

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología

CARACTERIZACIÓN DE 20 VARIEDADES
MUTANTES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
MEDIANTE LA TÉCNICA DEL AFLP

Guatemala
2004

CARACTERIZACIÓN DE 20 VARIEDADES
MUTANTES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
MEDIANTE LA TÉCNICA DEL AFLP

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología

CARACTERIZACIÓN DE 20 VARIEDADES
MUTANTES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
MEDIANTE LA TÉCNICA DEL AFLP

Trabajo de investigación presentado por
Andrés Weinfeld Ávalos Figueroa
para optar al grado académico de
Licenciado en Bioquímica

Guatemala
2004

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. <i>Phaseolus vulgaris</i>	3
1. Descripción	3
2. Importancia del cultivo	5
3. Muestra a caracterizar	7
a. ICTA Altense	8
b. ICTA Hunapú	8
c. Mutantes de ICTA Altense e ICTA Hunapú	9
B. Empleo de marcadores moleculares en la caracterización de germoplasma	9
1. Marcador molecular	10
a. Definición	10
b. Base genética	10
2. Caracterización molecular de germoplasma	11
a. Marcadores moleculares empleados en caracterización de germoplasma	11
b. Marcadores empleados en caracterización de <i>P. vulgaris</i>	12
1) Morfológicos (no moleculares)	12
2) Proteínas / isoenzimas	13
3) RAPD	14
4) RFLP	14
5) SSR	14

6) AFLP	14
C. Empleo del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados en la caracterización de germoplasma	15
1. Origen	16
2. Definiciones	17
a. La técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados	17
b. El polimorfismo de longitud de un fragmento amplificado	17
3. Etapas de la técnica	17
a. Digestión del ADN genómico	17
b. Ligación de adaptadores	18
c. Preamplificación	29
d. Amplificación selectiva	20
e. Visualización	21
4. Base genética	22
5. Ventajas y desventajas de la técnica del AFLP	23
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	25
A. Objetivos	25
1. Objetivo general	25
2. Objetivos específicos	25
B. Hipótesis	25
IV. TRABAJO EXPERIMENTAL	26
A. Esquema general de la metodología	26
B. Materiales	29
C. Métodos	31

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
A. Extracción del ADN	43
B. Técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados	45
C. Obtención y análisis de datos	48
VI. CONCLUSIONES	60
VII. RECOMENDACIONES PARA ESTUDIOS FUTUROS	61
VIII. LITERATURA CITADA	62
IX. APÉNDICES	66
A. El género <i>Phaseolus</i>	67
B. Información general del frijol	68
C. Lista de acrónimos de algunos marcadores moleculares	69
D. Información general de algunos marcadores moleculares	70
E. Aplicación de los marcadores moleculares en plantas	71
F. Similitudes y distancias genéticas entre variedades de frijol del ICTA	72
G. Glosario	73

H. Geles de las 64 amplificaciones selectivas aplicadas a las variedades originales ICTA Altense e ICTA Hunapú	75
I. Geles de las cuatro amplificaciones selectivas aplicadas a la muestra	84
J. Reproducibilidad de las amplificaciones selectivas en las dos variedades estudiadas	89

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Clasificación taxonómica de <i>P. vulgaris</i>	3
2. Principales productores Latinoamericanos de frijol	6
3. Variedades de <i>P. vulgaris</i> a caracterizar	10
4. Conveniencia de la aplicación de los marcadores en la caracterización de germoplasma	13
5. Equipo de laboratorio	29
6. Reactivos utilizados	30
7. Extracción de ADN	31
8. Soluciones utilizadas en el protocolo de extracción de ADN	32
9. Verificación de la integridad del ADN	33
10. Espectrofotometría ultravioleta	34
11. Digestión del ADN genómico	34
12. Ligación de adaptadores	35
13. Preamplificación	35
14. Amplificación selectiva	36
15. Visualización de las amplificaciones selectivas	36
16. Electroforesis en gel de secuenciación	37
17. Soluciones empleadas en electroforesis	40
18. Análisis de las imágenes de los geles	41
19. Análisis estadístico de las matrices de datos	42
20. Concentración y pureza de las muestras de ADN analizadas	44
21. Número de bandas obtenidas con cada combinación de partidores para las dos variedades analizadas	46
22. Combinaciones de partidores adecuadas para estudiar <i>P. vulgaris</i>	47
23. Combinaciones de partidores utilizadas	47
24. Matriz de similitud del grupo de ICTA Altense y sus mutantes	53

25.	Matriz de similitud del grupo de ICTA Hunapú y sus mutantes	53
26.	Matriz de distancia genética entre ICTA Altense y sus mutantes	53
27.	Matriz de distancia genética entre ICTA Hunapú y sus mutantes	53
28.	Variabilidad de los grupos de mutantes de ICTA Altense y de variedades	55
29.	Variabilidad de los grupos de mutantes de ICTA Hunapú y de variedades	56
30.	Distancias genéticas de los mutantes de ICTA Altense con cada par de amplificaciones selectivas	57
31.	Distancias genéticas de los mutantes de ICTA Hunapú con cada par de amplificaciones selectivas	57
32.	Índices de correlación, mutantes de ICTA Altense	57
33.	Índices de correlación, mutantes de ICTA Hunapú	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
1. <i>Phaseolus vulgaris</i>	5
2. Distribución mundial de <i>Phaseolus vulgaris</i>	6
3. Digestión del genoma mediante enzimas de restricción	18
4. Adaptador para el extremo cohesivo generado por la enzima de corte raro <i>EcoRI</i>	18
5. Adaptador para el extremo cohesivo generado por la enzima de corte frecuente <i>MseI</i>	19
6. Ligación de adaptadores	19
7. Fragmento de restricción ligado	19
8. Representación esquemática de un partidador para AFLP	19
9. Diseño de los partidores para AFLP	20
10. Pre-amplificación	20
11. Amplificación selectiva	21
12. Amplificación de sitios con inserciones, deleciones o mutaciones	23
13. Diagrama de flujo del proceso de preparación de ADN para la técnica del AFLP	26
14. Diagrama de flujo de la técnica del AFLP	27
15. Diagrama de flujo del análisis del AFLP	28
16. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído	43
17. Electroforesis en gel de agarosa del producto de preamplificación	45
18. Comparación directa de las 4 amplificaciones selectivas aplicadas a ICTA Altense y a ICTA Hunapú	49
19. Fragmento del gel correspondiente a la amplificación selectiva 2 para ICTA Altense y sus mutantes.	50
20. Ejemplo de matriz de ausencia/presencia, correspondiente a la amplificación selectiva 2 para ICTA Altense y sus mutantes.	50
21. Diferencias en los patrones de AFLPs entre ICTA Altense y sus mutantes	50

22.	Diferencias en los patrones de AFLPs entre ICTA Hunapú y sus mutantes	51
23.	Patrones de bandas obtenidos de ICTA Altense y sus mutantes con las cuatro amplificaciones selectivas.	52
24.	Patrones de bandas obtenidas de ICTA Hunapú y sus mutantes con las cuatro amplificaciones selectivas.	52
25.	Dendrograma del grupo de ICTA Altense y sus mutantes	54
26.	Dendrograma del grupo de ICTA Hunapú y sus mutantes	54
27.	Dendrograma generado para el grupo de ICTA Altense y sus mutantes con la combinación AS2/AS4	58
28.	Dendrograma generado para el grupo de ICTA Hunapú y sus mutantes con la combinación AS2/AS4	59

RESUMEN

Se presenta el análisis de 22 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados; dos de estas variedades pertenecen al conjunto de variedades liberadas por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas –ICTA Altense e ICTA Hunapú– y 20 variedades pertenecen a la colección de mutantes inducidos por radiación γ del Programa de Mejoramiento Genético de Frijol del ICTA –10 mutantes de ICTA Altense y 10 mutantes de ICTA Hunapú–. Las variedades mutantes presentan en común la característica de ciclo vegetativo precoz.

Se extrajo, de cada individuo, ADN de alta integridad –con poca cola en la migración electroforética– y de alta pureza – A_{260}/A_{280} media de 1.85 ± 0.03 –, requerimientos críticos para la técnica del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados –AFLP, por sus siglas en inglés para *Amplified Fragment Length Polymorphism*–; se obtuvo una concentración de ADN media de 760 ± 260 ng/ μ L.

Se determinó que las combinaciones de partidores del Kit de AFLP* de Invitrogen adecuadas para el análisis son: M+CAG/E+ACC, M+CTC/E+AGC, M+CAC/E+ACA, M+CAT/E+ACA y M+CTA/E+ACA; las primeras cuatro combinaciones diferenciaron a ICTA Altense de ICTA Hunapú individualmente. Cuatro de estas combinaciones de partidores se utilizaron para obtener los patrones de bandas de cada una de las variedades mutantes a manera de matriz de presencia –1– o ausencia –0– de AFLPs; dichos patrones diferenciaron a las variedades mutantes entre sí, permitieron establecer relaciones filogenéticas y permitieron verificar el efecto aleatorio de la radiación a nivel genómico.

Este estudio constituye el primer paso en la búsqueda de marcadores AFLP ligados a características de interés agronómico –QTLs, por sus siglas en inglés para *Quantitative Trait Loci*– como desarrollo precoz, para lo que se requieren posteriores análisis de conglomerados segregantes –BSA, por sus siglas en Inglés para *Bulked Segregant Analysis*–.

* AFLP® es una marca registrada de Keygene n. v.

I. INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares ya han jugado un importante papel en la caracterización genética y en el mejoramiento genético de muchos cultivos; estos están siendo extensamente utilizados para investigar la base genética de características agronómicas y para facilitar la transferencia y la acumulación de características deseables entre plantas que forman parte de programas de mejoramiento. Este trabajo constituye uno de las primeras aproximaciones a la caracterización molecular de germoplasma de *P. vulgaris* mediante marcadores moleculares y el primero encaminado hacia la caracterización de germoplasma mutante generado con fines de mejoramiento genético en Guatemala.

El frijol es una excelente y barata fuente de proteínas y calorías que cubre, en buena medida, las necesidades nutricionales de personas de bajos ingresos alrededor del mundo; originario de Mesoamérica, se cultiva en más de 70 países, siendo un vegetal ampliamente aceptado. En Guatemala, el frijol es el segundo alimento en importancia por debajo únicamente del maíz.

El programa de Mejoramiento Genético de Frijol del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, como resultado de la identificación de enfermedades, plagas y malezas que inciden negativamente en la producción en el altiplano medio, liberó ICTA Altense e ICTA Hunapú, dos variedades de frijol negro que se caracterizan por su resistencia a antracnosis, roya y mancha angular de las hojas y por su alto rendimiento. Estas características de adaptación al altiplano de ambas variedades son deseables para pequeños productores, sin embargo, el ciclo de vida de éstas no les permite producir otros cultivos durante la temporada de lluvias, por lo que se recurrió a la inducción de mutaciones para generar plantas con las características de las originales que presenten ciclos de vida más cortos.

Un marcador molecular es cualquier segmento de ADN cuya secuencia de bases es diferente – polimórfica– en organismos diferentes, lo que lo hace diagnóstico de cada uno de ellos. La técnica del AFLP® es una técnica relativamente barata, relativamente fácil, rápida y confiable que puede generar cientos de marcadores moleculares para cualquier organismo sin conocimiento previo de su conformación genómica basándose en la amplificación selectiva –mediante PCR– de un subgrupo de fragmentos genómicos generados por la digestión con enzimas de restricción.

Los marcadores AFLP se han empleado en estudios de genética de poblaciones de variedades silvestres de *P. vulgaris* que han determinado 4 focos principales de biodiversidad en América y el flujo asimétrico de genes desde poblaciones domesticadas hacia silvestres. (Papa and Gepts, 2003)

La hipótesis de este estudio plantea que es posible encontrar un patrón de AFLPs tal que permita diferenciar a individuos mutantes de sus respectivas variedades originales; para evaluarla se estableció el objetivo general de hacer un estudio del ADN genómico de las 22 variedades mediante la técnica del AFLP, y

los objetivos específicos de obtener ADN genómico íntegro y puro de cada individuo, seleccionar las combinaciones de partidores –i.e. primers, cebadores o iniciadores– del Kit de AFLP de Invitrogen, Life Technologies adecuadas para el análisis, obtener un patrón de bandas para cada individuo y verificar el efecto de la inducción de mutaciones en el genoma de las variedades originales.

La revisión bibliográfica pretende cubrir objetivamente la importancia de *P. vulgaris* en Guatemala y en el mundo, la importancia de las variedades originales en Guatemala, la importancia de la caracterización molecular de germoplasma y, finalmente, los fundamentos de la técnica del AFLP contemplando sus ventajas y desventajas.

La información contenida y generada en este estudio puede ser útil para posteriores estudios que involucren análisis de conglomerados segregantes cuyo fin sea desarrollar marcadores ligados a características de interés agronómico de *P. vulgaris*.

AFLP® es una marca registrada de Keygene n. v.

II. ANTECEDENTES

A. *Phaseolus vulgaris*

1. **Descripción.** El frijol común, *Phaseolus vulgaris* L., es miembro de la familia de las Leguminosas – Fabaceae; véase el cuadro 1–, que comprende cerca de 600 géneros y cerca de 13000 especies. (Nwokolo, 1996)

Al género *Phaseolus* –véase el apéndice A– pertenecen 55 especies, de las cuales se han domesticado 5 (Debouck, 1994). Las especies de este género se cultivan como alimento o como plantas ornamentales, siendo todas propias de regiones cálidas de ambos hemisferios, mayormente de los trópicos (Standley and Steyermark, 1946).

El nombre específico *Phaseolus vulgaris* se refiere a cientos de variedades y cultivares de frijol común que se han cultivado por miles de años. A lo largo de este período los nombres comunes han evolucionado paralelamente, según la selección por color de la semilla, que es reflejo de la preferencia de los habitantes de diferentes regiones; de aquí surge la importancia de especificar el tipo y variedad del frijol luego del uso del nombre específico. *P. vulgaris* es un cultivo muy común de la mayoría de climas templados, subtropicales y tropicales desde secos hasta húmedos (Nwokolo, 1996); se cultiva en prácticamente todas partes en Guatemala, excepto en las regiones altas (Standley and Steyermark, 1946), siendo predominantemente de color negro (Nwokolo, 1996).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *P. vulgaris*
(USDA/NRCS, 2002)

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Spermatophyta
Subdivisión	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Phaseolus</i> L.
Especie	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

P. vulgaris es nativo de América, específicamente de Centroamérica y de Sudamérica (Nwokolo, 1996; Robertson, 2003). El ancestro de *P. vulgaris* creció dentro de la frontera entre dos zonas climáticas, subtropical seca y tropical templada, donde se establecieron las sociedades precolombinas (Debouck, 1994). Las evidencias arqueológicas más antiguas de la domesticación de semillas de frijol datan de 5500 A. C. y 5000 A. C., y

proviene de un sitio montañoso al norte de Perú y de sitios arqueológicos en México, respectivamente, lo que sugiere que fue domesticado independientemente en las dos regiones (Robertson, 2003). Análisis de proteínas de las semillas, de isoenzimas, y de diferencias morfológicas de cultivares de *P. vulgaris* muestran que esta especie presenta seis razas mayores que son el resultado de seis eventos separados de domesticación entre México y el sur de los Andes (Robertson, 2003); sin embargo, se cuenta con evidencia genética de que en realidad hubo un sólo evento de domesticación, puesto que estas razas son genéticamente similares (Papa and Gepts, 2003).

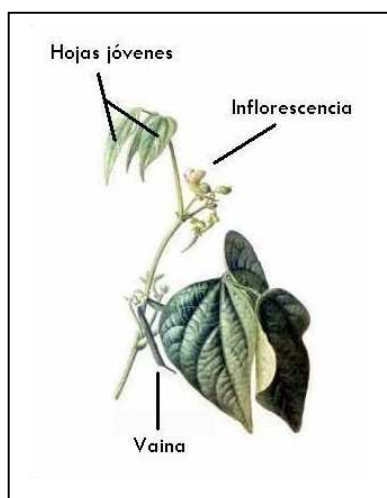
Los frijoles domesticados tomaron mucho tiempo en diseminarse ampliamente hacia Norteamérica y Sudamérica para finalmente establecerse como un cultivo básico. Hacia el año 1400 a. C., los frijoles se combinaron con el maíz, constituyéndose así como cultivos básicos en toda América. Hacia el año 1500 a. C., los cultivares de *P. vulgaris* empezaron a introducirse en Europa. Los frijoles se introdujeron en África probablemente a través de los portugueses, y se diseminaron hacia el interior del continente más rápido que la exploración europea (Robertson, 2003). Actualmente se cultiva en casi todas las regiones de la tierra excepto en las áreas más frías. (Standley and Steyermark, 1946; Robertson, 2003).

Las formas silvestres de *P. vulgaris* se caracterizan por el hecho de que sus semillas son más pequeñas que las de las domesticadas y se encuentran en una franja ancha y discontinua que se extiende desde México hasta Argentina. Entre estas poblaciones se observan diferencias morfológicas y bioquímicas tales que los híbridos de plantas de las dos regiones son mayormente estériles, lo que puede considerarse como evidencia para colocarlas en especies diferentes que, sin embargo, no se ha hecho puesto que ambas dan origen de forma conjunta o separada a los distintos cultivares de frijoles que se clasifican como *P. vulgaris*, y la subsiguiente hibridación entre estas razas ha producido nuevas variedades. Por esto, separar los cultivares de *P. vulgaris* entre las dos especies silvestres puede llevar a una nomenclatura confusa, pero probablemente esto no sea una razón de peso para no hacerlo. (Robertson, 2003)

Phaseolus vulgaris –véase la figura 1– es altamente polimórfico (Nwokolo, 1996b), y está considerado como una especie típica de autofecundación $-2n = 2x = 22$ (Papa and Gepts, 2003)– aunque, en ciertas ocasiones ocurre polinización cruzada natural en el campo (Ortega, 1974); la visita de insectos aumenta el éxito reproductivo (Hoc y Amela, 1998). Las plantas de frijol son anuales, herbáceas (Standley and Steyermark; 1946 Nwokolo, 1996b). Cuando son erectas, alcanzan de 25 a 60 cm de altura; cuando son de tipo trepador, se extienden de 2 a 3 m o más (Standley and Steyermark; 1946 Nwokolo, 1996b). Presentan estípulas pequeñas, estriadas; hojas ovaladas o rómbicas-ovaladas, delgadas, acuminadas, glabras o pubescentes; pedúnculos más cortos que los peciolo; poco floreadas, flores en o cerca del ápice, pequeñas, blancas o azul púrpura (Standley and Steyermark, 1946), aparecen alrededor de 4 semanas luego de la siembra (Nwokolo, 1996b), presentan 10 estambres de los cuales el superior está libre mientras los otros nueve están unidos dentro de un tubo que encierra el largo ovario y parte del estilo; las anteras se abren la tarde del día anterior a la apertura de las flores; muchos granos de polen germinan en las anteras, pero se desconoce si éstos participan en la fertilización

(«Chapter 4: Legumes and Some Relatives», 2000). Las legumbres o vainas aparecen rápidamente luego de la floración (Nwokolo, 1996b), son delgadas, lineales, comprimidas o casi cilíndricas, ligeramente curvadas (Standley and Steyermark, 1946), su longitud es de 10 a 20 cm y pueden tener de 1.0 a 1.5 cm de ancho (Nwokolo, 1996b), varían en color de verde a amarillo, rojo, púrpura o negro (Standley and Steyermark, 1946; Nwokolo, 1996b); la maduración de las vainas ocurre cerca de 2 semanas luego de la floración, y los frijoles verdes maduros se pueden cosechar regularmente cada 2 a 3 días (Nwokolo, 1996b). Las semillas son altamente variables en forma, tamaño –de 10 a 70 g/100 semillas– y color que puede ser rojo, blanco, café, gris, negro o multicolor (Nwokolo, 1996b); son poco comprimidas y sin líneas conspicuas que radian desde el hilo (Standley and Steyermark, 1946); hay de 6 a 8 semillas en una vaina madura, aunque el número puede ser de hasta 2 (Nwokolo, 1996b).

Figura 1. *Phaseolus vulgaris*.
(Probert Encyclopaedia, 2003)

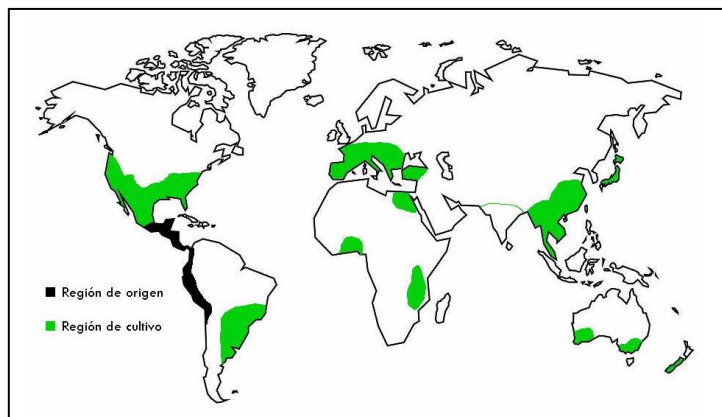


El nombre Maya es “bul” o “buul” (Standley and Steyermark, 1946). Hasta la fecha se han registrado 14000 cultivares, siendo el Centro Internacional de Agricultura Tropical –CIAT; Cali, Colombia– el mayor depósito y distribuidor. (Duke, 1983; Nwokolo, 1996b)

2. **Importancia del cultivo.** De todas las leguminosas, el frijol es la más ampliamente cultivada. Aunque se produce predominantemente en India, Brasil, China, Estados Unidos y México, se cultiva en más de 70 países en África, Norteamérica, Centroamérica, Sudamérica, Asia y Europa –véase la figura 2–. La producción total en 1990 excedió las 35 mil millones de libras, de las cuales se produjeron aproximadamente: 17 mil millones en Asia, 8 mil millones en Norteamérica y Centroamérica, 5 mil millones en Sudamérica, 4 mil millones en África y mil millones en Europa. En el cuadro 2 se muestran los principales países Latinoamericanos productores de frijol (Nwokolo, 1996b). Donde se cultive, el frijol es un vegetal popular y un componente popular de muchos platos. En países templados, una porción del cultivo se cosecha inmaduro y

verde y se vende fresco, congelado o enlatado. Frijoles congelados y enlatados se exportan a nivel mundial y se encuentran hasta en los supermercados de los países más pobres del mundo. (Nwokolo, 1996b)

Figura 2. Distribución mundial de *Phaseolus vulgaris*. (Adaptado de Schucher, 2002)



En África, Asia y Latinoamérica, el frijol tiene amplia aceptación y mucho consumo, preparándose de muchas maneras y constituyendo una proporción significativa de la alimentación diaria. En países de Norteamérica, Centroamérica y Sudamérica, *P. vulgaris* es, por mucho, el grano leguminoso más consumido; en África y Asia las legumbres más consumidas son las de los géneros *Dolichos*, *Vigna* y *Cajanus*; en el Medio Oriente son las de los géneros *Pisum* y *Vicia*. (Nwokolo, 1996b)

Cuadro 2. Principales productores Latinoamericanos de frijol (Nwokolo, 1996)

País	Lb (millones)
Brasil	4497
México	2848
Argentina	353
Colombia	291
Guatemala	260

El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación reportó que, para el año 2000, el aporte estimado del cultivo de frijol al PIB Agrícola de Guatemala fue del 1.5%; el costo de producción fue de 4543 Q/hect. y que el empleo directo en campo ascendió 1170000 jornales/año equivalentes a 41786 empleos permanentes. Para el período 1999-2000, las importaciones de frijol fueron de 7 a 11 millones de libras, provenientes en un 38% de Argentina y en un 36% de EEUU; las exportaciones fueron de 3 a 7 millones de libras, hacia El Salvador en un 55% y hacia Costa Rica en un 45%. Actualmente, las tendencias tanto de las importaciones como de las exportaciones son crecientes. (Guatemala, 2003)

Como alimento en Guatemala, el frijol es segundo en importancia, por debajo del maíz; se comen dos o tres veces cada día por la vasta mayoría de las personas que, de hecho, apenas consideran que han comido a

menos que estos dos alimentos básicos constituyan parte de la comida (Standley and Steyermark, 1946). En el período de 2000-2001, la producción de frijol en Guatemala se estimó en más de 200 millones de libras, para 11 millones de personas. Los principales departamentos productores de frijol son Chimaltenango, Jutiapa, Guatemala, Alta Verapaz, Chiquimula, Zacapa, Santa Rosa y El Progreso –véase el Apéndice B– (Guatemala, 2002). El cultivo del frijol se ve menos afectado por la sequía que el maíz, además, se puede producir en menos tiempo. Cuando hay poco suministro de frijol se pueden encontrar substitutos más fácilmente que cuando hay escasez de maíz. (Standley and Steyermark, 1946). En Guatemala, el frijol se cultiva en regiones situadas entre 50 y 2300 metros sobre el nivel del mar; las variaciones en cuanto a condiciones de clima y suelo son amplias y, consecuentemente, los problemas de producción son muy diferentes. (Guatemala, 1996)

El valor nutritivo de un alimento depende, en gran parte, de su contenido de nutrientes, especialmente de proteína y energía –véase el Apéndice B– y de la digestibilidad de estos nutrientes. También depende de la composición de aminoácidos –véase el Apéndice B– y de la biodisponibilidad de estos aminoácidos. Está documentado que el frijol constituye una excelente y barata fuente de proteínas y calorías que son importantes para cubrir las necesidades nutricionales de personas de bajos ingresos. El frijol es deficiente en los aminoácidos azufrados –cisteína y metionina– y triptófano, pero su contenido de lisina es adecuado. Además, el proceso de cocción que se requiere usualmente para inactivar los factores antinutricionales –hemaglutininas, inhibidores de proteasas, polifenoles y fitatos– en los frijoles, puede producir que los aminoácidos constituyentes dejen de ser solubles y, quizás, indigeribles. Debido a esto, no sólo los aminoácidos azufrados son limitantes, sino que también se pueden volver no disponibles por varios tratamientos de calor y otros procesamientos diseñados para mejorar la digestibilidad completa. No obstante, se ha reportado que el mayor aprovechamiento de proteínas, como resultado de una mayor digestibilidad, ocurre cuando se han sometido a 15 minutos de cocción a alta presión con vapor de agua, o bien cuando se cocinan a 97 °C por hasta 30 minutos (Nwokolo, 1996b)

3. **Muestra a caracterizar.** Las plantas a caracterizar pertenecen a una colección de mutantes de dos variedades liberadas en 1996 por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas: ICTA Altense e ICTA Hunapú. Estas dos variedades de frijol negro fueron desarrolladas por el Programa de Mejoramiento Genético de Frijol del ICTA, como resultado de la identificación de las enfermedades, plagas y malezas que inciden negativamente en la producción en el altiplano medio; ICTA Altense e ICTA Hunapú se adaptan a este estrato de producción situado entre 1600 y 2300 msnm. (Guatemala, 1996)

Estas dos variedades se desarrollaron con la colaboración del Centro Internacional de Agricultura Tropical –CIAT–, dentro de las actividades del Programa Cooperativo Regional de Frijol para Centroamérica, México y El Caribe –PROFRIJOL– (Guatemala, 1996) y, entre sus características principales están la resistencia a antracnosis, roya y mancha angular de las hojas y su alto rendimiento (Voysesst, 2002). Junto con otras 5 variedades liberadas por el ICTA, ICTA Altense e ICTA Hunapú forman el conjunto de variedades de frijol más cultivadas en Guatemala (Voysesst, 2002; Guatemala, 2003)

a. Variedad ICTA Altense. Se originó en Chimaltenango a partir del cruzamiento entre “A 230” –material proveniente del CIAT– y “Guatemala 192” –material del Programa de Frijol del ICTA, con tolerancia a *Ascochyta*–, cruza registrada como “C 88”. Posteriormente se hizo una cruza entre “C 88” y la línea “A 175” del CIAT, obteniéndose la cruza triple “C 160”; una línea de la población “C-160” se evaluó en campo y fue finalmente liberada en 1996. (Guatemala, 1996; PROFRIJOL, 2003)

Es una variedad de frijol negro, cuyo hábito de crecimiento es de tipo indeterminado postrado –tipo III– (PROFRIJOL, 2003), que alcanza de 60-70 cm de altura; la nacencia completa ocurre a los 8 días y la florescencia de color morado brota 53 días después de la siembra –DDS–, las legumbres son de color crema con tonalidades ligeras de color morado que contienen 6 semillas por vaina. (Guatemala, 1996) Es resistente a *Ascochyta*, roya, picudo de la vaina y, de manera intermedia, a antracnosis. Se adapta a altitudes mayores a 1400 msnm (Voysset, 2002). La madurez fisiológica se alcanza a los 120 DDS, la madurez de cosecha a los 135 DDS. El rendimiento experimental potencial es de 6172 lb/hect. (Guatemala, 1996; PROFRIJOL, 2003)

b. Variedad ICTA Hunapú. Se originó en Chimaltenango a partir del cruce entre “Negro Opaco” –material precoz originario de Chimaltenango– y la línea “A 216” –material proveniente del CIAT–, cruza registrada como “C 132”. Posteriormente fue sometida a diversos procesos de mejoramiento genético por el Programa de Frijol del ICTA, para finalmente ser liberada en 1996. (Guatemala, 1996; PROFRIJOL, 2003)

Es una variedad de frijol negro, cuyo hábito de crecimiento es de tipo indeterminado arbustivo –tipo II–; su floración ocurre 50 DDS (PROFRIJOL, 2003). Es tolerante a *Ascochyta*, roya, picudo de la vaina y, de manera intermedia, a antracnosis (PROFRIJOL, 2003). Se adapta a altitudes mayores a 1400 msnm (Voysset, 2002). La madurez fisiológica se alcanza a los 115 DDS, y la madurez de cosecha a los 130 DDS. El rendimiento experimental potencial es de 6153 lb/ha. (Guatemala, 1996; PROFRIJOL, 2003)

c. Variedades Mutantes de ICTA Altense e ICTA Hunapú. Las características de adaptación al altiplano, resistencia a enfermedades e insectos y alto rendimiento de ambas variedades son deseables para pequeños productores, sin embargo, el ciclo de vida de éstas no permiten a los agricultores producir otros cultivos durante la temporada de lluvias –usualmente hortalizas– luego de la cosecha del frijol, lo que evita incrementar la eficiencia de sus parcelas. Para solucionar este problema se recurrió a la técnica de inducción de mutaciones, con lo que se busca producir líneas mutantes con un ciclo más corto que las variedades originales y que conserven las características de tolerancia a enfermedades, potencial de rendimiento y buena arquitectura tanto como sea posible. (Soto y Molina, 2000) Semillas de ICTA Altense e ICTA Hunapú se irradiaron con 200 Gy de radiación γ de una fuente de ^{60}Co para obtener la primera descendencia de las semillas irradiadas –M1–, que se plantó en 1997 en la Estación Experimental del ICTA de Chimaltenango con condiciones adecuadas para obtener la población M2 –i.e., la segunda descendencia–. En 1998 se plantaron 45000 plantas de M2 en la

misma Estación Experimental; como consecuencia de una dosis adecuada de radiación se obtuvieron mutantes drásticos de abundante follaje, de hábito postrado, con pocas vainas y con características deseables, seleccionándose plantas que presentaron floración temprana, madurez fisiológica temprana–100 días o menos– o ambas, formándose así la población M3. En 1999 se cultivó la población M3, de la que se seleccionaron las plantas con ciclos más cortos que las variedades originales así como las de mejores arquitectura de planta, longitud de vainas, número de vainas por planta y salud, obteniéndose así la población M4. (Soto y Molina, 2000)

Se observó que las progenies de ciclo más corto correspondían a la M2 y que éstas, además, mostraban susceptibilidad a enfermedades y variación en el tipo de planta. La M3 presentó un nivel alto de variación en cuanto a tiempo para alcanzar madurez fisiológica. Sin embargo, líneas mutantes con mejores vigor, arquitectura de planta y tolerancia a enfermedades que las variedades originales se identificaron y seleccionaron, aunque no presentaran madurez temprana. En esta etapa del estudio surgió la inquietud de formar y caracterizar la colección de mutantes (Soto y Molina, 2000)

En 2000, M4 se cultivó separadamente en dos viveros, uno con plantas de ciclos más cortos que las variedades originales y otro con plantas de ciclos parecidos a los de las variedades originales pero con otras características mejoradas, obteniéndose la población M5. En general, las diferencias fenotípicas son mayores mientras menor sea el ciclo vegetativo, incluso, las plantas de menor ciclo presentan menor estatura y susceptibilidad a enfermedades, sin embargo, la mayoría de las selecciones se basaron en la ausencia de *Ascochyta* y antracnosis. (Soto y Molina, 2001)

El Programa de Producción de Frijol del ICTA mantiene una colección de mutantes de ambas variedades que surgió de cada planta de la población M3 –en esta población se encuentran tanto características deseables como no deseables– (Soto y Molina, 2001).

El grupo de variedades mutantes sometido al estudio consiste de 20 plantas –10 provenientes de ICTA Altense y 10 provenientes de ICTA Hunapú, véase el Cuadro 3–, que pertenecen a generaciones M6 y que fueron seleccionadas por presentar ciclos vegetativos cortos (Molina, 2003 comunicación personal).

B. Empleo de marcadores moleculares en la caracterización de germoplasma

Actualmente, la biotecnología ofrece a los fitomejoradores varias herramientas para incrementar la productividad, la diversificación y la producción de sus cultivos sin dejar de lado el desarrollo de una agricultura más sustentable. Los marcadores moleculares constituyen el conjunto de técnicas más prometedor para programas modernos de mejoramiento de cultivos (IAEA, 2002)

Cuadro 3. Variedades de *P. vulgaris* a caracterizar.

Código	Variedad
Alt	ICTA Altense
MAlt1	Altense AF9-4-CMBB-CM-SI-3-CM
MAlt2	Altense AF9-4-CMBB-CM-SI-1-CM
MAlt3	Altense AF9-2-CMB-CM-SI-1-CM
MAlt4	Altense AF9-1-CMB-CM-SI-2-CM
MAlt5	Altense AF9-1-CMB-CM-SI-1-CM
MAlt6	Altense AF4-1CMB-CMBB-SI-4-CM
MAlt7	Altense AF4-1-CMB-CMBB-SI-3-CM
MAlt8	Altense AF4-1-CMB-CMBA-SI-4-CM
MAlt9	Altense M6 AF4-1-CMB-CMBA-SI-3-CM
MAlt10	Altense M6 AF3-1-CMB-CMB-SI-2-CM
Hun	ICTA Hunapú
MHun1	Hunapú HF81-2-CMBA-CMA-SI-2-CM *
MHun2	Hunapú HF03-2-CMB-CM-SI-2-CM
MHun3	Hunapú HF03-2-CMB-CM-SI-4-CM
MHun4	Hunapú HF56-1-CMB-CM-SI-9-CM
MHun5	Hunapú HF03-2-CMB-CM-SI-5-CM
MHun6	Hunapú HF03-2-CMB-CM-SI-6-CM
MHun7	Hunapú HF56-1-CMB-CM-SI-7-CM
MHun8	Hunapú HF56-1-CMB-CM-SI-6-CM
MHun9	Hunapú HF26-2-CMB-CM-SI-9-CM
MHun10	Hunapú HF26-1-CMB-CM-SI-3-CM

* Sus semillas presentan un color beige característico

1. Marcador molecular

a. **Definición.** Un marcador molecular es cualquier segmento específico de ADN cuya secuencia de bases es diferente –polimórfica– en organismos diferentes y, por ende, diagnóstica de cada uno de ellos. Los marcadores moleculares se pueden visualizar por técnicas basadas en hibridización –como la huella dactilar de ADN o los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción, RFLP’s por sus siglas en Inglés para *Restriction Fragment Length Polymorphisms*– o por métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa – como la huella dactilar obtenida por amplificación o los fragmentos polimórficos amplificados al azar, RAPD’s por sus siglas en Inglés para *Random Amplified Polimprphic DNA*– (Kahl, 2001).

Por otra parte, un marcador genético es cualquier gen cuya expresión produce un efecto fenotípico que se puede detectar fácilmente; se usa comúnmente para identificar organismos transformados o su progenie (Kahl, 2001).

b. **Base genética.** Si un determinado marcador molecular de fácil identificación fenotípica está físicamente ligado, a pequeña distancia, a un marcador genético –un gen– que controla un carácter de interés agronómico, la selección de este marcador resulta en la selección indirecta del gen de interés. La eficacia de este proceso de selección indirecta, basado en la segregación conjunta del marcador y del gen, es función de la distancia entre ambos, expresada como probabilidad de recombinación genética. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

El marcador genético/molecular ideal no degrada al fenotipo, es altamente polimórfico entre dos organismos, se expresa codominantemente, tiene una sola copia distribuida frecuente y uniformemente a lo largo del genoma, es de bajo costo, es de fácil ensayo y de fácil visualización, es multifuncional, de uso no restringido, tiene naturaleza específica para el genoma, puede usarse en múltiplex y puede ser automatizado. Lo anterior depende mucho de la aplicación y de la especie involucradas. (Kahl, 2001; IAEA, 2002)

2. Caracterización molecular de germoplasma. Los marcadores moleculares revelan variaciones en la secuencia del ADN genómico, por lo que ya han jugado un papel importante en la caracterización genética y en el mejoramiento de muchos cultivos. También han contribuido con la evaluación de biodiversidad, con la reconstrucción de relaciones filogenéticas y con la comprensión de la estructura, evolución e interacción de poblaciones de plantas y microbios –véase el cuadro 4–. Los marcadores moleculares han sido adoptados rápidamente por mejoradores de plantas y biólogos moleculares como herramientas apropiadas y efectivas para estudios básicos y aplicados relacionados con componentes biológicos del sistema de producción de los agricultores. (IAEA, 2002)

El uso de marcadores moleculares en programas de mejoramiento incluye desde facilitar una elección adecuada de los padres de una cruce hasta elaborar mapas o marcar grupos de genes asociados con características de importancia económica –o QTLs por sus siglas en Inglés para *Quantitative Trait Loci*–. El marcaje de genes y el mapeo de QTLs, a su vez, permiten una selección asistida por marcadores –SAM– en retrocruzas, pedigrí y programas de mejoramiento de poblaciones. Mediante comparaciones genómicas, los marcadores moleculares pueden emplearse de maneras que permitan descubrir fácilmente y explotar más eficientemente la biodiversidad y las relaciones evolutivas entre organismos. (IAEA, 2002)

Durante la última década, el mundo de la genética Mendeliana clásica entró a una nueva era, la de la genómica, que implica los estudios de las estructuras de los genes y de sus funciones. Se conoce mucha información del genoma de especies modelo como arroz y *Arabidopsis*, pero las funciones de sus genes son mayormente desconocidas, por lo que los esfuerzos conjuntos en la investigación están enfocados en rellenar esta “brecha fenotípica”. Las mutaciones inducidas combinadas con tecnología de marcadores moleculares juegan un papel importante en este campo, lo que ha llevado al aumento de la demanda de plantas en las que ciertos caracteres se han cambiado debido a mutaciones que han silenciado a los genes responsables. Utilizando herramientas moleculares y genéticas, un carácter mutado puede ser asociado con una secuencia de ADN de función previamente desconocida. (IAEA, 2002)

a. Marcadores moleculares empleados en caracterización de germoplasma. En años recientes, se ha progresado sustancialmente mapeando, marcando y aislando muchos genes importantes para la agricultura utilizando marcadores moleculares debido, en gran parte, a las mejoras en las técnicas que se han desarrollado para ayudar a encontrar marcadores de interés. Entre las técnicas que son particularmente promisorias están: El polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción –RFLP, por sus siglas en

Inglés para *Restriction Fragment Length Polymorphism*–; el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados – AFLP, por sus siglas en Inglés para *Amplified Fragment Length Polymorphism*–; el ADN polimórfico amplificado al azar –RAPD, por sus siglas en Inglés para *Random Amplified Polymorphic DNA*–; los microsatélites o secuencias simples repetidas –SSR, por sus siglas en Inglés para *Simple Sequence Repeats*– y marcadores del ADN basados en la PCR como: Las regiones amplificadas caracterizadas por una secuencia –SCAR, por sus siglas en inglés para *Sequence Characterized Amplified Regions*– y los sitios marcados con una secuencia –STS, por sus siglas en Inglés para *Sequence Tagged Sites*–. Estas técnicas –véase el Apéndice C– ayudan en la selección directa de muchos caracteres deseables de manera simultánea, utilizando poblaciones F2 y de retrocruzas, líneas isogénicas, dobles haploides y líneas recombinantes –véase el Cuadro 4–. (IAEA, 2002)

La primera generación de marcadores (RFLP) estaban basados en la hibridización ADN-ADN y eran lentos y caros. La invención de la PCR para amplificar segmentos cortos de ADN dio origen a una segunda generación de marcadores más rápidos y más baratos basados en la PCR, que se aplican ampliamente en la caracterización de germoplasma. La transferencia inicial de tecnología hacia países en desarrollo se limita a técnicas bien establecidas y/o que tengan o parezcan tener una aplicación amplia como: RFLP, SSR, SIR, AFLP, RAPD, IRAP y REMAP y SNP –véase el Apéndice D–. Es claro, sin embargo, que la tecnología continuará evolucionando hacia nuevos sistemas de detección que resulten más eficientes y que representen menos costos para los mejoradores de este siglo. (IAEA, 2002)

b. Marcadores moleculares empleados en caracterización de *P. vulgaris*

P. vulgaris ha sido objeto de extensas caracterizaciones con prácticamente todos los recursos disponibles, entre ellos:

1) Morfológicos (no moleculares). Se estudió la habilidad de combinación de *P. vulgaris* para la resistencia a la roya bacteriana común, obteniéndose que para las condiciones de prueba donde dos variedades de frijol resistentes se sometieron a cruza con otras susceptibles, sólo los efectos aditivos están involucrados en la resistencia a la roya bacteriana en las hojas, lo que indica que esta resistencia se puede fijar en generaciones siguientes; por otra parte, los efectos dominantes predominan sobre los efectos aditivos para la reacción ante la roya bacteriana en las vainas. (Rodrigues *et al.*, 1999)

Se estudió el control genético de la arquitectura de la planta en *P. vulgaris* –puesto que una planta más erecta ha sido la meta en el desarrollo de cultivares de frijol–, obteniéndose que evaluar la arquitectura de planta en cuanto a erectilidad en plantas individuales no es eficiente; sin embargo, los estimados de los parámetros genéticos con la evaluación de familias confirmó la posibilidad de una selección satisfactoria, especialmente si se evaluaban por algunas pocas generaciones y/o ambientes, a pesar de la fuerte influencia del ambiente en la expresión de los caracteres. (Teixeira *et al.*, 1999)

Cuadro 4. Conveniencia de la aplicación de los marcadores en la caracterización de germoplasma. (Adaptado de IAEA, 2002)

	MOF	PROTEÍNAS E. ISOENZIMAS	STS/EST	SNP	SCARS/SCAPS	MICROARRREGLO	RFLP	RAPD	SSR	ISSR	AFLP	TRAP/REMAP
Introducción de genes exógenos	v		v									
Mejoramiento genético	v	v	v			v	v	v	v	v		
Análisis de mezclas segregantes			v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Mapeo comparativo						v		v				
Conversión a sondas aleloespecíficas				v								
Estudios de diversidad			v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Identificación de la F1	v	v	v	v	v		v	v	v	v	v	v
Huella dactilar					v			v	v	v	v	v
Mapeo en marco de referencia				v		v		v				
Identificación de genes					v							
Marcaje de genes			v	v	v	v			v	v	v	
Mapas genéticos	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Mapeo de alta resolución			v	v	v			v	v	v	v	v
Identificación de líneas	v	3				1	2	2	v			
Clonación de genes basada en mapas			v	v		v	v	v		v		
Selección asistida por marcadores			v	v	v	v		v	v	v	v	v
Detección de alelos nuevos			v	v			v	v				
Detección de fenotipos nuevos	v											
Mapeo de QTL's		v										
Mapeo regioespecífico								v				
Enriquecimiento regioespecífico de marcadores										v		
Pruebas para semillas		v					v	v	v		v	
Secuenciación					v							
Transcripción					v							
Identificación de variedades	v	3	v			v	1	2	2	v	v	v
Mapeo rápido										v		

1 Se requiere multiplexación de sondas
2 Se requiere multiplexación de partidores
3 Se requiere multiplexación de proteínas o isoenzimas

2) Proteínas / isoenzimas. Se estudió el papel de las enzimas endopoligalacturonasa y pectin-metilesterasa en la estructura de las pectinas de *P. vulgaris* durante el desarrollo de las vainas hasta la maduración, obteniéndose que no hay un efecto sinérgico entre ellas y que la expresión de genes de isoenzimas varían significativamente en vainas de diferentes cultivares, lo que sugiere que están involucradas en la determinación de la morfología de la vaina. (Ebbelaar *et al.*, 1996)

3) RAPD. Se logró identificar alelos resistentes a la infección por Antracnosis – conocidos como Co.4 y Co.5– que pueden ser útiles en la selección de plantas resistentes al hongo (Castanheira *et al.*, 1999)

4) RFLP. Inicialmente se desarrollaron sondas de ADN genómico para RFLP, con el fin de crear un mapa de ligamiento integrado para *P. vulgaris* (Nodari *et al.*, 1992); posteriormente se desarrolló dicho mapa que cubre 827 centimorgans –cM–. Este mapa está basado en una población F₂ que surgió de una cruce entre genotipos –i.e. líneas– que exhiben diferencias en origen evolutivo, en isoenzimas y en tipo de faseolina y por varias características agronómicas. Se pudieron asignar 143 marcadores a 15 grupos de ligamiento, siendo el primero en localizarse el gen *I* que confiere resistencia al virus del mosaico común. (Nodari *et al.*, 1993)

Posteriormente se desarrolló un mapa de ligamiento alineando tres mapas RFLP con algunos mapas RAPD, obteniendo un mapa de 1226 cM que comprende 563 marcadores –120 RFLP, 430 RAPD y algunos loci de isoenzimas y fenotípicos que, en total suman aproximadamente 1070 marcadores (Freyre *et al.*, 1998).

5) SSR. Se clonó y caracterizó un fragmento de 130 pb, llamado OPG9-130 amplificado del ADN genómico de *P. vulgaris* que corresponde a una secuencia de ADN minisatélite que contiene siete repeticiones de 15 bp que difieren ligeramente entre ellas en su secuencia. Esta secuencia de 15 bp se repite en grupos que se encuentran dispersos a lo largo del genoma y ha permitido identificar líneas de frijol según sus huellas dactilares. (Métais *et al.*, 1998)

Para evaluar la abundancia y utilidad de microsatélites como marcadores moleculares en *P. vulgaris* se hizo una búsqueda en 326 secuencias de ADN provenientes de las bases de datos de GenBank, identificándose 49 secuencias como microsatélites potenciales de *P. vulgaris*. 11 pares de primarios produjeron fragmentos o grupos de fragmentos, 7 de éstos son polimórficos y produjeron de 2 a 10 alelos que se segregan de manera Mendeliana. (Yu *et al.*, 1999)

Se asignaron satisfactoriamente 15 marcadores SSR al mapa de ligamiento molecular de *P. vulgaris*. Se desarrollaron y probaron un total de 37 pares de cortadores SSR en la población empleada previamente para la construcción de un mapa de ligamiento molecular del frijol común, obteniéndose que la distribución a lo largo del genoma es amplia. Estos marcadores deben ser útiles para mapeo genético, identificación de genotipos y para selección asistida por marcadores de frijol común. (Yu *et al.*, 2000)

6) AFLP. Empleando la técnica del AFLP se evaluó la estructura genética entre y dentro de grupos de genes –pozos de genes, o *gene pools*– de una colección central de 114 variedades silvestres de *P. vulgaris*, reconociéndose grupos de genes mayoritarios en Mesoamérica, en Colombia, en los Andes del norte del Ecuador y del Perú y en los Andes del sur; se obtuvo que la separación entre todos estos pozos de genes no es amplia. En este estudio se sugirió profundizar en la estructura genética de las plantas silvestres guatemaltecas,

puesto que se reveló que se agrupan aparte de las mexicanas, haciéndolas un foco de biodiversidad interesante; además, es el único país donde se ha encontrado al ancestro silvestre *Phaseolus polyanthus* Greenman, lo que sugiere que Guatemala presenta un ambiente único que puede tener un papel especial en la evolución de *Phaseolus* sp. (Tohme, 1996)

Utilizando marcadores AFLP se analizó la estructura genética de variedades de *P. vulgaris* silvestres y domesticados mesoamericanos para probar la hipótesis de flujo genético asimétrico y para investigar el origen de las poblaciones de tipo maleza. De este estudio se obtuvo que el flujo genético es cerca de tres o cuatro veces mayor desde poblaciones domésticas hacia poblaciones silvestres que en la dirección opuesta; esto, conjuntamente con otro estudio, apunta a que ocurre una sustitución de la diversidad genética en poblaciones silvestres debido al flujo genético desde las poblaciones domesticadas. Además, las poblaciones de tipo maleza parecen ser intermediarios genéticos entre poblaciones domesticadas y silvestres, lo que sugiere que son más bien producto de hibridación entre tipos domesticados y silvestres que producto de un escape del cultivo. (Papa and Gepts, 2003)

C. Empleo de la técnica del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados en la caracterización de germoplasma

Los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados son marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa que se emplean para la investigación rápida de diversidad genética. La técnica del AFLP genera rápidamente cientos de marcadores altamente reproducibles a partir del ADN de cualquier organismo – véase el Apéndice D–; por esto, permiten el genotipado de alta resolución con alta calidad de huella dactilar. Las eficiencias de tiempo y de costo, la reproducibilidad y resolución de los marcadores AFLP son superiores o iguales a los de otros marcadores, con la excepción de que la técnica del AFLP genera marcadores dominantes, en lugar de codominantes –véase el Apéndice D–. Dada su alta reproducibilidad y facilidad de uso, los marcadores AFLP han emergido como un tipo nuevo de marcador genético con amplia aplicación en sistemática, genética de poblaciones, mapeo de QTLs y obtención de huella dactilar de ADN –véase el Apéndice D–. (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

Muchas técnicas desarrolladas en los últimos años para obtener huellas dactilares de ADN se basan generalmente en una de dos estrategias:

- La clásica huella dactilar basada en hibridación: Involucra el corte del ADN genómico con endonucleasas de restricción seguido por la separación electroforética de los fragmentos de ADN. Los RFLPs se detectan por hibridación “Southern” con sondas dirigidas a regiones hipervariables del ADN. (Invitrogen, Life Technologies, 2003)
- La huella dactilar basada en la PCR: involucra la amplificación *in vitro* de secuencias particulares de ADN empleando cortadores específicos o arbitrarios y una polimerasa termoestable. Los productos de

amplificación se separan por electroforesis y se detectan por tinción o por el uso de partidores marcados. Las técnicas de esta categoría incluyen RAPD, huella dactilar obtenida por amplificación –DAF, por sus siglas en Inglés para *DNA amplification Fingerprinting*– y PCR empleando partidores arbitrarios –AP-PCR, por sus siglas en Inglés para *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*–. (Invitrogen, Life Technologies, 2003)

La tecnología del AFLP se emplea para obtener la huella dactilar del ADN combinando ambas estrategias; se basa en la amplificación selectiva, usando PCR, de un subgrupo de fragmentos genómicos resultantes de una digestión del genoma (Invitrogen, Life Technologies, 2003). El análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados constituye la tecnología más reciente que permite obtener un gran número de marcadores moleculares distribuidos en genomas procariotas y eucariotas. La técnica del AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos vía PCR. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

1. **Origen.** El desarrollo y divulgación de la técnica iniciaron en 1993, cuando Zabeau y Vos la denominaron como la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción –SRFA, por sus siglas en Inglés para *Selective Restriction Fragment Amplification*–. A partir de entonces se ha empleado de forma creciente para obtención de huellas dactilares de ADN, mapeo genético localizado y construcción de mapas genéticos, principalmente en especies de plantas cultivadas que presentan una baja tasa de polimorfismo del ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998). La técnica del AFLP, como tal, fue reportada por primera vez en 1995 (Vos *et al.*, 1995) por un grupo de investigadores de Keygene N. V. en Wageningen, Holanda. La técnica fue desarrollada partiendo de que, idealmente, una huella dactilar de ADN no debería requerir inversiones previas en términos de análisis de la secuencia, síntesis de partidores o caracterización de sondas de ADN, tal como lo hacen técnicas como RAPD, DAF y AP-PCR. Todos estos métodos se basan en la amplificación de fragmentos de ADN aleatorios por la selección arbitraria de partidores para la PCR; los patrones de fragmentos de ADN se pueden generar a partir de cualquier ADN sin conocimiento previo de su secuencia, y estos dependen de la secuencia de los partidores para la PCR y de la naturaleza del ADN molde. La PCR se lleva a cabo a bajas temperaturas de hibridación de los partidores para permitir que se unan a múltiples loci en el ADN. Los fragmentos de ADN se generan cuando la unión de los partidores están dentro de una distancia que permita la amplificación. Estos métodos nuevos para la obtención de la huella dactilar presentan la desventaja de que son muy sensibles a las condiciones de reacción, la calidad de ADN y los perfiles de temperatura de la PCR, lo que limita su aplicación. (Vos *et al.*, 1995)

La técnica del AFLP se basa en la detección de fragmentos de restricción genómicos mediante amplificación por la PCR, y pueden ser usados para ADNs de cualquier origen o complejidad. Las huellas dactilares se producen sin conocimiento previo de la secuencia, usando un conjunto limitado de partidores genéricos. El número de fragmentos detectados en una sola reacción se puede “sintonizar” seleccionando juegos específicos de partidores. La técnica del AFLP es robusta y confiable dadas las condiciones de reacción

asringentes durante la hibridación de los partidores; la confiabilidad de la técnica del RFLP se combina con el poder de la técnica de la PCR. (Vos *et al.*, 1995)

2. Definiciones

a. La técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. La técnica del AFLP constituye un método para la detección de polimorfismos de secuencia entre genomas de organismos diferentes que combina la huella dactilar de ADN basada en hibridación con las técnicas de exploración del ADN basadas en la PCR. Se basa en la amplificación selectiva de un subgrupo de fragmentos de la restricción del genoma. Con ese fin, los fragmentos se ligan con adaptadores y se amplifican con partidores que contienen nucleótidos selectivos en su extremo 3' que se hibridan con las secuencias de los adaptadores. Los productos de amplificación se separan mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y se visualizan mediante, autorradiografía, fluorografía (Kahl, 2001) o tinción con nitrato de plata (IAEA, 2002)

b. El polimorfismo de longitud de un fragmento amplificado. Un AFLP es cualquier diferencia entre fragmentos correspondientes de ADN de dos organismos A y B, que se detecta por la técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. Estos fragmentos presentan de 50 a 1000 pb de longitud. Los polimorfismos de las secuencias amplificadas de los organismos A y B se originan de variaciones en los sitios de restricción y se heredan típicamente de manera Mendeliana. Los AFLP's generados por la técnica del AFLP se caracterizan por un polimorfismo de tipo presencia/ausencia –1/0– en lugar del propio polimorfismo de la longitud del fragmento –esto es, la diferencia de longitud de los fragmentos– (Kahl, 2001).

3. Etapas de la técnica

a. Digestión del ADN genómico. En esta etapa, el ADN genómico total del individuo se digiere con dos endonucleasas de restricción, generando así fragmentos genómicos con extremos cohesivos – véase la Figura 3– (Invitrogen, Life Technologies, 2003; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

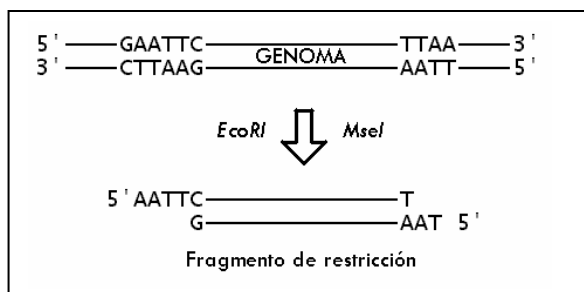
La digestión se realiza con una enzima de corte raro combinada con una enzima de corte frecuente. Las enzimas de corte raro reconocen de seis a ocho pares de bases o una secuencia rara de bases –e.g. Eco RI, NotI– y las de corte frecuente reconocen cuatro pares de bases –e.g. MseI, RsaI–. (Ferreira y Grattapaglia, 1998) La digestión puede realizarse separadamente, tratando primero al ADN con la enzima de corte raro y después con la de corte frecuente o bien simultáneamente, agregando ambas enzimas en la mezcla de reacción (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Invitrogen, Life Technologies, 2003).

Con esta digestión se generan tres clases de fragmentos que difieren en sus extremos (Ferreira y Grattapaglia, 1998):

- Fragmentos grandes resultantes de la digestión por la enzima de corte raro en ambos extremos.
- Fragmentos pequeños resultantes del corte con la enzima frecuente en ambos extremos.
- Fragmentos de tamaños intermedios resultantes del corte combinado de ambas enzimas, corte raro/corte frecuente.

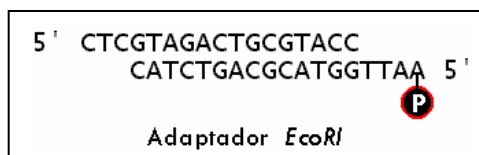
La razón de usar dos enzimas de restricción es, en primer lugar, que la enzima de corte frecuente genera fragmentos pequeños de ADN que se amplifican bien y cuyo tamaño es óptimo para su separación en geles de secuenciación; en segundo lugar, el número de fragmentos a ser amplificados se reduce usando la enzima de corte raro, dado que solo se amplifican los fragmentos con extremos raro/frecuente. Adicionalmente, el uso de dos enzimas hace posible marcar radiactivamente una banda del producto doble hebra de la PCR, con lo que se evita la aparición de “dobletes” en los geles debido a una movilidad distinta de las dos hebras de los fragmentos amplificados; en cuarto lugar, el uso de las dos enzimas provee la mayor flexibilidad en “sintonizar” el número de fragmentos que se van a amplificar y, finalmente, grandes números de huellas dactilares distintas se pueden generar por las varias combinaciones de un número pequeño de partidores. (Vos *et al.*, 1995)

Figura 3. Digestión del genoma mediante enzimas de restricción (Adaptada de Kahl, 2001)



b. Ligación de adaptadores. En esta etapa se incorporan, mediante ligación, adaptadores de doble hebra –véanse figuras 4 y 5– a los extremos cohesivos de los fragmentos genómicos resultado de la digestión enzimática– véase la figura 6–; obteniéndose así el ADN molde para la preamplificación –véase la figura 7–. (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Invitrogen, Life Technologies, 2003)

Figura 4. Adaptador para el extremo cohesivo generado por la enzima de corte raro *EcoRI* (Vos *et al.*, 1995)

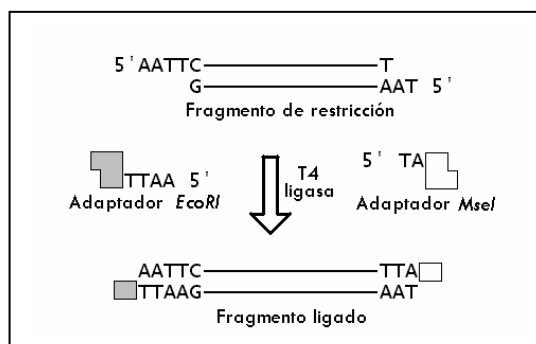


Los adaptadores *EcoRI* específicos se unen a los extremos cohesivos producidos por la enzima de corte raro *EcoRI*, mientras que los adaptadores *MseI* se unen específicamente a los extremos cohesivos resultantes del corte por la enzima de corte frecuente *MseI* –véase la figura 6–; éstos no están fosforilados, lo que provoca que sólo una hebra sea ligada a cada extremo de cada fragmento de restricción –véase la figura 6– (Vos *et al.*, 1995).

Figura 5. Adaptador para el extremo cohesivo generado por la enzima de corte frecuente *MseI* (Vos *et al.*, 1995)

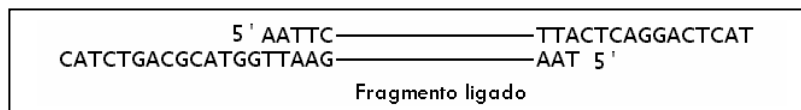


Figura 6. Ligación de adaptadores. (Adaptada de Kahl, 2001)



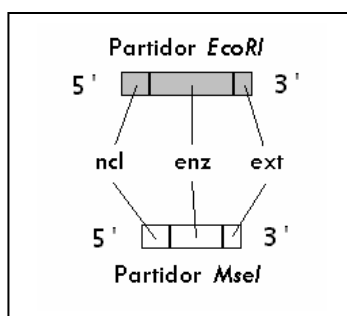
La ligación de adaptadores se lleva a cabo de manera que los sitios de restricción no se regeneren –véase la figura 7–(Tohme *et al.*, 1996).

Figura 7. Fragmento de restricción ligado.



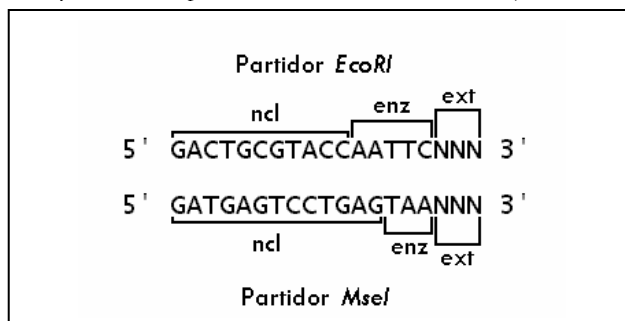
c. Preamplificación. La preamplificación consiste en una PCR, y ocurre debido a que los partidores o primers –véase figura 8– se unen a la secuencia de los adaptadores y del sitio de restricción adyacente. De este modo se obtiene un subconjunto de fragmentos de restricción. (Invitrogen, Life Technologies, 2003).

Figura 8. Representación esquemática de un partidador para AFLP. “ncl” es la secuencia nuclear, “enz” es la secuencia reconocida por la enzima y “ext” se refiere a los nucleótidos adicionales.



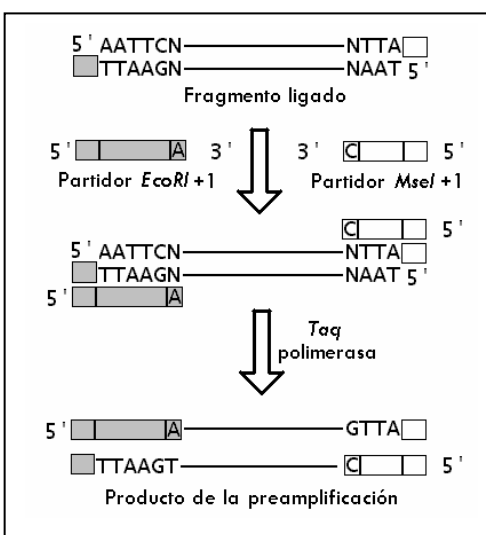
Los adaptadores poseen de 20 a 30 pares de bases cuyas secuencias son diferentes en cada uno de ellos – véase la figura 9–. En este paso podría ser amplificado un gran número de fragmentos mediante una PCR dirigida con cebadores específicos a partir de las secuencias de los adaptadores, sin embargo, este número sería demasiado grande para obtener una buena definición de fragmentos individuales incluso en geles de alta resolución. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

Figura 9. Diseño de los partidores para AFLP. “ncl”, corresponde a la secuencia nuclear del partidor; “enz”, corresponde a la secuencia reconocida por la enzima y “ext” corresponde a los nucleótidos selectivos (Vos *et al.*, 1995)



En ésta etapa, los cebadores utilizados contienen sólo un nucleótido arbitrario adicional –véase la figura 10–. Con esto, solamente 1 de cada 4 bases –A, C, G y T– posibles interviene en la producción de fragmentos amplificados. Una vez que esta presión de selección se realiza de forma independiente en cada sitio de iniciación de la PCR, el resultado es que solamente 1 de cada 16 fragmentos existentes será amplificados –1 cada 4x4 bases–. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

Figura 10. Pre amplificación (adaptada de Kahl, 2001)



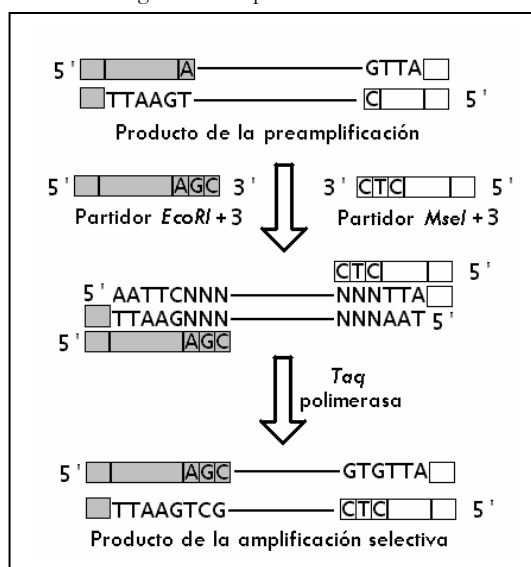
d. Amplificación selectiva. La amplificación selectiva consiste en una PCR que emplea una nueva pareja de partidores que poseen nucleótidos selectivos adicionales –en los extremos 3'– que se extienden hacia los fragmentos de restricción preamplificados. De este modo, sólo se amplificarán los fragmentos de

restricción cuyos nucleótidos próximos a los sitios de restricción se aparean con los nucleótidos selectivos de los cebadores –véase la figura 11–. (Invitrogen, Life Technologies, 2003; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La especificidad en esta extremidad es crucial, dado que justamente este sitio es donde se inicia la polimerización. Del mismo modo, los cebadores se hibridan solamente con los fragmentos que poseen la secuencia complementaria a su secuencia arbitraria adicional. Por lo tanto, se produce una acción selectiva en el momento en que se realiza la PCR y solamente una subpoblación de fragmentos es amplificada. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

La presión de selección es mayor en esta etapa, puesto que los cebadores utilizados poseen otros 2 nucleótidos arbitrarios adicionales, totalizando tres. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

Figura 11. Amplificación selectiva.



e. Visualización. El subconjunto de fragmentos amplificados selectivamente se analiza mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante, para generar la huella dactilar. (Invitrogen, Life Technologies, 2003; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los cebadores dirigidos al adaptador para el extremo cortado por la enzima de corte raro, tiene su terminal 5' marcado con radioisótopos o fluorescencia. De este modo, aunque las tres clases de fragmentos sean amplificadas, solamente se visualizarán los que se amplificaron a partir de, por lo menos, un adaptador para corte raro. La clase de fragmentos resultantes de la digestión por la enzima de corte raro en ambas extremidades tiene un tamaño medio aproximado de 4 a 5 Kb, por lo que migran muy poco en la electroforesis en poliacrilamida, quedando retenidos en la porción superior del gel. Solamente los fragmentos de tamaños intermedios resultantes del corte combinado raro/frecuente son los que se visualizan en el análisis de AFLP.

Los fragmentos de mayor tamaño que no están marcados, no se observan en el gel cuando la visualización es por autorradiografía (Ferreira y Grattapaglia, 1998); sin embargo, cuando la forma de visualización de las bandas es mediante tinción con plata, se observan las bandas correspondientes a las tres clases de fragmentos.

4. Base genética. El polimorfismo de longitud de un fragmento amplificado depende de la relación entre el número de nucleótidos selectivos en los cebadores de la PCR y la complejidad del genoma. Para genomas menos complejos –i.e. microorganismos– se debe utilizar un menor número de nucleótidos selectivos para obtener el número adecuado de bandas visualizadas. A medida que se analizan genomas más complejos, se debe utilizar un número mayor de nucleótidos selectivos. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

Si se considera un genoma con una secuencia arbitraria de una mezcla equimolar de los cuatro nucleótidos, el corte por una enzima que reconoce seis pares de bases se produce una media de una vez cada cuatro mil noventa y seis pares de bases. Cada fragmento producido será cortado una vez cada doscientos cincuenta y seis pares de bases por la enzima de corte frecuente, produciendo una media de dieciséis subfragmentos. De estos dieciséis subfragmentos, solamente dos, que posean extremidades diferentes (frecuente/raro), serán visualizados en el gel, puesto que el marcaje terminal se efectúa en el cebador para el adaptador específico de corte raro en el caso de que la visualización sea por autorradiografía. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

La ecuación Ec. 1. es una expresión sencilla para calcular el número esperado de fragmentos $-F-$ en función de la complejidad de genoma haploide $-C-$, del número total de nucleótidos arbitrarios utilizado $-n-$ y del número de bases reconocidas por la enzima de corte raro $-y-$, asumiendo que la enzima de corte frecuente cortará por lo menos una vez cada fragmento producido por la enzima de corte raro (Ferreira y Grattapaglia, 1998):

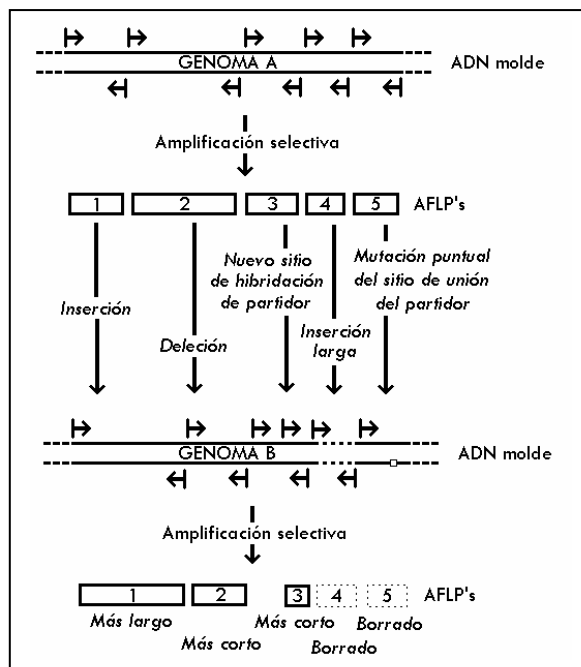
$$F = \frac{2C}{4^y 4^n} \quad \text{Ec. 1.}$$

El polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados resulta de mutaciones puntuales, inversiones, deleciones e inserciones, que llevan a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción reconocido por las enzimas utilizadas o bien, por alteración de la secuencia reconocida por los nucleótidos arbitrarios en los extremos 3' de los cebadores que dirigen la PCR a partir de los adaptadores –véase la figura 12–. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

Los polimorfismos del sitio de restricción ocurren cuando una secuencia específica reconocida por una endonucleasa de restricción está presente o ausente en un sitio dado; los polimorfismos de longitud de secuencia ocurren cuando el número de secuencias repetitivas dispuestas a manera de tándem en un sitio dado

varían; y, finalmente el tipo de AFLP que es el mayor responsable de la huella dactilar lo generan cambios de pares de bases no asociados con los sitios de restricción (Kahl, 2001).

Figura 12. Amplificación de sitios con inserciones, deleciones o mutaciones (Adaptada de Kahl, 2001)



5. Ventajas y desventajas de la técnica del AFLP. Se han desarrollado una serie de técnicas de marcadores genéticos para estimar la diversidad genética, y aunque la técnica del AFLP es la que más se aproxima a ser la ideal, incluso ésta presenta ventajas y desventajas. (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

Como principal ventaja de la técnica es que puede ser automatizada y se puede adaptar para diferentes usos –cDNA-AFLP i.e. AFLP del ADN complementario, por ejemplo– (IAEA, 2002). Además, es una técnica relativamente barata, fácil, rápida y confiable que genera cientos de marcadores genéticos informativos (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

Bajo un enfoque taxonómico, los marcadores AFLP se pueden generar para cualquier organismo a partir de su ADN y sin previo conocimiento sobre su conformación genómica (Mueller and Wolfenbarger, 1999; IAEA, 2002). Por esto, los marcadores AFLP tienen amplia aplicabilidad taxonómica y se han empleado efectivamente en una variedad de taxa, incluyendo bacterias, hongos, animales y plantas. (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

Las amplificaciones AFLP ocurren bajo condiciones de alta selectividad –a alta astringencia–, eliminando así la variación artificial que se ve rutinariamente en RAPD. Repetidas amplificaciones selectivas muestran una

reproducibilidad casi perfecta y errores menores al 2%. El error entre laboratorios para los marcadores AFLP es menor al 0.6%, que está al nivel de los errores de los microsatélites (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

Las cantidades de tejido o ADN requeridas son mínimas y se pueden emplear muestras parcialmente degradadas. (Mueller and Wolfenbarger, 1999, IAEA, 2002)

Los marcadores AFLP se pueden generar a gran velocidad, según lo demuestran la cantidad de polimorfismos generados por cada PCR y el porcentaje de polimorfismo. Los estudios reportan rutinariamente cientos o hasta miles de marcadores. (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

Los marcadores AFLP segregan de manera mendeliana, y se pueden usar en genética de poblaciones y análisis de QTL (Mueller and Wolfenbarger, 1999).

Dado el casi ilimitado número de marcadores que se pueden generar con AFLP, utilizando una serie de combinaciones de partidores, al menos algunos marcadores AFLP estarán localizados en regiones variables, lo que revelaría diferencias genéticas aún menores dentro de un grupo de organismos. Las diferencias en un solo nucleótido entre fragmentos AFLP se puede visualizar ya sea con una electroforesis en gel de poliacrilamida o por métodos automáticos. También es posible analizar los marcadores AFLP con una electroforesis en gel de agarosa, aunque la simplicidad se traduce en una menor resolución. (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

Entre las desventajas de la técnica, solamente se pueden evaluar hasta 100 loci, puede ocurrir un agrupamiento de marcadores, puede ser técnicamente desafiante, la técnica está patentada (IAEA, 2002) y, por último, es muy difícil identificar marcadores homólogos, haciéndolo menos útil para estudios que requieren una asignación precisa de estados alélicos como análisis de heterocigosidad (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

El concepto de “dominancia” de los marcadores RAPD se aplica igualmente a los marcadores basados en AFLP. Los marcadores AFLP no permiten la detección de heterocigotos, o sea, no es posible distinguir si una banda en el gel es resultado de la amplificación de uno o de dos alelos. En principio, sin embargo, bandas procedentes de heterocigotos poseen la mitad de la intensidad de las bandas provenientes de homocigotos. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

Comparados con los marcadores SSR –microsatélites–, los marcadores AFLP sufren por su naturaleza dominante (Mueller and Wolfenbarger, 1999; IAEA, 2002); sin embargo, la información detallada del pedigrí permite la identificación de marcadores AFLP codominantes, lo que permite una estimación precisa de la frecuencia de alelos y un más poderoso análisis genético de poblaciones. Se han encontrado marcadores AFLP codominantes en una frecuencia del 4% al 15% entre todos los marcadores AFLP polimórficos; según lo anterior, 200 marcadores polimórficos contendrán marcadores codominantes de al menos 5 a 30 loci. (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

A. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Hacer un estudio del ADN genómico de veinte variedades mutantes de *Phaseolus vulgaris* L. mediante la técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados –AFLP– para obtener una huella dactilar de ADN de cada una.

2. Objetivos específicos

- Extraer ADN genómico de altas integridad y pureza a partir de plantas de *P. vulgaris* para someterlo a la técnica del AFLP.
- Seleccionar las combinaciones de partidores adecuadas para diferenciar la variedad ICTA Altense de la variedad ICTA Hunapú.
- Emplear las combinaciones de partidores seleccionadas para caracterizar la muestra de variedades mutantes.
- Establecer gráficamente las relaciones filogenéticas entre las variedades originales y las variedades mutantes mediante un dendrograma.
- Verificar el efecto de las mutaciones inducidas por radiación gama en la huella dactilar de las plantas mutantes.

B. HIPÓTESIS

Es posible observar patrones característicos de AFLP's en variedades mutantes de ICTA Altense e ICTA Hunapú tales que permitan diferenciarlas entre sí y de sus variedades originales.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

A. Esquema general de la metodología

Según lo establecido previamente, la técnica del AFLP consta de varias etapas, que pueden representarse esquemáticamente desde la preparación del ADN hasta el análisis del AFLP –véanse figuras 13 a 15–.

Figura 13. Diagrama de flujo del proceso de preparación del ADN para la técnica del AFLP.

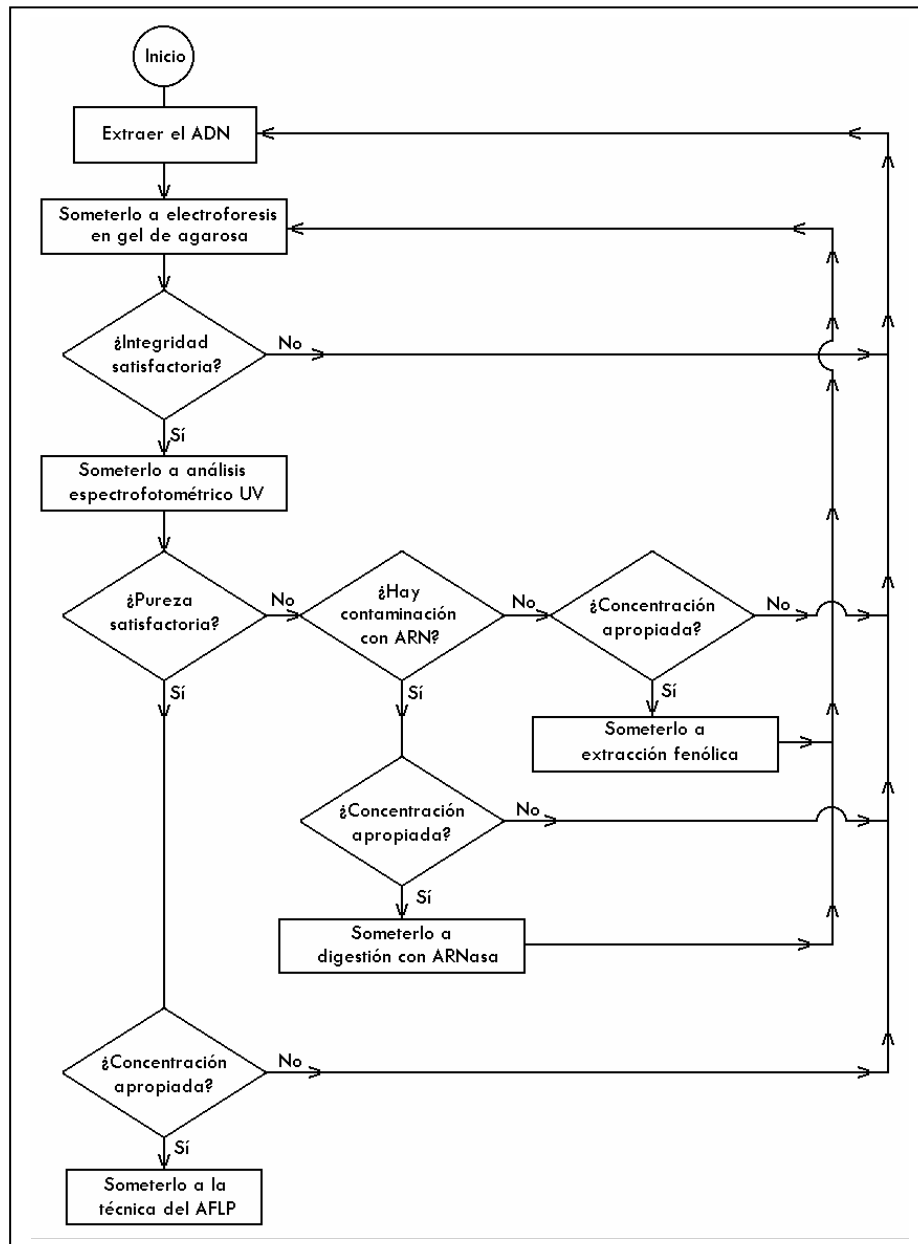


Figura 14. Diagrama de flujo de la técnica del AFLP; restrictasas, enzimas de restricción o endonucleasas –continuación del diagrama de flujo de la figura 13–.

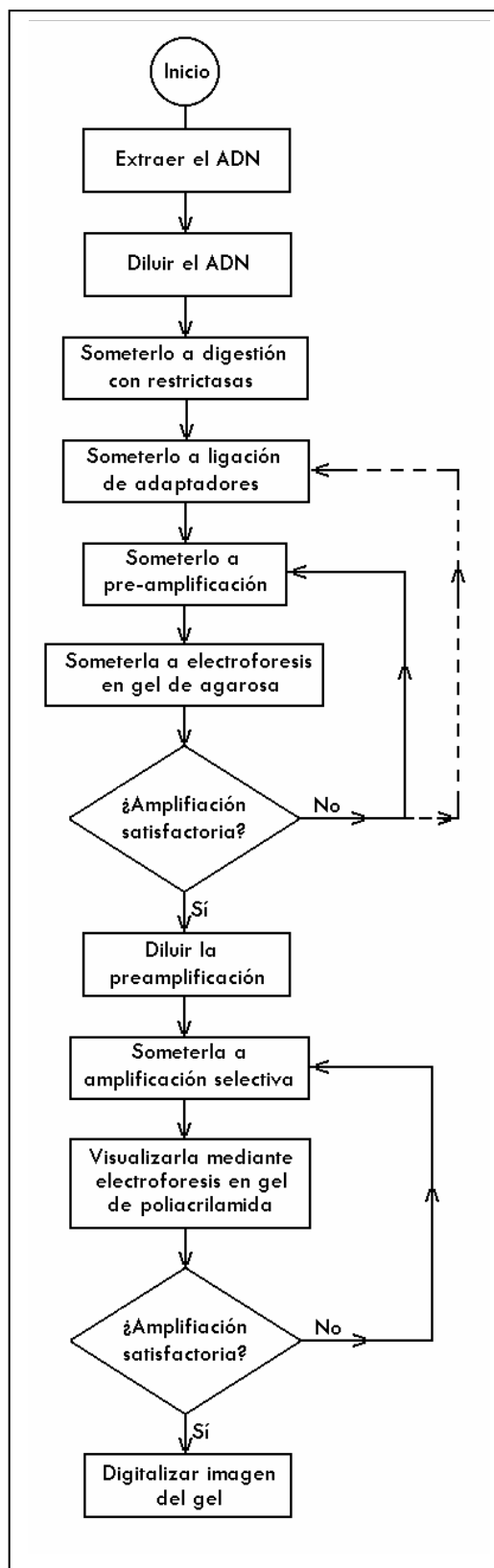
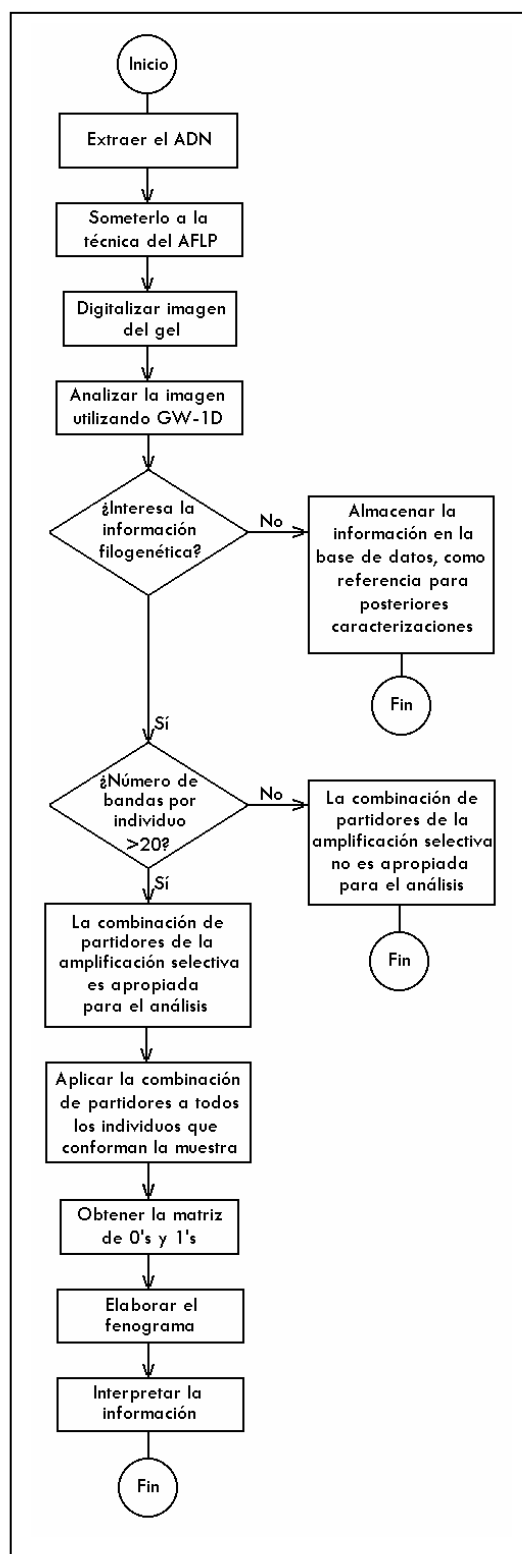


Figura 15. Diagrama de flujo del análisis del AFLP
–continuación de la figura 14–.
GW-1D se refiere al software GelWorks 1D®.



B. Materiales

Cuadro 5. Equipo de laboratorio.

Equipo	Marca
Agitador orbital	Eyela
Agitadores magnéticos	Sigma
Autoclave	Market Forge
Balanza analítica	Denver Instruments Co.
Bandejas para tinción	Sterilite
Bata	
Beakers de 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 mL	Pyrex
Bidón para agua destilada	Nalgene
Bloque calentador para tubos	Boekel
Calculadora científica	Casio
Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa	Fisher
Cámara de electroforesis vertical para geles de secuenciación	Bio-Rad
Cámara fotográfica con filtro UV	Polaroid/Fotodyne
Concentrador Centri-Vap	Labconco
Congelador -20 C	Sanyo
Cronómetro	Junghans, Casio
Destilador de agua	Corning
Dewar	
Escáner	Dell
Espátulas	Fisher
Estufa/agitador	Fisher, Cole-Parmer
Filtros Whatman #1	
Fuentes de poder para cámaras de electroforesis	Bio-Rad
GelWorks1D software, digital image analysis	UVP
Guantes de nitrilo	N-DEX
Kimwipes	Kimberly-Clark
Lentes	
Microcentrifuga	Eppendorf
Micropipetas de 2, 10, 20, 100, 200 y 1000 uL	Eppendorf, Wheaton
Minicentrífuga	Bio-Rad
Organizador de tubos	Nalgene
PC	Dell
Puntas para micropipetas	Eppendorf, Wheaton, Fisher
Refrigerador 4 C	Fisher
Sistema de filtración	Millipore
Suavizador de agua	Culligan
Termociclador	Techne
Termómetro	Fisher, VWR
Trampa fría para Centri-Vap	Labconco
Transiluminador ultravioleta	Fotodyne, UVP
Tubos de 1.5 y 0.5 mL	Sigma

Cuadro 6. Reactivos utilizados.

Reactivos	Grado	Marca
Ácido acético glacial	PA	EM
Ácido bórico	BM	Calbiochem
Acrilamida	E	Sigma
Agarosa	E	Sigma
Azul de bromofenol	E	Sigma
Bind Silane	E	Sigma
Bisacrilamida	E	Sigma
Bromuro de etidio	E	Sigma
Carbonato de sodio anhidro	PA	Merck
Acetato de potasio	BM	Sigma
Acetato de sodio	BM	Sigma
dNTP's	BM	Fisher
Dodecil sulfato de sodio	BM	Sigma
EDTA	BM	Sigma
Etanol absoluto	PA	Merck
Formaldehido al 37%	PA	Merck
Formamida	BM	Fisher
Hidróxido de sodio en lentejas	PA	Fisher
Isopropanol	BM	Sigma
Marcador de masa molecular de ADN, escalera de 100bp		Invitrogen
Nitrato de plata	PA	Merck
Persulfato de amonio	E	Sigma
Kit <i>Taq</i> polimerasa		Invitrogen
Kit AFLP		Invitrogen
Sigma Cote	E	Sigma
Tiosulfato de sodio	PA	Sigma
Trizma base	BM	Sigma
Urea	E	Bio-Rad, Invitrogen
Xilen cianol	E	Sigma

C. Métodos

Cuadro 7. Extracción de ADN (Lobos *et al.*, 1999).

Protocolo de extracción de ADN	
1	Macerar con Nitrógeno líquido 500 mg de tejido de hoja joven e introducirlo en dos tubos Eppendorf de 1.5 mL.
2	Agregar 600 µL de TAMPÓN DE LISIS a cada tubo (precalentado a 65 °C) e incubar 2 minutos a 65 °C.
3	Agregar 200 µL de TAMPÓN DE EXTRACCIÓN e incubar 30 minutos a 65 °C, homogenizando cada 5 minutos.
4	Agregar a cada tubo 160 µL de ACETATO DE POTASIO (enfriado a 4°C); mezclar y dejar en hielo durante 10 minutos
5	Separar el contenido equitativamente en 2 tubos (aprox 450 µL).
6	Agregar un volumen (450 µL) de FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL; homogenizar por 1 minuto y centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm.
7	Recuperar la fase acuosa y agregar 0.6 volúmenes de ISOPROPANOL a -20 °C.
8	Mezclar y almacenar a -20 °C durante 20 minutos; centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm; descartar el sobrenadante (succión suave).
9	Agregar 300 µL de ETANOL 70% a -20 °C y desprender el precipitado utilizando un vórtex.
10	Centrifugar 5 minutos a 13,000 rpm; descartar el sobrenadante y luego secar en centrífuga con vacío (Centri-Vap) 3 minutos a 65 °C.
11	Agregar 50 µL de TE a cada tubo e incubar 7 minutos a 65 °C.
12	Agregar 15 µL de ARNasa, centrifugar 10 segundos e incubar 40 minutos a 37 °C.
13	Agregar 20 µL de PROTEINASA K e incubar 20 minutos a 50 °C.
14	Llevar a un volumen final de 200 µL con TE; agregar 200 µL de FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL; homogenizar por 1 minuto y centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm.
15	Recuperar las fases acuosas, aproximadamente 150 µL de cada tubo, y juntarlas en uno solo.
16	Agregar 300 µL de CLOROFORMO:ISOPENTANOL; homogenizar y centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm; recuperar la fase acuosa (170 µL aprox.).
17	Agregar 17 µL de ACETATO DE SODIO y homogenizar.
18	Agregar 400 µL de ETANOL a -20 °C, homogenizar y almacenar toda la noche a -20°C.
19	Centrifugar 30 minutos a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante (succión).
20	Agregar 700 µL de ETANOL 70% a -20 oC, desprender el precipitado utilizando un vórtex; centrifugar 5 minutos a 13,000 y descartar el sobrenadante (succión).
21	Centrifugar al vacío (Centri-Vap) durante 3 minutos a 65 °C.
22	Agregar 50 µL de TE e incubar 5 minutos a 65 °C para esuspender el ADN. Homogenizar pipeteando suavemente.
<p>En caso de contaminación con ARN, ajustar el volumen a 50 µL con TE y proceder a partir del paso 12.</p> <p>En caso de contaminación con Proteínas, ajustar el volumen a 200 µL con TE y proceder a partir del paso 14.</p>	

Cuadro 8. Soluciones utilizadas en el protocolo de extracción de ADN.

Soluciones requeridas para la extracción de ADN.	
TAMPÓN DE LISIS	
Componente	Conc. final
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM
SDS	4% (p/v)
NaCl	250 mM
β -Mercaptoetanol	1 mM
Proteinasa K	10 mg/mL
TAMPÓN DE EXTRACCIÓN	
Componente	Conc. final
Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
EDTA	20mM
CTAB	8.4% (p/v)
ACETATO DE POTASIO 5M	
FENOL:CLOROFORMO:ISOPENTANOL (25:24:1)	
Componente	Prop. final
Fenol equilibrado a pH 8.0	25
Cloroformo	24
Isopentanol (alcohol isoamílico)	1
ISOPROPANOL	
ETANOL 70%	
Componente	Prop. final
Etanol absoluto	70% (v/v)
Agua destilada	30% (v/v)
TE	
Componente	Conc. final
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA	1 mM
ARNasa	
Componente	Conc. final
ARNasa	10 mg/mL
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
NaCl	15 mM
Incubar 15 minutos a 100 °C. Enfriar a temperatura ambiente. Almacenar, en alícuotas, a -20 °C.	
PROTEINASA K	
Componente	Conc. Final
Proteinasa K	20 mg/ml
Glicerol	50%
CLOROFORMO:ISOPENTANOL 24:1	
Componente	Prop. final
Cloroformo	24
Isopentanol (alcohol isoamílico)	1
ACETATO DE SODIO 3M pH 5.2	
ETANOL	
H₂O UP	Ultra Pura. Destilada, filtrada.

Cuadro 9. Verificación de la integridad del ADN. Electroforesis en gel de agarosa. (Lobos *et al.*, 1999).

Protocolo para la electroforesis en gel de agarosa		
Cámara	FISHER™	
Dimensiones	15 x 15 (cm, gel)	
Peine	20 pozos (x 2)	
Capacidad	Solución de agarosa	200 mL
	Tampón en el reservorio	1 L
	Pozos (40)	30 uL
1 Preparación de la cámara		
	Enjuagar las piezas (reservorio del buffer, bandeja del gel y peines) con agua destilada.	
	Lubricar las bandas de hule de los extremos con vaselina y ensamblar la cámara de modo que al agregar la solución de agarosa, ésta quede contenida en la bandeja del gel.	
2 Solución de agarosa 1%		
	Agarosa	2 g
	Buffer 0.5X	agregar 200 mL
	Horno de microondas	20 segundos (hasta ebullición)
3 Carga de la agarosa en la bandeja del gel		
	Esperar que la temperatura de la solución de agarosa baje hasta 50 °C.	
	Verter la solución en la bandeja y colocar los peines en posición.	
	Esperar que el gel polimerice por aproximadamente 1 hora.	
	Retirar la bandeja del gel y recolocarla en posición de corrida (pozos en el lado del polo positivo)	
4 Carga		
	Mezclar la muestra con la cantidad suficiente de tampón de carga 10X para que la concentración final de éste sea 1X.	
5 Corrida		
	Ajustar el voltaje y el tiempo de corrida requeridos, según sea verificación de la integridad del ADN o bien la verificación de la preamplificación.	
6 Tinción con bromuro de etidio		
	Retirar el gel de la bandeja y sumergirlo en una solución de bromuro de etidio de 1 µg/mL durante 10 minutos (usar dos pares de guantes).	
7 Visualización		
	Colocar el gel sobre el transiluminador ultravioleta (302 nm), si el gel está sobreteñido, sumergirlo 10 minutos en agua destilada (usar dos pares de guantes).	
	Fotografiar el gel, utilizando una obturación de 6.5 y un tiempo de exposición de 1/2 segundo.	
8 Remoción del gel		
	Colocar el gel en el reservorio con carbón activado. Posteriormente descartarlo como sólido.	

Cuadro 10. Espectrofotometría ultravioleta (Lobos *et al.*, 1999)

Protocolo para el análisis espectrofotométrico ultravioleta		
Espectrofotómetro	SmartSpec 3000®	Bio-Rad™
Celda	Cuarzo (100 μ L)	Bio-Rad™
Tipo de análisis	ADN de doble hebra.	
Blanco	TE	
Muestra	TE	995 μ L
	ADN	5 μ L
Factor de dilución	200	
<hr/>		
1	Luego de la inicialización automática, seleccionar el tipo de análisis.	
2	Ingresar el factor de dilución.	
3	Hacer la lectura de 995 μ L de blanco.	
4	Agregar 5 μ L del ADN y homogenizar.	
5	Hacer la lectura de 1000 μ L de blanco + muestra.	
6	Enjuagar la celda con agua destilada.	
7	Imprimir los resultados.	
<hr/>		

Cuadro 11. Digestión del ADN genómico (Invitrogen, Life Technologies, 2003)

Protocolo para la digestión del ADN		
1	Diluir el ADN extraído hasta una concentración de 25 μ g/ μ L.	
2	Mezcla de reacción	
	Componente	Concentración Volumen
	H ₂ O	up 7.5 μ L
	Tampón de las restrictasas	5 x 5 μ L
	Eco RI/Mse I	1.25 U/ μ L (c/u) 2.5 μ L
	ADN	25 ng/ μ L 10 μ L
		(Σ =25 μ L)
3	Digestión. Incubar 2h a 37 °C	
4	Desnaturalización de las restrictasas. Incubar 15 min a 70 °C.	
<hr/>		

Cuadro 12. Ligación de adaptadores (Invitrogen, Life Technologies, 2003).

Protocolo para la ligación de adaptadores		
1 Mezcla de reacción		
Componente	Concentración	Volumen
ADN digerido		25 μ L
Solución de ligación		24 μ L
Ligasa de ADN, T4		1 μ L
		(Σ =50 μ L)
2 Ligación. Incubar 2h a 20 °C		
3 Hacer dilución 1:10 del producto de ligación 10 μ L de mezcla de reacción + 90 μ L de TE		
4 Almacenar el resto de la mezcla de reacción a -20 °C		

Cuadro 13. Preamplificación (Invitrogen, Life Technologies, 2003).

Protocolo para la preamplificación		
1 Mezcla de reacción		
Componente	Concentración	Volumen
ADN digerido molde	dilución 1:10	5 μ L
Mezcla de partidores de preamplificación		40 μ L
Tampón PCR + Mg	10 x	5 μ L
Taq, polimerasa de ADN	5 U/ μ L	1 μ L
		(Σ =51 μ L)
2 Amplificación		
Evento	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94 °C	30 s
Hibridización	56 °C	60 s
Extensión	72 °C	60 s
	20 CICLOS	
Almacenamiento	4 °C	indefinido
3 Hacer dilución 1:25 del producto de la preamplificación 6 μ L de producto de la PCR + 144 μ L de TE		
4 Verificación de la pre amplificación mediante electroforesis.		
Matriz	Agarosa	
	Concentración	1.20%
	Tampón	TBE 0.5 x
Muestra	Producto de la preamplificación	10 μ L
	Tampón de carga 10 x	2. μ L
	Vol muestra por pozo	12 μ L
Corrida	Voltaje	50 constante
	Tiempo	30 min
Tinción	Bromuro de etidio	
	Concentración	1 μ g/mL
	Tiempo	10min
Visualización	Transiluminador UV	302 nm
	Fotografía	Exp. 1/2 s
		Obt. 6.5

Cuadro 14. Amplificación selectiva. (Invitrogen, Life Technologies, 2003).

Protocolo para la amplificación selectiva		
1 Mezcla de reacción A		
Componente	Concentración	Volumen
H ₂ O	up	0.3 μ L
Partidor E+3		0.2 μ L
Partidor M+3 (contiene dNTP's)		4.5 μ L
Producto de la preamplificación	dilución 1:25	5.0 μ L
		($\Sigma=10 \mu$ L)
2 Mezcla de reacción B		
Componente	Concentración	Volumen
H ₂ O		7.8 μ L
Tampón PCR + Mg	10 x	2 μ L
Taq, polimerasa de ADN	5 U/ μ L	0.2 μ L
		($\Sigma=10 \mu$ L)
3 Mezclar el contenido de los pasos 1 y 2 ($\Sigma=20 \mu$L) en un solo tubo.		
Evento	Temp	Tiempo
4		
Desnaturalización	94 °C	30 s
Anillamiento	65 °C	30 s
Extensión	72 °C	60 s
1 CICLO		
Desnaturalización	94 °C	30 s
Anillamiento	Anillamiento -0.7 °C	30 s
Extensión	72 °C	60 s
12 CICLOS		
Desnaturalización	94 °C	30 s
Anillamiento	56 °C	30 s
Extensión	72 °C	60 s
23 CICLOS		
Almacenamiento	4 °C	indefinido
5 Agregar 20 μL de mezcla de formamida a cada producto de reacción		
6 Almacenar a -20 °C indefinidamente		

Cuadro 15. Visualización de las amplificaciones selectivas (Lobos *et al.*, 1999; Invitrogen, Life Technologies, 2003).

Especificaciones para la visualización de la preamplificación		
Electroforesis		
Matriz	Poliacrilamida	
	Concentración	5%
	Tampón	TBE 1 x
Muestra	Amplificación selectiva + mezcla de formamida (1:1)	
	Vol muestra por pozo	3 μ L
Corrida	Temperatura	50 °C constante (55 watt)
	Tiempo	1h
Tinción	Plata	
Análisis	Mediante UVP™ GelWorks 1D® Image Analysis Software , previa digitalización de la imagen del gel en escala de grises a una resolución de 300 píxeles por pulgada.	

Cuadro 16. Electroforesis en gel de secuenciación
(Schoua, 1998; Lobos, 1999; IAEA, 2002).

Protocolo de la electroforesis en gel de poliacrilamida

Cámara	BIO-RAD™ SequiGen®	
Dimensiones	38x30 (cm)	
Peine	Dientes de tiburón (0.4 mm de espesor)	
Espaciadores	0.4 mm de espesor	
Capacidad	Solución de acrilamida	60 mL
	Tampón en los reservorios	1.5 L
	Pozos (48)	5 µL

1 Preparación de la cámara

Placa entera, a la que queda adherido el gel.

Enjuagar con agua corriente, si hay restos del gel anterior, removerlos con una espátula; lavar la placa con jabón suave y esponja suave.

Colocar la placa en posición casi vertical y enjuagar con:

Agua destilada

Etanol 95%

Dejar secar la placa por 5 minutos en posición vertical, luego colocar en posición horizontal y, si es necesario, emplear 1 KIMWIPE para acelerar el proceso de secado.

Cuando la placa esté completamente seca, distribuir 30 µl de la solución de Bind Silano con 1 KIMWIPE.

Humedecer el mismo KIMWIPE con agua destilada y continuar distribuyendo el Bind Silano sobre la placa.

Dejar reposar 5 minutos.

Colocar la placa en posición casi vertical y enjuagar con etanol 95% dos veces

Dejar secar en la misma posición, luego colocarla en posición horizontal, si es necesario, emplear 1 KIMWIPE para acelerar el proceso de secado.

NOTA: EN ESTE MOMENTO ES PRECISO CAMBIARSE LOS GUANTES
(AHORA CONTAMINADOS CON BIND-SILANO)

Placa cortada

Enjuagar con agua corriente, si hay restos de gel, removerlos con una espátula.

Aplicar aprox. 5 mL de solución limpiadora NaOH-SDS y distribuirla uniformemente en toda la placa con frotación vigorosa empleando una esponja plástica dura (verde), dejar reposar 5 minutos.

Frotar vigorosamente de nuevo y finalmente enjuagar con agua corriente.

Si aún hay restos de gel repetir el procedimiento.

Colocar el gel en posición casi vertical y enjuagar con:

Agua destilada

Etanol 95%

Dejar secar la placa por 5 minutos en posición vertical, luego colocar en posición horizontal y, si es necesario, emplear 1 KIMWIPE para acelerar el proceso de secado.

Cuando la placa esté completamente seca en posición horizontal, distribuir uniformemente un total de 1.5 mL de SIGMACOTE, 0.75 mL cada vez con un mismo KIMWIPE.

Ensamblar la cámara con los espaciadores.

Cuadro 16, continuación. Electroforesis en gel de secuenciación (Schoua, 1998; Lobos, 1999; IAEA, 2002).

2 Preparación del gel	
<i>Solución de acrilamida al 5%</i>	
Urea	30 g
Tampón TBE 5X	15 mL
Acrilamida:bisacrilamida (19:1)	10 mL
H2O destilada	aforar a 75 mL
Filtrar	Whatman No. 1
<i>Activar la solución de poliacrilamida</i>	
TEMED	15 µL
Persulfato de amonio 10%	150 µL
Carga del gel	
Inmediatamente después de agregar el TEMED y el persulfato de amonio y de homogenizar (agitar ligeramente con la punta empleada para agregar el persulfato de amonio):	
Cargar la mezcla en la jeringa.	
Acoplar la manguera en la jeringa.	
Expulsar el aire de la manguera llenándola con la solución.	
Acoplar la manguera en el adaptador de llenado de la cámara.	
Descargar la mezcla lenta y continuamente hasta que se desborde por la parte superior de la cámara, evitando burbujas.	
Colocar el lado recto del peine a manera de formar un solo pozo en la parte superior del gel.	
Dejar que polimerice aproximadamente 1 hora, mientras tanto, calentar TBE 1X hasta aproximadamente 60 °C.	
3 Pre-corrída	
Luego de finalizada la polimerización, acoplar el gel en la base.	
Colocar 500 mL de tampón TBE 1X en el reservorio inferior.	
Colocar 1000 ml de tampón TBE 1X en el reservorio superior.	
Retirar el peine y lavar el pozo con el buffer y una pipeta para eliminar restos	
Insertar el lado dentado el peine en el gel (aproximadamente 0.5 mm) y .	
lavar cada pozo.	
Aplicar 100 watt de potencia hasta que la temperatura alcance los 50°C	
Ajustar la potencia a 55 watt para mantener la temperatura constante.	
de urea y poliacrilamida.	
4 Carga de las muestras	
Trabajar rápidamente para evitar la pérdida de temperatura del sistema.	
5 Corrida	
Correr a una potencia de 55 watt por 1 hora.	
Luego de finalizada la corrida, recuperar el tampón del reservorio para reutilizarlo hasta 5 veces. Descartar el tampón del reservorio inferior.	

Cuadro 16, continuación. Electroforesis en gel de secuenciación
(Schoua, 1998; Lobos, 1999; IAEA, 2002).

6	Tinción con nitrato de plata
	Usar soluciones frescas, preparadas durante la corrida.
Fijación	Colocar el gel en la bandeja de fijación. Cubrir el gel con 1.5 L de la solución de fijación. Agitar durante 20 minutos. Almacenar la solución de fijación.
Lavado	Colocar el gel en la bandeja de agua. Cubrir el gel con 1.5 L de agua destilada fresca. Agitar durante 10 minutos.
Tinción	Colocar el gel en la bandeja de tinción Cubrir el gel con 1.5 L de la solución de tinción. Agitar durante 30 minutos.
Lavado	Colocar el gel en el borde de la bandeja de agua, que contiene 1.5 L de agua destilada fresca, sin sumergirlo. Terminar de preparar la solución de revelado. Sumergir el gel en el agua durante 10 segundos, inmediatamente después colocarlo en la solución de revelado.
Revelado	Sumergir el gel en la bandeja de revelado que contiene 1.5 L de solución de revelado; agitar hasta que se observen las bandas.
Detención del revelado	Determinar el punto en el que la intensidad del fondo sea adecuada para detener el revelado (aprox. 3 minutos). Detener el revelado agregando en la bandeja los 1.5 L de la solución de fijación recuperada anteriormente.
Lavado	Agitar durante 2 minutos, la efervescencia cesa. Sumergir el gel en la bandeja de agua que contiene 1.5 L de agua destilada fresca. Agitar por 2 minutos.
Secado	Secar el gel en un horno a 40 °C por 2 horas.
7	Obtención de la imagen del gel
	Digitalizar la imagen del gel empleando una computadora con escáner. Guardar la imagen en formato *.TIF o *.TIFF para su posterior análisis asistido por GelWorks1D.
8	Remoción del gel
	Distribuir aproximadamente 10 ml de solución NaOH-SDS. Dejar reposar 15 minutos. Remover el gel con ayuda de una espátula. Descartar el gel como sólido.

Cuadro 17. Soluciones empleadas en electroforesis
(Lobos, 1999; IAEA, 2002; Invitrogen, Life Technologies, 2003)

Soluciones utilizadas en electroforesis	
Solución de Bind Silano	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Etanol	15 mL
Ácido acético glacial	75 µL
γ-metacriloxi-propiltrimetoxisilano	75 µL
Almacenar a 4°C.	
Tampón TBE 5X	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Tris Base (Trizma)	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA	4.65 g
Llevar a 1 litro con agua destilada.	
Almacene a temperatura ambiente.	
Acilamida:Bis-acilamida (19:1)	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Acilamida	190 g
Bisacilamida	10 g
Llevar a 500 mL con agua destilada.	
Filtrar la solución (Whatman N°1)	
Almacenar en botella ámbar a 4°C.	
Persulfato de amonio 10%	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Persulfato de amonio	1 g
Llevar a 10 mL con agua destilada.	
Almacenar a -20°C en alícuotas.	
Tampón de carga 10X, 1 mL	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Glicerol 80%	600 µL
Xilen-cianol	2.5 mg
Azul de bromofenol	2.5 mg
Agua destilada	400 µL
Almacenar a -20°C en alícuotas.	
Solución de fijación	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Ácido acético glacial	150 mL
Llevar a 1.5 L con agua destilada.	
Solución de tinción	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Nitrato de plata	3 g
Formaldehído	3 mL
Llevar a 2 L con agua destilada.	
Solución de revelado	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Carbonato de sodio	45 g
Agregar 750 mL de agua destilada.	
Formaldehído 37%	2.25 ml
Tiosulfato de sodio 10mg/mL	400 µl
Agregar 750 mL de agua destilada fría.	
Solución limpiadora NaOH-SDS	
"Uncle Bill's magic solution of love"	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Dodecilsulfato de sodio	58 g
Hidróxido de sodio	400 g
Llevar a 1 L con agua destilada.	
Almacenar a temperatura ambiente.	
Mezcla de formamida, 1 mL	
<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Formamida deionizada	950 µL
Agua destilada	30 µL
EDTA 5M	20 µL
Xilen-cianol	1 mg
Azul de bromofenol	1 mg
Almacenar a -20°C en alícuotas.	

Cuadro 18. Análisis de las imágenes de los geles
(UVP,1998; Tohme *et al.*, 1996; Caicedo *et al.*, 1999; Papa and Gepts, 2003)

Protocolo del análisis en GelWorks1D 4.01	
1	Ejecutar el programa. Crear nuevo experimento.
2	Agregar al experimento todas las imágenes (archivos tipo *.tif)
3	<p><u>Analizar las imágenes.</u></p> <p>Trazar suficientes carriles para cubrir todos los pozos, eliminar los correspondientes a los pozos en donde no se cargó muestra y, finalmente, identificarlos.</p> <p>Eliminar el fondo mediante la opción de círculo rodante de radio 50; visualizar los perfiles de banda con substracción de fondo.</p> <p>Detectar bandas</p> <p><i>Bandas de masa molecular conocida</i> Seleccionar las bandas del marcador de masa molecular manualmente, desde 30 pb hasta 330pb, incluir la banda de 1668pb</p> <p><i>Bandas totales, determinación de las combinaciones de paridores adecuadas</i> Seleccionar todas las bandas bien definidas, que no presenten ambigüedades en su visualización.</p> <p><i>Bandas cuyo tamaño esté dentro del rango de análisis</i> Seleccionar las bandas manualmente, excluyendo las que presenten ambigüedad en su visualización, las de menos de 50pb y las de más de 500pb.</p> <p>Asignar valores de pares de bases a las bandas del marcador detectadas. Obtener el modelo que describa la masa de los AFLPs en función de su migración y aplicarlo a todas las bandas detectadas.</p> <p>Comparar todos los patrones de bandas mediante la opción de carril sintético.</p>
4	Obtener la matriz de 0's y 10's resultante de la comparación.
5	Elaborar dendrograma.
<p>Análisis estadístico</p> <p>El programa genera un dendrograma del tipo Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) según "Principles of Numerical Taxonomy", R.R. Sokal and P.H.A. Sneath (section 4.3.3)</p>	

Cuadro 19. Análisis estadístico de las matrices de datos
(NTSYS, 1997; Zar, 1996; Daniai, 1996)

Protocolo del análisis en NTSYSpc 2.0

- 1 Obtener la matriz de 0's y 1's proveniente del análisis GelWorks1D.
- 2 Elaborar una matriz de 0's y 1's con el formato requerido por NTSYSpc con la información de tipo de matriz (1), número de filas y número de columnas en la primera fila.
- 3 Con base en la matriz elaborada en 2, generar una matriz de similitud entre los individuos, utilizando el coeficiente DICE.

"Dice" o "Nei y Li":
$$S_{ij} = \frac{2a}{(2a + b + c)} \text{ Ec. 2.}$$

Donde:

- S_{ij} es la similitud entre dos individuos, i y j
- a número de bandas presentes en ambos, i y j
- b número de bandas presentes en i ausentes en j
- c número de bandas presentes en j ausentes en i

Esta definición excluye del cálculo bandas ausentes en ambos individuos, dado que la ausencia en ambos no puede ser atribuida necesariamente a una misma causa y, por eso, a su similitud.

- 4 De manera asistida por MS-EXCEL elaborar una matriz de distancia genética a partir de la matriz generada en 3.

Distancia genética de Nei:
$$D_{ij} = 1 - S_{ij} \text{ Ec. 3.}$$

- 5 Con base en la matriz elaborada en 4, generar un dendrograma según el método de agrupamiento UPGMA.

Cálculo del índice de variabilidad:

$$V = \frac{s}{\bar{X}} \text{ Ec. 4.}$$

Donde: s = desviación estándar y \bar{X} = media

La generación de estadísticas descriptivas y el análisis de correlación se hizo mediante el *Analysis Toolpak* de MS-EXCEL.

Análisis unilateral de variancia, por rangos, de Kruskal-Wallis

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1) \text{ Ec. 5.}$$

Donde: k = número de grupos; n_j = número de observaciones del j -ésimo grupo; n = número de observaciones en todos los grupos combinados y R_j = suma de los rangos en el j -ésimo grupo.

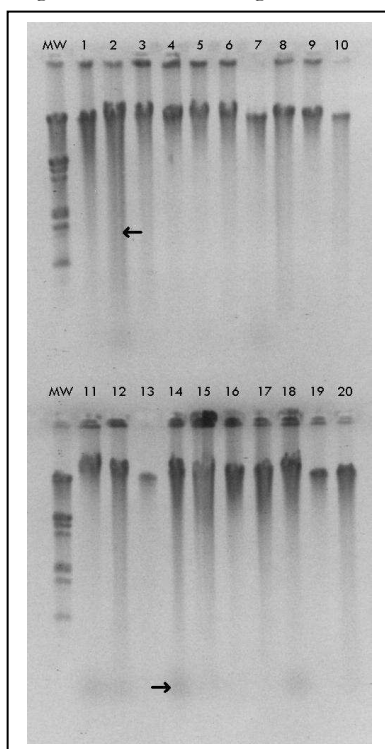
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo a la vista los objetivos de la investigación, la secuencia de la metodología permitió obtener los siguientes resultados:

A. Extracción del ADN

Se obtuvo, de cada individuo, ADN genómico íntegro (con poca cola en la migración electroforética), puro –razón A_{260}/A_{280} media = 1.85 ± 0.03 –, y en alta concentración –concentración media = 760 ± 260 ng/ μ L–. El criterio empleado para determinar si la integridad del ADN era la adecuada para su análisis fue el aspecto de su migración electroforética en gel de agarosa al 1% –véase Trabajo Experimental–; un barrido uniforme de la muestra indica su degradación, mientras que un núcleo con poca o sin cola indica una alta integridad (Lobos et al., 1999).

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de ADN extraído.
Se observan ejemplos de algunos casos de integridad, pureza y concentración.
MW Lambda dig. *Eco*R I/ *Hind* III. Negativo de la imagen original



En la Figura 16 se observa la electroforesis de 20 muestras de ADN; las integridades presentadas son aceptables en general. La muestra 2 presenta una integridad relativamente pobre –la flecha indica la cola que evidencia la presencia de fragmentos pequeños–, la muestra 4 puede considerarse como íntegra, presentando fragmentos predominantemente de un solo tamaño. Puesto que la técnica del AFLP se emplea para obtener la

huella dactilar del ADN de un organismo, es crítico someter al análisis al genoma tan completo e íntegro como sea posible. Aunque pueda analizarse ADN parcialmente degradado (Mueller and Wolfenbarger, 1999) la probabilidad de que un potencial AFLP no sea amplificado, a causa de la interrupción de su secuencia, aumenta conforme la degradación del ADN molde sea mayor. Pese a la extensa manipulación a la que el ADN es sometido en el método de extracción empleado, en el que el daño mecánico por pipeteo es constante, éste permite obtener ADN adecuado para aplicar la técnica del AFLP.

El criterio empleado para determinar si la pureza del ADN era la adecuada para su análisis fue su razón A_{260}/A_{280} –véase Trabajo Experimental– aceptándose, como razón de ADN puro, valores entre 1.7 y 1.9. Valores por debajo del intervalo indican la presencia de proteínas y valores por encima indican la presencia de ARN (Lobos et al., 1999). En la muestra 14 de la Figura 16 se indica, mediante una flecha, la presencia de ARN que aparece como una nube de fragmentos relativamente pequeños; aunque las muestras 11 y 18 también presentan contaminación, ésta es más evidente en la indicada y, en los casos en los que la presencia de esta nube de ARN fuera consistente con la respectiva razón A_{260}/A_{280} se procedió a su limpieza. Por otro lado, puesto que una contaminación con proteínas no se visualiza en gel de agarosa salvo en el caso de que la concentración sea muy alta (Ponciano, 2004) sólo se tomaron en cuenta los datos espectrofotométricos para proceder a su limpieza mediante extracción fenólica. La técnica del AFLP requiere ADN libre de otros componentes celulares, lo que es crítico puesto que estos pueden inhibir la acción de las enzimas de restricción empleadas en la primera etapa de la técnica –digestión del genoma– (Invitrogen, Life Technologies, 2003).

Cuadro 20. Concentración y pureza de las muestras de ADN analizadas. Las últimas dos columnas son los volúmenes de cada componente para realizar la solución de trabajo del ADN molde.

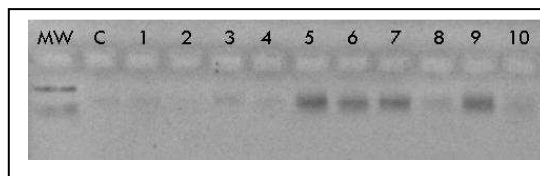
Código	Variedad	Concentración ng/ μ L	A_{260}/A_{280}	VF = 200 μ L DILUCIÓN (25ng/ μ L)	
				ADN	H ₂ O
Alt	ICTA Altense	267.0002	1.8561	18.73	181.27
MAlt1	Altense AF9-4-CMBB-CM-SI-3-CM	256.0377	1.7875	19.53	180.47
MAlt2	Altense AF9-4-CMBB-CM-SI-1-CM	373.0703	1.8541	13.40	186.60
MAlt3	Altense AF9-2-CMB-CM-SI-1-CM	288.8179	1.8042	17.31	182.69
MAlt4	Altense AF9-1-CMB-CM-SI-2-CM	567.3289	1.9466	8.81	191.19
MAlt5	Altense AF9-1-CMB-CM-SI-1-CM	1594.0404	1.9498	3.14	196.86
MAlt6	Altense AF4-1CMB-CMBB-SI-4-CM	802.1903	1.9029	6.23	193.77
MAlt7	Altense AF4-1-CMB-CMBB-SI-3-CM	756.3495	1.8813	6.61	193.39
MAlt8	Altense AF4-1-CMB-CMBA-SI-4-CM	393.1689	1.7388	12.72	187.28
MAlt9	Altense M6 AF4-1-CMB-CMBA-SI-3-CM	651.3405	1.8017	7.68	192.32
MAlt10	Altense M6 AF3-1-CMB-CMB-SI-2-CM	2434.2703	1.8887	2.05	197.95
Hun	ICTA Hunapú	1539.0515	1.7891	3.25	196.75
MHun1	Hunapú HF81-2-CMBA-CMA-SI-2-CM	359.4088	1.9199	13.91	186.09
MHun2	Hunapú HF03-2-CMB-CM-SI-2-CM	823.9412	1.8510	6.07	193.93
MHun3	Hunapú HF03-2-CMB-CM-SI-4-CM	220.6492	1.7565	22.66	177.34
MHun4	Hunapú HF56-1-CMB-CM-SI-9-CM	390.0599	1.7398	12.82	187.18
MHun5	Hunapú HF03-2-CMB-CM-SI-5-CM	216.4698	1.8039	23.10	176.90
MHun6	Hunapú HF03-2-CMB-CM-SI-6-CM	574.5220	1.8932	8.70	191.30
MHun7	Hunapú HF56-1-CMB-CM-SI-7-CM	860.3907	1.7655	5.81	194.19
MHun8	Hunapú HF56-1-CMB-CM-SI-6-CM	435.8506	1.8800	11.47	188.53
MHun9	Hunapú HF26-2-CMB-CM-SI-9-CM	1414.9403	1.8845	3.53	196.47
MHun10	Hunapú HF26-1-CMB-CM-SI-3-CM	1524.9801	1.9419	3.28	196.72
Concentración promedio y LC95%		760 \pm 260ng/ μ L			
Pureza promedio y LC95%		1.85 \pm 0.03			

La concentración del ADN extraído no es crítica para la técnica del AFLP en sí, puesto que de cada individuo se deben digerir 250ng de los aproximadamente 35000ng obtenidos por extracción, en promedio; esto puede dar lugar al ensayo de varias técnicas a partir de un mismo ADN –AFLPs, SSRs, RFLPs, etc.–. La concentración es crítica, sin embargo, cuando el ADN está contaminado y se pretende su purificación; según la evidencia obtenida durante este estudio, no se recomienda la purificación de la muestra cuando su concentración sea menor a 400 ng/ μ L, puesto que independientemente del paso del procedimiento a partir del cual haya que proceder, –véase Trabajo Experimental– al final del proceso la concentración del ADN puede estar por debajo del límite de cuantificación del espectrofotómetro. En el cuadro 20 se muestran las concentraciones y las purezas de los ADNs extraídos de cada individuo, ambas determinadas luego de obtener una integridad aceptable –se muestra también la elaboración de las diluciones sometidas posteriormente a digestión–.

B. Técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados

Se obtuvo un patrón de bandas a partir de los ADNs genómicos extraídos de cada una de las variedades originales utilizando del Kit de AFLP de Invitrogen. Como evidencia de la reproducibilidad de la técnica entre laboratorios, la metodología sugerida por el fabricante produjo los resultados esperados, no obstante, se realizaron modificaciones tales como: 1)El aumento del volumen de la mezcla de enzimas de restricción utilizado en un 2% del volumen final de reacción –este incremento llevó el volumen de enzima al 10% (Lobos *et al.*, 1999), con lo que se propició una digestión más exhaustiva–; 2)la introducción del paso de verificación de la preamplificación (IAEA, 2002) –véanse la figura 17 y Trabajo Experimental– en gel de agarosa, para determinar si era posible continuar con las amplificaciones selectivas; y, finalmente 3)la omisión del paso de marcaje radiactivo de partidores, puesto que se determinó de antemano la visualización de las bandas en el gel de poliacrilamida mediante tinción con plata. Pese a que está ampliamente documentada la alta reproducibilidad del patrón de bandas de cada individuo (Vos *et al.*, 1995; Tohme *et al.*, 1996; Caicedo *et al.*, 1999; Mueller and Wolfenbarger, 1999; Papa and Gepts, 2003), la esta se verificó en este estudio –véase el apéndice J–.

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del producto de preamplificación.
MW Lambda dig. *EcoR* I/ *Hind* III. Negativo de la imagen original.



En la Figura 17 se observan ejemplos del paso de verificación de diez muestras distintas; se obtuvo una amplificación variable pero generalmente útil para continuar; en la muestra 2 no hubo amplificación y las muestras 5, 6, 7 y 9 son más intensas que control interno C del Kit –ADN de *Arabidopsis* previamente digerido y ligado–. Exceptuando 2, en todos los casos hubo amplificación selectiva a partir de la dilución del producto

de preamplificación, dado que el partidador limitante es el E+3, la amplificación selectiva tuvo la misma intensidad para todos los casos. La principal implicación de prescindir de la visualización mediante autorradiografía en la técnica del AFLP es la visualización de los tres tipos de fragmentos generados –véase Antecedentes–, por lo que es posible tomar en cuenta más información –mayor número de bandas– en el análisis de los polimorfismos.

Se obtuvo un conjunto de cuatro combinaciones de partidores –amplificaciones selectivas– adecuadas para diferenciar a la variedad ICTA Altense de la variedad ICTA Hunapú.

Cuadro 21. Número de bandas obtenidas con cada combinación de partidores para las dos variedades analizadas. Léase (# de bandas de ICTA Altense, # de bandas de ICTA Hunapú) en la combinación correspondiente (M+3, E+3). NR=no hubo amplificación.

	M+CAA	M+CAC	M+CAG	M+CAT	M+CTA	M+CTC	M+CTG	M+CTT
E+ACC	2, 30	8, 6	30, 30	11, 2	15, 19	13, 8	5, 24	1, 18
E+ACG	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E+AGC	2, 1	17, 2	2, 6	2, 2	21, 2	23, 21	2, 8	4, 9
E+ACT	16, 20	6, 16	11, 11	2, 1	2, 1	5, 0	5, 12	1, 0
E+AGG	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E+ACA	8, 30	34, 30	26, 17	22, 21	31, 23	28, 8	8, 34	18, 12
E+AAG	11, 19	6, 1	5, 12	NR	1, 6	NR	13, 13	NR
E+AAC	23, 18	23, 18	24, 10	15, 5	17, 27	8, 14	2, 12	13, 14

Estas cuatro amplificaciones selectivas resultaron ser adecuadas para obtener una huella dactilar de ADN de *P. vulgaris* mediante la técnica del AFLP según el criterio del número de bandas generadas con cada combinación (Tohme *et al.*, 1996; Manubens *et al.*, 1999).

En resumen, cuando el número de bandas por amplificación es mayor que 20, la combinación de partidores empleada es adecuada pues, para todas las combinaciones de partidores, la probabilidad de encontrar polimorfismos aumenta cuando el número de bandas es mayor. Dado entonces que es deseable obtener la mayor información posible del genoma por reacción de amplificación selectiva, los moldes de ADN –producto de preamplificación, véanse Antecedentes y Trabajo experimental– de cada una de las dos variedades se amplificaron selectivamente con las 64 combinaciones de partidores; todos los productos de las PCRs se sometieron a electroforesis en gel de secuenciación, visualización mediante tinción con plata –véanse los geles en la sección de Apéndices– y a análisis de la imagen asistida por el programa GelWorks1D –véase Trabajo Experimental– con el objeto de generar el Cuadro 21.

Cuadro 22. Combinaciones de partidores adecuadas para estudiar *P. vulgaris*. Manubens y colaboradores (1999) clasifican a las 64 combinaciones de partidores selectivos que permite realizar el Kit de AFLP de Invitrogen en categorías.

	M+CAA	M+CAC	M+CAG	M+CAT	M+CTA	M+CTC	M+CTG	M+CTT
E+ACC	-	☞	☞☞	☞	☞	☞	☞	-
E+ACG	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E+AGC	-	-	-	-	-	☞☞	-	-
E+ACT	☞	☞	☞	-	-	NR	☞	NR
E+AGG	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
E+ACA	☞	☞☞	☞	☞☞	☞☞	☞	☞	☞
E+AAG	☞	-	☞	NR	-	NR	☞	NR
E+AAC	☞	☞	☞	☞	☞	☞	-	NR

Clave

NR	No hubo reacción en alguna de las dos variedades
-	4 o menos bandas polimórficas en las dos variedades
☞	5 o más bandas polimórficas en las dos variedades
☞☞	Combinación de partidores adecuada para la detección de los patrones polimórficos del AFLP (20 o más bandas)

Las cuatro combinaciones coinciden con otro estudio de *P. vulgaris* en el partidador E+3 (Papa and Gepts, 2003), lo que sugiere que es común encontrar la secuencia de los sitios de restricción más los respectivos tres nucleótidos en la especie *P. vulgaris*. Con base en el Cuadro 21, se elaboró el Cuadro 22, según los criterios de clasificación ya descritos. Debe notarse que en el Cuadro 22 se resaltan 4 de las 5 amplificaciones selectivas clasificadas como adecuadas, el criterio para emplear sólo 4 fue el número de combinaciones empleadas para otros estudios de biodiversidad de *P. vulgaris*; estos estudios se realizaron con 2 combinaciones (Tohme *et al.*, 1996) y con 4 combinaciones (Papa and Gepts, 2003), por otro lado, se prefirió no utilizar un mismo partidador en tres reacciones de PCR, ante la probabilidad de agotar en su totalidad el partidador E+ACA del Kit debido al número de plantas de la muestra. En el Cuadro 23 se muestran las combinaciones de partidores utilizadas en este estudio.

Cuadro 23. Combinaciones de partidores utilizadas.

	M+3	E+3
AS1	M+CAG	E+ACC
AS2	M+CTC	E+AGC
AS3	M+CAC	E+ACA
AS4	M+CAT	E+ACA

Se obtuvo un patrón de AFLP's distinto para cada variedad –ICTA Altense e ICTA Hunapú– con las 4 combinaciones de partidores seleccionadas. De este modo se caracterizó a cada variedad original dado que fue posible encontrar un total de 9 AFLPs capaces de diferenciar entre los dos genomas, un número relativamente pequeño de bandas comparado con el grande número total de bandas generadas –93 bandas monomórficas, dentro del el rango de análisis–; esto sugería un parecido entre las dos variedades confirmado en el posterior análisis de un estudio paralelo (Sagastume *et al.*, 2003).

El estudio de Sagastume y colaboradores empleó las cuatro combinaciones de partidores que se determinaron adecuadas en este estudio. El gel de comparación se presenta en la Figura 18, donde se enumeran las bandas polimórficas –de 1 a 9,–; en esta figura se puede observar que cada amplificación selectiva es capaz de distinguir entre las dos variedades de manera individual.

C. Obtención y análisis de datos

Se obtuvo un patrón de AFLPs para cada una de las 10 variedades mutantes ICTA Altense y para cada una de las 10 variedades mutantes de ICTA Hunapú, en forma de matrices de 1's y 0's. Los AFLPs fueron representados por un “1” en la matriz, según los criterios de selección que excluyen a cualesquiera fragmentos fuera del rango de 50bp a 500bp y a cualesquiera que presenten ambigüedades en su visualización (Tohme *et al.*, 1996) para analizarlas mediante los programas de computación GelWorks1D y NTSYSpc. La visualización mediante tinción con plata implicó la pérdida de AFLPs en el fondo generado por el proceso de tinción, esto sugiere que no es apropiado cargar muestras amplificadas con la misma combinación de partidores selectivos en geles distintos, a manera de que todos los individuos sean evaluados bajo las mismas condiciones de corrida y de tinción; no obstante, es importante resaltar que éste método de visualización evita los inconvenientes del marcaje radiactivo. De este modo se logró caracterizar a los miembros de la muestra según su perfil de presencia –1– o ausencia –0– de bandas y se obtuvieron conjuntos de bandas de cada grupo –véanse las figuras 21 y 22–.

Al comparar los patrones de bandas de los mutantes con el patrón de bandas de sus respectivas variedades originales se visualizó el efecto que puede ser atribuido directamente a la radiación γ , esto es, la “desaparición” de AFLPs y la “generación” de nuevos AFLPs. En la figura 19 se muestra una sección de un gel que presenta ejemplos de los tres tipos de eventos observados, siendo éstos: La ausencia de AFLPs en mutantes –indicado por “1” y por “4”–, bandas monomórficas –indicado por 2– y la generación de “nuevos” AFLPs en las mutantes –indicado por “3” –. La matriz correspondiente a la sección de gel de la Figura 19, para los polimorfismos indicados por flechas, se presenta en la Figura 20.

Figura 18. Comparación directa de las 4 ampliificaciones selectivas aplicadas a ICTA Altense y a ICTA Hunapú. MW 30-330bp.

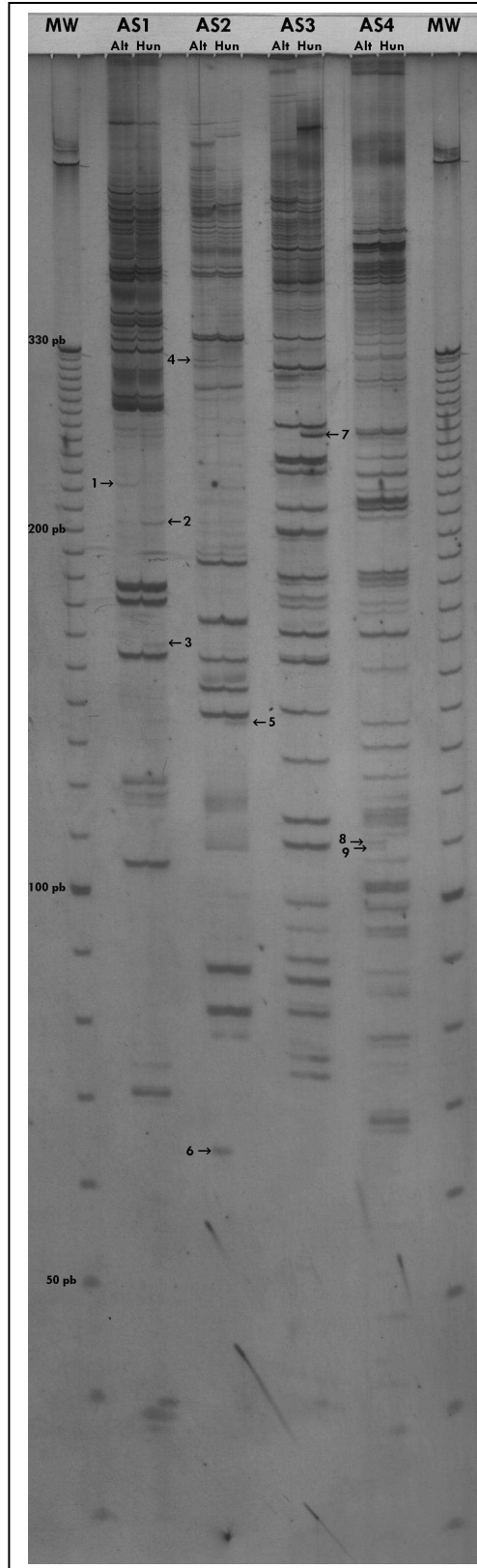


Figura 19. Fragmento del gel correspondiente a la amplificación selectiva 2 para ICTA Altense y sus mutantes.

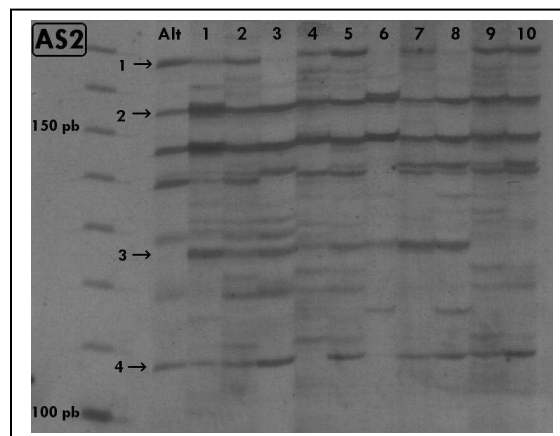


Figura 20. Ejemplo de matriz de ausencia/presencia, correspondiente a la amplificación selectiva 2 para ICTA Altense y sus mutantes.

<u>AS2</u>	Alt	MAlt1	MAlt2	MAlt3	MAlt4	MAlt5	MAlt6	MAlt7	MAlt8	MAlt9	MAlt10
1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
4	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1

Figura 21. Diferencias en los patrones de AFLPs entre ICTA Altense y sus mutantes. El número entre paréntesis indica el orden de carga en el gel; imagen generada por GelWorks1D.

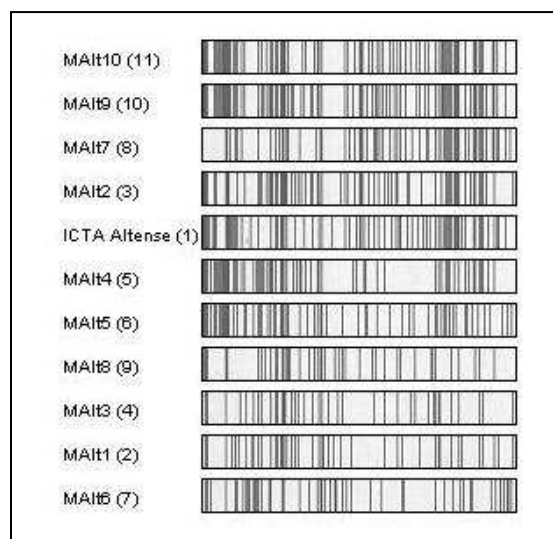
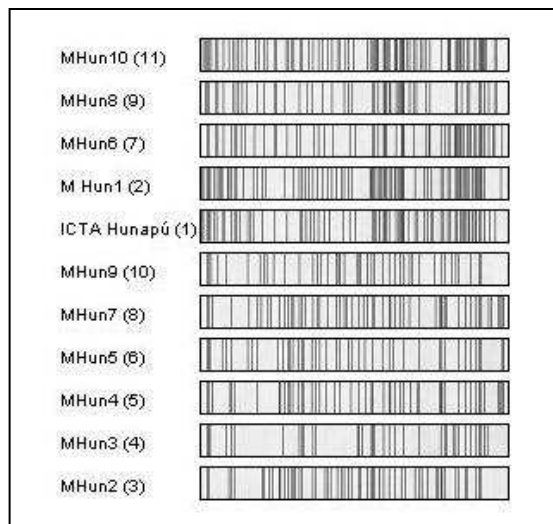


Figura 22. Diferencias en los patrones de AFLPs entre ICTA Hunapú y sus mutantes. El número entre paréntesis indica el orden de carga en el gel; imagen generada por GelWorks1D.



GelWorks1D permite visualizar fácilmente estas diferencias de los miembros de cada grupo de mutantes generando un dendrograma al lado del cual coloca los patrones de bandas de los individuos; en las Figuras 21 y 22 se muestran únicamente los patrones de bandas que asemejan códigos de barras para cada individuo. Las Figuras 23 y 24 son las matrices generadas por GelWorks1D para los grupos Altense Hunapú, respectivamente; las franjas verticales al costado izquierdo indican la combinación de partidores que generaron esas bandas. Luego de exportadas a MS-EXCEL e importadas a NTSYSpc, fue posible continuar con el análisis. A simple vista, en las figuras 21, 22, 23 y 24 no hay dos individuos que presenten el mismo patrón de bandas, por lo que a estas alturas puede decirse que estas cuatro amplificaciones selectivas distinguen a cada individuo del resto de individuos de su grupo.

De la comparación de los AFLPs de cada individuo mediante el coeficiente de Dice y posterior determinación de la distancia genética entre todos los individuos se obtuvo, agrupando según el método UPGMA, un dendrograma para cada subgrupo de la muestra.

Es evidente el efecto de la radiación en los mutantes, que se manifiesta en sus perfiles de AFLPs; pero si se desea observar la variabilidad inducida en cada grupo de mutantes es conveniente elaborar dendrogramas. La información de estos dendrogramas permite apreciar la magnitud del cambio, en términos de distancia genética, que provocó la irradiación de las variedades originales. La matriz de similitud de los individuos de cada grupo –coeficiente de Dice, véase Trabajo Experimental Cuadro 19, Ec. 2.– se muestra en el Cuadro 24 para Altense y en el Cuadro 25 para Hunapú; la matriz de distancia genética –véase Cuadro 19, Ec.3.– se muestra en el Cuadro 26 para Altense y en el Cuadro 27 para Hunapú.

Figura 23. Patrones de bandas obtenidos de ICTA Altense y sus mutantes con las cuatro amplificaciones selectivas.

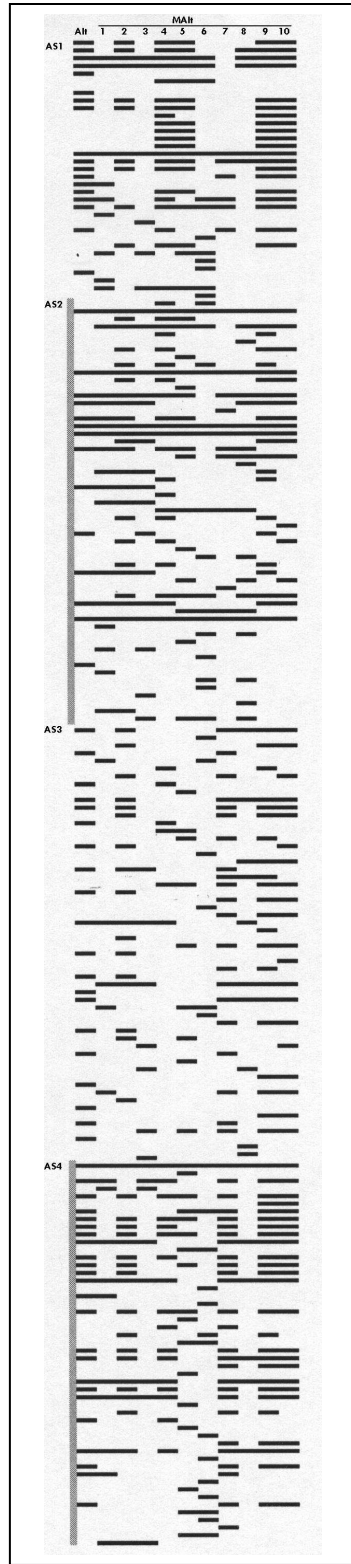
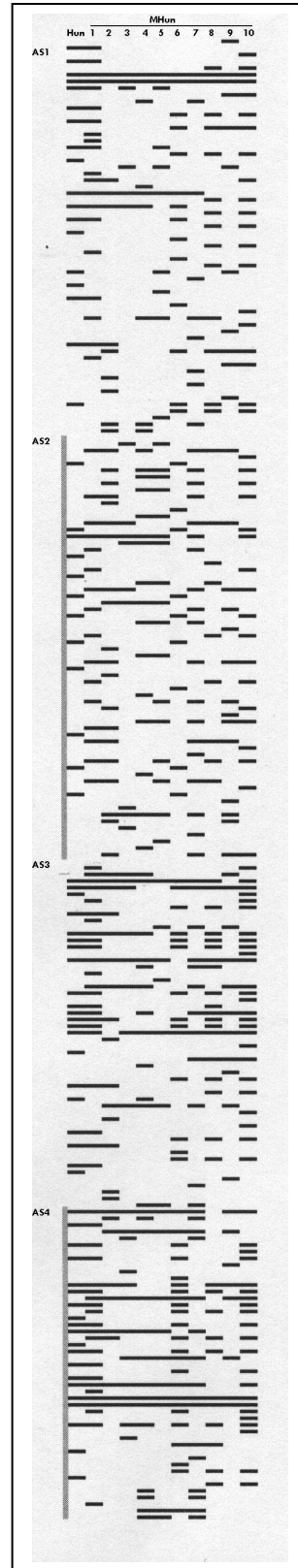


Figura 24. Patrones de bandas obtenidas de ICTA Hunapú y sus mutantes con las cuatro amplificaciones selectivas.



Cuadro 24. Matriz de similitud del grupo de ICTA Altense y sus mutantes.

	Alt	MAlt1	MAlt2	MAlt3	MAlt4	MAlt5	MAlt6	MAlt7	MAlt8	MAlt9	MAlt10
Alt	1.0000										
MAlt1	0.4500	1.0000									
MAlt2	0.6577	0.4786	1.0000								
MAlt3	0.3826	0.6988	0.4643	1.0000							
MAlt4	0.5734	0.3964	0.6286	0.3396	1.0000						
MAlt5	0.3714	0.2963	0.4234	0.2913	0.5649	1.0000					
MAlt6	0.1935	0.3261	0.2314	0.2989	0.3130	0.4107	1.0000				
MAlt7	0.6056	0.3455	0.5036	0.3048	0.4511	0.3692	0.2105	1.0000			
MAlt8	0.3898	0.4419	0.4348	0.4691	0.3853	0.3774	0.3778	0.4259	1.0000		
MAlt9	0.5988	0.3704	0.6707	0.3692	0.6709	0.4774	0.2302	0.6752	0.4060	1.0000	
MAlt10	0.6164	0.3622	0.6538	0.3607	0.6400	0.5034	0.2137	0.6711	0.4320	0.8736	1.0000

Cuadro 25. Matriz de similitud del grupo de ICTA Hunapú y sus mutantes.

	Hun	MHun1	MHun2	MHun3	MHun4	MHun5	MHun6	MHun7	MHun8	MHun9	MHun10
Hun	1.0000										
MHun1	0.6184	1.0000									
MHun2	0.3150	0.4964	1.0000								
MHun3	0.3364	0.3932	0.5217	1.0000							
MHun4	0.2810	0.3206	0.4717	0.5581	1.0000						
MHun5	0.2632	0.3065	0.3838	0.5570	0.6452	1.0000					
MHun6	0.5152	0.4225	0.2906	0.3505	0.2883	0.2500	1.0000				
MHun7	0.2205	0.3942	0.5179	0.4783	0.6038	0.5253	0.2564	1.0000			
MHun8	0.3360	0.4444	0.3091	0.2667	0.2692	0.2268	0.5391	0.3091	1.0000		
MHun9	0.1913	0.3200	0.4400	0.4750	0.3617	0.3908	0.2476	0.5200	0.3061	1.0000	
MHun10	0.3822	0.4910	0.3662	0.2787	0.2500	0.2171	0.5578	0.3099	0.6286	0.3231	1.0000

Cuadro 26. Matriz de distancia genética entre ICTA Altense y sus mutantes.

	Hun	MHun1	MHun2	MHun3	MHun4	MHun5	MHun6	MHun7	MHun8	MHun9	MHun10
Hun	0.0000										
MHun1	0.3816	0.0000									
MHun2	0.6850	0.5036	0.0000								
MHun3	0.6636	0.6068	0.4783	0.0000							
MHun4	0.7190	0.6794	0.5283	0.4419	0.0000						
MHun5	0.7368	0.6935	0.6162	0.4430	0.3548	0.0000					
MHun6	0.4848	0.5775	0.7094	0.6495	0.7117	0.7500	0.0000				
MHun7	0.7795	0.6058	0.4821	0.5217	0.3962	0.4747	0.7436	0.0000			
MHun8	0.6640	0.5556	0.6909	0.7333	0.7308	0.7732	0.4609	0.6909	0.0000		
MHun9	0.8087	0.6800	0.5600	0.5250	0.6383	0.6092	0.7524	0.4800	0.6939	0.0000	
MHun10	0.6178	0.5090	0.6338	0.7213	0.7500	0.7829	0.4422	0.6901	0.3714	0.6769	0.0000

Cuadro 27. Matriz de distancia genética entre ICTA Hunapú y sus mutantes.

	Alt	MAlt1	MAlt2	MAlt3	MAlt4	MAlt5	MAlt6	MAlt7	MAlt8	MAlt9	MAlt10
Alt	0.0000										
MAlt1	0.5500	0.0000									
MAlt2	0.3423	0.5214	0.0000								
MAlt3	0.6174	0.3012	0.5357	0.0000							
MAlt4	0.4266	0.6036	0.3714	0.6604	0.0000						
MAlt5	0.6286	0.7037	0.5766	0.7087	0.4351	0.0000					
MAlt6	0.8065	0.6739	0.7686	0.7011	0.6870	0.5893	0.0000				
MAlt7	0.3944	0.6545	0.4964	0.6952	0.5489	0.6308	0.7895	0.0000			
MAlt8	0.6102	0.5581	0.5652	0.5309	0.6147	0.6226	0.6222	0.5741	0.0000		
MAlt9	0.4012	0.6296	0.3293	0.6308	0.3291	0.5226	0.7698	0.3248	0.5940	0.0000	
MAlt10	0.3836	0.6378	0.3462	0.6393	0.3600	0.4966	0.7863	0.3289	0.5680	0.1264	0.0000

Con los datos de distancia genética se obtuvieron dos dendrogramas, uno para cada grupo de mutantes, que se muestran en la Figura 25 para Altense y en la Figura 26 para Hunapú. En general, la variabilidad es mayor entre los individuos del grupo de ICTA Altense que entre los individuos del grupo de ICTA Hunapú dado que el rango de distancia de Nei –distancia entre la pareja más parecida y la pareja menos parecida– es mayor; esto es consistente con la Figura 21 en cuanto a que en esta figura se observa más heterogeneidad en la disposición de las bandas entre individuos que en la Figura 22. Esta observación es particularmente interesante por ser evidencia de que, pese a que todas las variedades mutantes son precoces con respecto a sus variedades originales, el efecto de la radiación y parece ser mayor en el conjunto de variedades mutantes de ICTA Altense que en el grupo de mutantes de ICTA Hunapú, en cuanto a cambio de composición del genoma.

Figura 25. Dendrograma del grupo de ICTA Altense y sus mutantes.

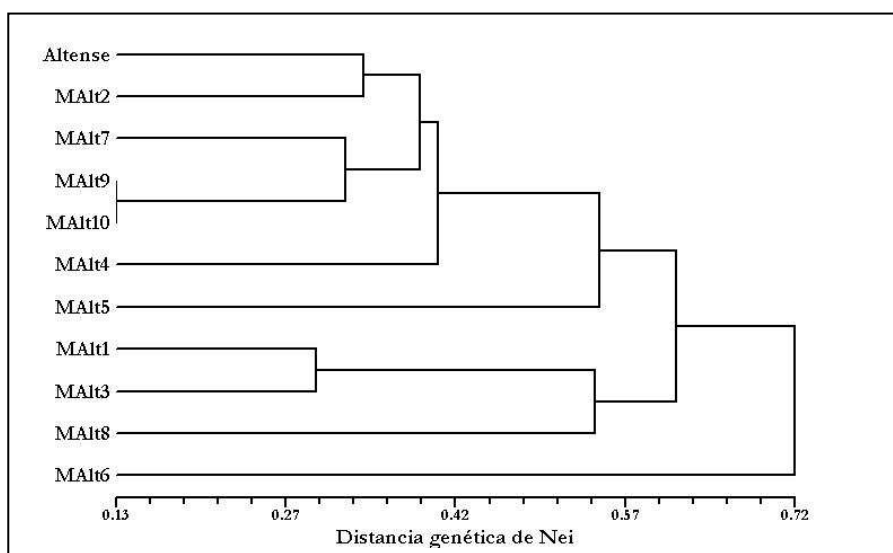
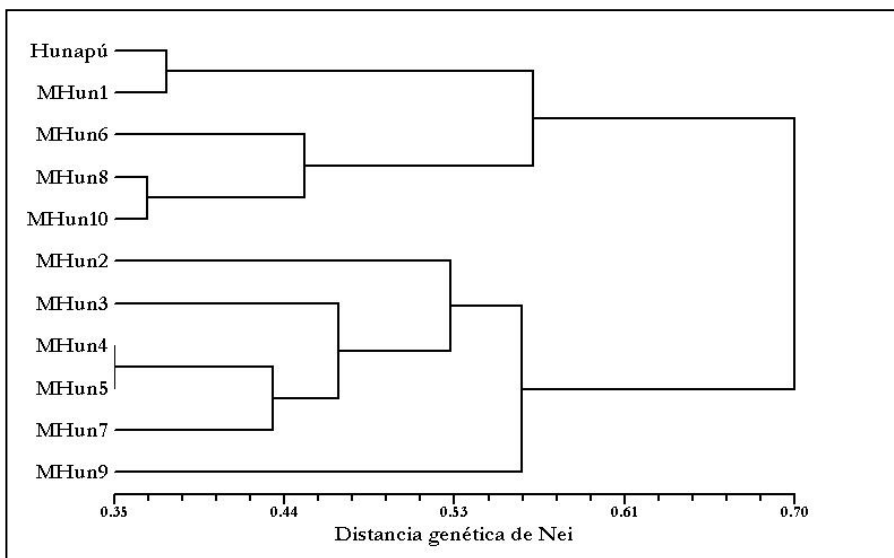


Figura 26. Dendrograma del grupo de ICTA Hunapú y sus mutantes.



Las figuras 25 y 26 aclaran que, tomando en cuenta la información de todas las amplificaciones selectivas, es posible diferenciar a cada individuo del resto de individuos de su grupo. Cuando dos individuos que presenten el mismo patrón de bandas se someten al coeficiente de Dice, el resultado es 1 porque la similitud es la máxima; consecuentemente su distancia genética –de Nei– es 0. La pareja de individuos más parecida se encuentra en la figura 25, donde los mutantes MAlt9 y MAlt10 presentan la menor distancia –0.13–, que es aún menor que la distancia genética entre ICTA Altense e ICTA Hunapú –véase el apéndice F –, no obstante, la técnica permite diferenciarlas.

Al comparar los patrones de bandas de los mutantes y de las variedades originales correspondientes pueden notarse y tratar de explicarse los efectos de la radiación γ en el genoma. La ausencia de una banda puede atribuirse a un cambio en la secuencia de los sitios de restricción o a un cambio en la secuencia complementaria a la de los nucleótidos selectivos de los partidores. La ausencia de un conjunto de bandas puede deberse a innumerables mutaciones puntuales o incluso a mutilaciones de los brazos de los cromosomas (IAEA, 1969). Si bien es cierto que algunos AFLPs –el 91%– que comparten la misma posición en el gel de secuenciación tienen secuencias conservadas (Santos and Simon, 2002), esto puede ser igualmente válido para mutantes inducidos por radiación ionizante, puesto que éstos sufren mutaciones puntuales que afectan únicamente en composición mas no en longitud a los AFLPs.

Se obtuvieron los índices de variabilidad de los grupos de mutantes de ICTA Altense –28.96– y de ICTA Hunapú –20.13–. Se habla de una distribución de distancias genéticas de dos grupos –mutantes y variedades mejoradas del ICTA (Sagastume *et al.*, 2003)– con respecto a los dos sujetos de referencia –Altense y Hunapú–. Ambos índices se determinaron, Según Zar (1996), a partir de las distancias genéticas de cada individuo del grupo de mutantes con respecto a la variedad original, utilizando al grupo de variedades como referencia. El coeficiente de variabilidad o índice de variación es el cociente de la desviación estándar y la media aritmética, lo que proporciona un valor adimensional, divorciado de las magnitudes (Zar, 1996), de la distancia genética. En el caso del grupo de ICTA Altense –véase cuadro 28–, el hecho de que el valor obtenido sea prácticamente igual al obtenido del grupo de variedades sugiere la existencia de la misma variabilidad.

Cuadro 28. Variabilidad de los grupos de mutantes de ICTA Altense y de variedades.

	Alt		Alt
Alt	0.0000	Alt	0.0000
MAlt1	0.5500	DORICTA	0.6460
MAlt2	0.3423	QUI-CHE	0.6952
MAlt3	0.6174	IAN5091	0.5840
MAlt4	0.4266	SANMART	0.4622
MAlt5	0.6286	PARRAMOS	0.3920
MAlt6	0.8065	COMPCHIM	0.4958
MAlt7	0.3944	TEXEL	0.6505
MAlt8	0.6102	LIGERO	0.5118
MAlt9	0.4012	HUNAPÚ	0.1933
MAlt10	0.3836	OSTUA	0.6731
		STAGERT	0.7383
V	28.9586	V	29.1566

El grupo de ICTA Hunapú presenta menor variabilidad que el grupo de variedades –véase cuadro 29–, lo que puede explicarse con la aleatoriedad del efecto de la radiación ionizante.

Cuadro 29. Variabilidad de los grupos de mutantes de ICTA Hunapú y de variedades

Hun	Hun	Hun	Hun
Hun	0.0000	Hun	0.0000
MHun1	0.3816	DORICTA	0.6667
MHun2	0.6850	QUI-CHE	0.7358
MHun3	0.6636	IAN5091	0.6032
MHun4	0.7190	SANMART	0.5500
MHun5	0.7368	PARRAMOS	0.4603
MHun6	0.4848	COMPCHIM	0.5667
MHun7	0.7795	TEXEL	0.6731
MHun8	0.6640	LIGERO	0.5000
MHun9	0.8087	ALTENSE	0.1933
MHun10	0.6178	OSTUA	0.6381
		STAGERT	0.7222
	v 20.1322		v 26.7552

Lo anterior sugiere que la radiación γ puede generar indistintamente individuos más o menos parecidos a su variedad original. El grupo de mutantes de ICTA Altense presenta distancias genéticas hacia ICTA Altense tan diversas como las distancias genéticas hacia ICTA Altense por parte del grupo de variedades mejoradas del ICTA; esto es evidencia la gran capacidad generadora de variabilidad de la radiación. Lo anterior, sin embargo, resulta ser lo opuesto para el grupo de mutantes de ICTA Hunapú dado que los patrones de bandas son más bien conservados en este grupo, es decir que las plantas mutantes de ICTA Hunapú tienden a ser más parecidas a ICTA Hunapú.

Se obtuvo el índice de correlación entre cada pareja de partidores selectivos posible y la suma de las combinaciones, para cada grupo de mutantes. La combinación de partidores a aplicar en un estudio genético de poblaciones es AS2/AS4. Utilizar un número pequeño de combinaciones se traduce en ahorro de tiempo y recursos, ambos aspectos se vuelven críticos cuando se pretende hacer un estudio de genética de poblaciones de gran escala. No obstante, es deseable determinar el menor número de combinaciones de partidores selectivos que contengan la mayor información posible. Tohme y colaboradores (1996) elaboraron un análisis de correlación para determinar cuál de dos combinaciones de partidores usar en su estudio de diversidad –165 individuos–, se concluyó que debe usar ambas; este estudio evaluó 16 combinaciones de partidores. Caicedo y colaboradores (1999) utilizan 2 combinaciones de partidores distintas a las de Tohme para su estudio de diversidad entre 122 individuos. Papa y Gepts (2003) utilizan 4 y 2 combinaciones para su estudio de genética de poblaciones con 100 individuos.

Mediante la correlación simple de los valores de distancia genética entre cada par de individuos, utilizando todas las parejas posibles de amplificaciones selectivas, así como las amplificaciones selectivas individuales –cuadros 30 y 31 para ICTA Altense e ICTA Hunapú, respectivamente– y los valores de distancia genética obtenidos para cada individuo como resultado de la sumatoria de las amplificaciones selectivas –1 a 4– es

posible determinar qué combinación o par de combinaciones generan información que sea más semejante a la de la sumatoria.

Cuadro 30. Distancias genéticas de los mutantes de ICTA Altense con cada par de amplificaciones selectivas.

COMB	1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	1234
MAlt1	0.6296	0.2727	0.9200	0.4857	0.4333	0.7692	0.5484	0.5517	0.3824	0.6667	0.5500
MAlt2	0.3103	0.3846	0.4595	0.2273	0.3529	0.3939	0.2603	0.4211	0.3012	0.3333	0.3423
MAlt3	0.7500	0.3125	0.8519	0.6250	0.5000	0.8039	0.6786	0.5593	0.4688	0.7288	0.6174
MAlt4	0.3333	0.5135	0.7692	0.2195	0.4211	0.5077	0.2750	0.6190	0.3590	0.4328	0.4266
MAlt5	0.4054	0.5294	1.0000	0.6585	0.4648	0.6615	0.5385	0.7419	0.6000	0.7971	0.6286
MAlt6	0.6667	0.6774	1.0000	0.8947	0.6721	0.8214	0.7941	0.8246	0.7971	0.9375	0.8065
MAlt7	0.5000	0.4615	0.6000	0.1373	0.4800	0.5625	0.2533	0.5455	0.2468	0.3407	0.3944
MAlt8	0.5652	0.5429	0.7333	0.6000	0.5517	0.6604	0.5849	0.6471	0.6316	0.7727	0.6102
MAlt9	0.2632	0.4054	0.8049	0.1600	0.3333	0.5443	0.2045	0.6154	0.2644	0.4505	0.4012
MAlt10	0.2632	0.4375	0.7561	0.1250	0.3429	0.5190	0.1860	0.6164	0.2500	0.4157	0.3836

Cuadro 31. Distancias genéticas de los mutantes de ICTA Hunapú con cada par de amplificaciones selectivas.

COMB	1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	1234
MHun1	0.3158	0.9286	0.2273	0.2381	0.4717	0.2778	0.2750	0.5000	0.5143	0.4211	0.3816
MHun2	0.6552	0.9375	0.5556	0.6000	0.7333	0.5849	0.6271	0.7353	0.7813	0.7143	0.6850
MHun3	0.5833	0.9048	0.6552	0.5758	0.6757	0.5652	0.5789	0.7600	0.7037	0.6883	0.6636
MHun4	0.7037	0.9286	0.6364	0.6471	0.7727	0.6400	0.6721	0.7705	0.7778	0.6712	0.7190
MHun5	0.5714	0.9310	0.7857	0.6667	0.6889	0.6250	0.6207	0.8596	0.8000	0.7838	0.7368
MHun6	0.6250	0.3333	0.4857	0.4545	0.5455	0.4737	0.5263	0.4286	0.4154	0.4615	0.4848
MHun7	0.7857	0.9355	0.6970	0.7222	0.8222	0.6923	0.7500	0.8125	0.8261	0.7727	0.7795
MHun8	0.8182	1.0000	0.4000	0.6129	0.8636	0.5238	0.7188	0.6364	0.8125	0.3898	0.6640
MHun9	0.7931	1.0000	0.7500	0.7143	0.8537	0.7308	0.7544	0.8621	0.8545	0.7975	0.8087
MHun10	0.8421	0.8000	0.4894	0.4286	0.7778	0.5890	0.6250	0.6104	0.5833	0.4217	0.6178

La correlación simple mencionada se muestra en los cuadros 32 y 33 para los grupos de mutantes de ICTA Altense y de ICTA Hunapú, respectivamente. La interpretación conjunta de la información en ambos cuadros permite determinar que la información generada por la AS4 es prácticamente equivalente a la generada por todas las amplificaciones selectivas –1 a 4–; las parejas de AS más correlacionadas con la suma de AS son AS1/AS4 y AS2/AS4. El índice de correlación entre AS1/AS4 y AS2/AS4 sugiere que la información generada por las dos es similar –0.8869–. El criterio para establecer que la mejor combinación de amplificaciones selectivas –AS– es AS2/AS4 es la correlación entre AS2 y AS4; esta es cercana a 0.5 en ambos grupos de mutantes, lo que sugiere que la información generada por ambas es más bien complementaria.

Cuadro 32. Índices de correlación, mutantes de ICTA Altense. La matriz simétrica compara la información obtenida con cada combinación o par de combinaciones de amplificaciones selectivas –AS–.

	1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	1234
1	1.0000	-0.0100	0.4200	0.7500	0.7800	0.8800	0.8700	0.2200	0.5900	0.7000	0.7500
2	-0.0230	1.0000	0.2500	0.4000	0.6100	0.0800	0.2700	0.7700	0.6400	0.4000	0.4700
3	0.4192	0.2503	1.0000	0.6900	0.4600	0.7800	0.6500	0.7900	0.6200	0.8000	0.7700
4	0.7460	0.3960	0.6909	1.0000	0.8300	0.8300	0.9800	0.6400	0.8700	0.7900	0.9800
12	0.7761	0.6102	0.4615	0.8338	1.0000	0.7400	0.8500	0.6400	0.8700	0.7900	0.8800
13	0.8847	0.0824	0.7800	0.8341	0.7377	1.0000	0.9000	0.5400	0.6900	0.8700	0.8800
14	0.8690	0.2660	0.6496	0.9757	0.8494	0.9008	1.0000	0.5400	0.8900	0.9400	0.9600
23	0.2152	0.7725	0.7934	0.6439	0.6358	0.5369	0.5352	1.0000	0.7600	0.7300	0.7500
24	0.5914	0.6419	0.6221	0.9503	0.8679	0.6892	0.8869	0.7561	1.0000	0.9300	0.9500
34	0.6976	0.3962	0.7954	0.9725	0.7892	0.8658	0.9428	0.7315	0.9333	1.0000	0.9800
1234	0.7505	0.4675	0.7672	0.9776	0.8779	0.8820	0.9593	0.7506	0.9453	0.9795	1.0000

Cuadro 33. Índices de correlación, mutantes de ICTA Hunapú. La matriz simétrica compara la información obtenida con cada combinación o par de combinaciones de amplificaciones selectivas –AS–.

	1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	1234
1	1.0000	0.0900	0.3900	0.6100	0.8900	0.7400	0.8900	0.3400	0.4700	0.1100	0.6700
2	0.0933	1.0000	0.2000	0.3700	0.5200	0.2900	0.2900	0.6800	0.7900	0.3800	0.5100
3	0.3939	0.1953	1.0000	0.8500	0.5000	0.8900	0.6900	0.8500	0.6300	0.8900	0.8600
4	0.6136	0.3720	0.8494	1.0000	0.7800	0.9000	0.9000	0.8400	0.8600	0.7600	0.9500
12	0.8884	0.5181	0.5023	0.7776	1.0000	0.8100	0.9400	0.6500	0.8000	0.3500	0.8500
13	0.7445	0.2860	0.8859	0.9027	0.8112	1.0000	0.9100	0.8200	0.7300	0.7300	0.9600
14	0.8933	0.2853	0.6887	0.9022	0.9352	0.9140	1.0000	0.6700	0.7600	0.4900	0.9100
23	0.3389	0.6782	0.8512	0.8407	0.6488	0.8167	0.6679	1.0000	0.9000	0.8800	0.9200
24	0.4662	0.7867	0.6336	0.8590	0.8037	0.7340	0.7553	0.9000	1.0000	0.6800	0.9000
34	0.1130	0.3774	0.8871	0.7617	0.3466	0.7324	0.4893	0.8790	0.6802	1.0000	0.7700
1234	0.6689	0.5080	0.8584	0.9547	0.8545	0.9568	0.9094	0.9153	0.8956	0.7680	1.0000

Dado que las distribuciones de distancias genéticas obtenidas individualmente con AS4, AS2/AS4 y con AS1/AS2/AS3/AS4 no son normales, la prueba de Kruskal-Wallis fue la apropiada para establecer que la información proporcionada por las tres estimaciones es la misma $-H_0 =$ el grado de diversidad determinado por las tres combinaciones de amplificaciones selectivas es el mismo–.

Finalmente, al observar los dendrogramas obtenidos con la información generada con la combinación AS2/AS4 –figuras 27 y 28 para ICTA Altense e ICTA Hunapú, respectivamente– puede notarse, para los dos grupos, una estructura similar en cuanto a agrupamiento de los individuos, pero sin llegar a ser necesariamente idéntica en lo que respecta a rangos de distancia genética. La AS4 por sí sola no generó dendrogramas que fueran tan notablemente parecidos a los generados con la combinación AS2/AS4.

Figura 27. Dendrograma generado para el grupo de ICTA Altense y sus mutantes con la combinación AS2/AS4.

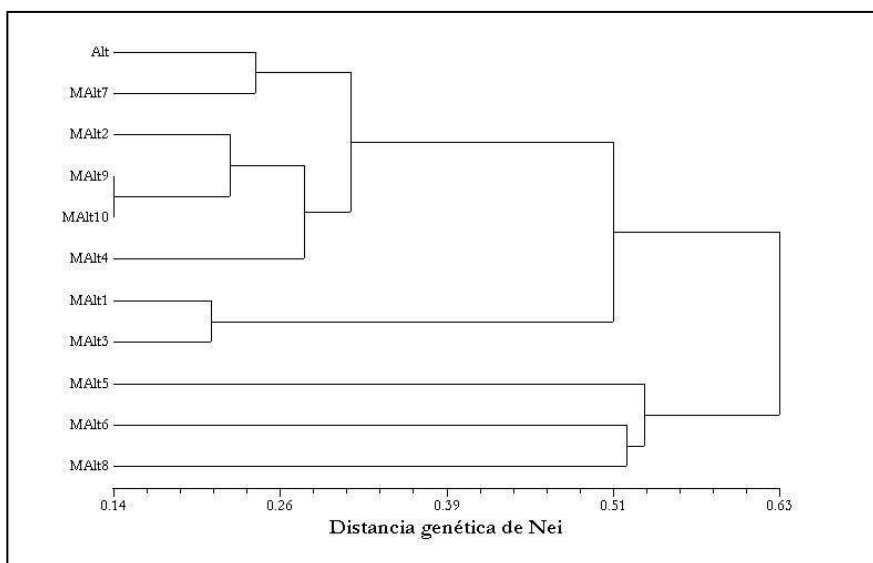
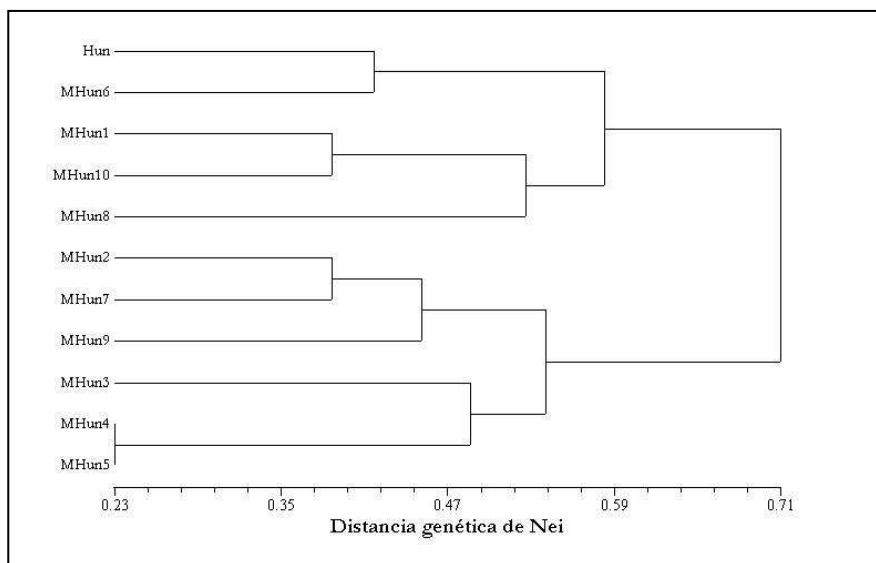


Figura 28. Dendrograma generado para el grupo de ICTA Hunapú y sus mutantes con la combinación AS2/AS4.



VI. CONCLUSIONES

Con el protocolo de extracción utilizado en este estudio se obtuvo ADN de *P. vulgaris* de altas integridad y pureza, adecuado para su análisis mediante la técnica del AFLP. Esto sustenta que los resultados obtenidos en este trabajo son confiables.

Según los criterios empleados, las combinaciones de partidores del Kit de AFLP de Invitrogen adecuadas para el análisis de la muestra fueron: M+CAG/E+ACC, M+CTC/E+AGC, M+CAC/E+ACA, M+CAT/E+ACA y M+CTA/E+ACA; las primeras 4 combinaciones son capaces de diferenciar ICTA Altense de ICTA Hunapú individualmente. La pareja de amplificaciones selectivas que genera mayor información es: M+CTC/E+AGC-M+CAT/E+ACA; los dendrogramas generados con esta combinación de amplificaciones selectivas son muy similares a los generados con la combinación de todas las amplificaciones selectivas, por lo que este par de combinaciones puede aplicarse en un estudio de genética de poblaciones.

Las cuatro combinaciones de partidores seleccionadas diferenciaron, conjuntamente, las variedades mutantes de sus respectivas variedades originales así como los individuos de cada grupo; estas combinaciones pueden usarse en estudios de caracterización de variedades de *P. vulgaris*.

Se establecieron las relaciones filogenéticas entre los individuos de los subgrupos de la muestra mediante dos dendrogramas, obteniéndose rangos de variabilidad altos que sugieren que la inducción de mutaciones por radiación γ produjo un efecto grande sobre la composición de los genomas de las variedades originales.

Se verificó la aleatoriedad del efecto de la radiación γ en la composición del genoma, puesto que los patrones de bandas del grupo de mutantes de ICTA Altense presenta más heterogeneidad en su distribución que los patrones de bandas de los mutantes de ICTA Hunapú, no obstante, en ambos grupos se indujo satisfactoriamente la característica de ciclo vegetativo precoz. El fitomejoramiento por inducción de mutaciones produce un cambio aleatorio en la composición genética de las plantas tal que la progenie de los materiales inicialmente irradiados puede presentar mayor o menor parecido a su progenitor. Mediante la inducción de mutaciones se puede generar variabilidad relativa en mayor o menor grado de manera aleatoria.

Se comprobó que la hipótesis planteada es verdadera, puesto que cada variedad mutante presenta un patrón de bandas distinto al de su variedad original. De igual forma, cada variedad mutante presenta un patrón de bandas único que la distingue del resto de variedades de su grupo.

Se observó que la radiación ionizante genera AFLPs que no están presentes en las variedades originales y que hace desaparecer AFLPs presentes en las variedades originales, eventos que podrían estar ligados a la característica de ciclo vegetativo precoz.

VII. RECOMENDACIONES PARA ESTUDIOS FUTUROS

Se recomienda utilizar la metodología de extracción de ADN empleada en este estudio en posteriores análisis de *P. vulgaris* mediante la técnica del AFLP.

Se recomienda utilizar las combinaciones de partidores M+CAG/E+ACC, M+CTC/E+AGC, M+CAC/E+ACA y M+CAT/E+ACA del Kit de AFLP de Invitrogen en posteriores estudios de caracterización de *P. vulgaris*.

Se recomienda utilizar las combinaciones de partidores M+CTC/E+AGC y M+CAT/E+ACA para posteriores estudios de genética de poblaciones de *P. vulgaris*.

VIII. LITERATURA CITADA

- Beebe, S. y F. Pedraza. Sin fecha. *Perspectivas para el uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol*.
- Caicedo, A. L., E. Gaitán, M. C. Duque, O. Toro Chica, D. G. Debouck, and J. Tohme. 1999. « AFLP Fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and Related Wild Species from South America » *Crop Science* No. 5 39 : 1497-1507.
- Castanheira, A. L. M., J. B. Dos Santos, D. F. Ferreira and L. C. Melo. 1999. «Identification of common bean alleles resistant to anthracnose using RAPD». *Genetics and Molecular Biology* 22 : (4) 565-569
- «Chapter 4: Legumes and Some Relatives». 2000. Carl Hayden bee research center. Arizona. (<http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/chap4/beans.html>)
- Daniel, W. 1996. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 3ra. Edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Versión autorizada en Español de la obra publicada en Inglés con el título: *Biostatistics: a foundation for análisis in the health sciences*.
- Duke, J. A. 1983. Handbook of Energy Crops. Unpublished. (http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Phaseolus_vulgaris.html)
- Debouck, D. 1994. «Beans» en *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective* de Bermejo and León (Eds.) Plant Production and Protection Series No. 26. FAO, Rome. Págs. 47-62.
- Ebbelaar, M. E. M., G. A. Tucker, M. M. Laats, van Kijk, C., T. Stolle-Smits, and K. Recourt. 1996. «Characterization of pectinases and pectin methylesterase cDNAs in pods of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.)». *Plant Molecular Biology* 31: 1141-1151.
- Ferreira, M. E. y D. Grattapaglia. 1998. *Introducción al uso de los marcadores moleculares en el análisis genético*. Traducción de J. N. Fernández, A. Sánchez y L. Rodríguez. Ministerio da Agricultura e de Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnología.
- Guatemala 1996. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. *ICTA Altense e ICTA Hunapú, dos nuevas variedades de frijol negro para el altiplano de Guatemala*. Publicación Técnica No. 33. Junio.
- Guatemala 2000. Ministerio de Cultura y Deportes. *Diccionario Lexical Multilingüe para Guatemala*. Editorial Cultura.
- Guatemala 2002. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Laboratorio SIG-MAGA. *Información cartográfica generada en apoyo al programa mundial de alimentos-MAGA con referencia a estimaciones de producción de maíz y frijol para el año 2001 y pérdidas estimadas.* (<http://www.maga.gob.gt/sig/>)
- Guatemala 2003. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Unidad de Políticas e información Estratégica. *Frijol Negro* (*Phaseolus vulgaris*).
- Hoc, P. y Amela, M. 1999. «Biología floral y sistema reproductivo de *Phaseolus vulgaris* var. *Arboriginens* (Fabaceae)». *Biología Tropical* 47: (1) 53-61.
- Henríquez, P. (Ed.) 2002. *Glosario de términos útiles para el manejo de los recursos filogenéticos*. Red Mesoamericana de Recursos Filogenéticos REMERFI; Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA.
- IAEA, 1969. *Induced Mutations in Plants*. International Atomic Energy Agency, Viena. 748 Págs.

- IAEA, 2002. *Mutant Germplasm Characterization Using Molecular Markers. A Manual*. International Atomic Energy Agency, Viena. 86 Págs.
- Invitrogen, Life Technologies. 2003. AFLP® Análisis system I, AFLP Starter primer kit. CAT NOS. 10544-013, 10483-014 Instruction Manual. 18 Págs.
- Kahl, G. 2001. *The dictionary of Gene technology. Genomics, Transcriptomics, Proteomics*. 2nd Ed. Weinheim, Wiley-VCH.. 942 págs.
- Lobos, S. y D. Seelenfreund. 1999. Manual de Técnicas en Biología Molecular. Universidad de Chile.
- Manubens, A., S. Lobos, Y. Jadue, M. Toro, R. Messina, M. Lladser, D. Seelenfreund. 1999. «DNA Isolation and AFLP Fingerprinting of Nectarine and Peach Varieties (*Prunus persica*)». *Plant Molecular Biology Reporter* **17**: 255-267. [Netherlands]
- Métais, I. C. Aubry, B. Hamon, D. Peltier, R. Jalouzot. 1998. «Cloning, quantification and characterization of a minisatellite DNA sequence from common bean *Phaseolus vulgaris* L.». *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 232-237
- Mueller, U. And Wolfenbarger, L. 1999. «AFLP genotyping and fingerprinting». *TREE* **14**:(10) 389-394.
- Nodari, R. O., S. M. Tsai, R. L. Gilbertson and P. Gepts. 1993. «Towards an integrated linkage map of common bean 2. Development of an RFLP-based linkage map». *Theoretical and Applied Genetics* **85**: 513-520. Nodari, R. O., S. M. Tsai, P. Guzman, R. L. Gilbertson and P. Gepts. 1993. «Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions». *Genetics* **134**: 341-350
- NTSYSpc, Versión 2.02c. Copyright© 1986-1998 Applied Biostatistics Inc.
- Nwokolo, E. 1996. «The need to increase consumption of pulses in the developing world» en *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. Nwokolo, E. and J. Smartt (Eds.) London, Chapman & hall. 419 págs.
- _____; 1996b. «Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)» en *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. Nwokolo, E. and J. Smartt (Eds.) London, Chapman & hall. 419 págs.
- Obrador, J. 1984. *Cosecha de granos. Trigo, maíz, frijol y soya*. Serie: Tecnología Postcosecha 2. Oficina regional de la FAO para América Latina y El Caribe. Santiago.
- Ortega, S. 1974. «Polinización cruzada natural de la caraota (*P. vulgaris*) en Venezuela». *Agronomía Tropical* **24**: (1) 27-32.
- Papa, R. And 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». *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 239-250.
- Ponciano, K. 2004. *Evaluación de técnicas de extracción de ADN y de visualización para marcadores microsátélites en caña de azúcar (Saccharum officinarum L.)*. Tesis. Universidad del Valle de Guatemala.
- Programa Cooperativo Regional de Investigación en Frijol (PROFRIJOL). 2003. (<http://www.guate.net/profrijol/variedades.htm>)
- Robertson, H. G. 2003. «*Phaseolus vulgaris* (green beans, large white beans, flageolet, black bean, borlotto bean, red kidney bean, cannellino bean)» Iziko Museums of Cape Town. (http://www.museums.org.za/bio/plants/fabaceae/phaseolus_vulgaris.htm)
- Rodrigues, R., N. Rocha Leal, M. Gonzaga Pereira and A. Lam-Sánchez. 1999. «Combining ability of *Phaseolus vulgaris* L. for resistance to common bacterial blight». *Genetics and Molecular Biology* **22**: (4) 571-575

- Sagastume, H., L. Molina, A. Ávalos y K. Ponciano. 2003. «Caracterización molecular, mediante AFLP, de la colección de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) liberadas por el ICTA». Informe técnico de actividades del Laboratorio de Biotecnología de la Región I ICTA, Guatemala.
- Santos, C. and Simon, P. 2002. «Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F₂ populations of carrot» *Genetics and Molecular Biology* **25**: (2) 195-201
- Schoua 1998. *Estudio genético de poblaciones del mosquito Anopheles albimanus mediante secuencias microsátélites*. Tesis. Universidad del Valle de Guatemala.
- Soto, J. And Molina, L. 2000. «Use of induced mutations for the improvement of common beans *Phaseolus vulgaris* L. in Guatemala». Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. Guatemala.
- _____; 2001. «Use of gamma rays- induced mutations for improvement of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Guatemala». Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. Guatemala.
- Standley P. and Steyermark, J. 1946. «Flora of Guatemala». Fieldiana: Botany. **24**: part V. Chicago Natural History Museum. 502 págs.
- StatSoft, Inc. 2003. Cluster Analysis. (<http://www.statsoftinc.com/textbook/stcluan.html>)
- Stockburger, D. Sin fecha. Multivariate Statistics: Concepts, Models, and Applications. Cluster Analysis. (<http://www.psychstat.smsu.edu/MultiBook/mlt04.html>)
- Teixeira, F. F., M. A. Patto Ramalho and A. de F. Barbosa Abreu. 1999. «Genetic control of plant architecture in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)» *Genetics and Molecular Biology* **22**: (4) 577-582
- Tohme, J., D. O. Gonzalez, S. Beebe and M. C. Duque. 1996. «AFLP Analysis of Gene Pools of a Wild Bean Core Collection». *Crop science* **36**:1375-1384.
- USDA, NRCS. 2002. The PLANTS Database, Version 3.5 (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- UVP GelWorks 1D Advanced. Versión 4.01 Ultra Violet Products Copyright© 1996-1998 NonLinear Dynamics Ltd.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau. 1995. «AFLP: a new technique for DNA fingerprinting». *Nucleic Acids Research* **23**: (21) 4407-4414.
- Voyses, O. 2002. *The impact of CLAT participation in the development of bean cultivars in Latin America*. Version 1.3.01. Strategic Planning and Impact Assessment Unit.
- Yu, K., S. J. Park and V. Poysa. 1999. «Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*)» *Genome* **42**: 27-34.
- Yu, K., S. J. Park, V. Poysa and P. Gepts. 2000. «Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) » *The Journal of Heredity* **91**: 429-434.
- Zar, J. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd Ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 662 págs.

Otras fuentes consultadas

- Ferreira Rezende, V., M. A. Patto Ramalho and H. R. Corte. «Genetic control of common bean (*Phaseolus vulgaris*) resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*)». *Genetics and Molecular Biology* **22**: (2) 233-236.

- Fisher, M. L. and M. M. Kyle. 1996. «Inheritance of resistance to potyviruses in *Phaseolus vulgaris* L. IV. Inheritance, linkage relations, and environmental effects on systemic resistance to four potyviruses». *Theoretical and Applied Genetics* 92: (2) 204-212.
- Freyre, R., P. W. Skorch, V. Geffroy, A.-F. Adam-Blondon, A. Shirmohamadali, W. C. Johnson, V. Llaca, R. O. Nodari, P. A. Pereira, S.-M. Tsai, J. Tohme, M. Dron, J. Nienhuis, C. E. Vallejos, P. Gepts. 1998. «Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps». *Theoretical and Applied Genetics* 97 : 847-856.
- Font Quer, P. 1982. *Diccionario de Botánica*. Barcelona. Labor. 1244 Págs.
- Gamez, T. de. 1973. *Simon and Schuster's International Dictionary. English/Spanish, Spanish/English*. New York, Simon and Schuster 1605 Págs.
- Garza, R., C. Cardona and S. P. Singh. 1996. «Inheritance of resistance to the bean-pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common beans from Mexico». *Theoretical and Applied Genetics* 92: 357-362.
- Gola, G., G. Negri, C. Cappelletti 1965. *Tratado de Botánica*. 3ra Ed. Traducción de P. Font Quer. Barcelona, Labor. 1160 Págs.

APÉNDICES

Apéndice A

El género *Phaseolus*

Las especies del género *Phaseolus* son mayormente trepadoras, anuales o perennes, a veces con raíces tuberosas, es más bien raro que sean frutescentes, a veces postradas o erectas; hojas ternadopinadas, estipeladas; estípulas estriadas; flores pequeñas o grandes, blancas, amarillas, rojas o púrpuras, fasciculada-racemosa a lo largo de la parte superior del pedúnculo, los nudos del raquis agrandados; brácteas mayormente caducas, estipuliformes o muy pequeñas; bracteolas a menudo más anchas que las brácteas; dos lóbulos caliciales superiores; orbicular normal, algo enrollado, los bordes flexionados hacia adentro en la base; alas usualmente obovadas, igual o más grande que lo normal; quilla lineal u obovada, el pico largo y obtuso, generalmente retorcido en espiral o enrollado; estambres vexilares libres, los otros innatos, las anteras uniformes; ovario subsésil, con pocos o numerosos óvulos; estilo retorcido con la quilla, por lo general longitudinalmente barbado en la parte superior, el estigma oblícuo; legumbre lieal o falcada, cilíndrica o aplanada, bivalva; semillas gruesas o aplanadas, el hilo pequeño o lineal, no estrofiolado. (Standley and Steyermark, 1946)

Apéndice B

Información general del frijol

Departamento	%
Chimaltenango	27.93
Petén	17.45
Chiquimula	15.28
Sacatepéquez	9.74
Quiché	7.74
Alta Verapaz	4.49
Huehuetenango	4.47
San Marcos	3.36
Zacapa	1.84
Izabal	1.66
Jalapa	1.31
Suchitepéquez	0.97
Sololá	0.92
Santa Rosa	0.82
Guatemala	0.69
Jutiapa	0.49
El Progreso	0.38
Baja Verapaz	0.22
Quetzaltenango	0.14
Retalhuleu	0.05
Totonicapán	0.02
Escuintla	---

Producción de frijol por departamento.
Porcentaje estimado del total

Constituyentes	% (p/p)
Agua	11.60
Proteína	22.28
Carbohidratos	61.41
Lípidos	1.08
Fibra cruda	5.93
Cenizas	3.64
Energía (kcal*)	336

* por 100g de frijoles secos crudos

Composición aproximada del frijol común (Nwokolo, 1996)

Vitamina	mg/100g *
Ácido ascórbico	3.7
Tiamina	0.56
Riboflavina	0.20
Niacina	1.52
Ácido pantoténico	0.74
Piridoxina	0.40
Vitamina A	4 (IU)

* de frijoles secos crudos

Contenido vitamínico del frijol común. (Nwokolo, 1996)

Aminoácido	mg/100g *
Ácido Glutámico	3.39
Ácido aspártico	2.69
Leucina	1.78
Lisina	1.53
Arginina	1.38
Serina	1.21
Fenilalanina	1.20
Valina	1.16
Isoleucina	0.98
Prolina	0.94
Treonina	0.94
Alanina	0.93
Glicina	0.87
Tirosina	0.62
Histidina	0.62
Metionina	0.33
Triptófano	0.26
Cistina	0.24

* de frijoles secos crudos

Contenido de aminoácidos del frijol común. (Nwokolo, 1996)

Apéndice C

Lista de acrónimos de algunos marcadores moleculares

	Nombre en Inglés
AFLP	A mplified F ragment L ength P olymorphism
CAPS	C leaved A mplified P olymorphic S equences
EST	E xpressed S equences T ag
IRAP	I nter- R etrotransposon A mplified P olymorphism
ISSR	I nter- S imple S equences R epeat amplification
RAPD	R andom A mplified P olymorphic D N
REMAP	R etrotransposon- M icrosatellite A mplified P olymorphism
RFLP	R estriction F ragment L ength P olymorphism
SCAR	S equences C haracterized A mplified R egion
SNP	S ingle N ucleotide P olymorphism
SSCP	S ingle S tranded C onformation P olymorphism
SSR	S imple S equences R epeat
STS	S equences T agged S ite

Lista de acrónimos de marcadores moleculares empleados en
caracterización de germoplasma (IAEA, 2002)

Apéndice D

Información general de algunos marcadores moleculares

Técnica	Basada en PCR	Abundancia de polimorfismos	Dominancia	
RFLP	N	B-M	C	
RAPD	S	M-A	D	
SSR	S	A	C	
ISSR	S	A	D	
AFLP	S	A	D	
IRAP/REMAP	S	A	C	
Morfológica	N	B	C	
Proteínas/isoenzimas	N	B	C	
STS/EST	S	A	C	
SNP	S	A	C	
Microarreglo	-	A	-	
SCARS/SCAPS	S	A	C	

Clave	
Alta	A
Media	M
Baja	B
Sí	S
No	N
Codominante	C
Dominante	D

Base, cantidad de polimorfismos y dominancia de las técnicas. (IAEA, 2002)

Técnica	Costo de desarrollo	Costo por dato obtenido	Reproducibilidad entre laboratorios	Reproducibilidad entre cultivos	
RFLP	M	A	A	A	
RAPD	B	B	B	B	
SSR	A	M	A	B	
ISSR	B	B	A	B	
AFLP	M-A	B	A	B	
IRAP/REMAP	A	M	A	B	
Morfológica	D	D	L	L	
Proteínas/isoenzimas	A	M	A	A	
STS/EST	A	M	M	A	
SNP	A	M-B	?	?	
Microarreglos	M	B	?	?	
SCARS/SCAPS	A	M	A	B	

Clave	
Bajo (a)	B
Medio (a)	M
Alto (a)	A
Desconocido	?
Depende	D
Limitada a mejoramiento	L

Técnica	Cantidad de ADN	Cantidad del ADN	Secuencia del	Detección radiactiva	Sistema de gel	
RFLP	A	A	N	Sí/No	Ag	
RAPD	B	B	N	N	Ag	
SSR	B	M	S	N	Ac/Ag	
ISSR	B	M	Sí/No	N	Ac/Ag	
AFLP	B	A	N	Sí/No	Ac	
IRAP/REMAP	B	M	S	N	Ac/Ag	
Morfológica	N	N	N	N	Ng	
Proteínas/isoenzimas	N	N	N	N	Ag/Ac	
STS/EST	B	A	S	Sí/No	Ac/Ag	
SNP	B	A	S	N	Sc	
Microarreglos	B	A	S	N	Ng	
SCARS/SCAPS	B	A	S	Sí/No	Ag	

Clave	
Alta	A
Media	M
Baja	B
Sí	S
No	N
Agarosa	Ag
Poliacrilamida	Pa
Ninguno	Ng
Secuenciación	Sc

Requerimientos básicos de las técnicas (IAEA, 2002)

Apéndice E

Aplicación de los marcadores moleculares en plantas

MEJORAMIENTO CLÁSICO		
Aplicaciones a corto plazo		Identificación de origen parental y pruebas de paternidad
		Identificación y protección de variedades y/o clones patentados
		Atribución de líneas a grupos heteróticos
		Certificación de pureza genética de líneas e híbridos
		Control de fecundación cruzada y autofecundación en plantaciones de semillas forestales
		Evaluación de germoplasma y poblaciones de mejoramiento (variabilidad, diversidad, clasificación, distancia genética y filogenia)
		Construcción de colecciones nucleares en bancos de gemoplasma a partir de estudios sobre diversidad y distancia genética
Aplicaciones a medio y largo plazo	Camino analítico	Construcción de mapas genéticos de ligamiento
		Mapeamiento genético de QTL y/o EIL, controladores de características cuantitativas y/o de importancia económica
		Análisis de arquitectura de características cuantitativas (número, posición, acción genética, magnitud de efecto e interacciones de QTLs)
		Detección de <i>loci</i> homólogos en otras especies o géneros a través de mapas comparativos
	Camino sintético	Introgresión de características por retrocruzamiento asistido por marcadores
		Selección y recombinación dirigida de genotipos superiores
		Selección durante el desarrollo de líneas endógamas
		Predicción de fenotipos esperados
		Selección indirecta para características de difícil evaluación (resistencia a factores bióticos y abióticos, o para características industriales)
		Selección precoz en cultivos perennes
MEJORAMIENTO TRANSGÉNICO		
		Mapeamiento genético detallado para clonación de genes basada en los mapas generados

Apéndice F

Similitudes y distancias genéticas entre variedades de frijol del ICTA.

Matriz de similitud del grupo de variedades del ICTA. (Sagastume, 2003)

	DORICTA	QUI-CHE	IAN5091	SANMART	PARRAMOS	COMPCHIM	TEXEL	LIGERO	ALTENSE	HUNAPÚ	OSTUA	STAGERT
DORICTA	1.0000											
QUI-CHE	0.4600	1.0000										
IAN5091	0.6333	0.4643	1.0000									
SANMART	0.5614	0.3962	0.7302	1.0000								
PARRAMOS	0.4833	0.3393	0.5758	0.7302	1.0000							
COMPCHIM	0.4912	0.3585	0.6984	0.8500	0.6667	1.0000						
TEXEL	0.2653	0.4000	0.3091	0.3077	0.3636	0.3462	1.0000					
LIGERO	0.3770	0.3158	0.5075	0.6094	0.5672	0.5938	0.3214	1.0000				
ALTENSE	0.3540	0.3048	0.4160	0.5378	0.6080	0.5042	0.3495	0.4882	1.0000			
HUNAPÚ	0.3333	0.2642	0.3968	0.4500	0.5397	0.4333	0.3269	0.5000	0.8067	1.0000		
OSTUA	0.1212	0.2198	0.2162	0.2476	0.2703	0.2476	0.3596	0.2301	0.3269	0.3619	1.0000	
STAGERT	0.1961	0.2766	0.2105	0.2222	0.2456	0.2222	0.2609	0.2241	0.2617	0.2778	0.4946	1.0000

Matriz de distancia genética del grupo de variedades del ICTA. (Sagastume 2003)

	DORICTA	QUI-CHE	IAN5091	SANMART	PARRAMOS	COMPCHIM	TEXEL	LIGERO	ALTENSE	HUNAPÚ	OSTUA	STAGERT
DORICTA	0.0000											
QUI-CHE	0.5400											
IAN5091	0.3667	0.5357	0.0000									
SANMART	0.4386	0.6038	0.2698	0.0000								
PARRAMOS	0.5167	0.6607	0.4242	0.2698	0.0000							
COMPCHIM	0.5088	0.6415	0.3016	0.1500	0.3333	0.0000						
TEXEL	0.7347	0.6000	0.6909	0.6923	0.6364	0.6538	0.0000					
LIGERO	0.6230	0.6842	0.4925	0.3906	0.4328	0.4063	0.6786	0.0000				
ALTENSE	0.6460	0.6952	0.5840	0.4622	0.3920	0.4958	0.6505	0.5118	0.0000			
HUNAPÚ	0.6667	0.7358	0.6032	0.5500	0.4603	0.5667	0.6731	0.5000	0.1933	0.0000		
OSTUA	0.8788	0.7802	0.7838	0.7524	0.7297	0.7524	0.6404	0.7699	0.6731	0.6381	0.0000	
STAGERT	0.8039	0.7234	0.7895	0.7778	0.7544	0.7778	0.7391	0.7759	0.7383	0.7222	0.5054	0.0000

Apéndice G

GLOSARIO

ADN (Ácido desoxirribonucleico): Polímero de nucleótidos que contiene la información genética de virus, de bacterias y de todos los organismos superiores (Kahl, 2001).

Alelo dominante: Uno de un par de alelos correspondientes que es fenotípicamente manifiesto en el heterocigoto (Kahl, 2001).

Alelo recesivo: El alelo fenotípicamente silencioso (Kahl, 2001).

Alelo: Uno de dos o más formas de un gen dado que difieren; estas ocupan el mismo locus en un cromosoma en particular (Kahl, 2001).

Autosomas: Un cromosoma que no es característico del sexo en un organismo eucariota (Kahl, 2001).

Codominancia: Contribución de 2 alelos al fenotipo de un organismo; surge cuando alelos diferentes tienen especificidades distintas, por lo que el heterocigoto posee las propiedades de los dos padres (Kahl, 2001).

Dominancia: Fenómeno en el que el efecto fenotípico de un alelo específico se expresa tanto en heterocigotos como en homocigotos –Aa es fenotípicamente idéntico a AA– (Kahl, 2001).

Eucromatina: a) Cromosomas o regiones de cromosomas que muestran los ciclos normales de enrollamiento –condensación– cromosomal durante la mitosis y de desenrollamiento en la interfase. b) El ADN de los autosomas –eucromosomas–, en contraste con el ADN de los heterosomas –heterocromatina–. (Kahl, 2001)

Germoplasma: Base física del acervo genético que reúne el conjunto de materiales hereditarios de una especie. (Henríquez, 2002)

Heterocromatina: a) La porción de cromatina que se encuentra condensada en el núcleo de la interfase, que se replica de forma tardía en la fase S y que contiene ADN que es, casi por completo, transcripcionalmente inactivo. b) El ADN de los heterosomas –cromosomas ligados al sexo– en contraste con el ADN de los autosomas. (Kahl, 2001)

Heterosomas: (heterocromosomas) Cromosomas ligados al sexo, e.g. cromosomas X y Y.

Isopentanol: Alcohol isoamílico.

Mejoramiento de plantas inducido por mutaciones: El desarrollo de plantas con características mejoradas a través de mutaciones físicamente o químicamente inducidas. Dado que estas mutaciones son totalmente al azar, no es posible un cambio genético dirigido. Este método se emplea aún, pero será reemplazado, en el futuro, por la ingeniería genética. (Kahl, 2001)

Marcador dominante: Cualquier marcador molecular que no discrimina entre los dos alelos de un locus genómico (Kahl, 2001).

Marcador codominante: Cualquier marcador que detecta ambos alelos de un locus genómico en particular. Se considera generalmente que un marcador es dominante si los dos alelos se pueden amplificar utilizando el mismo par de primers, si los dos alelos se segregan en fase de repulsión o si difieren ligeramente en longitud. Mutación: cualquier cambio en la estructura o en la composición del ADN de un organismo que no es provocada por segregación normal o por un proceso de recombinación. El cambio en la base de un nucleótido puede, por ejemplo, provocar la conversión de un codón en otro, pero la mutación es silenciosa si el codón no provoca un cambio fenotípico. (Kahl, 2001)

Múltiple: Circuito telegráfico que permite transmitir varios telegramas simultáneamente (Casares, 1963).

Mutagénesis: Inducción de mutaciones en el ADN ya sea *in vitro* o *in vivo* —e.g. por irradiación, por químicos o por la delección/inversión o inserción de las secuencias de ADN—. (Kahl, 2001)

Mutágeno: Cualquier agente físico o químico que incrementa la frecuencia de mutaciones sobre el nivel espontáneo basal; tales agentes incluyen la radiación ionizante, radiación ultravioleta, compuestos alquilantes y análogos de bases (Kahl, 2001).

Mutante: Un organismo que alberga un gen mutante cuya expresión cambia los fenotipos del organismo (Kahl, 2001).

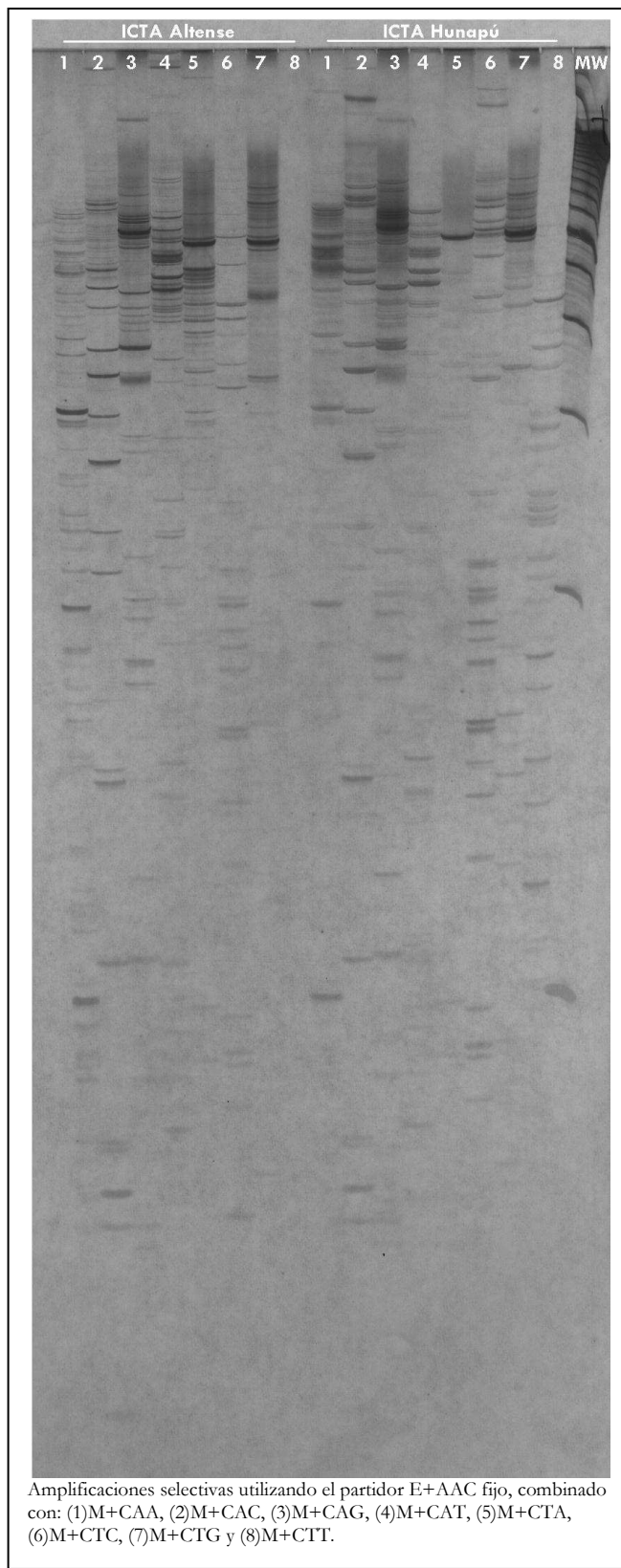
Mutón: La unidad más pequeña de un gen que puede sufrir mutación —es equivalente a un par de bases de ADN— (Kahl, 2001).

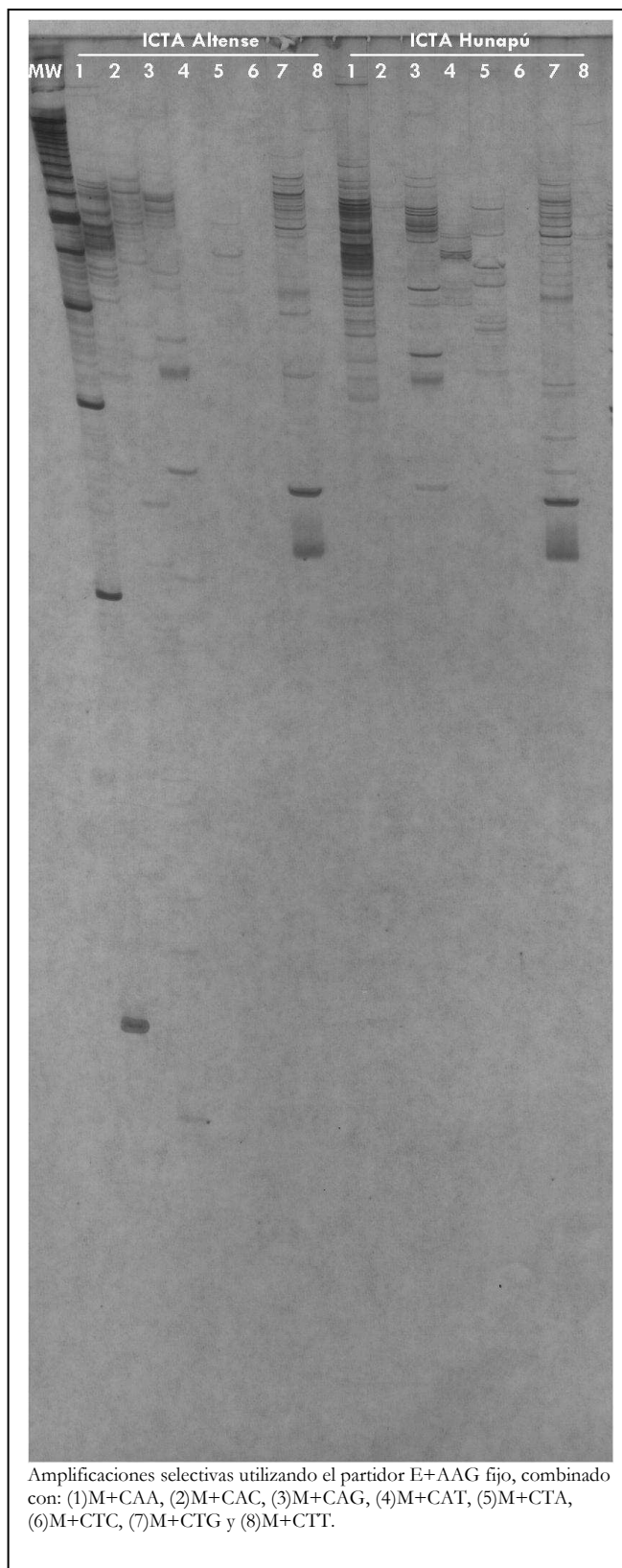
Nucleótido: Un nucleósido —de pirimidina o de purina— que está esterificado con uno, dos o tres grupos fosfato en el carbono 5' de la ribosa —ribonucleótido— o desoxirribosa (desoxirribonucleótido) (Kahl, 2001).

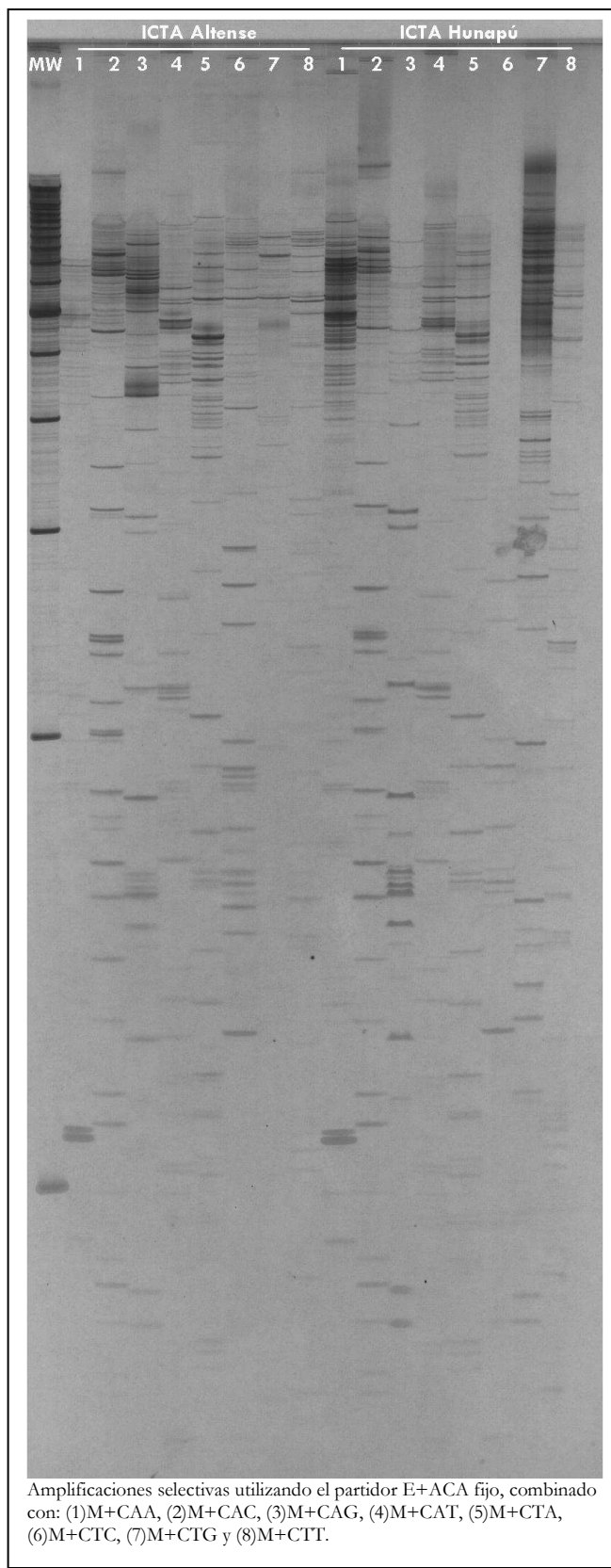
pb (par de bases): a) Cualquier par de bases purina-pirimidina unido por puentes de hidrógeno en hebras complementarias de una molécula dúplex de ADN. b) El número de pares de bases es una función de la longitud de una molécula ácido nucleico de doble hebra; por ello se usa como unidad de medida para tales moléculas, donde 1kpb=1kilo par de bases=1000pb. (Kahl, 2001).

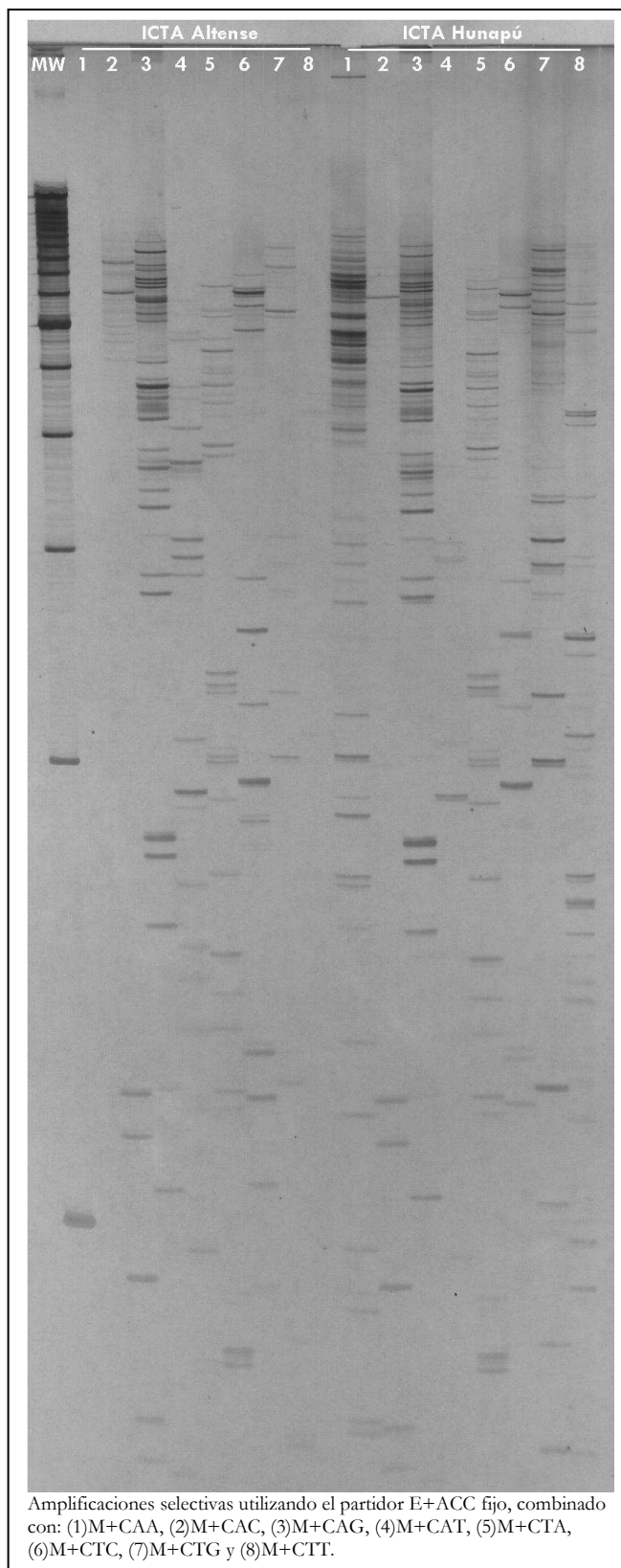
APÉNDICE H

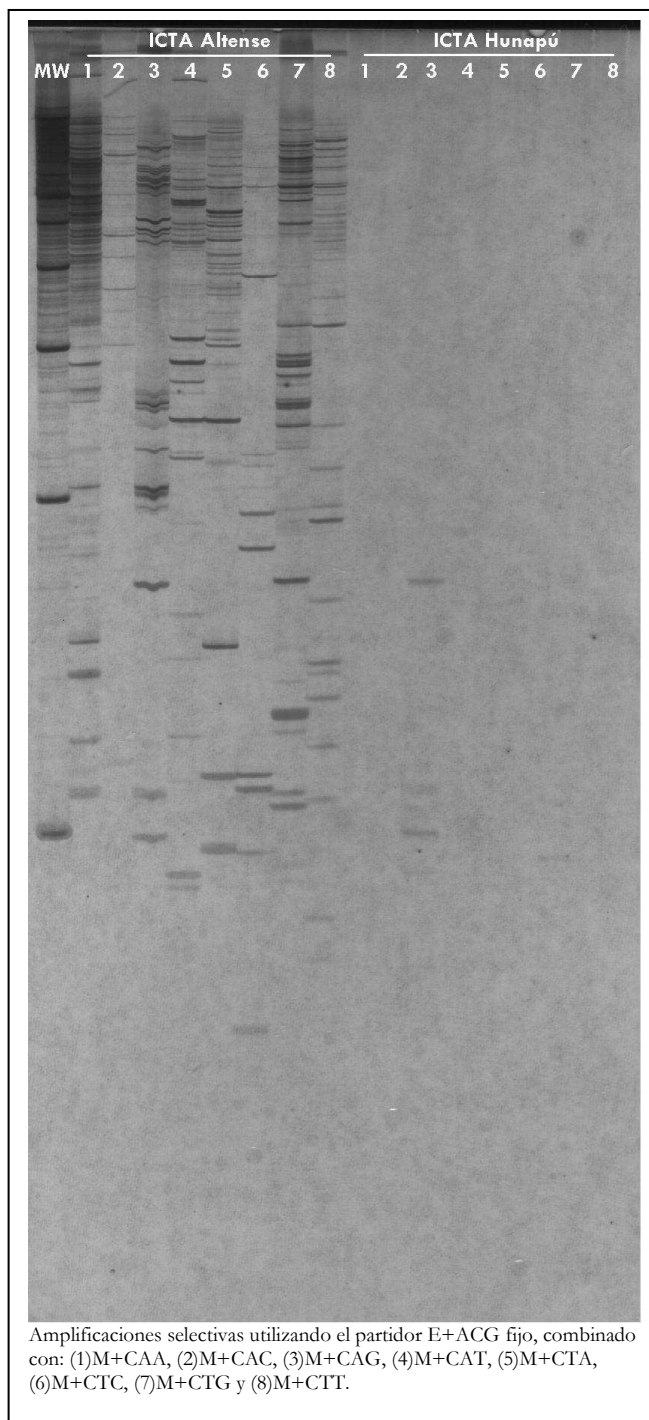
Geles de las 64 amplificaciones selectivas
aplicadas a las variedades originales
ICTA Altense e ICTA Hunapú
(MW 100pb)

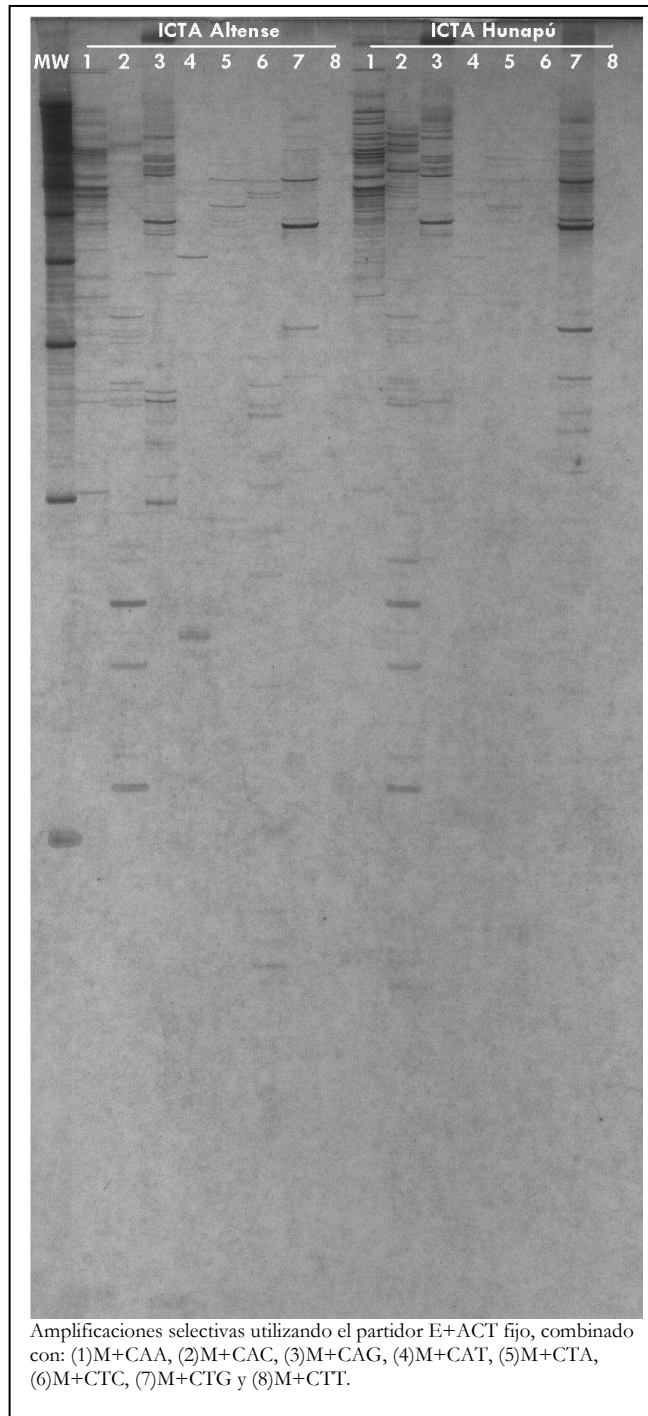


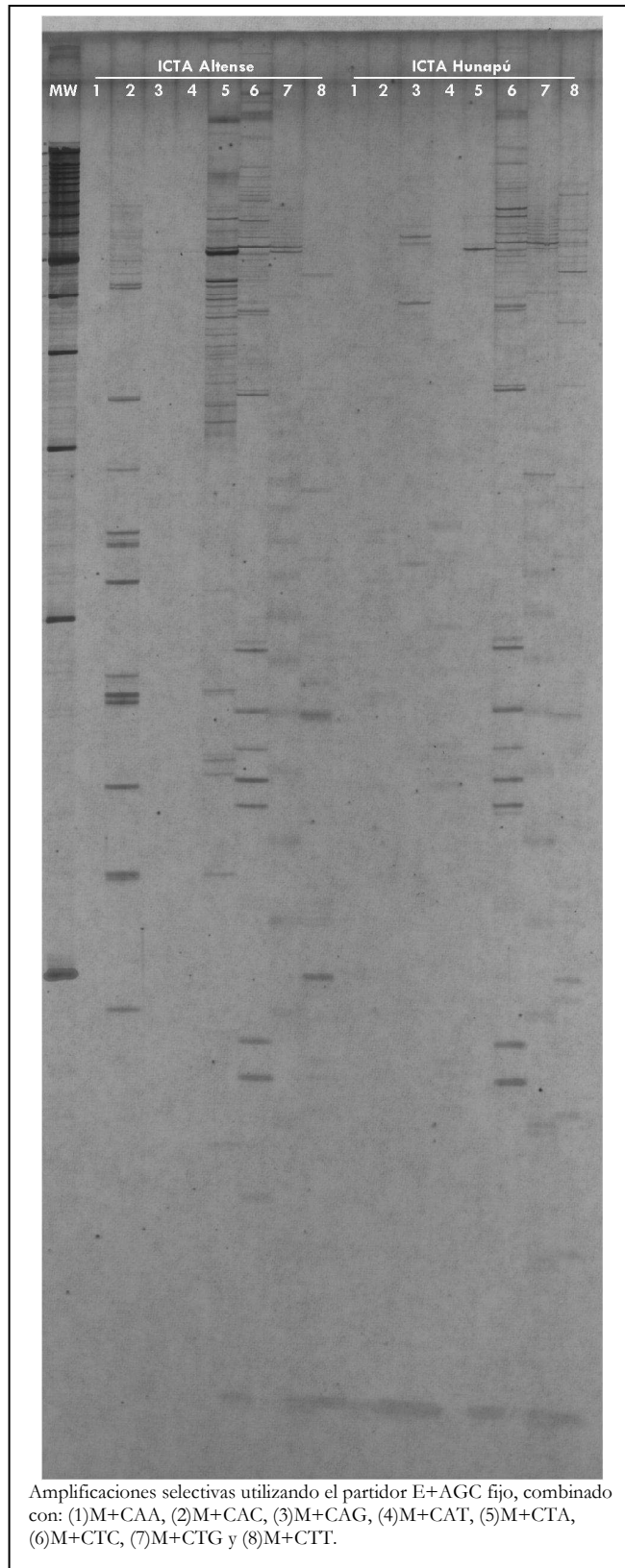


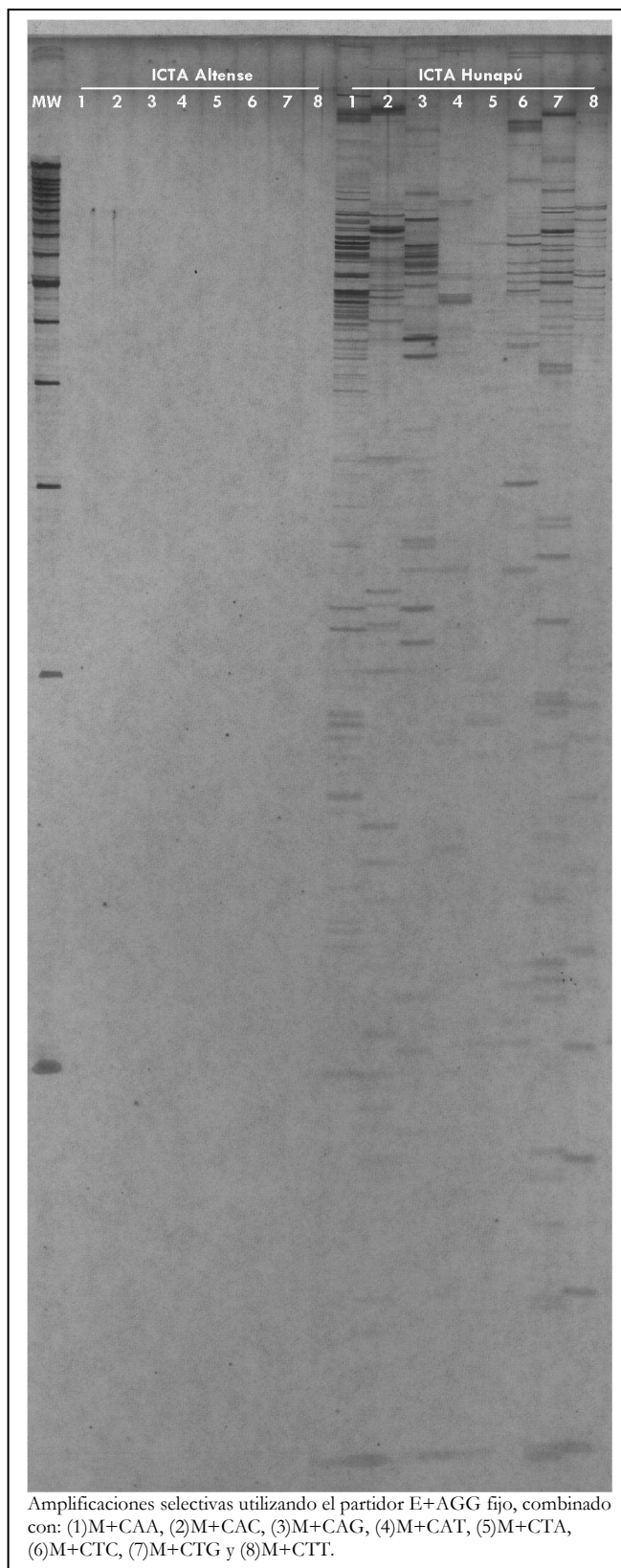




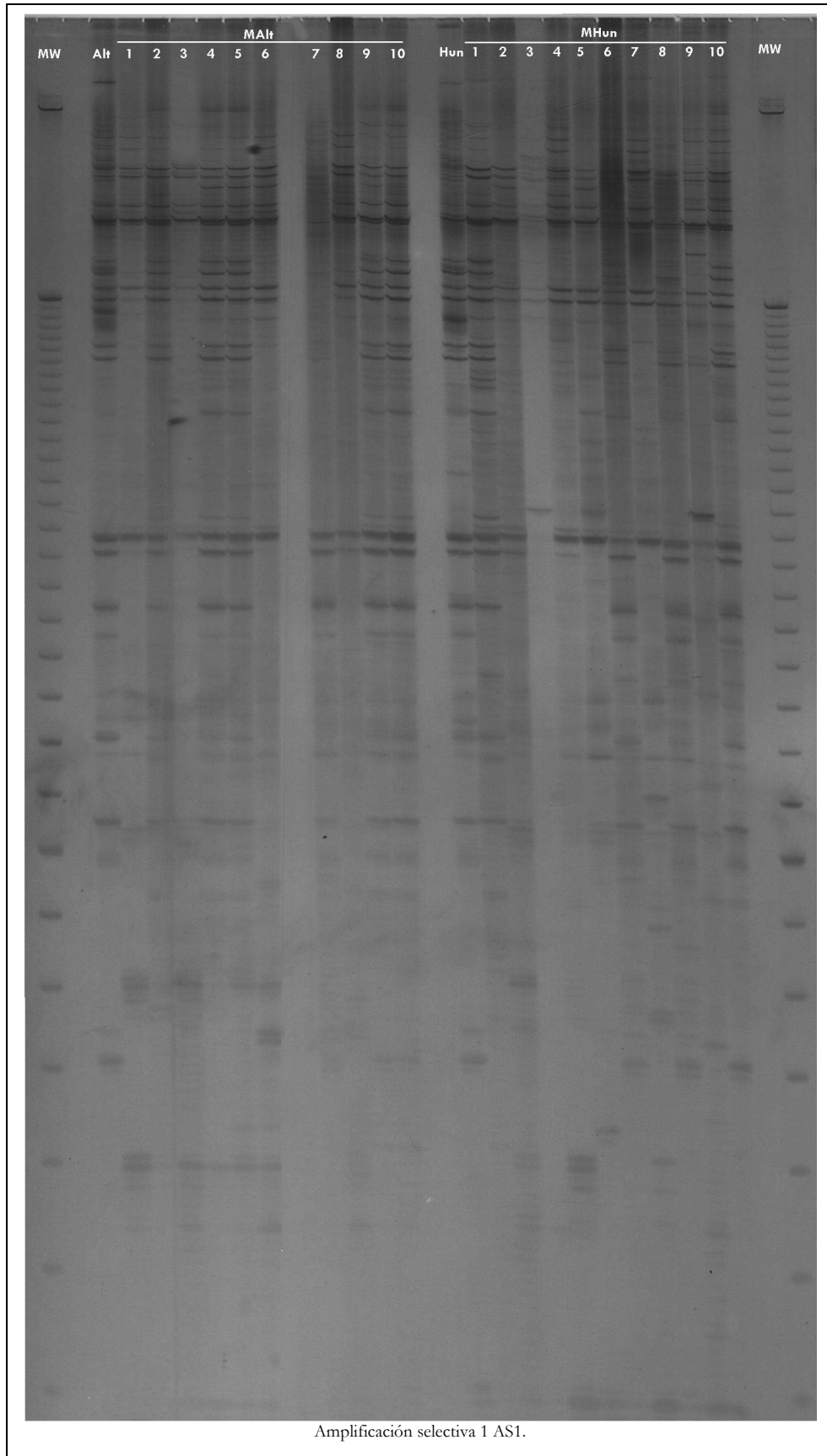


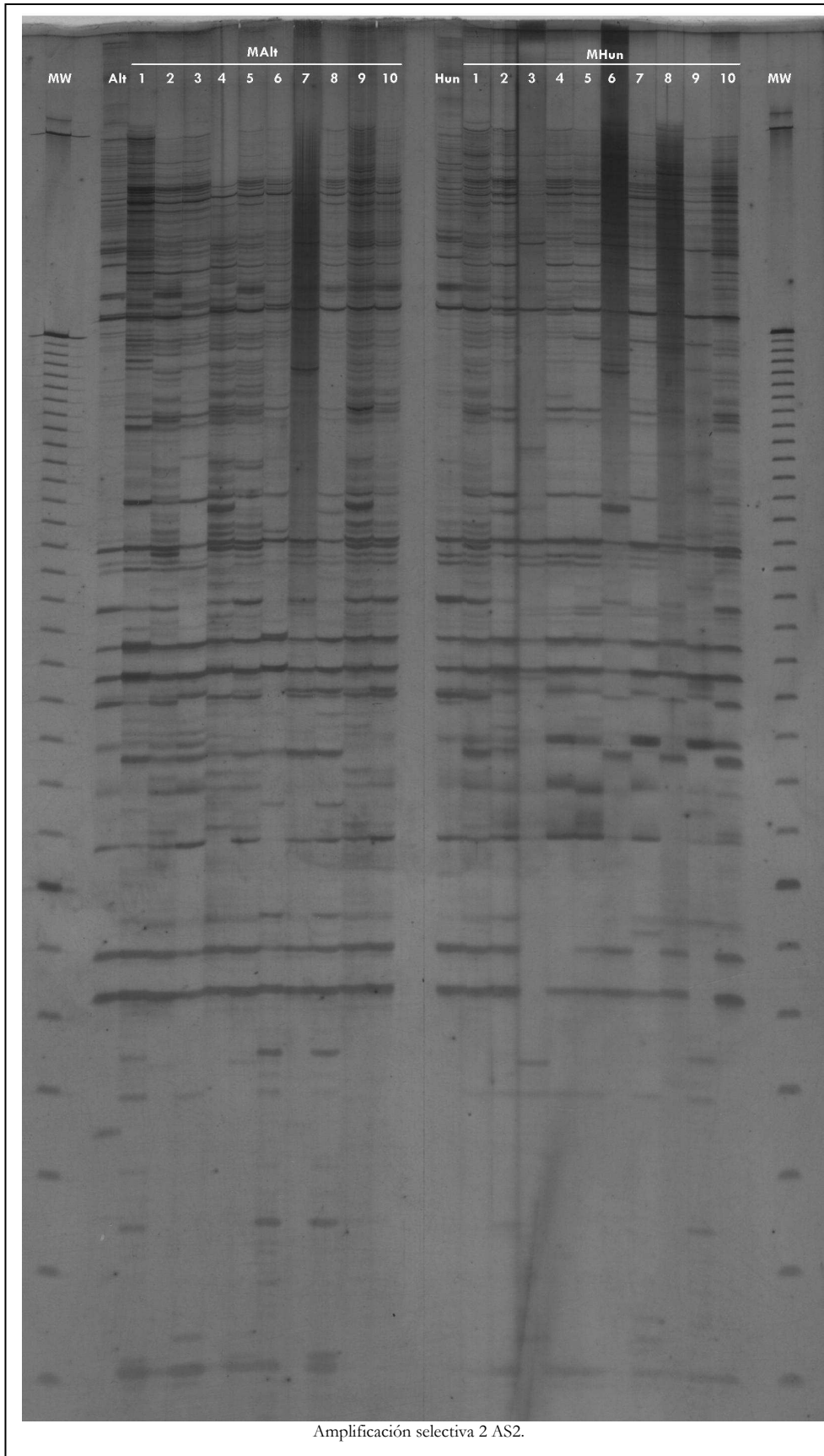


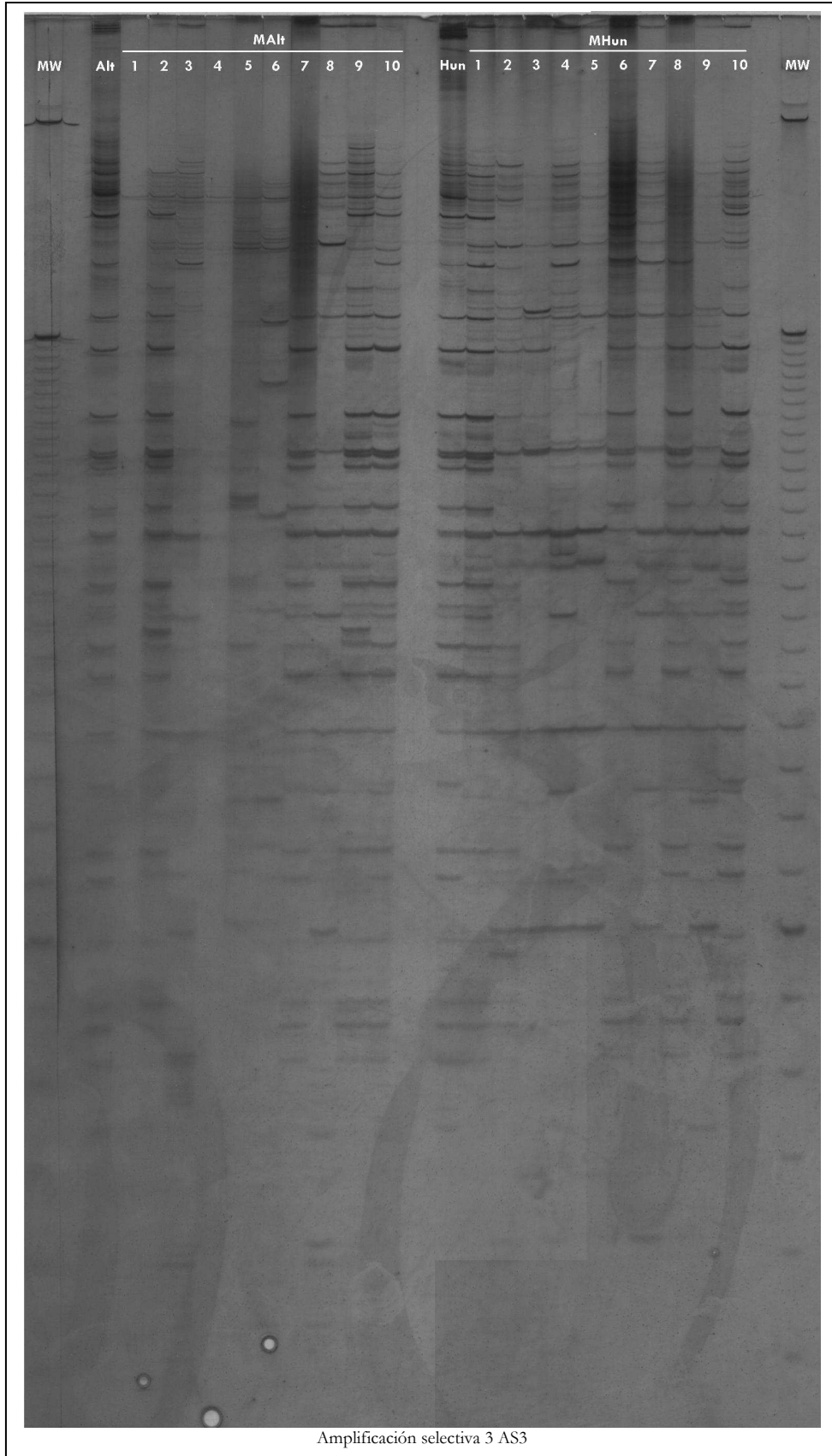


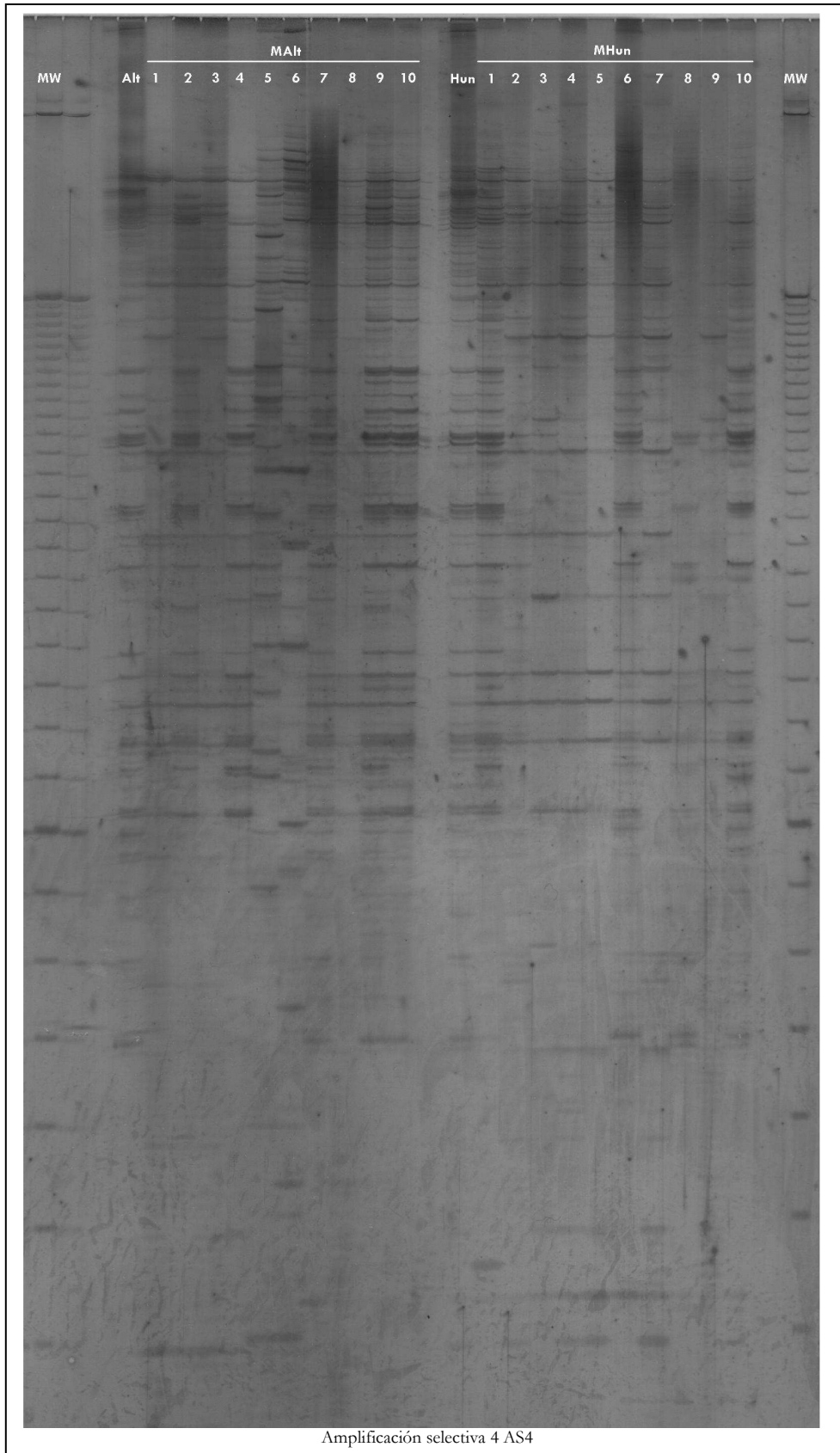


APÉNDICE I
Geles de las cuatro
amplificaciones selectivas
aplicadas a la muestra
(MW 30-330pb)









APÉNDICE J
Reproducibilidad de las
amplificaciones selectivas
en las dos variedades estudiadas
(MW 30-330pb)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología



CARACTERIZACIÓN DE 20 VARIEDADES
MUTANTES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
MEDIANTE LA TÉCNICA DEL AFLP

Trabajo de investigación presentado por
Andrés Weinfeld Ávalos Figueroa
para optar al grado académico de
Licenciado en Bioquímica

Guatemala
2004