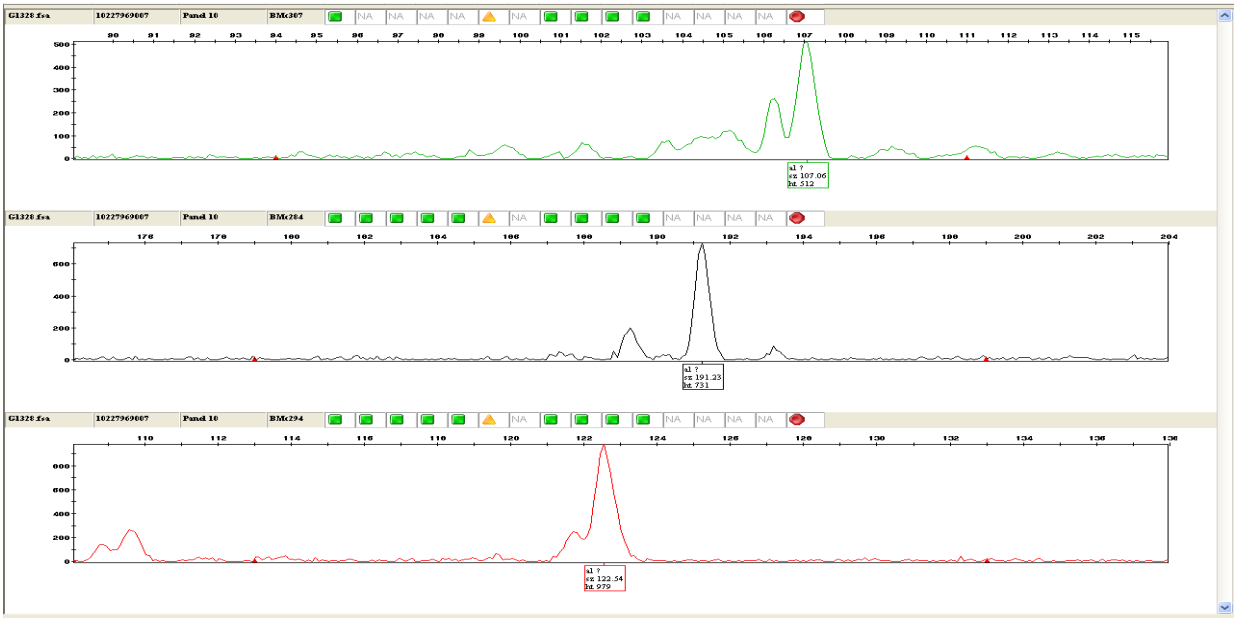


**Fig. 8: Picos obtenidos a partir de las lecturas con GeneMapper,** cada uno de los colores corresponde a un marcador diferente, el tamaño de los alelos es señalado en el eje X y la intensidad de la señal en el eje Y.

### 4.3.1 Análisis de la estructura de población

La estructura genética de la Colección Referencia de cultivados fue analizada mediante el programa *STRUCTURE* (Pritchard *et al.* 2000., Falush *et al*. 2003). Este programa plantea subdividir la muestra en poblaciones en las que se logre el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se trata de un algoritmo de análisis de clúster, basado en criterios de genética de poblaciones, (probabilidad condicionada) y con la ventaja que ofrece resultados con un cierto grado de objetividad, por lo que la agrupación final no depende sólo del criterio del investigador.

El número de poblaciones (K) fue confirmado mediante un análisis bayesiano de Monte Carlo con cadenas Markov (MCMC) empleando 10.000 series markovianas, implementado en el programa *STRUCTURE* (Pritchard *et al*., 2000; Falush *et al*., 2003), empleando la opción de "modelo de ligamiento". Este método permite clasificar los genotipos en 43 poblaciones, mediante el procedimiento de minimizar el desequilibrio de ligamiento dentro de las mismas.

El programa *DARWIN* se empleó para la realización de árboles que representan la estructura de la diversidad basado en métodos de distancias. Se empleó el algoritmo de *Neighbor-Joining Tree* "reunión por vecindad", para obtener un árbol de distancias genéticas, el cual consiste en agrupar los genotipos de acuerdo al número de alelos compartidos, expresando de esta manera la cercanía que pueda presentar los individuos.

### 4.3.2 Análisis de diversidad genética

Mediante el programa PowerMarker (Liu & Muse 2005), se evaluó el número de alelos polimórficos, Contenido de Información Polimórfica (PIC), Heterocigosidad Observada y Diversidad Genética.

El Contenido de Información Polimórfica fue calculado según (Botstein *et al*. 1980, citado por Li 2002) así:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{k} P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} 2p_i^2 p_j^2$$

Donde:

Pi=Frecuencia del i-ésimo alelo

Pj=Frecuencia del j-ésimo alelo

K=número de alelos

La diversidad genética, frecuentemente se refiere a la heterocigosidad esperada, es definida como la probabilidad de que dos alelos que sean escogidos aleatoriamente de la población sean diferentes. Según Weir (1996) un estimador de la diversidad genética en el l-ésimo *locus* es:

$$Di= (1- \sum_{i=1} P_i^2)/(\frac{1- 1+ f}{n})$$

Donde:

f= Coeficiente de endogamia

i= alelos en el *locus l*

l= *l*-ésimo *locus*

P*i*=frecuencia del alelo *i* en el *l*-ésimo *locus* de la población

n=número de individuos muestreados

# 5. RESULTADOS

## 5.1. Número de alelos y diversidad genética

En un total de 202 accesiones se realizó un genotipage con 88 marcadores microsatélites fluorescentes (Anexo 3). De los 88 marcadores, 76 fueron diseñados con marcaje terminal fluorescente (Anexo 4 y 5) y 12 con la metodología del primer universal M13. Los marcadores evaluados presentaron una distribución por todo el genoma de fríjol común con un promedio de 8 marcadores microsatélites por grupo de ligamiento, siendo los cromosomas b02 y b04 los que contienen más marcadores microsatélites con 15% y 13% del total, respectivamente (Fig. 6).

Todos los marcadores evaluados dentro de la colección referencia fueron polimórficos con valores de 2 alelos por *locus* para los microsatélites genómicos BM149, GATs54, BMd12 y BMd40, hasta 50 alelos para el marcador génico PV-at001, siendo este un microsatélite muy informativo ya que también presentó un alto Contenido de Información Polimórfica (PIC) 0.97. En contraste con el microsatélite genómico trialélico BMd51 hubo un PIC de 0.02. En total el promedio obtenido del PIC para los 88 SSR fue de 0.60, así mismo se identificó un total de 960 alelos con un promedio de 10.7 por marcador. La diversidad genética en promedio fue de 0.65, con una heterocigosidad observada de 0.11 la cual según Kwak & Gepts (2009) es muy baja y característico de especies autógamas (Tabla 2).

Todos los microsatélites detectaron un único *loci* a excepción del marcador BM188, el cual presentó dos patrones de picos y rangos en los tamaños generando alelos de 147 – 151 pb para BM188A y 161 – 187 pb para BM188B. Este tipo de alelo de doble *locus* también fue detectado por Blair *et al.* (2009a) donde encontraron 2 rangos en los tamaños alélicos para este marcador cuyos fragmentos estuvieron entre 130 – 153 pb para BM188A y 160 – 200 pb para BM188B, además al realizar el mapeo genético confirmaron que los dos *loci* son independientes en grupos de ligamiento separados (datos no publicados CIAT).

Dentro del análisis realizado en los grupos por separado, se encontró que en el grupo de marcadores A se obtuvo un total de 380 alelos con un promedio de 10 alelos por *locus*; la diversidad genética observada tuvo un promedio de 0,66 un Contenido de Información Polimórfica (PIC) de 0.54 (Anexo 4). Mientras tanto para el grupo de marcadores B el total de

alelos observados fue de 476 con un promedio de 13 alelos por *locus*, la diversidad genética fue de 0,62, un poco más baja que la obtenida para el grupo de marcadores A, y un PIC de 0,61, siendo este valor más alto para el grupo de marcadores B (Anexo 5).

Los marcadores del grupo A presentaron una distribución por todo el genoma, diferente a lo observado con los marcadores del grupo B los cuales están ausentes en los grupos de ligamiento b08, b10 y b11 (Fig. 6).

Los tipos de marcadores evaluados (génicos y genómicos), presentaron pocas diferencias entre sí con respecto a los promedios obtenidos para las variables analizadas y mencionadas anteriormente, ya que por un lado se presentaron marcadores con altos valores como es el caso observado para el microsatélite génico PV-at001 con 50 alelos por *locus*, y por otro lado los marcadores genómicos BM149, GATs54, BMd12 y BMd40 con dos alelos por *locus*. Sin embargo dentro de los marcadores genómicos los microsatélites BM137, BM187 y BM200 presentaron 33, 42 y 41 alelos respectivamente, así mismo el PIC para estos marcadores fue superior a 0.90, contrario para lo observado en los marcadores génicos cuyos valores fueron más bajos (Anexo 5).

**Tabla. 2: Evaluación de 202 genotipos por medio de 88 SSRs fluorescentes analizados en Powermarker**

| MARCADORES GÉNICOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **MARCADOR** | **No ALELOS** | **VIABILIDAD$^{\phi}$** | **DIVERSIDAD GENÉTICA** | **HETEROCIGOCIDAD** | **PIC$^{*}$** |
| **BM197** | **3** | 0,90 | 0,59 | 0,011 | 0,51 |
| **BM213** | 17 | 0,99 | 0,76 | 0,945 | 0,72 |
| **BM68** | 4 | 1,00 | 0,64 | 0,861 | 0,58 |
| **BMc161** | 5 | 0,97 | 0,71 | 0,000 | 0,66 |
| **BMc206** | 7 | 0,99 | 0,76 | 0,025 | 0,72 |
| **BMc283** | 11 | 1,00 | 0,71 | 0,000 | 0,67 |
| **BMc284** | 15 | 0,93 | 0,84 | 0,000 | 0,82 |
| **BMc292** | 13 | 0,96 | 0,83 | 0,440 | 0,81 |
| **BMc294** | 11 | 1,00 | 0,81 | 0,010 | 0,79 |
| **BMc307** | 6 | 1,00 | 0,72 | 0,070 | 0,67 |
| **BMc352** | 11 | 1,00 | 0,70 | 0,960 | 0,65 |
| **BMd01** | 14 | 0,99 | 0,78 | 0,050 | 0,75 |
| **BMd02** | **3** | 1,00 | 0,50 | 0,025 | 0,38 |
| **BMd07** | 8 | 1,00 | 0,72 | 0,000 | 0,67 |
| **BMd10** | **3** | 1,00 | 0,52 | 0,000 | 0,45 |
| **BMd15** | 6 | 0,97 | 0,58 | 0,282 | 0,50 |
| **BMd16** | 5 | 0,98 | 0,51 | 0,036 | 0,39 |
| **BMd17** | **3** | 0,99 | 0,66 | 0,080 | 0,58 |
| **BMd18** | 4 | 0,98 | **0,14** | 0,071 | **0,13** |
| **BMd20** | 6 | 0,93 | 0,69 | 0,027 | 0,64 |
| **BMd22** | **3** | 1,00 | 0,53 | 0,000 | 0,44 |
| **BMd26** | 8 | 0,99 | 0,69 | 0,719 | 0,64 |
| **BMd45** | 19 | 1,00 | 0,76 | 0,617 | 0,73 |
| **BMd47** | **3** | 0,97 | 0,48 | 0,010 | 0,37 |
| **BMd53** | **3** | 0,97 | 0,50 | 0,000 | 0,39 |
| **PV-ag001** | 4 | 1,00 | 0,53 | 0,000 | 0,46 |
| **PV-gaat001** | 5 | 1,00 | 0,54 | 0,000 | 0,48 |
| **PV-at007** | 13 | 1,00 | 0,87 | 0,000 | 0,86 |
| **PV-ag004** | 8 | 1,00 | 0,78 | 0,000 | 0,74 |
| **PV-ag003** | **3** | 0,99 | 0,57 | 0,000 | 0,48 |
| **PV-at001** | **50** | 0,99 | **0,97** | 0,035 | **0,97** |
| **PV-at003** | 7 | 0,98 | 0,51 | 0,178 | 0,43 |
| **PROMEDIO** | **9** | **0,98** | **0,65** | **0,17** | **0,61** |
| **MARCADORES GENÓMICOS** | | | | | |
| **AG01** | 6 | 0,94 | 0,43 | 0,074 | 0,40 |
| **BM114** | 10 | 1,00 | 0,80 | 0,000 | 0,79 |
| **BM137** | 33 | 0,85 | **0,95** | 0,082 | **0,94** |
| **BM138** | 7 | 1,00 | 0,59 | 0,000 | 0,52 |
| **BM139** | 17 | 0,98 | 0,65 | 0,051 | 0,64 |
| **BM140** | 13 | 0,92 | 0,48 | 0,033 | 0,46 |
| **BM141** | 18 | 0,96 | 0,78 | 0,042 | 0,75 |
| **BM142** | 3 | 1,00 | 0,49 | 0,000 | 0,39 |
| **BM143** | 26 | 1,00 | 0,91 | 0,085 | 0,90 |
| **BM149** | **2** | 1,00 | 0,39 | 0,015 | 0,31 |
| **BM151** | 5 | 1,00 | 0,62 | 0,000 | 0,57 |
| **BM152** | 24 | 1,00 | 0,88 | 0,473 | 0,86 |
| **BM153** | 14 | 1,00 | 0,83 | 0,000 | 0,81 |
| **BM154** | 15 | 1,00 | 0,88 | 0,000 | 0,86 |
| **BM156** | 21 | 0,99 | 0,82 | 0,056 | 0,80 |
| **BM157** | 19 | 1,00 | 0,85 | 0,647 | 0,83 |
| **BM160** | 16 | 0,99 | 0,68 | 0,030 | 0,66 |
| **BM161** | 6 | 1,00 | 0,75 | 0,000 | 0,71 |
| **BM165** | 13 | 1,00 | 0,84 | 0,000 | 0,82 |
| **BM167** | 4 | 1,00 | 0,51 | 0,000 | 0,39 |
| **BM170** | 13 | 1,00 | 0,79 | 0,000 | 0,77 |
| **BM172** | 17 | 0,91 | 0,71 | 0,126 | 0,70 |
| **BM175** | 17 | 0,99 | 0,72 | 0,010 | 0,70 |

Continuación tabla 2.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **BM181** | 7 | 1,00 | 0,66 | 0,000 | 0,61 |
| **BM183** | 11 | 0,98 | 0,75 | 0,025 | 0,71 |
| **BM184** | 6 | 1,00 | 0,61 | 0,000 | 0,55 |
| **BM185** | 10 | 1,00 | 0,68 | 0,000 | 0,63 |
| **BM187** | **42** | 0,98 | 0,93 | 0,076 | 0,93 |
| **BM188A** | 5 | 0,92 | 0,52 | 0,016 | 0,41 |
| **BM188B** | 13 | 0,92 | 0,76 | 0,022 | 0,74 |
| **BM189** | 7 | 1,00 | 0,70 | 0,000 | 0,65 |
| **BM199** | 10 | 1,00 | 0,51 | 0,000 | 0,47 |
| **BM200** | 41 | 0,84 | 0,93 | 0,036 | 0,93 |
| **BM201** | 9 | 0,93 | 0,77 | 0,129 | 0,74 |
| **BM202** | 11 | 1,00 | 0,68 | 0,000 | 0,62 |
| **BM205** | 11 | 0,99 | 0,70 | 0,020 | 0,66 |
| **BM209** | 20 | 0,97 | 0,86 | 0,641 | 0,84 |
| **BM211** | 8 | 0,97 | 0,80 | 0,000 | 0,78 |
| **BM212** | 18 | 1,00 | 0,83 | 1,000 | 0,81 |
| **BM53** | 20 | 1,00 | 0,60 | 0,055 | 0,53 |
| **BM98** | 5 | 1,00 | 0,49 | 0,000 | 0,46 |
| **BMd03** | 7 | 1,00 | 0,67 | 0,000 | 0,61 |
| **BMd08** | 5 | 0,93 | 0,55 | 0,032 | 0,46 |
| **BMd12** | **2** | 0,97 | 0,26 | 0,000 | 0,23 |
| **BMd33** | 18 | 1,00 | 0,73 | 0,204 | 0,69 |
| **BMd36** | 9 | 1,00 | 0,82 | 0,000 | 0,80 |
| **BMd40** | **2** | 1,00 | 0,47 | 0,000 | 0,36 |
| **BMd41** | 6 | 1,00 | 0,60 | 0,000 | 0,55 |
| **BMd42** | 3 | 1,00 | 0,21 | 0,000 | 0,19 |
| **BMd46** | 3 | 1,00 | 0,49 | 0,000 | 0,38 |
| **BMd51** | 3 | 0,98 | **0,02** | 0,005 | **0,02** |
| **BMd56** | 4 | 0,95 | 0,24 | 0,016 | 0,21 |
| **GATS11** | 6 | 1,00 | 0,41 | 0,000 | 0,38 |
| **GATs54** | **2** | 0,94 | 0,45 | 0,011 | 0,35 |
| **GATs91** | 22 | 0,91 | 0,90 | 0,082 | 0,89 |
| **PV-cct001** | 5 | 0,97 | 0,10 | 0,010 | 0,10 |
| **PV-ctt001** | 9 | 0,99 | 0,76 | 0,096 | 0,72 |
| **PROMEDIO** | **12** | **0,97** | **0,64** | **0,070** | **0,60** |

[Φ] Porcentaje de viabilidad de los marcadores. * Contenido de Información Polimórfica.

## 5.2. Estructura de la población en fríjol común con 88 microsatélites

Para el análisis de la estructura poblacional en los 202 genotipos mediante los 88 SSR, la subdivisión de las poblaciones se realizó mediante el software *STRUCTURE* (Fig. 9). La designación de las razas y sub-razas dentro de cada acervo fue previamente realizada por Blair *et al.* (2009a) en un grupo de 604 genotipos.

En la estructura poblacional obtenida a partir de 88 SSR fluorescentes (Fig. 9), se pudo observar una clara separación de los acervos Mesoamericano, en color rojo, y Andino, en color verde para el *K* = 2, así como la división en seis poblaciones (*K* = 6), tres de la cuales pertenecieron al acervo Mesoamericano y tres al acervo Andino. (Fig. 9). El término "población" solo se aplica por conveniencia para designar los grupos generados por *STRUCTURE*, pero no en el actual estudio no son tomados como grupos naturales.

La separación de las accesiones dentro de los grupos se presentó de acuerdo al número *K* observándose en *K* = 2 los dos acervos, Mesoamericano y Andino, con algunas mezclas Mesoamericanas dentro de los Andinos y viceversa. Posteriormente para un *K* = 3 aparece el grupo de las Líneas avanzadas Andinas, de color azul oscuro, dentro del acervo Andino. En el acervo Mesoamericano la primera subdivisión fue realizada por el grupo de las Líneas Avanzadas Mesoamericanas, las cuales se observan de color amarillo, en un *K* = 4. Luego dentro del mismo acervo surge el grupo del complejo Durango-Jalisco en K = 5, presentándose de color azul oscuro. En este grupo se pude observar mezclas dentro de las razas del complejo Durango-Jalisco y el grupo de las Líneas avanzadas Mesoamericanas, así como en el grupo de la raza Mesoamérica, el cual en *K* = 6 se observa de color amarillo.

La diferenciación de los grupos dentro del acervo Andino (K = 6) estuvo compuesto de la sub-raza Nueva Granada 2 (en color rojo), con una considerable combinación con el grupo de la sub-raza Nueva Granada 1 (de color violeta). Dentro del grupo NG1 se localizaron todas las accesiones de la raza Perú la cual no se pudo diferenciar dentro de la población (Fig. 9).

Para el análisis de las poblaciones obtenidas a partir de *K* = 6, en el grupo de 88 marcadores microsatélites, se observó una combinación de las sub-razas Mesoamérica 1 y 2, las cuales conformaron la población 3, obtenida a partir de *STRUCTURE*. Además se encontró individuos del complejo Durango-Jalisco (D-J) en la población 3. Este nuevo agrupamiento según Díaz & Blair (2006), puede deberse a características como hábito de crecimiento, tamaño y forma de la semilla, lo cual puede conllevar a que se presente un poco de diferenciación entre las razas individuales del complejo, además puede ser debido también por el numero de SSR o su posición en el genoma.

El agrupamiento que se obtuvo para las líneas avanzadas, tanto Mesoamericanas (*K* = 1), como para Andinas, (*K* = 5), puede ser debido a que han sido sometidas a varios procesos de cruzamiento para obtener características de interés, por lo tanto comparten alelos de los mismos parentales conllevando a una gran similitud entre sí y por ende han pasado por un cuello de botella que los diferencian a parte de las accesiones de origen, además estas líneas no pertenecían a la colección referencia sino que fueron incluidas como controles en este estudio con el fin de generar más claridad en los agrupamientos obtenidos.

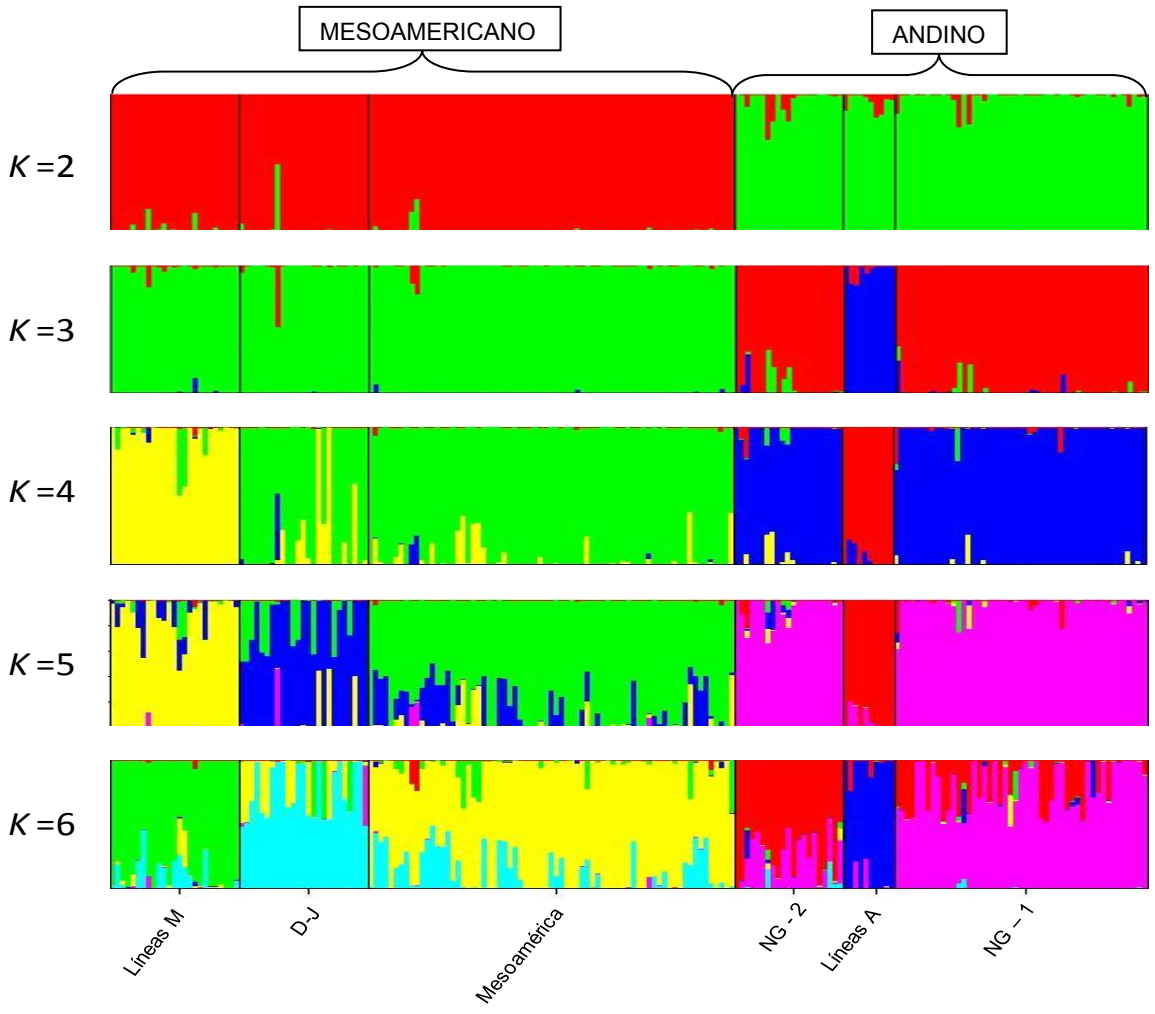



**Fig. 9: Análisis de la estructura poblacional con K = 2 a K = 6** en 202 genotipos cultivables de la colección referencia de fríjol común con 88 SSR, mostrando la subdivisión en las poblaciones. Las abreviaciones de los subgrupos para las poblaciones del acervo Mesoamericano, (Líneas M) Líneas avanzadas Mesoamericanas; (D-J) Complejo Durango-Jalisco, y final mente la raza Mesoamérica. Para el acervo Andino, (NG – 2) sub-raza Nueva Granada 2; (Líneas A) Líneas avanzadas Andinas, y (NG – 1) sub-raza Nueva Granada 1.

### 5.3. Análisis de estructura poblacional para el grupo de 40 SSR

Para el grupo de 40 SSR se obtuvo un *K* = 7 donde se observó la separación de cinco razas Mesoamericanas y dos Andinas (Fig. 10). La denominación de los grupos se ha realizado de acuerdo al porcentaje mayor de los individuos que componen la población. Dentro del Acervo Mesoamericano, en color verde, se presenta la población 1 denominada sub-raza Mesoamérica 1 (M1) con un 38%; en color naranja la población 2 denominada raza Mesoamérica (M) con 70% la cual es una mezcla de M1 y M2; en azul la sub-raza Mesoamérica 2 (M2) con 32% para conformar la población 3; en color rojo el complejo Durango-Jalisco (D-J) con 54%, y en color amarillo las Líneas avanzadas Mesoamericanas (Líneas M), para conformar la población 5, con un 48%. En el acervo Andino se obtuvo la separación de las Líneas avanzadas Andinas (Líneas A), de color azul oscuro, con 60%, para formar la población 6, y en violeta la población 7 que es combinación de las sub-razas Andinas Nueva Granada 1 y 2 (NG 1 y NG2) y la raza Perú, conformando un 88% de este grupo (Fig. 11).

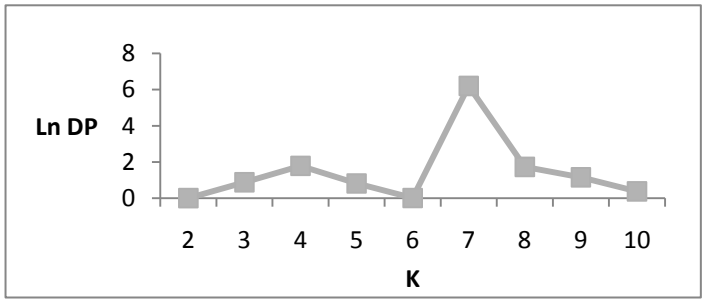



**Fig. 10: Comportamiento del logaritmo de probabilidad (Ln DP) en función del número de poblaciones (K) para el grupo de 40 SSR.**

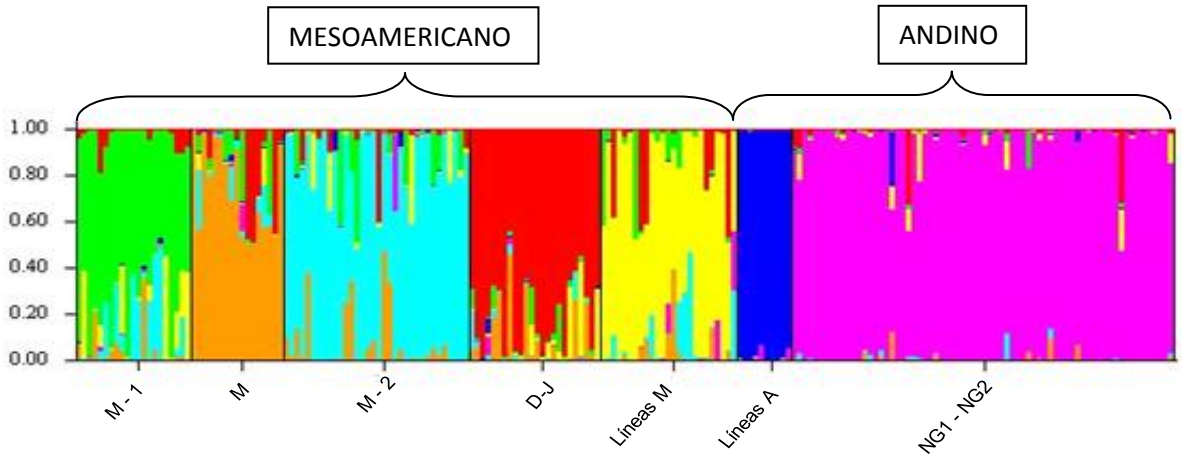



**Fig. 11: Análisis de la estructura poblacional en 202 genotipos cultivables de la colección referencia de fríjol común, evaluados con 40 SSR (K = 7).** (M-1) Mesoamérica 1; (M-2) Mesoamérica 2); (D-J-M) Durango-Jalisco y Mesoamérica; (D-J-G) Durango-Jalisco y Guatemala; (Líneas M) Líneas avanzadas Mesoamericanas; (Líneas A) Líneas avanzadas Andinas; (NG1) Nueva Granada 1; (NG2) Nueva Granada 2.

### 5.4. Análisis de estructura poblacional para el grupo de 36 SSR

En la estructura poblacional a partir de los 36 SSR, la prueba estadística de Evanno arrojó que el *K* óptimo fuese *K* = 8 (Fig. 12). A partir de este número de poblaciones se realizó una segunda corrida en *STRUCTURE* observándose la separación de ocho razas correspondientes a los acervos Mesoamericano y Andino (Fig. 13). Para el acervo Mesoamericano se pudieron distinguir cinco grupos, donde los nombres designados para cada grupo corresponden al porcentaje de individuos que lo compone. En color rojo, la sub-raza Mesoamérica 1 (M1) la cual contiene el 38% de los individuos de esta raza; en color naranja, la sub-raza Mesoamérica 2 (M2) con un 41%; en color azul claro, el complejo Durango-Jalisco y la raza Guatemala denominada complejo (D-J) presentando un 50%; en color marrón, las líneas avanzadas Mesoamericanas con 41%; y finalmente la raza Mesoamérica (M) (en color lila) que contiene una combinación de (M1, M2 y D2). Para las poblaciones Andinas se observan tres grupos, los cuales están compuestos por las Líneas avanzadas Andinas (Líneas A) que se agrupan con la sub-raza Nueva Granada 2 (NG2) que se representan de color azul oscuro con un 63%; en

color verde, la sub-raza Nueva Granada 1 (NG1) con 67%, y la raza Perú de color amarillo con 66%.

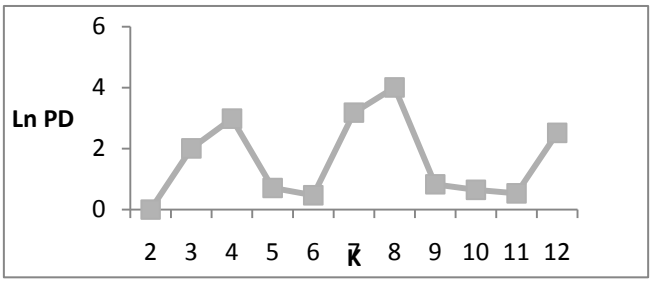



**Fig. 12: Comportamiento del logaritmo de probabilidad (Ln PD) en función del número K de poblaciones para el grupo de 36 SSR.**

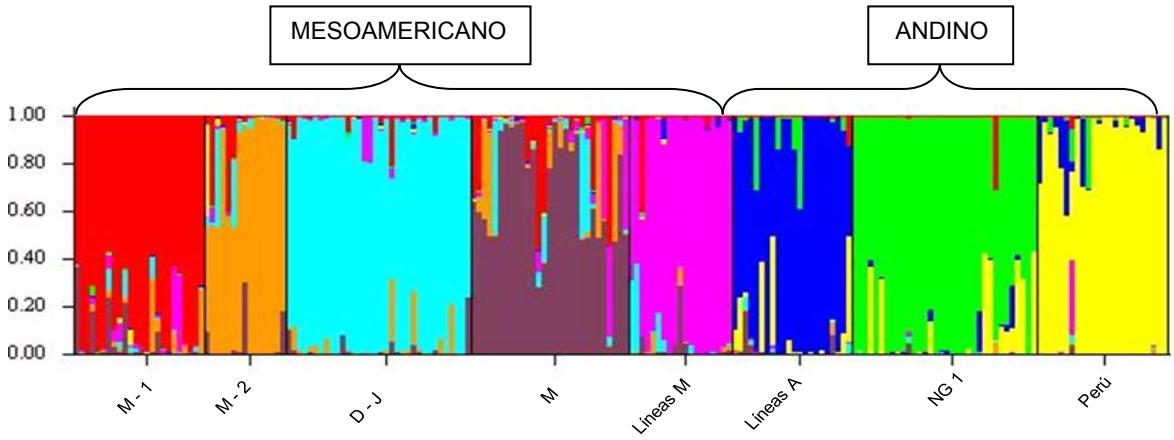



**Fig. 13: Análisis de la estructura poblacional en 202 genotipos cultivables de la colección referencia de fríjol común, evaluados con 36 SSR (K = 8).** (M-1) Mesoamérica 1; (M-2) Mesoamérica 2; (D-J-G) Durango-Jalisco y Guatemala; (M) Mesoamérica; (Líneas M) Líneas avanzadas Mesoamericanas; (Líneas A) Líneas avanzadas Andinas; (NG2) Nueva Granada 2; (NG1) Nueva Granada 1.

### 5.5. Análisis de coordenadas principales para 88 SSR

Este análisis, el cual se realizó por medio del programa Powermarker, permitió ilustrar mejor los ejes principales de variabilidad entre las accesiones, reflejando su ordenación en el espacio (Figura 14 A). Las tres coordenadas resultantes de éste análisis, explicaron un gran porcentaje de la totalidad de la diversidad genética (82.38%). El eje 1 explicó el 67.23% de la variabilidad, el eje 2, explicó el 7.92% de la variabilidad y el eje 3 el 7.23% de la variabilidad para la totalidad de los marcadores empleados.

La representación de la gráfica tridimensional permitió confirmar de manera espacial la estructura obtenida en *STRUCTURE*. De acuerdo con la gráfica la subdivisión más evidente ocurrió entre los acervos Mesoamericano y Andino para los tres grupos de marcadores evaluados. Dentro de cada uno de los acervos se observó la separación de las razas, las cuales presentaron el mismo comportamiento obtenido por *STRUCTURE*, generando así diferente número de poblaciones de acuerdo al grupo de marcadores estudiados.

De esta manera se puede observar en el análisis de 88 SSR una separación muy clara entre los subgrupos de cada acervo, así como la ubicación del genotipo control Mesoamericano (DOR364), el cual se agrupa dentro de la tercera población correspondiente al grupo denominado Mesoamérica, y el genotipo control Andino (G19833) quien se agrupa en la población número cuatro la cual corresponde a la población denominada Nueva Granada 2 (NG2). (Fig. 14 A).

### 5.6. Análisis de coordenadas principal para el grupo de 40 SSR

Para el grupo de 40 SSR, grupo A, se explicó un 78.19% de la variabilidad genética, en el cual el eje 1 explicó el 57.81% de la variabilidad, el eje 2, 12.03% de la variabilidad y el eje 3, 8.35% de la variabilidad (Fig. 14 B); se observan cinco poblaciones Mesoamericanas donde se distinguen la población Mesoamérica 1 (M1), que conforma la población 1; Mesoamérica 2, conforma la población 2 (M2); el complejo Durango-Jalisco (D-J) el cual se combina con individuos de la raza Mesoamérica (M), para formar la población 3, y con individuos de

Guatemala (G) para conformar la población 4; finalmente las líneas Mesoamericanas (LM) formando el grupo 5.

Entre tanto se obtuvo dos poblaciones del acervo Andino como son, líneas Andinas (LA) para formar la población 6, y la combinación de los individuos de las sub-razas Nueva Granada 1 y 2, además de los individuos de la raza Perú (NG1, NG2 y Perú) para conformar la población 7.

### 5.7. Análisis de coordenadas principales para el grupo de 36 SSR

Al evaluar 36 marcadores del grupo B, en el cual se explicó el porcentaje de la totalidad de la diversidad genética en 80.9% en donde el eje 1 explicó el 61.84% de la variabilidad, el eje 2, 11.34% de la variabilidad y el eje 3, 7.72% de la variabilidad (Fig. 14 C); se observaron cinco poblaciones dentro del acervo Mesoamericano correspondientes a los subgrupos Mesoamérica 1 (M1); Mesoamérica 2 (M2); Complejo Durango-Jalisco (D-J) combinado con la raza Guatemala (G); raza Mesoamérica, la cual contiene individuos M1 y M2, y las líneas avanzadas Mesoamericanas (Líneas M). Las subdivisiones del acervo Andino fueron tres, correspondientes a los subgrupos líneas avanzadas Andinas (líneas A) combinadas con los individuos de la raza nueva Granada 2 (NG2); raza Nueva granada 1 (NG1) y finalmente la raza Perú que forma un grupo diferenciado. De esta manera se puede observar que el grupo de 36 marcadores puede discriminar de forma clara las razas Andinas en comparación con los marcadores del grupo de 40 SSR. Para las poblaciones del acervo Mesoamericano ambos grupos de marcadores pudieron diferenciar cinco poblaciones, aunque con pocas diferencias entre el agrupamiento de los individuos para las poblaciones obtenidas.

**Fig. 14: Representación gráfica en tres dimensiones de la distribución y ubicación espacial de 202 genotipos cultivables a partir del análisis de coordenadas principales (*PCoA*).** A**.** Agrupamiento en 6 poblaciones por medio de 88 SSR, donde se señala la posición de los controles tanto Andino (G19833), como Mesoamericano (DOR364). **B.** Agrupamiento de 7 poblaciones por medio de 40 SSR. **C.** Agrupamiento de 8 poblaciones por medio de 36 SSR. Los colores de las poblaciones son correspondientes a los obtenidos en el software *STRUCTURE*. Las figuras geométricas representan los individuos de cada población y la gama de colores para cada población se presenta en las columnas correspondiente a cada figura.

### 5.8. Análisis de diversidad *Neighbor-Joining*

El análisis de las distancias genéticas entre accesiones fueron calculadas mediante el árbol *Neighbor-Joining* construido por el software *DARWIN* versión 5.0, el cual compara los genotipos que presentan mayor relación y los agrupan de acuerdo al número de alelos compartidos. De acuerdo a esto se observa la divergencia de los acervos Mesoamericano y Andino (Fig. 15 A y B).

El comportamiento de las poblaciones dentro de cada uno de los acervos, y el análisis de *Neighbor-Joining*, presentaron variación de acuerdo al grupo de marcadores evaluados (A y B), por tal razón existe diferencia en la agrupación de las accesiones. En el árbol obtenido para el grupo de marcadores A (Fig. 15 A) no se observó discriminación entre de los individuos lo cual conllevó al agrupamiento de las accesiones de tal manera que no se presentó una separación clara de las razas y sub-razas. En el grupo de marcadores B (Fig. 15 B), las accesiones denominadas M1 y M2 presentaron agrupaciones muy próximas, así mismo varias líneas mejoradas se agruparon entre sí dentro de la rama formada por estas sub-razas. Mientras tanto para las razas denominadas Durango y Guatemala, que conforman el complejo D-J, se generaron varias ramas en las cuales los individuos estuvieron más dispersos. En el caso del acervo Andino las sub-razas denominadas NG1 y NG2 se presentaron completamente combinadas, contrario a lo observado por los individuos de la raza Perú los cuales están más agrupados conformando una rama definida. De esta manera se pudo observar que los marcadores del grupo B presentaron una mayor discriminación de las poblaciones, más que los marcadores del grupo A, lo cual puede ser debido a que los marcadores del grupo A están ubicados en regiones más conservadas lo que incide en la poca diferenciación de los individuos.

En lo que corresponde a las líneas avanzadas Mesoamericanas y Andinas, se generaron grupos más definidos en ambos acervos para el caso de los marcadores del grupo A, mientras que para el grupo B el comportamiento de las líneas avanzadas fue diferente en el cual se agruparon con diferentes razas. Dicho comportamiento puede estar dado por la procedencia que presentan, ya que estas accesiones han sido sometidas a diversos cruces en el proceso de mejoramiento, lo que ha conllevado a que presenten alelos de diversas procedencias, y su agrupamiento se debe a que comparten más características entre sí que las que comparten con las demás razas.

### 5.9. Análisis molecular de varianza en el grupo de 88 SSR

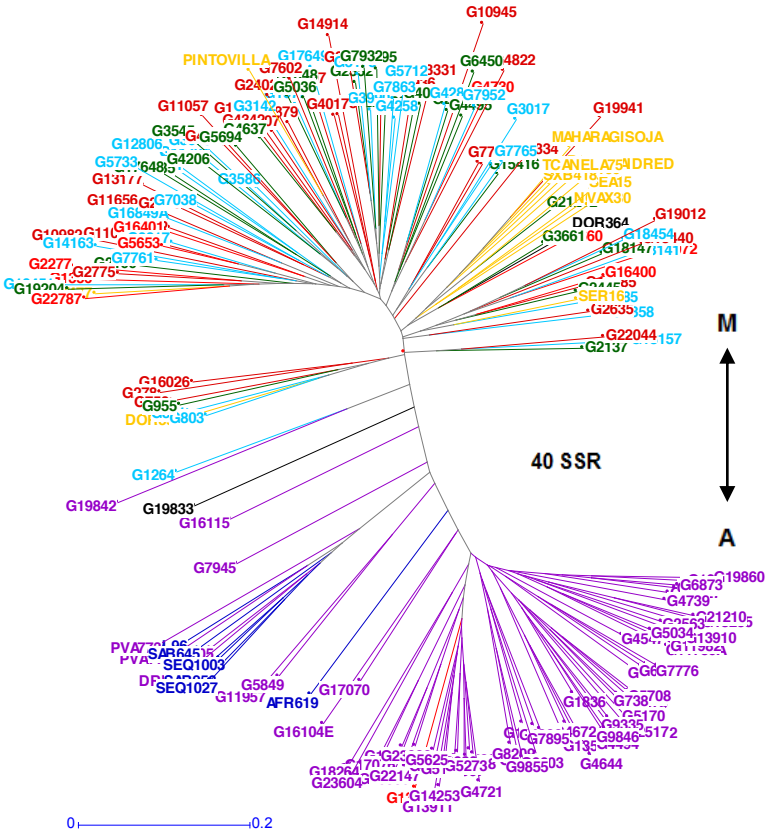
Se analizó la varianza molecular entre individuos, entre poblaciones y dentro de las poblaciones por medio del programa GeneAlex versión 6.1 (Peakall & Smouse 2007), lo cual indicó que las agrupaciones establecidas en las accesiones de la colección referencia de cultivables son significativas y que la mayoría de la variación es explicada por la interacción entre los individuos entre poblaciones (82%). Sin embargo se pudo observar que la variación entre las poblaciones (2%) fue más baja que la variación obtenida dentro de las poblaciones (16%). (Tabla 3). El grado de diferenciación genética entre poblaciones en términos de frecuencias alelicas fue de 0.023 **($F_{ST}$)**, lo cual según Wright (1978) este valor es bajo siendo un indicativo de poca diferenciación genética (Tabla 4), de esta manera una tendencia al incremento de los valores de $F_{ST}$ ($0 \leq F_{ST} \leq 1$) indicara incremento de la diferenciación genética.

**Tabla 3: Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA), comparando las poblaciones derivadas del análisis con el programa *STRUCTURE* para 88 SSR.**

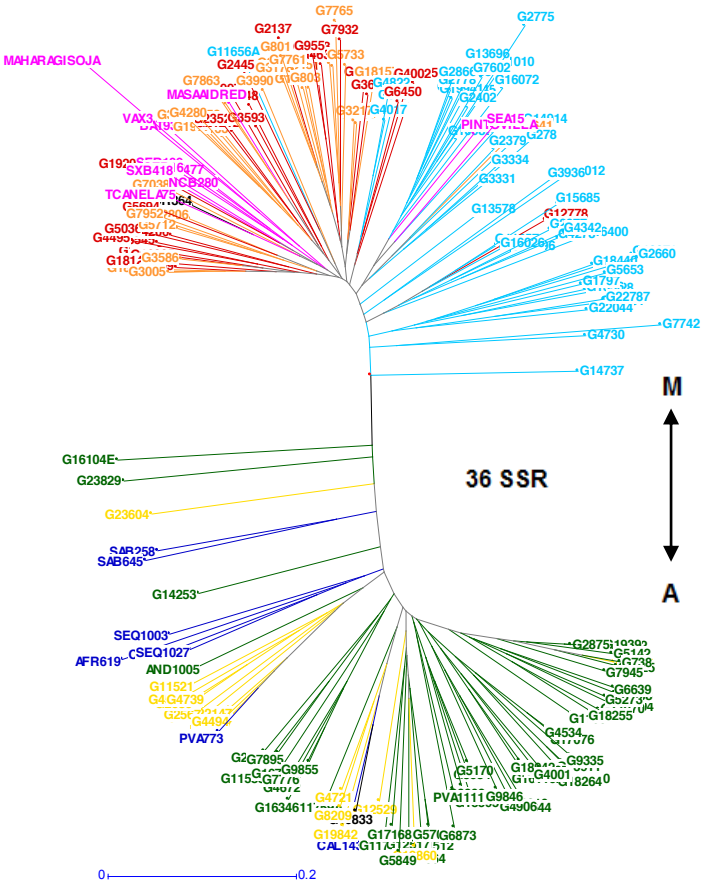
| AMOVA | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **FUENTE DE VARIACION** | **GL** | **SUMA DE CUADRADOS** | **COMPONENTES PRINCIPALES** | **% DE VARIACION** |
| **ENTRE POBLACIONES** | 5 | 474.413 | 94.883 | 2% |
| **ENTRE INDIVIDUOS ENTRE POBLACIONES** | 195 | 10384.868 | 53.256 | 82% |
| **DENTRO DE LA POBLACION** | 201 | 955.500 | 4.754 | 16% |
| **TOTAL** | 401 | 11814.781 | | 100% |
| **FST: 0.023** | | | | |

**Tabla 4: Rangos Interpretación planteada por Wright 1978**

| RANGOS DE $F_{ST}$ | GRADO DE DIFERENCIACION POBLACIONAL |
|---|---|
| 0.00 - 0.05 | INDICATIVO DE POCA DIFERENCIACIÓN GENÉTICA |
| 0.05 - 0.15 | INDICA UNA DIFERENCIACIÓN GENÉTICA MODERADA |
| 0.15 - 0.25 | INDICA GRAN DIFERENCIACIÓN GENÉTICA |
| 0.25 - 1.00 | INDICA UNA DIFERENCIACIÓN GENÉTICA MUY GRANDE |




A




B

**Fig. 15: Árbol Neighbor-Joining obtenido a partir del software Darwin. A)** Evaluación de 202 genotipos de la colección referencia a partir de 40 SSR, la designación de los colores se realizo de acuerdo a las poblaciones obtenidas en STRUCTURE. Para el acervo Mesoamericano, en color verde M1, naranja M, azul claro M2, rojo D-J y amarillo Líneas M. Para el acervo Andino, Azul oscuro Líneas A, Violeta NG1-NG2. **B)** Grupo de 36 SSR. Para el acervo Mesoamericano se observa en color rojo M1, naranja M2, azul claro D-J, rosado Líneas M, azul oscuro Líneas A, NG1 verde y amarillo Perú.

# 6. DISCUSIÓN

El concepto de colección *Core* fue desarrollado hace 25 años (Frankel 1984) para facilitar el acceso a la diversidad disponible en estas grandes colecciones. La idea es identificar una muestra representativa manejable sobre las cuales los análisis podrían ser concentrados antes de re-explorar una amplia variación de materiales. Glazzman *et al.* (2010) señalan que una colección referencia es un grupo de recursos genéticos representativos de líneas o accesiones de cultivares que son usados por la comunidad científica como una referencia para una caracterización integrada de su diversidad biológica. Debido a la importancia de estas colecciones se han dedicado muchos esfuerzos para la creacion de estas en diferenntes cultivos de interes, es asi com el programa de frijol del CIAT ha seleccionado un conjunto de genotios de especial interes para cubrir ciertas caracteristicas a nivel agronomico como tolerancia a estrés hídrico e incremento de minerales que aporten a una mejor nutrición.

Para frijol común el actual conocimiento de la estructura de la población y el origen de la domesticación a partir de la colección referencia está basado en estudios de diversos tipos de marcadores moleculares como son proteínas de semilla (Gepts *et al.* 1986, Gepts & Bliss 1986), alozimas (Koenig & Gepts 1989; Singh *et al*. 1991), RFLPs (Becerra-Velásquez & Gepts1994), RAPDs (Freyre *et al.* 1998), AFLPs (Tohme *et al*. 1996; Papa and Gepts 2003), SSRs (Blair *et al*. 2006; Díaz and Blair 2006) y características morfológicas (Singh *et al*.1991; Gepts 1998). Sin embargo en la mayoría de estos estudios el bajo nivel de polimorfismo de los marcadores, a excepción de los SSRs, y el reducido número de estos excluyen una cuantificación más detallada de la estructura de la población y las relaciones genéticas dentro del germoplasma de fríjol común. Presumiblemente marcadores más neutrales podrían por lo tanto ser mas deseables para evaluar la estructura y diversidad genética del fríjol común (Kwak *et al.* 2009). De esta manera para obtener más información acerca de la estructura y la diversidad genética de fríjol común se han usado 88 marcadores microsatélites fluorescentes cuya metodología es mas informativa y precisa con el tamaño y numero de alelos obtenidos para cada marcador, conllevando así a la minimización de los errores que se puedan obtener bajo otras metodologías empleadas en el proceso de tinción y visualización de las bandas.

### 6.1. Metodología M13

Inicialmente para este estudio se diseñaron 100 marcadores microsatélites fluorescentes de los cuales 76 presentaron marcaje terminal fluorescente y 24 fueron diseñados con la metodología de marcaje fluorescente M13. Sin embargo solo se tuvo éxito con 12 marcadores diseñados con M13 en el proceso de amplificación y marcaje fluorescente, reduciendo el número total de marcadores a 88.

Entre los inconvenientes que surgieron con los marcadores diseñados con M13 están, una mala señal en el electroferograma, como tartamudeo y baja intensidad de los picos, aparición de un pico de bandas inespecíficas y muchos datos perdidos. Debido a lo anterior se eliminaron dichos marcadores los cuales componían 3 paneles. Estos inconvenientes han sido detectados también por Schuelke (2000) en análisis de microsatélites humanos, mientras tanto, Oblessuc *et al.* (2009) para fríjol común y Arruda *et al.* (2010) para estudios de estructura poblacional en anfibios, desarrollaron en la metodología cambios en el proceso de amplificación y marcaje, ya que para estos autores se obtuvo amplificaciones inespecíficas o baja señal de la banda por lo que para el actual estudio se realizaron las modificaciones necesarias a la metodología pero con resultados negativos. Sin embargo las amplificaciones positivas de 12 SSR con M13 generaron buenos resultados con picos bien definidos y tamaños de los alelos esperados.

Las posibles causas de la no obtención de la banda esperada se pueden resumir en el proceso de amplificación y marcaje fluorescente. Debido a que la metodología usa tres cebadores puede existir competición entre ellos para el alineamiento con el ADN, esto ha sido reportado por Neilan *et al.* (1997) y quienes han sugerido una extensiva homología entre el cebador marcado y el genoma objetivo lo cual limita el uso de muchos cebadores, lo que posteriormente fue adicionado por Arruda *et al.* (2010) aportando también el amplio rango de temperatura de alineamiento que presenta el cebador fluorescente M13 siendo 53°C el óptimo de ensamble y sin embargo encontraron que este primer presentó actividad de acoplamiento por encima de 62°C lo que generaría problemas al acoplamiento de los demás cebadores, en especial el *forward* o quimera que para el actual estudio presentó una longitud adicional de 18pb. Wu *et al.* (1991) y Singh *et al.* (2000) sugieren que largos cebadores tienden a ser más inestables lo cual dificulta su alineamiento con la plantilla de ADN.

Por esta razón la metodología ha sufrido cambios en el proceso de marcaje fluorescente y el protocolo debe ser aplicado y/o modificado para cada especie con la cual se vaya a trabajar, por ejemplo Kwak & Gepts (2009) realizaron 2 reacciones de PCR para evitar las amplificaciones inespecíficas, lo que conllevó a la disminución de la competencia entre cebadores ya que el proceso de marcaje se llevo a cabo en una segunda reacción, por otra parte Arruda *et al.* (2010) resolvieron el problema con la pausa de la reacción de PCR en los ciclos finales para así adicionar el cebador marcado y extender los ciclos para el proceso de marcaje, este mismo proceso fue aplicado por Oblessuc *et al.* (2009). Este tipo de metodologías fueron llevadas a cabo en este estudio, sin embargo los errores de amplificación y marcaje pudieron ser debidos por los marcadores microsatélites ya que algunos de ellos presentaron una baja resolución o una amplia gama de bandas en el registro obtenido a partir de los geles de poliacrilamida.

A pesar de estas dificultades el número de marcadores microsatélites fue suficiente para generar una buena estructura poblacional, ya que este sistema de marcadores automatizados reportan gran utilidad en la detección de altos niveles de diversidad genética y una estructura poblacional bien definida para fríjol común, tanto para genotipos cultivados (Blair *et al.*, 2009; Asfaw *et al.*, 2009; Blair *et al.*, 2010) como para la comparación entre silvestres y cultivados (Kwak and Gepts, 2009).

### 6.2. Estructura poblacional de la colección referencia de fríjol común

La asignación de las accesiones dentro de cada una de las razas fue determinada parcialmente por Singh *et al.* (1991); usando características morfológicas y bioquímicas. Singh *et al.* (1991) propusieron dos acervos y seis razas, Nueva Granada, Perú y Chile, para el acervo Andino; Durango, Jalisco y Mesoamérica para el acervo Mesoamericano. Posteriormente Beebe *et al.* (2000), por medio de marcadores moleculares de tipo RAPD, distinguió una cuarta raza Mesoamericana designada Guatemala, la cual fue confirmada por Blair *et al.* (2009a) con marcadores SSRs quien le dio una distinción a la raza dentro del grupo Mesoamérica usando 604 genotipos con 36 marcadores microsatélites génicos y genómicos. Por otra parte Díaz & Blair (2006) encontraron que las razas Durango y Jalisco se agrupan juntas debido a la

variedad de características compartidas, como son, tipo de faseolina, tamaño de semilla y hábito de crecimiento, conllevando a la denominación del complejo Durango-Jalisco.

La estructura poblacional identificada en este estudio es generalmente consistente con el esquema jerárquico actual de los acervos y la estructura racial ecogeográfica dentro de los acervos propuestos previamente (Singh *et al.* 1991; Beebe *et al.* 2001; Blair *et al.* 2009). La diferenciación de los acervos Mesoamericano y Andino han sido bien soportados en este análisis mediante los software *STRUCTURE, PCoA y Darwin*, donde se observó una clara separación de los principales acervos geográficos, está ahora bien documentado basado en características genotípicas y moleculares lo que para Kwak & Gepts (2009) en la información obtenida hasta el momento se puede sugerir que *P. vulgaris* podría estar sufriendo un proceso de especiación incipiente inclusive cuando los dos acervos fueron domesticados.

Los grupos identificados por *STRUCTURE* para cada uno de los acervos generalmente correspondieron a la estructura racial de fríjol común identificado por Singh *et al.* (1991) excepto para las razas Durango y Jalisco las cuales han sido previamente agrupados en los estudios realizados por Díaz & Blair (2006) y de la misma manera se agruparon en los estudios realizados por kwak & Gepts (2009). Estos autores explican que la raza Jalisco es una variedad que presenta hábito de crecimiento principalmente trepador (hábito IV) distribuida en altas tierras en los estados de Jalisco, Guanajuato, Michoacán, México, Puebla y Oxaca, y la raza Durango que incluye variedades de hábito postrado (hábito III) que habitan principalmente en las altas tierras semiáridas del norte de México. La subdivisión de D-J podría ser distinguida por su distribución, morfología de la planta y resistencia a enfermedades, pero aún no están bien diferenciadas a nivel molecular (Kwak & Gepts 2009). Otra alternativa seria que el complejo D-J ha divergido muy recientemente, además del gran flujo de genes entre las dos razas, lo que conlleva a que la diferenciación sea limitada a unos pocos genes principales que controlan la morfología de la planta y la semilla, o una combinación de estos factores. (Kwak & Gepts 2009).

El comportamiento de las accesiones dentro de los grupos para cada uno de los acervos a partir del análisis de *STRUCTURE* puede estar mediado por características como hábitos de crecimiento tipo II y III, lo cual es similar a lo obtenido por Blair *et al.* (2009) donde las sub-razas M1 y M2 estuvieron estrechamente relacionadas y cuya asociación estuvo mediada por los hábitos de crecimiento y tamaño de semilla. Estas observaciones llevadas a cabo por Blair

*et al.* (2009) en las razas Mesoamericanas, correspondieron con el comportamiento observado para los sub-grupos M1 y M2 donde existió una relación más agudizada de estas sub-razas como se pudo analizar por medio de las poblaciones obtenidas, los sub-grupos M1 y M2 siempre estuvieron muy relacionados, así mismo para el complejo D-J que también presentó una estrecha relación con los individuos de la raza Guatemala, tanto en los análisis llevados a cabo en *STRUCTURE*, como los obtenidos en *PCoA* y *Neighbor Joining*.

En el agrupamiento observado para las poblaciones Andinas, donde se determinó la inclusión de algunos genotipos agrupados en razas o sub-razas diferentes a las asignadas, puede ser el resultado del largo proceso de domesticación al cual han sido sometidas, donde las características de selección se han basado principalmente en tamaño de la semilla, color y hábito de crecimiento, lo que ha conllevado a que aparezca un flujo de genes importante dentro de las razas e incluso dentro de los acervos (Debouck 1991). De esta misma manera Beebe *et al.* (2001) encontraron por medio de AFLP, que los genotipos cultivables Andinos formaran un grupo relativamente compacto sin las subdivisiones que corresponderían a las razas Nueva Granada, Perú y Chile, lo que los llevó a concluir que las tres razas Andinas han tenido un origen común y han divergido como resultado de la selección humana. De acuerdo con los análisis llevados a cabo por Beebe *et al.* (2001), se puede explicar porque algunos individuos de las razas pertenecientes al acervo Andino presentaron una combinación entre sí en el agrupamiento, lo que relacionado con este estudio en el grupo de 40 SSR las accesiones Andinas forman un grupo indiferenciado entre las razas Nueva Granada 1 y 2 y la raza Perú.

Adicionalmente Blair *et al.* (2007), sugieren que, además de que los genotipos de la raza Nueva Granada son distinguidos de la raza Perú por la producción de semillas cilíndricas o ligeramente ovaladas, y que también difieren en términos de su rango de adaptación y pueden ser encontrados en un amplio grado de regiones tropicales, subtropicales y templadas comparado a el más limitado ambiente donde los genotipos de la raza Perú crecen en sitios de alta elevación en los Andes, el flujo de genes entre las razas Nueva Granada y Perú es probablemente muy común en las regiones de los Andes donde las dos razas se sobrelapan como en Ecuador y Colombia y conlleva a genotipos intermedios. Además los intercambios entre germoplasma, flujo de genes y programas de cruzamiento entre y dentro de los acervos han dado surgimiento a la introgresión entre los acervos (Beebe *et al.* 2001; Islam *et al.* 2002) y entre razas (Díaz & Blair 2006) resultando en fenotipos intermediarios que no clasifican bien

dentro de alguna raza o acervo. Además es conocido que las razas se originaron de múltiples domesticaciones separadas, o fueron el resultado de una única domesticación en cada región con subsecuente diferenciación y adaptación a nichos agroecológicos específicos (Chacón *et al.* 2005).

### 6.3. Diversidad genética en frijol común

La diversidad genética presentó un valor alto (0.65), sin embargo el PIC (0.60) obtenido para este estudio fue bajo, lo cual según Kwak & Gepts (2009) esta característica de presentar valores pequeños de polimorfismo es común en especies autógamas. Serwinski (1997) agrega también que las especies cultivables pueden sufrir perdida de la variabilidad genética de las poblaciones lo cual puede ocurrir tanto *in situ* (bancos de germoplasma) como *ex situ* (mediada por los granjeros y programas de mejoramiento), lo que es causado por el bajo intercambio genético entre los cultivados (Gómez *et al.* 2004). En contraste la riqueza en número de alelos obtenidos a partir de los microsatélites fluorescentes (960) es muy alta lo cual según Blair *et al* (2009) la tecnología de marcadores fluorescentes es altamente aguda en la detección de los alelos con pequeñas diferencias, así como su alta reproducibilidad y característica co-dominante hace de ellos una gran ventaja con respecto a otro tipo de marcadores.

Sin embargo en lo que respecta a los grupos dentro de las razas el grado de diferenciación genética entre poblaciones en términos de frecuencias alelicas fue muy bajo ($F_{ST}$ 0.023) lo que es un indicativo de poca diferenciación (Wright 1978) y cuyos valores obtenidos corresponden a la misma especie, principalmente para especies autógamas. El bajo valor $F_{ST}$ así como la baja diferenciación genética existente entre las poblaciones (2%) llevado a cabo por medio del análisis de la AMOVA, fue más baja que la diferenciación dentro de las poblaciones (16%), y puede ser debida según Gepts (1988) a la limitada diversidad genética que se presenta dentro de las accesiones que han sido sometidas a domesticación, visto desde la perspectiva de los análisis de faseolina de fríjol común cultivable se sugiere una única domesticación. Papa & Gepts (2003) por medio de AFLP encontraron que las diferentes razas mesoamericanas se agrupan juntas dentro de un gran grupo, y quienes consideran como soporte para las conclusiones de los datos de faseolina. Además Chacón *et al.* (2005) consideraron también que las razas se han diferenciado después de la domesticación como un resultado de la selección de los granjeros.

En consideración de una posible alternativa a la baja diversidad genética obtenida en genotipos cultivables, es que podrían haber sido domesticados una vez y entonces dispersados en cultivos a otras regiones. El *locus* de faseolina es un único complejo de genes repetitivos y es uno de los factores que influyen en el tamaño de la semilla (Gepts 1988), conllevando así a un cuello de botella regido por los humanos en el proceso de selección y domesticación de frijol común.

La selección entre los híbridos domesticados y silvestres para grandes semillas pudo favorecer la vinculación de la faseolina tipo S (Chacón *et al* 2005). Por otra parte Beebe *et al.* (2000) sugieren que este proceso pudo haber ocurrido repetidamente, produciendo diferentes poblaciones de fríjol domesticado que derivan más de su genoma de diversas poblaciones de fríjol silvestre que las características derivadas del síndrome de domesticación del domesticado original y desde allí compartió su faseolina tipo S. Gonzales & Debouck (2004), (datos no publicados) explican también que las diferentes adaptaciones agroecológicas en las razas Mesoamericanas difieren en los haplotipos de los cloroplastos, lo que según Papa & Gepts (2003) parecen haber sido introgresados predominantemente desde los silvestres a los domesticados, mientras la introgresión de los genes nucleares es predominantemente de los domesticados a los silvestres.

El comportamiento observado para algunas accesiones en el análisis de *Neighbor-Joining* es una representación de genotipos introgresados ya que no presentaron una clara separación hacia uno de los acervos. Un caso más característico fue para el control Andino G19833 el cual se alejó de acervo Andino y se ubica en el árbol en posición intermedia, lo que según Blair *et al.* (2010) es debido a que G19833 es un genotipo que presenta características muy andinas lo que lo excluye de los demás genotipos de la raza Perú. Por otra parte con respecto a las demás accesiones, el proceso de mejoramiento ha generado introgresión de genes (como el gen I) por parte de las variedades Mesoamericanas hacia las Andinas lo que conlleva a que estas accesiones no se agrupen con los acervos respectivos, adicionalmente Debouck (1991) sugiere que la introgresión se puede deber al proceso de domesticación que se ha llevado a cabo desde hace 4.000 años y el proceso de selección lo cual favoreció a los genotipos que presentaban características como tamaño de semilla generando así un flujo de genes importante entre las accesiones domesticadas.

Mientras tanto en las graficas de 3D a pesar de lo observado para la separación de los acervos, también se pudo identificar y separar claramente las poblaciones dentro de cada acervo de acuerdo a lo establecido por Blair *et al.* (2007) para razas Andinas, Blair *et al.* (2009) para la colección *Core*, y en genotipos silvestres y cultivados (Kwak & Gepts 2009)

### 6.4. Análisis de los grupos de marcadores evaluados

En el grupo de 40 SSR los agrupamientos y obtención de las poblaciones, especialmente para el acervo Andino, no se pudo generar ya que las accesiones de este acervo presentaron gran similitud a partir de este grupo de marcadores conllevando a una diferenciación nula. Blair *et al.* (2007) sugieren que ha sido notable el hallazgo de diversos genotipos de hábito trepador de los cuales previamente se pensó que estaban en la raza Perú y actualmente pueden clasificarse en la raza Nueva Granada, y viceversa, fríjol determinado arbustivo el cual se ha pensado que pertenecen a la raza Nueva Granada y podrían clasificarse como de la raza Perú. Este tipo de acontecimientos convergen en la posible explicación del comportamiento de los individuos dentro de las poblaciones de acuerdo al grupo de marcadores evaluados, ya que se presentaron algunas diferencias en el agrupamiento de las accesiones según el grupo de marcadores, lo cual se podría inferir que flanquean regiones del genoma que pueden cambiar un poco la estructura de la población.

Por otra parte para el grupo de 36 SSR evaluados en este estudio los individuos de la raza Perú formaron un grupo bien diferenciado bajo el análisis de *STRUCTURE* y *PCoA*, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Blair *et al.* (2007), además bajo el mismo análisis hallaron mezclas de algunos genotipos de las razas Perú y Nueva Granada en las agrupaciones arrojadas por *STRUCTURE*, de la misma manera en lo observado para el presente análisis. Posteriormente Blair *et al.* (2009) por medio de mapeo asociativo, pudieron diferenciar que los genotipos de la raza Perú presentaron características diferenciales entre sí con respecto al tamaño y color de la semilla dando lugar a la diferenciación en 2 sub-razas de la raza Perú (P1 y P2).

De esta manera se pudo observar la variación de la estructura poblacional y la diversidad genética de la colección referencia a partir de los SSRs evaluados, dicho comportamiento podría estar siendo influenciado por la ubicación de los microsatélites usados en el genoma.

Estos resultados son una opción y punto de partida para poder llevar a cabo un análisis de estructura poblacional y diversidad genética a partir de un número de marcadores que sean bien informativos y presenten alta calidad de amplificación, si que sea necesario el uso de un gran número de marcadores.

La combinación de ambos grupos, así como los marcadores diseñados con la metodología M13 revelaron la estructura poblacional de acuerdo por lo establecido en otros estudios a partir de microsatélites automatizados (Blair *et al.* 2009; Kwak & Gepts 2009; Oblessuc *et al.* 2009; Asfaw *et al.* 2009), siendo esta una gran herramienta para el estudio de grandes colecciones permitiendo así una evaluación precisa de los alelos.

## 7. CONCLUSIONES

- La metodología de marcaje fluorescente llevada a cabo con el cebador universal M13 es una gran posibilidad para el análisis en los estudios de diversidad, ya que es la metodología mas económica dentro del sistema de marcadores automatizados, conllevando así a facilitar el acceso a estas tecnologías que van de la mano con las necesidades de estudiar y comprender mejor la diversidad, sin embargo se requiere mejorar la calidad de las bandas obtenidas en la amplificación para optimizar el proceso de marcaje fluorescente.

- De acuerdo al gran número de alelos observados, diversidad genética y PIC, se pudo observar que el análisis de fragmentos por medio de microsatélites fluorescentes presentó una mejor detección mediante el sistema automatizado *ABI3730* dando un tamaño más preciso de los alelos y grado de polimorfismo entre ellos, hasta de un par de bases de diferencia, generando a una mayor sensibilidad y agudización de los resultados obtenidos.

- Las colecciones de germoplasma son una gran fuente de información para la comprensión de los procesos de domesticación y selección que han sido llevados a cabo por los humanos durante milenios. Para frijol común es de especial importancia la colección referencia, ya que por medio de esta se puede inferir acerca de la historia de la especie a nivel de la agricultura y todos los procesos de dispersión que subsecuentemente fueron ejecutados por las civilizaciones humanas. Además este tipo de estudios ayuda a conocer los centros de diversidad donde es crítica la conservación de estas áreas para la protección de los recursos genéticos donde existe un potencial de información que puede ser aplicada para la protección de las especies.

- La comparación de diversos grupos de marcadores SSR son una buena herramienta para poder discriminar la calidad y el potencial de información que contienen para así llegar a un análisis más a fondo de los marcadores empleados para los estudios de

diversidad, de esta manera se puede obtener un número pequeño de SSRs que puedan ser analizados en otras colecciones de frijol común.

## 8. RECOMENDACIONES

- Existe una gran fuente de información contenida en el banco de germoplasma de frijol común y lacolección referencia es un acceso a gran parte de la diversidad contenida allí, de esta manera es importante continuar anclando mas marcadores que puedan flanquear regiones de inerés agronómico que puedan generar avances significativos en los procesos de mejoramiento genéntico.

- La metodología de marcaje fluorescente M13 es una nueva propuesta para el programa de caracterización de germoplasma de fríjol del CIAT, la cual debe seguir siendo implementada hasta lograr calidad y eficiencia en todos los SSR utilizados en esta metodología, por ello se recomienda al equipo de trabajo de frijol del CIAT continuar con el proceso de marcadores fluorescentes por medio del cebador M13.

- Es importante diseñar cebadores automatizados que sean informativos y así mismo que tengan un gran poder discrimitnativo que puedan collevar a una mejor estructura poblacional en los genotipos cultivados.

## 9. BIBLIOGRAFÍA


Acosta JA, Kelly JD, Gepts P (2007) Prebreeding in Common Bean and Use of Genetic Diversity from Wild Germplasm. Crop Sci. 47(S3) S44–S59

Andersen JW, Story L, Sieling B, Chen WJL, Petro MS, Story J (1984) Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic. Clin. Nutr. 40:1146–1155.

Arruda MP, Gonçalves EC, Schneider MP, Da-Silva AL, Versute ME (2010) An alternative genotyping method using dye- labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. Mol Biol Rep 37:2031–2036

Asfaw A, Blair MW, Almekinders C (2009) Genetic diversity and population *STRUCTURE* of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. Theor Appl Genet 120:1–12

Baird V, Abbott A, Ballard R, Sosinski B, Rajapakse S (1997) DNA Diagnostics in Horticulture. P. Gresshoff. 111–130

Beaver JS, Osorno JM (2009) Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. Euphytica 168:145–175

Becerra V, Gepts P (1994) RFLP Diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centers of origin. Genome 37: 256-263.

Beebe S, Skroch PW, Tohme J, Duque MC, Pedraza F, Nienhuis J (2000) *STRUCTURE* of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence
analysis of RAPD. Crop Sci 40:264–273

Beebe S, Rengifo J, Gaitan E, Duque MC, Tohme J (2001) Diversity and origin of Andean landraces of common bean. Crop Sci 41:854–862
Betancour RMJ, Quirós DJE (2002) El fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.): Cultivo, Beneficio y Variedades.

Blair MW, Hedetale V, McCouch SR (2002) Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 105:449–457

Blair MW, Pedraza F, Buendia HF, Gaitán-Solís E, Beebe SE, Gepts P, Tohme J (2003) Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet 107:1362–1374

Blair MW, Giraldo MC, Buendía HF, Tovar E, Duque MC, Beebe S (2006) Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet 113:100–109

Blair MW, Díaz JM, Hidalgo R, Díaz LM, Duque MC (2007) Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Theor Appl Genet (2007) 116:29–43

Blair MW, Díaz LM, Buendía HF Duque M (2009a) Genetic diversity, seed size associations and populations *STRUCTURE* of a *Core* collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Theor Appl Genet 119:955-972

Blair MW, Muñoz M, Pedraza F, Giraldo M, Buendia HF, Hurtado N (2009b) Development of microsatellite markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on screening of non-enriched, small-insert genomic librares. Genome 52:772-782

Blair MW, Gonzales LF, Kimani P and Butare L (2010) Intergenepool introgression, genetic diversity and nutritional quality of common bean (Phaseolus vulgaris L.) landraces from Central Africa. Theoretical and Applied Genetics 121: 237–248.

Bonin A, Bellemain E, Bronken EP, Pompanon F (2004). How to track and assess genotyping errorsin population genetics studies. *Mol. Ecol.* 13: 3261-3273.

Broughton WJ, Hernandez G, Blair MW, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. Plant and soil 252: 55–128

Botstein D, White RD, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Hum. Genet. 32: 314-331

Burle ML, Fonseca JR, Kami JA, Gepts P (2010) Microsatellite diversity and genetic *STRUCTURE* among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity Theor Appl Genet 121:801–813

Cipriani G, Lot G, Huang WG, Matarazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterization and cross species amplification in *Prunus*. Theoretical and Applied Genetics 99:65-72.

Chacón M (2001) Chloroplast DNA polymorphisms and the evolution and domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Agricultural botany. The University of Reading, Reading, UK

Chacón MI, Pickersgill B, Debouck DG (2005) Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races Theor Appl Genet 110: 432–444

Coburn JR, Temnykh SV, Paul EM, McCouch SR (2002) Design and application of microsatellite marker panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). Crop Sci 42:2092–2099

Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, Pang EC (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement. Euphytica 142: 169–196

Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2001) Population genetic *STRUCTURE* of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. Molecular Ecology 10:349-356.

Corrêa RX, Costa MR, Good-God PI, Ragagnin VA, Faleiro FG, Moreira MA, Barros EG (2000) Sequence Characterized Amplified Regions Linked to Rust Resistance Genes in the Common Bean. Crop Sci. 40:804–807

Coulibaly S (1999) *PCR*-derived analysis of genetic giversity and relationships within the *Phaseolus vulgaris* L. complex and in *Vigna unguiculata* L. PhD, University of California, Davis.
David LS, Scott LS, Stephen CR (1993) An alternate universal *forward* primer for improved automated DNA sequencing of M13. BioTechniques, 15:580−582

Dayanandan S, Bawa KS and Kesseli R (1997) Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). American Journal of Botany 84:1658-1663.

Debouck DG, Hidalgo R (1985) Morfología de la planta de fríjol común. En: Fríjol: Investigación y Producción. CIAT-PNUD.

Debouck, DG (1986) Primary diversification of *Phaseolus* in the Americans: Three centres. Plant Genet. Resour. Newsl. 67:2–8

Debouck DG (1991) Systematics and morphology. In: "Common beans: research for crop improvement" United Kingdom, pp. 55- 118.

Debouck D, Toro O, Paredes OM, Jonson WC, Gepts P (1993) Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in Northwestern South America. Econ. Bot. 47:408-423

Debouck DG (1999) Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. 25–52

Delgado SA, Bonet A, Gepts P (1988) The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. Netherlands 163–184

Dellaporta S, Wood L, Hicks J (1983) A plant DNA minipreparation: Version ii. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol.1.

Díaz LM, Blair MW (2006) Race *STRUCTURE* within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers Theor Appl Genet 114:143–154

Díaz LM, Buendía HF, Duque MC, Blair MW (2011) Genetic diversity of Colombian landraces of common bean as detected through the use of silver-stained and fluorescently labelled microsatellites Plant Genetic Resources 9: 86–96

Diwan N, Cregan PB (1997) Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. Theor Appl Genet 95:723–733

Eujay I, Sorrells ME, Baum M, Wolters P, Powell W (2002) Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. Theor Appl Genet 104:399–407

Falush D, Stephens M, Pritchard J (2003) Inference of Population *STRUCTURE* Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frecuencies. Genetics.164:1567-1587.

Field D, Wills C (1998) Long polymorphic microsatellites in simple organisms. Biological Sciences 263:209-215.

Frankel OH (1984) Genetic perspective of germplasm conservation. In Genetic Manipulations: Impact on Man and Society. Edited by Arber W, Llimensee K, Peacock WJ, Stralinger P. Cambridge University Press; 1984:161-170.

Freyre R, Skroch PW, Geffory V, Adam-Blondon AF, Shirmohamadali A, Johnson WC, Llaca V, Nodari RO, Periera PA, Tsai SM, Tohme J, Dron M, NIenhuis J, Vallejos CE, Gepts P (1998)

Towards an integrated linkage map of common bean. 4 Development of a *Core* linkage map and alignment of RFLP maps. Theor Appl Genet, 97, 847-856.

Gaitan-Solís E, Duque MC, Edwards KJ, Tohme J (2002) Microsatellite repeats in common bean (*Paseolus vulgaris.*): Isolation characterization, and cross species amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Sci 42:2128-2136

Gepts P, Osborn T, Rashka K, Bliss F (1986) Phaseolin-Protein variability on wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Economic Botany 40(4) 451–468. 1986.

Gepts P (1988) Genetic resources of Phaseolus beans: current plant science and biotechnology in agriculture. Dordrecht. 619

Gepts P, Bliss FA (1986) Phaseolin variability among wild and cultivated common bean (Phaseolus vulgaris) from Colombia. Econ Bot 40:469–478

Gepts P, Bliss FA (1988) Dissemination pathways of common bean (Phaseolus vulgaris, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. Econ Bot 42:86–104

Gepts P, Debouck DG (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Research for crop improvement 7-53

Gepts P. (1998) Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. HortScience 33:1124–1130.

Gepts. P. 2001. *Phaseolus vulgaris* (Beans). Academic press, 1-2.

Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. Plant Phisiology. 137:1228-1235

Gepts P, Aragão FJL, Baros E, Blair MW, Brondani R, Broughton W, Galaso I, Hernández G, Kami J, Lariguet P, McClean P, Meloto M, Miklas P, Pauls P, Pedrosa HA, Porch T, Sánchez F, Sparvoli F, Yu K (2008) Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. Genomics of Tropical Crop Plants 1:113−143.

Glaszmann JC, Kilian B, Upadhyaya HD, Varshney RK (2010) Accessing Genetic Diversity for Crop Improvement. Plant Biology. 13:167-173

Gomez OJ, Blair MW, Frankow-Lindberg BE, Gullberg U (2004) Molecular and phenotypic diversity of common bean landraces from Nicaragua. Crop Sci 44:1412–1418

González-Torres RI, D.G. Debouck (2004) Genetic Resources Unit, Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Guo DC and Milewicz DM (2003). Methodology for using a universal primer to label amplified DNA segments for molecular analysis. Biotechnol. Lett. 25: 2079-2083.

Grisi MCM, Blair MW, Gepts P, Brondani C, Perera PAA, Brondani RPV. (2007) Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x JALO EEP558. Gen Mol Res. 6:691-706

Hangen LA, MR Bennink (2003) Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethaneinduced colon cancer in rats. Nutr Cancer 44: 60–65.

Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutation mechanisms. Evolution and Applications. 1-9

Henry R (1997) Molecular markers in plant improvement. In: Practical Applications of Plant Molecular Biology. 99–132

Heywood VH, Iriondo JM (2003) Plant conservation: Old problems, new perspectives. Biological Conservation 113:321-335.

Hoffman JI, Amos W (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. Mol. Ecol. 14: 599-612.

Horvath A, Didier A, Koenig J, Exbrayat F, Charmet G, Balfourier François (2009) Analysis of diversity and linkage disequilibrium along chromosome 3B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Theor Appl Genet 119:1523–1537

Idury RM, Cardon LR (1997) A Simple Method for Automated Allele Binning in Microsatellite Markers. Genome Research 7: 1104-1109

Islam FMA, Basford KE, Redden RJ, Gonzalez AV, Kroonenberg PM, Beebe S (2002) Genetic variability in cultivated common bean beyond the two major gene pools Genetic Resources and Crop Evolution 49: 271–283

Jarne P, Lagoda PJL (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution 11:424-429

Jahufer M, Barret B, Griffiths A, Woodfield D (2003) DNA fingerprinting and genetic relationships among white clover cultivars. Grassland Association 65: 163–169

Joe LK, Wheaton AM, Bay SJ, Krotzer LE, Baybayan PA, Ostadan OS, Berosik SR, Yang TH, Pistacchi SA, Feng SS, Lou YN (2004) Improved Solutions for High Throughput Microsatellite Analysis. (Ed. A. Biosystems). California.

Jones PG, Beebe S, Tohme J (1997a) The use of geographical information systems in biodiversity exploration and conservation. Biodivers Conserv 6:947–958

Jones N, Ougham H, Thomas H (1997b) Markers and mapping: We are all geneticists now. New Phytol 137: 165–177.

Kami J, Becerra VV, Debouck DG, Gepts P (1995) Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1101–1104.

Kaplan L, Lynch TF (1999) *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Columbian agriculture. Econ Bot 53:261–272

Koenig R, Gepts P (1989) Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two mayor centers of genetic diversity. Theoretical and Applied Genetics 78: 809-817.

Kwak M, Kami AJ, Gepts P (2009) The putative Mesoamerican Domestication Center of *Phaseolus vulgaris* Is Located in the Lerma – Santiago Basin of Mexico. Crop Science 49:554-563

Kwak M, Gepts P (2009) *STRUCTURE* of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) Theor Appl Genet 118:979–992

Lavin M, Doyle JJ, Palmer JD (1990) Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily Papilionoideae. Evolution 44, 390–402.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology, 11, 2453-2465.

Liu KJ, Muse SV (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics 21:2128–2129

Masi P, Spagnoletti Zeuli PL, Donini P (2003) Development of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Mol Breed 11:303–313

Mabberley DJ (1998) The Plant Book. Cambridge University Press, Cambridge. 706 pp.

McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Gu Cho Y, Huang N, Ishii T, Blair M (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Mol Biol 35:89–99

Mensack MM, Fitzgerald VK, Ryan EP, Lewis MR, Thompson HJ, Brick MA (2010) Evaluation of diversity among common beans (Phaseolus vulgaris L.) from two centers of domestication using 'omics' technologies. BMC Genomics 11:686

Métais I, Hamon B, Jalouzot R, Peltier D (2002) *STRUCTURE* and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. Theor Appl Genet 104:1346–1352

Miklas PN, Kelly JD, Beebe SE, Blair MW (2006) Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. Euphytica 147: 105–131

Miklas PN, Singh SP (2007) Common Bean. In: Genome Mapping an Molecular Breeding in Plants (Ed. C. KOLE) Berlin.

Missiaggia A, Grattapaglia D (2006) Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers Genet. Mol. Res. 5:72-78

Narvel JM, Chu W, Fehr WR, Cregan PB, Shoemaker RC (2000) Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. Mol Breed 6:175–183

Neilan B A, Wilton A N, Jacobs D (1997) A universal procedure for cebador labeling of amplicons. Nucleic Acids Research. 25:2938-2939

Oblessuc P R, Campos T, Cardoso K j, Sforça D A, Baroni R M, Souza A P, Benchimol L L (2009) Adaptation of fluorescent technique for genotyping with new microsatellite markers in common bean. Pesq. agropec. Bras 44:638-644

Oetting W S, Lee H K, Flanders D J, Weisner G L, Sellers T A, King R A (1995) Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed cebador. Genomics 30:450-458

Oliveira J E, Pádua J G, Zucchi P M, Venkovsky R, Vieira L C (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology. 29:294-307

Papa R, Gepts P (2003) Asymmetry of gene flow and differential geographical *STRUCTURE* of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. Theor Appl Genet 106:239–250

Paterson AH. (1996) Making genetic maps. Genome Mapping in Plants, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, 288-295.

Pedrosa A, Vallejos C, Bachmair A y Schwizer, D. (2002) Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris*) linkage and chromosomal maps. Theor Appl Genet.

Pinto LR, Vieira MLC, Souza Jr CL, Souza AP (2003a) Reciprocal recurrent selection effects on the genetic *STRUCTURE* of tropical maize populations assessed at microsatellite loci. Genetics and Molecular Biology 26:355-364.

Pinto LR, Vieira, MLC, Souza Jr CL, Souza AP (2003b) Genetic- diversity assessed by microsatellites in tropical maize Oliveira *et al.* 305 populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. Euphytica 134:277-286.

Polhill RM (1981) Papilionoideae. *In* Advances in Legume Systematics, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey. 191–205.

Polhill RM (1994) Classification of the Leguminosae. *In* Phytochemical Dictionary of the Leguminosae, . Chapman and Hall, London 1: 16-37.

Pritchard J, Stephens M, Donelly P (2000) Inference of Population *STRUCTURE* Usin Multilocus Genotype Data. Genetics. 155:945-959.

Reed PW, Davies JL, Copeman JB, Benett ST, Palmer SM, Pritchard LE, Gough SCL, Kawaguchi Y, Cordell HJ, Balfour KM, Jenkins SC, Powell EE, Vignal A, Todd JA (1994) Chromosome specific microsatellite sets for fluorescence-based, semi-automated genome mapping. Nature Genet 7:390–395

Ríos-Betancour MJ and Quirós-Dávila JE (2002) El fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.): cultivo, beneficio y variedades. Federacion Nacional de cultivadores de cereales (Fenalce): 141–151.

Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C, Tohme J (2000) Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship American Journal of Botany 87:1647-1655.

Rodrigo MAP (2000) Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. In: Biología. Universidad Santiago de Compostela, Pontevedra.

Schlötterer C, Amos B and Tautz D (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. Nature 354:63-65.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology 18:233-234

Schwengel DA, Jedlicka AE, Nanthakumar EJ, Weber JL *et al*. (1994). Comparison of fluorescence-based semi-automated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. Genomics 22: 46-54.

Serwinski J (1997) Reporting on the assessment of plant genetic erosion. Research Institute of Crop Production, Prague.

Singh S, Gutierres A, Molina A, Urrea C, Gepts P (1991). Genetic diversity in cultivated common bean. II. Marker- based analysis on morphological and agronomic traits. Crop Sci. 31:23-29.

Singh VK, Govindarajan R, Naik S, Kumar A (2000) The effect of hairpin *STRUCTURE* on PCR amplification efficiency. Mol Biol Today 1:67–69

Singh SP (2001) Broadening the genetic base of common beans cultivars: A review. Crop Sci. 41:1659–1675.

Srnić G, Murphy J P, Lyerly J H, Leath S, Marshall D S (2005) Inheritance and Chromosomal Assignment of Powdery Mildew Resistance Genes in Two Winter Wheat Germplasm Lines. Crop Sci. 45:1578–1586

Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E and Glossl J (1997) Conservation of (GA)(n) microsatellite loci between *Quercus* species. Molecular Ecology 6:1189-1194.

Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG , Ishii T, McCouch SR (2000) Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 100:697–712

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch SR (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res 11:1441–1452

Thoquet P, Ghérardi M, Journet EP, Kereszt A, Ané JM, Prosperi JM, Huguet T (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. BMC Plant Biol 2:1

Tohme J, Gonzales D, Beebe S, Duque MC (1996) AFLP analysis of gene pools of a wild bean *Core* collection. Crop Sci, 36, 1375-1384.

Tommasini L, Batley J, Arnold GM, Cooke RJ, Donini P, Lee D, Law JR, Lowe C, Moule C, Trick M, Edwards KJ (2003) The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. Theor Appl Genet 106:1091–1101

Tóth G, Gáspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. Genome Research 10:967-981.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotech.* 23:48-55.

Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1995) Applications of DNA Fingerprinting in Plants and Fungi DNA Fingerprinting in Plants and Fungi, CRC Press, Boca Raton.

Weir BS (1996) Genetic data analysis II. Methods for discretepopulation genetic data. Sinauer Associates, INC.Publishers, Sunderland, Masachusetts. p 283

White G, Powell W (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): An endangered tropical hardwood species. Molecular Ecology 6:851-860.

Winter P, Kahl G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. World Journal of Microbiology & Biotechnology 11: 438–448.

Wright S (1978) Evolution and the Genetics of Populations vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. DNA Cell Biol 10:233–238.

Yu K, Park SJ, Poysa V, Gepts P (2000) Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Hered 91:429–434

Zhang X, Blair MW, Wang S (2008) Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers

Zizumbo-Villarreal D, P Colunga, E Payro, P Delgado-Valerio, P Gepts (2005) Population *STRUCTURE* and evolution dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. Crop Sci. 45:1073-1083.

Zucchi MI, Brondani RV, Pinheiro JB, Brondani C, Vencovsky R (2002) Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). Molecular Ecology Notes 2:512-514.

# ANEXOS

**Anexo 1. 121 Genotipos pertenecientes al Acervo Mesoamericano**

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G278 | G2379 | G3545 | G4730 | G10971 | G15685 | G19941 |
| G753 | G2402 | G3586 | G4822 | G10982 | G16026 | G21212 |
| G801 | G2445 | G3593 | G5036 | G11010 | G16072 | G22044 |
| G803 | G2635 | G3595 | G5653 | G11057 | G16400 | G22787 |
| G955 | G2660 | G3661 | G5694 | G11656A | G16401 | BAT477 |
| G1264 | G2775 | G3807 | G5712 | G11721 | G16835 | BAT93 |
| G1328 | G2778 | G3936 | G5733 | G12778 | G16849A | DOR364 |
| G1356 | G2866 | G3990 | G6450 | G12796 | G17648 | DOR390 |
| G1358 | G2997 | G4002 | G7038 | G12806 | G17649 | MAHARAGISOJA |
| G1797 | G3005 | G4017 | G7602 | G13177 | G18141 | MASAAIDRED |
| G1957 | G3017 | G4206 | G7742 | G13578 | G18147 | NCB280 |
| G1977 | G3142 | G4258 | G7761 | G13696 | G18157 | PINTOVILLA |
| G2093 | G3178 | G4278 | G7765 | G14163 | G18440 | SEA15 |
| G2137 | G3185 | G4280 | G7863 | G14737 | G18451 | SER109 |
| G2199 | G3217 | G4342 | G7932 | G14914 | G18454 | SER16 |
| G2277 | G3331 | G4495 | G7952 | G15416 | G19012 | SXB418 |
| G2348 | G3334 | G4637 | G10945 | G15641 | G19204 | T.CANELA75 |
| G2352 | | | | | | VAX3 |

Anexo 1. 81 Genotipos pertenecientes al Acervo Andino.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G8209 | G4494 | G5273 | G9846 | G13094 | G17168 | AND1005 |
| G738 | G4534 | G5625 | G9855 | SEQ1027 | G18255 | CAL143 |
| G1678 | G4547 | G5708 | G11512 | G13910 | G18264 | CAL96 |
| G1688 | G4644 | G5849 | G11521 | G13911 | G18942 | DRK47 |
| G1836 | G4672 | G6639 | G11564 | G14016 | G19833 | PVA1111 |
| G1939 | G13595 | G6873 | G11585 | G14253 | G19842 | PVA773 |
| G2563 | G4721 | G7776 | G11727 | G16104E | G19860 | SAB258 |
| G2567 | G4739 | G7895 | G11759A | G16110A | G21210 | SAB645 |
| G2686 | G4906 | G7945 | G11957 | G16115 | G22147 | SEQ1003 |
| G2875 | G5034 | G19839 | G11982 | G16346 | G23604 | |
| G3157 | G5142 | G9335 | G12517 | G17070 | G23829 | |
| G4001 | G5170 | G9603 | G12529 | G17076 | AFR619 | |

**Anexo 2. Grupo A. 40 Cebadores con marcaje terminal fluorescente conformados por 10 paneles.**

| MARCADOR | SECUENCIA *FORWARD* | SECUENCIA *REVERSE* | Pb MIN | Pb MAX | PANEL | FLUORESCENTE | TIPO | Mg | Ta | GRUPO DE LIGAMIENTO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BM142 | *TTC CGCTGA TTG GAT ATT AGA G* | *AGCCCGTTCCTTCGTTTAG* | 155 | 162 | 0A | FAM | GENÓMICO | 2Mm | 52 | b02 |
| BM138 | *TGT CCC TAA GAA CGA ATA TGG AAT C* | *GAATCAAGCAACCTTGGATCATAAC* | 185 | 210 | 0A | NED | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b05 |
| BM53 | *AAC TAA CCT CAT ACG ACA TGA AA* | *AATGCTTGCACTAGGGAGTT* | 90 | 130 | 0A | VIC | GENÓMICO | 2Mm | 55 | b01 |
| BMd33 | *TAC GCT GTG ATG CAT GGT TT* | *CCTGAAAGTGCAGAGTGGTG* | 97 | 110 | 0A | PET | GENÓMICO | 2Mm | 47 | b11 |
| BM170 | *AGC CAG GTG CAA GAC CTT AG* | *AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC* | 148 | 192 | 0B | PET | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b06 |
| GATS11 | *CAC ATT GGT GCT AGT GTC GG* | *GAACCTGCAAAGCAAAGAGC* | 226 | 233 | 0B | NED | GENÓMICO | 2Mm | 52 | b10 |
| BM185 | *AAG GAG GTT TCT ACC TAA TTC C* | *AAAGCAGGGATGTAGTTGC* | 100 | 117 | 0B | VIC | GENÓMICO | 2Mm | 52 | b07 |
| BMd36 | *CAT AAC ATC GAA GCC TCA CAG T* | *ACGTGCGTACGAATACTCAGTC* | 161 | 182 | 0B | FAM | GENÓMICO | 2Mm | 47 | b03 |
| BM212 | *AGG AAG GGA TCC AAA GTC ACT C* | *TGAACTTTCAGGTATTGATGAATGAAG* | 90 | 130 | 1A | FAM | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b10 |
| BM199 | *AAG GAG AAT CAG AGA AGC CAA AAG* | *TGAGGAATGGATGTAGCTCAGG* | 270 | 320 | 1A | NED | GENÓMICO | 2Mm | 56 | b04 |
| BM157 | *ACT TAA CAA GGA ATA GCC ACA CA* | *GTTAATTGTTTCCAATATCAACCTG* | 96 | 130 | 1A | VIC | GENÓMICO | 2Mm | 52 | b10 |
| PV-ag001 | *CAA TCC TCT CTC TCT CAT TTC CAA TC* | *GACCTTGAAGTCGGTGTCGTTT* | 148 | 160 | 1A | PET | GÉNICO | 2Mm | 47 | b11 |
| BMd40 | *AAC CTT CTT GCG CTG ATC TC* | *TAGTGGCCATTCCTCGATCT* | 190 | 213 | 1B | FAM | GENÓMICO | 2Mm | 47 | b07 |
| BMd41 | *CAG TAA ATA TTG GCG TGG ATG A* | *TGAAAGTGCAGAGTGGTGGA* | 232 | 255 | 1B | NED | GENÓMICO | 2Mm | 47 | b11 |
| BM152 | *AAG AGG AGG TCG AAA CCT TAA ATC G* | *CCG GGA CTT GCC AGA AGA AC* | 80 | 138 | 1B | VIC | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b02 |
| BM161 | *TGC AAA GGG TTG AAA GTT GAG AG* | *TTC CAA TGC ACC AGA CAT TCC* | 148 | 195 | 1B | PET | GENÓMICO | 2Mm | 52 | b04 |
| BMd03 | *TGT TTC TTC CTT ATG GTT AGG TTG* | *TCA CGT TAT CAC CAG CAT CGT AGT A* | 217 | 233 | 2A | FAM | GÉNICO | 2Mm | 49 | Na |
| PV-gaat001 | *AAG GAT GGG TTC CGT GCT TG* | *CAC GGT ACA CGA AAC CAT GCT ATC* | 130 | 140 | 2A | NED | GÉNICO | 2Mm | 47 | b04 |
| BM184 | *AGT GCT CTA TCA AGA TGT GTG* | *ACA TAA TCA ATG GGT CAC TG* | 150 | 167 | 2A | PET | GENÓMICO | 2Mm | 52 | b11 |
| BM98 | *GCA TCA CAA AGG ACT GAG AGC* | *CCC AAG CAA AGA GTC GAT TT* | 242 | 255 | 2A | VIC | GENÓMICO | 2Mm | 55 | b03 |
| BM209 | *CAA CCA ATG AAT GCT GAC AAT G* | *CAA TTT CTT GAT TGA AAG GCA AT* | 90 | 158 | 2B | FAM | GENÓMICO | 2Mm | 56 | b07 |
| BMd12 | *CAT CAA CAA GGA CAG CCT CA* | *GCAGCTGGCGGGTAAAACAG* | 155 | 170 | 2B | NED | GENÓMICO | 2Mm | 47 | b06 |
| BM211 | *ATA CCC ACA TGC ACA AGT TTG G* | *CCA CCA TGT GCT CAT GAA GAT* | 140 | 220 | 2B | PET | GENÓMICO | 2Mm | 52 | b08 |
| BMd53 | *TGC TGA CCA AGG AAA TTC AG* | *GGA GGA GGC TTA AGC ACA AA* | 95 | 112 | 2B | VIC | GÉNICO | 2Mm | 47 | b05 |
| BMd42 | *TCA TAG AAG ATT TGT GGA AGC A* | *TGAGACACGTACGAGGCTGTAT* | 128 | 160 | 3A | PET | GENÓMICO | 2Mm | 49 | b10 |
| BM181 | *ATG CTG CGA GTT AAT GAT CG* | *TGA GGA GCA AAC AGA TGA GG* | 175 | 200 | 3A | NED | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b03 |
| BMd45 | *GGT TGG GAA GCC TCA TAC AG* | *ATCTTCGACCCACCTTGCT* | 85 | 130 | 3A | VIC | GÉNICO | 2Mm | 49 | b01 |
| BM151 | *CAC AAC AAG AAA GAC CTC CT* | *TTA TGT ATT AGA CCA CAT TAC TTC C* | 140 | 154 | 3A | FAM | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b08 |
| BM165 | *TCA AAT CCC ACA CAT GAT CG* | *TTC TTT CAT TCA TAT TAT TCC GTT CA* | 155 | 192 | 3B | PET | GENÓMICO | 2Mm | 52 | Na |
| BM154 | *TCT TGC GAC CGA GCT TCT CC* | *CTG AAT CTG AGG AAC GAT GAC CAG* | 205 | 248 | 3B | NED | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b09 |
| BM189 | *CTC CCA CTC TCA CCC TCA CT* | *GCG CCA AGT GAA ACT AAG TAG A* | 100 | 117 | 3B | VIC | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b08 |
| BMd10 | *GCT CAC GTA CGA GTT GAA TCT CAG* | *ATC TGA GAG CAG CGA CAT GGT AG* | 135 | 144 | 3B | FAM | GÉNICO | 2Mm | 48 | b01 |
| BMd07 | *GGA TAT GGT GGT GAT CAA GGA* | *CATACCCAATGCCATGTTCTC* | 140 | 180 | 4A | NED | GÉNICO | 2Mm | 49 | b02 |
| PV-at007 | *AGT TAA ATT ATA CGA GGT TAG CCT AAA TC* | *CAT TCC CTT CAC ACA TTC ACC G* | 145 | 215 | 4A | FAM | GÉNICO | 2Mm | 49 | b09 |
| BM167 | *TCC TCA ATA CTA CAT CGT GTG ACC* | *CCT GGT GTA ACC CTC GTA ACA G* | 100 | 165 | 4A | VIC | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b02 |
| BM153 | *CCG TTA GGG AGT TGT TGA GG* | *TGA CAA ACC ATG AAT ATG CTA AGA* | 175 | 255 | 4A | PET | GENÓMICO | 2Mm | 52 | Na |
| BMd22 | *GGT CAC TTC CGG AGC ATT C* | *CGGGAAATGGAAGTCACAGT* | 100 | 123 | 4B | NED | GÉNICO | 2Mm | 47 | b11 |
| BM202 | *ATG CGA AAG AGG AAC AAT CG* | *CCT TTA CCC ACA CGC CTT C* | 130 | 210 | 4B | FAM | GENÓMICO | 2Mm | 50 | Na |
| BM114 | *AGC CTG GTG AAA TGC TCA TAG* | *CAT GCT TGT TGC CTA ACT CTC T* | 220 | 275 | 4B | VIC | GENÓMICO | 2Mm | 50 | b09 |
| Pv-ag004 | *TTG ATG ACG TGG ATG CAT TGC* | *AAA GGG CTA GGG AGA GTA AGT TGG* | 150 | 216 | 4B | PET | GÉNICO | 2Mm | 47 | b04 |

**Cada marcador presenta la secuencia del cebador *forward* que contiene el fluorocromo y la secuencia *reverse*, el tamaño estimado para cada alelo (en pb máximo y mínimo), los paneles (0A – 4B), el nombre del fluorocromo, el tipo de marcador (Genómico y Génico), la concentración de Magnesio (Mg), así como la temperatura de alineamiento (Ta en °C) y el grupo de ligamiento al que pertenecen. Los marcadores que presentan Na no han sido mapeados aún por lo que no presentan anclaje a un grupo de ligamiento.**

**Continuación Anexo 2. Grupo B. 36 cebadores con marcaje terminal fluorescentes conformados por 9 paneles.**

| MARCADOR | SECUENCIA *FORWARD* | SECUENCIA *REVERSE* | Pb MIN | Pb MAX | PANEL | FLUORESCENTE | TIPO | Mg | Ta | GRUPO DE LIGAMIENTO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GATS91 | GAG TGC GGA AGC GAG TAG AG | TCC GTG TCC CTC TGT CTG TG | 210 | 275 | 5a | FAM | GENOMIC | 1.5Mm | 50 | b02 |
| BMd08 | TTC ATC CTC TCT CCC GAA CTT | CTT TTG TGG CTG AGA CAT GGT | 176 | 190 | 5a | NED | GENIC | 1.5Mm | 52 | Na |
| BMd20 | GTT GCC ACC GGT GAT AAT CT | GTG AGG CAA GAA GCC TTC AA | 118 | 132 | 5a | VIC | GENIC | 2Mm | 52 | b05 |
| BM172 | CTG TAG CTC AAA CAG GGC ACT | GCA ATA CCG CCA TGA GAG AT | 82 | 110 | 5a | PET | GENOMIC | 2Mm | 50 | b03 |
| BM188 | TCG CCT TGA AAC TTC TTG TAT C | CCC TTC CAG TTA AAT CAG TCG | 142 | 190 | 5b | NED | GENOMIC | 1.5Mm | 50 | b09 |
| BM175 | CAA CAG TTA AAG GTC GTC AAA TT | CCA CTC TTA GCA TCA ACT GGA | 160 | 195 | 5b | VIC | GENOMIC | 1.5Mm | 50 | b05 |
| BM200 | TGG TGG TTG TTA TGG GAG AAG | ATT TGT CTC TGT CTA TTC CTT CCA C | 227 | 295 | 5b | FAM | GENOMIC | 2Mm | 54 | b01 |
| BM205 | CTA GAC CAG GCA AAG CAA GC | TGA GCT GGG ATT TCA TTT CTG | 135 | 153 | 5b | PET | GENOMIC | 2Mm | 50 | b07 |
| BM139 | TTA GCA ATA CCG CCA TGA GAG | ACT GTA GCT CAA ACA GGG CAC | 84 | 118 | 6a | PET | GENOMIC | 2Mm | 50 | b02 |
| BM156 | CTT GTT CCA CCT CCC ATC ATA GC | TGC TTG CAT CTC AGC CAG AAT C | 210 | 315 | 6a | FAM | GENOMIC | 1.5Mm | 55 | b02 |
| PV-ctt001 | GAG GGT GTT TCA CTA TTG TCA CTG C | TTC ATG GAT GGT GGA GGA ACA G | 152 | 172 | 6a | VIC | GENIC | 1.5Mm | 50 | b03 |
| BM160 | CGT GCT TGG CGA ATA GCT TTG | CGC GGT TCT GAT CGT GAC TTC | 183 | 265 | 6a | NED | GENOMIC | 1.5Mm | 55 | b07 |
| PV-ag003 | TCA CGT ACG AGT TGA ATC TCA GGA T | GGT GTC GGA GAG GTT AAG GTT G | 161 | 168 | 6b | NED | GENIC | 1.5Mm | 50 | b01 |
| BMd01 | CAA ATC GCA ACA CCT CAC AA | GTC GGA GCC ATC ATC TGT TT | 165 | 199 | 6b | FAM | GENIC | 1.5Mm | 50 | b03 |
| BMd02 | AGC GAC AGC AAG AGA ACC TC | CAA CAA ACG GTG ATT GAC CA | 100 | 110 | 6b | PET | GENIC | 1.5Mm | 50 | b02 |
| BMd16 | ATG ACA CCA CTG GCC ATA CA | CTC ACT GTC TTC CAT CCA AGC | 135 | 150 | 6b | VIC | GENIC | 1.5Mm | 50 | b04 |
| BM201 | TGG TGC TAC AGA CTT GAT GG | TGT CAC CTC TCT CCT CCA AT | 94 | 114 | 7a | PET | GENOMIC | 2Mm | 50 | b07 |
| AG01 | CAT GCA GAG GAA GCA GAG TG | GAG CGT CGT CGT TTC GAT | 126 | 142 | 7a | VIC | GENOMIC | 2Mm | 50 | b03 |
| BM140 | TGC ACA ACA CAC ATT TAG TGA C | CCT ACC AAG ATT GAT TTA TGG G | 160 | 210 | 7a | FAM | GENOMIC | 1.5Mm | 50 | b04 |
| GATS54 | GAA CCT GCA AAG CAA AGA GC | TCA CTC TCC AAC CAG ATC GAA | 114 | 117 | 7a | NED | GENOMIC | 1.5Mm | 50 | b3 |
| BM187 | TTT CTC CAA CTC ACT CCT TTC C | TGT GTT TGT GTT CCG AAT TAT GA | 150 | 226 | 7b | VIC | GENOMIC | 1.5Mm | 52 | b06 |
| BMd17 | GTT AGA TCC CGC CCA ATA GTC | AGA TAG GAA GGG CGT GGT TT | 100 | 118 | 7b | PET | GENIC | 1.5Mm | 50 | b02 |
| BM183 | CTC AAA TCT ATT CAC TGG TCA GC | TCT TAC AGC CTT GCA GAC ATC | 134 | 160 | 7b | NED | GENOMIC | 1.5Mm | 52 | b07 |
| PV-at001 | GGG AGG GTA GGG AAG CAG TG | GCG AAC CAC GTT CAT GAA TGA | 170 | 330 | 7b | FAM | GENIC | 2Mm | 55 | b04 |
| BM143 | GGG AAA TGA ACA GAG GAA A | ATG TTG GGA ACT TTT AGT GTG | 118 | 176 | 8a | PET | GENOMIC | 2Mm | 55 | b02 |
| BM149 | CGA TGG ATG GAT GGT TGC AG | GGG CCG ACA AGT TAC ATC AAA TTC | 242 | 258 | 8a | FAM | | 2Mm | 50 | Na |
| BM137 | CGC TTA CTC ACT GTA CGC ACG | CGC TTA CTC ACT GTA CGC ACG | 122 | 238 | 8a | VIC | GENOMIC | 2Mm | 65 | b0 |
| BMd46 | GGC TGA CAA CAA CTC TGC AC | CTG GCA TAG GTT GCT CCT TC | 320 | 330 | 8a | NED | GENIC | 1.5Mm | 50 | Na |
| BMd47 | ACC TGG TCC CTC AAA CCA AT | CAA TGG AGC ACC AAA GAT CA | 128 | 154 | 8b | PET | GENIC | 1.5Mm | 50 | b02 |
| BM141 | TGA GGA GGA ACA ATG GTG GC | CTC ACA AAC CAC AAC GCA CC | 160 | 350 | 8b | FAM | GENOMIC | 2Mm | 55 | b09 |
| PV-cct001 | CCA ACC ACA TTC TTC CCT ACG TC | GCG AGG CAG TTA TCT TTA GGA GTG | 137 | 158 | 8b | VIC | GENIC | 1.5Mm | 50 | Na |
| BMd15 | TTG CCA TCG TTG CTT AAT TG | TTG GAG GAA GCC ATG TAT GC | 163 | 202 | 8b | NED | GENIC | 1.5Mm | 50 | b04 |
| BMd51 | CGC CAA TTC TTC AAC CCT AA | GTA GTT CGC CCG AGG ACT G | 107 | 118 | 9a | PET | GENIC | 1.5Mm | 50 | Na |
| BMd18 | AAA GTT GGA CGC ACT GTG ATT | TCG TGA GGT AGG AGT TTG GTG | 156 | 242 | 9a | FAM | GENIC | 1.5Mm | 50 | b02 |
| PV-at003 | AAG GAT GGG TTC CGT GCT TG | GAA TGT GAA TAT CAG AAA GCA AAT GG | 156 | 166 | 9a | VIC | GENIC | 1.5Mm | 50 | b04 |
| BMd56 | AAT GCG TGA GCA TGA TTA AGG | TCA TCT GTC AGC ACC AAA CC | 186 | 192 | 9a | NED | GENOMIC | 2Mm | 50 | b02 |

**Continuación Anexo 2. Grupo C. 12 cebadores diseñados con primer universal M13 conformando 3 paneles.**

| MARCADOR | *SECUENCIA *FORWARD* | SECUENCIA *REVERSE* | Pb MIN | Pb MAX | PANEL | FLUOROSCENTE | TIPO | Ta | Mg | GRUPO DE LIGAMIENTO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BMc307 | *CGC ACG ATT ACT GAA AGT TAG A* | *TCTGCCGAAACTAACACTCG* | 94 | 125 | 10 | VIC | GENICO | 47 | 2mM | b11 |
| BMc294 | *GGT CGT GAT GTC TCC ATT T* | *TACCTCCCATCATGCACTTAC* | 100 | 133 | 10 | PET | GENICO | 47 | 2mM | b02 |
| BMc284 | *CCC TAT TTA TCT GCA AAT TCA CGA G* | *GGGAGTGTAGATCAAGAGATTAAG* | 170 | 194 | 10 | NED | GENICO | 47 | 2mM | b04 |
| BMc292 | *CCT TAT TAT ACT TGT GGT CTC TCT CTC* | *CGAGGATGAACAGAGCATGA* | 80 | 135 | 10 | FAM | GENICO | 47 | 2mM | b09 |
| | | | | | | | | | | |
| BMc206 | *CTC TCA TCC ATT CGC ACC TT* | *ACCCCACTTGGTCTTCGTCT* | 102 | 104 | 14 | VIC | GENICO | 47 | 2mM | b06 |
| BMc161 | *CCG CTC TTA ACC TGT CAC CT* | *ACCGTGTATTTGAGCGGTTG* | 130 | 140 | 14 | PET | GENICO | 47 | 2mM | b06 |
| BM213 | *AAC CCT AAG CTT CAC GCA TTT G* | *GAGAGATTGACGACGGTTT* | 158 | 160 | 14 | NED | GENICO | 55 | 2mM | Na |
| BM197 | *TGG ACT GGT CGA TAC GAA GC* | *CCCAGAAGATTGAGAACACCAC* | 195 | 200 | 14 | FAM | GENICO | 53 | 2mM | b03 |
| | | | | | | | | | | |
| BMc283 | *CAA AGT CCC ACT CTT CTC TCT C* | *TCAGCAAACCCTAATTGGAA* | 96 | 113 | 15 | VIC | GENICO | 47 | 2mM | b06 |
| BMc352 | *TCT CTC TCT TAC TCT TTC TCT CTC TC* | *AGAATTGAGAATTGTGCTGAGAA* | 55 | 90 | 15 | PET | GENICO | 47 | 2mM | b09 |
| BMd26 | *CTT GCC TTG TGC TTC CTT CT* | *TCCATTCCCAACCAAGTTTC* | 90 | 125 | 15 | NED | GENICO | 55 | 2mM | b04 |
| BM68 | *TTC GTT CAC AAC CTC TTG CAT T* | *TGCTTGTTATCTTGCCCAGTG* | 90 | 100 | 15 | FAM | GENICO | 56 | 2mM | b04 |

*El cebador *forward* se diseño con la secuencia del primer universal M13 (TGTAAAACGACGGCCAGT) unida a su extremo 5' por lo que recibe el nombre de quimera. La secuencia *reverse* se mantiene inalterada.

**Anexo 3. Diversidad genética en 202 genotipos analizados por medio de 88 marcadores microsatélites, 77 con marcaje terminal fluorescente y 12 con la metodología de marcaje fluorescente M13.**

| MARCADORES GÉNICOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **MARCADOR** | **No ALELOS** | **VIABILIDAD**[†] | **DIVERSIDAD GENÉTICA** | **HETEROCIGOCIDAD** | **PIC**[*] |
| **BM197** | **3** | 0.90 | 0.59 | 0.011 | 0.51 |
| **BM213** | 17 | 0.99 | 0.76 | 0.945 | 0.72 |
| **BM68** | 4 | 1.00 | 0.64 | 0.861 | 0.58 |
| **BMc161** | 5 | 0.97 | 0.71 | 0.000 | 0.66 |
| **BMc206** | 7 | 0.99 | 0.76 | 0.025 | 0.72 |
| **BMc283** | 11 | 1.00 | 0.71 | 0.000 | 0.67 |
| **BMc284** | 15 | 0.93 | 0.84 | 0.000 | 0.82 |
| **BMc292** | 13 | 0.96 | 0.83 | 0.440 | 0.81 |
| **BMc294** | 11 | 1.00 | 0.81 | 0.010 | 0.79 |
| **BMc307** | 6 | 1.00 | 0.72 | 0.070 | 0.67 |
| **BMc352** | 11 | 1.00 | 0.70 | 0.960 | 0.65 |
| **BMd01** | 14 | 0.99 | 0.78 | 0.050 | 0.75 |
| **BMd02** | **3** | 1.00 | 0.50 | 0.025 | 0.38 |
| **BMd07** | 8 | 1.00 | 0.72 | 0.000 | 0.67 |
| **BMd10** | **3** | 1.00 | 0.52 | 0.000 | 0.45 |
| **BMd15** | 6 | 0.97 | 0.58 | 0.282 | 0.50 |
| **BMd16** | 5 | 0.98 | 0.51 | 0.036 | 0.39 |
| **BMd17** | **3** | 0.99 | 0.66 | 0.080 | 0.58 |
| **BMd18** | 4 | 0.98 | **0.14** | 0.071 | **0.13** |
| **BMd20** | 6 | 0.93 | 0.69 | 0.027 | 0.64 |
| **BMd22** | **3** | 1.00 | 0.53 | 0.000 | 0.44 |
| **BMd26** | 8 | 0.99 | 0.69 | 0.719 | 0.64 |
| **BMd45** | 19 | 1.00 | 0.76 | 0.617 | 0.73 |
| **BMd47** | **3** | 0.97 | 0.48 | 0.010 | 0.37 |
| **BMd53** | **3** | 0.97 | 0.50 | 0.000 | 0.39 |
| **PV-ag001** | 4 | 1.00 | 0.53 | 0.000 | 0.46 |
| **PV-gaat001** | 5 | 1.00 | 0.54 | 0.000 | 0.48 |
| **PV-at007** | 13 | 1.00 | 0.87 | 0.000 | 0.86 |
| **PV-ag004** | 8 | 1.00 | 0.78 | 0.000 | 0.74 |
| **PV-ag003** | **3** | 0.99 | 0.57 | 0.000 | 0.48 |
| **PV-at001** | **50** | 0.99 | **0.97** | 0.035 | **0.97** |
| **PV-at003** | 7 | 0.98 | 0.51 | 0.178 | 0.43 |
| **PROMEDIO** | **9** | **0.98** | **0.65** | **0.17** | **0.61** |

En color verde se señalan los valores altos para cada una de las variables y en color rojo los valores más bajos. ([*]) Grado de contenido de información polimórfica. ([†]) porcentaje de datos perdidos.

**Continuación Anexo 3**

| MARCADORES GENÓMICOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **MARCADOR** | **No ALELOS** | **VIABILIDAD** | **DIVERSIDAD GENÉTICA** | **HETEROCIGOCIDAD** | **PIC*** |
| **AG01** | 6 | 0.94 | 0.43 | 0.074 | 0.40 |
| **BM114** | 10 | 1.00 | 0.80 | 0.000 | 0.79 |
| **BM137** | 33 | 0.85 | **0.95** | 0.082 | **0.94** |
| **BM138** | 7 | 1.00 | 0.59 | 0.000 | 0.52 |
| **BM139** | 17 | 0.98 | 0.65 | 0.051 | 0.64 |
| **BM140** | 13 | 0.92 | 0.48 | 0.033 | 0.46 |
| **BM141** | 18 | 0.96 | 0.78 | 0.042 | 0.75 |
| **BM142** | 3 | 1.00 | 0.49 | 0.000 | 0.39 |
| **BM143** | 26 | 1.00 | 0.91 | 0.085 | 0.90 |
| **BM149** | **2** | 1.00 | 0.39 | 0.015 | 0.31 |
| **BM151** | 5 | 1.00 | 0.62 | 0.000 | 0.57 |
| **BM152** | 24 | 1.00 | 0.88 | 0.473 | 0.86 |
| **BM153** | 14 | 1.00 | 0.83 | 0.000 | 0.81 |
| **BM154** | 15 | 1.00 | 0.88 | 0.000 | 0.86 |
| **BM156** | 21 | 0.99 | 0.82 | 0.056 | 0.80 |
| **BM157** | 19 | 1.00 | 0.85 | 0.647 | 0.83 |
| **BM160** | 16 | 0.99 | 0.68 | 0.030 | 0.66 |
| **BM161** | 6 | 1.00 | 0.75 | 0.000 | 0.71 |
| **BM165** | 13 | 1.00 | 0.84 | 0.000 | 0.82 |
| **BM167** | 4 | 1.00 | 0.51 | 0.000 | 0.39 |
| **BM170** | 13 | 1.00 | 0.79 | 0.000 | 0.77 |
| **BM172** | 17 | 0.91 | 0.71 | 0.126 | 0.70 |
| **BM175** | 17 | 0.99 | 0.72 | 0.010 | 0.70 |
| **BM181** | 7 | 1.00 | 0.66 | 0.000 | 0.61 |
| **BM183** | 11 | 0.98 | 0.75 | 0.025 | 0.71 |
| **BM184** | 6 | 1.00 | 0.61 | 0.000 | 0.55 |
| **BM185** | 10 | 1.00 | 0.68 | 0.000 | 0.63 |
| **BM187** | **42** | 0.98 | 0.93 | 0.076 | 0.93 |
| **BM188A** | 5 | 0.92 | 0.52 | 0.016 | 0.41 |
| **BM188B** | 13 | 0.92 | 0.76 | 0.022 | 0.74 |
| **BM189** | 7 | 1.00 | 0.70 | 0.000 | 0.65 |
| **BM199** | 10 | 1.00 | 0.51 | 0.000 | 0.47 |
| **BM200** | 41 | 0.84 | 0.93 | 0.036 | 0.93 |
| **BM201** | 9 | 0.93 | 0.77 | 0.129 | 0.74 |
| **BM202** | 11 | 1.00 | 0.68 | 0.000 | 0.62 |
| **BM205** | 11 | 0.99 | 0.70 | 0.020 | 0.66 |
| **BM209** | 20 | 0.97 | 0.86 | 0.641 | 0.84 |
| **BM211** | 8 | 0.97 | 0.80 | 0.000 | 0.78 |
| **BM212** | 18 | 1.00 | 0.83 | 1.000 | 0.81 |

**Continuación Anexo 3**

| MARCADORES GENÓMICOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **MARCADOR** | **No ALELOS** | **VIABILIDAD[■]** | **DIVERSIDAD GENÉTICA** | **HETEROCIGOCIDAD** | **PIC[*]** |
| **BM53** | 20 | 1.00 | 0.60 | 0.055 | 0.53 |
| **BM98** | 5 | 1.00 | 0.49 | 0.000 | 0.46 |
| **BMd03** | 7 | 1.00 | 0.67 | 0.000 | 0.61 |
| **BMd08** | 5 | 0.93 | 0.55 | 0.032 | 0.46 |
| **BMd12** | **2** | 0.97 | 0.26 | 0.000 | 0.23 |
| **BMd33** | 18 | 1.00 | 0.73 | 0.204 | 0.69 |
| **BMd36** | 9 | 1.00 | 0.82 | 0.000 | 0.80 |
| **BMd40** | **2** | 1.00 | 0.47 | 0.000 | 0.36 |
| **BMd41** | 6 | 1.00 | 0.60 | 0.000 | 0.55 |
| **BMd42** | 3 | 1.00 | 0.21 | 0.000 | 0.19 |
| **BMd46** | 3 | 1.00 | 0.49 | 0.000 | 0.38 |
| **BMd51** | 3 | 0.98 | **0.02** | 0.005 | **0.02** |
| **BMd56** | 4 | 0.95 | 0.24 | 0.016 | 0.21 |
| **GATS11** | 6 | 1.00 | 0.41 | 0.000 | 0.38 |
| **GATs54** | **2** | 0.94 | 0.45 | 0.011 | 0.35 |
| **GATs91** | 22 | 0.91 | 0.90 | 0.082 | 0.89 |
| **PV-cct001** | 5 | 0.97 | 0.10 | 0.010 | 0.10 |
| **PV-ctt001** | 9 | 0.99 | 0.76 | 0.096 | 0.72 |
| **PROMEDIO** | **12** | **0.97** | **0.64** | **0.07** | **0.60** |

En color verde se señalan los valores altos para cada una de las variables y en color rojo los valores más bajos. ([*]) Grado de contenido de información polimórfica. ([■]) porcentaje de datos perdidos.

**Anexo 4. Grupo de marcadores A. Diversidad genética en 202 genotipos analizados con 40 marcadores microsatélites fluorescentes génicos y genómicos.**

| MARCADORES GÉNICOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| MARCADOR | No ALELOS | VIABILIDAD* | DIVERSIDAD GENÉTICA | HETEROCIGOCIDAD | PIC* |
| BMd07 | 9.0 | 1.00 | 0.72 | 0.00 | 0.67 |
| BMd10 | 3.0 | 1.00 | 0.52 | 0.00 | 0.45 |
| BMd22 | 3.0 | 1.00 | 0.53 | 0.00 | 0.44 |
| BMd45 | 19.0 | 1.00 | 0.76 | 0.62 | 0.73 |
| BMd53 | 3.0 | 0.97 | 0.50 | 0.00 | 0.39 |
| PV-ag001 | 4.0 | 1.00 | 0.53 | 0.00 | 0.46 |
| PV-gaat001 | 8.0 | 1.00 | 0.74 | 0.00 | 0.69 |
| PV-at007 | 13.0 | 1.00 | 0.87 | 0.00 | 0.86 |
| PV-ag004 | 8.0 | 1.00 | 0.78 | 0.00 | 0.74 |
| **PROMEDIO** | **7.8** | **0.99** | **0.66** | **0.07** | **0.60** |

| MARCADORES GENÓMICOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| MARCADOR | No ALELOS | VIABILIDAD* | DIVERSIDAD GENÉTICA | HETEROCIGOCIDAD | PIC* |
| BM114 | 10.0 | 1.00 | 0.80 | 0.00 | 0.79 |
| BM138 | 7.0 | 1.00 | 0.59 | 0.00 | 0.52 |
| BM142 | 3.0 | 1.00 | 0.49 | 0.00 | 0.39 |
| BM151 | 5.0 | 1.00 | 0.62 | 0.00 | 0.57 |
| BM152 | 24.0 | 1.00 | 0.88 | 0.47 | 0.86 |
| BM153 | 14.0 | 1.00 | 0.83 | 0.00 | 0.81 |
| BM154 | 15.0 | 1.00 | 0.88 | 0.00 | 0.86 |
| BM157 | 19.0 | 1.00 | 0.85 | 0.65 | 0.83 |
| BM161 | 6.0 | 1.00 | 0.75 | 0.00 | 0.71 |
| BM165 | 13.0 | 1.00 | 0.84 | 0.00 | 0.82 |
| BM167 | 4.0 | 1.00 | 0.51 | 0.00 | 0.39 |
| BM170 | 13.0 | 1.00 | 0.79 | 0.00 | 0.77 |
| BM181 | 7.0 | 1.00 | 0.66 | 0.00 | 0.61 |
| BM184 | 6.0 | 1.00 | 0.61 | 0.00 | 0.55 |
| BM185 | 10.0 | 1.00 | 0.68 | 0.00 | 0.63 |
| BM189 | 7.0 | 1.00 | 0.70 | 0.00 | 0.65 |
| BM199 | 10.0 | 1.00 | 0.51 | 0.00 | 0.47 |
| BM202 | 11.0 | 1.00 | 0.68 | 0.00 | 0.62 |
| BM209 | 20.0 | 0.97 | 0.86 | 0.64 | 0.84 |
| BM211 | 8.0 | 0.97 | 0.80 | 0.00 | 0.78 |
| BM53 | 20.0 | 1.00 | 0.60 | 0.05 | 0.53 |
| BM98 | 5.0 | 1.00 | 0.49 | 0.00 | 0.46 |
| BMd03 | 7.0 | 1.00 | 0.67 | 0.00 | 0.61 |
| BMd12 | 2.0 | 0.97 | 0.26 | 0.00 | 0.23 |
| BMd33 | 18.0 | 1.00 | 0.73 | 0.20 | 0.69 |
| BMd36 | 9.0 | 1.00 | 0.82 | 0.00 | 0.80 |
| BMd40 | 2.0 | 1.00 | 0.47 | 0.00 | 0.36 |
| BMd41 | 8.0 | 1.00 | 0.60 | 0.00 | 0.56 |
| BMd42 | 3.0 | 1.00 | 0.21 | 0.00 | 0.19 |
| GATS11 | 6.0 | 1.00 | 0.41 | 0.00 | 0.38 |
| **PROMEDIO** | **9.7** | **0.99** | **0.65** | **0.07** | **0.61** |

**Anexo 5. Grupo de marcadores B. Diversidad genética en 202 genotipos analizados con 36 marcadores microsatélites fluorescentes génicos y genómicos.**

| MARCADORES GÉNICOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **MARCADOR** | **No ALELOS** | **VIABILIDAD** | **DIVERSIDAD GENÉTICA** | **HETEROCIGOCIDAD** | **PIC*** |
| **BMd01** | 14.0 | 0.99 | 0.78 | 0.050 | 0.75 |
| **BMd02** | **3.0** | 1.00 | 0.50 | 0.025 | 0.38 |
| **BMd15** | 6.0 | 0.97 | 0.58 | 0.282 | 0.50 |
| **BMd16** | 5.0 | 0.98 | 0.51 | 0.036 | 0.39 |
| **BMd17** | **3.0** | 0.99 | 0.66 | 0.080 | 0.58 |
| **BMd18** | 4.0 | 0.98 | **0.14** | 0.071 | **0.13** |
| **BMd20** | 6.0 | 0.93 | 0.69 | 0.027 | 0.64 |
| **BMd47** | **3.0** | 0.97 | 0.48 | 0.010 | 0.37 |
| **PV-ag003** | **3.0** | 0.99 | 0.57 | 0.000 | 0.48 |
| **PV-at001** | **50.0** | 0.99 | **0.97** | 0.035 | **0.97** |
| **PV-at003** | 7.0 | 0.98 | 0.51 | 0.178 | 0.43 |
| **PROMEDIO** | **9.5** | **0.98** | **0.58** | **0.072** | **0.51** |

| MARCADORES GENÓMICOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **MARCADOR** | **No ALELOS** | **VIABILIDAD** | **DIVERSIDAD GENÉTICA** | **HETEROCIGOCIDAD** | **PIC*** |
| **AG01** | 6.0 | 0.94 | 0.43 | 0.074 | 0.40 |
| **BM137** | 33.0 | 0.85 | **0.95** | 0.082 | **0.94** |
| **BM139** | 17.0 | 0.98 | 0.65 | 0.051 | 0.64 |
| **BM140** | 13.0 | 0.92 | 0.48 | 0.033 | 0.46 |
| **BM141** | 18.0 | 0.96 | 0.78 | 0.042 | 0.75 |
| **BM143** | 26.0 | 1.00 | 0.91 | 0.085 | 0.90 |
| **BM149** | **2.0** | 1.00 | 0.39 | 0.015 | 0.31 |
| **BM156** | 21.0 | 0.99 | 0.82 | 0.056 | 0.80 |
| **BM160** | 16.0 | 0.99 | 0.68 | 0.030 | 0.66 |
| **BM172** | 17.0 | 0.91 | 0.71 | 0.126 | 0.70 |
| **BM175** | 17.0 | 0.99 | 0.72 | 0.010 | 0.70 |
| **BM183** | 11.0 | 0.98 | 0.75 | 0.025 | 0.71 |
| **BM187** | **42.0** | 0.98 | 0.93 | 0.076 | 0.93 |
| **BM188A** | 5.0 | 0.92 | 0.52 | 0.016 | 0.41 |
| **BM188B** | 14.0 | 0.92 | 0.77 | 0.022 | 0.74 |
| **BM200** | 41.0 | 0.84 | 0.93 | 0.036 | 0.93 |
| **BM201** | 9.0 | 0.93 | 0.77 | 0.129 | 0.74 |
| **BM205** | 11.0 | 0.99 | 0.70 | 0.020 | 0.66 |
| **BMd08** | 5.0 | 0.93 | 0.55 | 0.032 | 0.46 |
| **BMd46** | 3.0 | 1.00 | 0.49 | 0.000 | 0.38 |
| **BMd51** | 3.0 | 0.98 | **0.02** | 0.005 | 0.02 |
| **BMd56** | 4.0 | 0.95 | 0.24 | 0.016 | 0.21 |
| **GATs54** | **2.0** | 0.94 | 0.45 | 0.011 | 0.35 |
| **GATs91** | 22.0 | 0.91 | 0.90 | 0.082 | 0.89 |
| **PV-ctt001** | 9.0 | 0.99 | 0.76 | 0.096 | 0.72 |
| **PROMEDIO** | **14.7** | **0.95** | **0.65** | **0.047** | **0.62** |

En color verde se señalan los valores altos para cada una de las variables y en color rojo los valores más bajos. (*) Grado de contenido de información polimórfica. (▪) porcentaje de datos perdidos.

**Anexo 6. Extracción de ADN de fríjol por medio de CTAB (Dellaporta et al. 1983).**

- Colectar 3gr. de tejido foliar joven (trifolios), se almacenan en bolsas de papel aluminio y se llevan a freezer -80°C.

- Macerar con Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, tratando de evitar la hidratación del macerado, posteriormente se lleva 3 gr. de macerado a tubo Falcon de 45ml.

- Se agrega 15ml de Buffer de extracción (1.5% CTAB; 1M NaCl; 0.015M EDTA PH=8.0 0.15M T/HCL PH=8; 1 % PVP ; 1.2% B-ME) precalentado en baño maria a 65°C.

- Agitar en Vortex por 1min.

- Incubar a 65°C en baño maria por 1 hora, cada 15 min. agitar por inversión.

- Adicionar 15ml. de Fenol: Cloroformo: Octanol (25:24:1), posteriormente agitar por inversión (aproximadamente 20 veces) hasta formar emulsión. Agitar en Shaker por 10min.

- Centrifugar a 4000 r. p. m por 20min a 4°C.

- Transferir fase acuosa (aproximadamente 15ml.) a un nuevo tubo sin tocar la interfase ya que es el precipitado proteico.

- Adicionar 15ml. de Cloroformo: Octanol (24:1), mezclar por inversión (aproximadamente 20 veces), posteriormente agitar en Shaker por 10min.

- Centrifugar a 4000 r. p. m. por 20min. a 4°C.

- Transferir fase acuosa (aproximadamente 10ml.) a un nuevo tubo.

- Añadir 1/10vol. de 3M Acetato de Sodio pH=5.2 (1ml) y 6/10vol. de Isopropanol 100%, frío (6ml.)

- Mezclar por inversión suavemente; incubar a -20°C, mínimo 1 hora, máximo toda la noche

- Centrifugar a 4000 r. p. m. por 20min. a 4°C

- Eliminar sobrenadante. Secar el pellet a temperatura ambiente (colocar tubo invertido sobre una toalla de papel).

- Lavar pellet con 1ml. de Etanol 70%, frío.

- Centrifugar a 4000 r. p. m. por 4min a 4°C.

- Eliminar sobrenadante suavemente sin perder el pellet, colocar el tubo invertido sobre una toalla de papel hasta que seque por completo.

- Resuspender el pellet en 500µl de TE pH= 8.0 con RNAasa (6ml. RNAasa por cada 1ml. de TE pH= 8.0).

- Incubar a 37°C por 1 hora.

- Transferir a tubo eppendorf de 1.5ml.

- Observar ADN en gel de agarosa al 1%. Preparar mezcla de Buffer de carga con GelRed para visualizar el ADN.

  $H_2O$= 300µl
  Blue Juice= 1200µl
  GelRed (1:1)= 4.5µl
  Vol. final= 1504.5µl

- Cuantificar con ADN de diferentes concentraciones 100. 200, 300 400ng/µl.