

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Determinación de la estructura genética de un grupo
de variedades de *P. vulgaris* L. originario del altiplano
guatemalteco empleando marcadores microsatélites (SSR's)**

Trabajo de graduación presentado por
Jonathan Andre Morales Marroquín
para optar al grado de académico de Licenciado en Biología

Guatemala

2014

Determinación de la estructura genética de un grupo de variedades de *P. vulgaris* L. originario del altiplano guatemalteco empleando marcadores microsatélites (SSR's)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de la estructura genética de un grupo de variedades de *P. vulgaris* L. originario del altiplano guatemalteco empleando marcadores microsatélites (SSR's)


Trabajo de graduación presentado por
Jonathan Andre Morales Marroquín
para optar al grado de académico de Licenciado en Biología

Guatemala

2014

Vo. Bo. :

(f)



Lic. Andrés Ávalos

Tribunal Examinador:

(f)



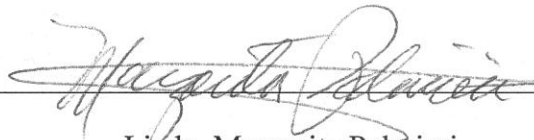
Lic. Andrés Ávalos

(f)



Licda. Elena Dardón

(f)



Licda. Margarita Palmieri

Fecha de aprobación: Guatemala 19 de Febrero de 2014.

PREFACIO

Desde mi profundidad, desde ese lugar donde todo se origina, desde esta compartida y hermosa singularidad, te escribo. Al final del camino nos veremos de frente y nos saludaremos gratamente.

Quiero agradecer a mis padres, Amarilis y Oscar. Por ellos y para ellos. Gracias por creer en mí y ser compañeros incondicionales. La posibilidad se hizo real, gracias.

Quiero agradecer a Andrés Ávalos, Elena Dardón y Margarita Palmieri. Gracias por ser mis mentores. Gracias por compartir su sabiduría y dirigir el camino. Aspiraré siempre a hacer lo correcto, y lo que ustedes con su visión, han logrado realizar.

Quiero agradecer a mis personas. A todas y todos los que con su amor me han guiado. A las que están cerca, a los que están lejos. Nos hemos tomado de la mano y hemos visto nuestros ojos. Gracias por estar siempre conmigo. Gracias por ser los mejores compañeros de viaje. Estrellas en el cielo, siempre cerca de Orión. Gracias por compartir todo. Por las aventuras, los miedos, los viajes, los toques de realidad y los vuelos trascendentales. Que siempre hayan abrazos.

Finalmente quiero agradecerle a esa idea que hace que la ciencia suceda, la inspiración. Gracias a cada epifanía. Gracias a cada catarsis. Gracias a cada una de esas singularidades. Luchando siempre porque la llama no se extinga. Porque el esfuerzo y la valentía de algunos lleven el conocimiento a todas y todos.

Agradezco a toda esta experiencia estudiantil universitaria. Gracias a esta alegre rebeldía, porque la educación plural puede cambiar Guatemala. Dedico este trabajo a las y los estudiantes. A sus sueños, a su osadía, a su motor.

Dedico este trabajo a todas y todos los que con la verdad y el ímpetu, han erigido el conocimiento. Dedico este trabajo a todas y a todos que con la ciencia integral, consciente y holística, cambiaron, cambian y cambiarán el mundo.

CONTENIDO

PREFACIO	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	xi

CAPÍTULOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	4
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. OBJETIVOS	17
V. HIPÓTESIS.....	18
VI. METODOLOGÍA	19
VII. RESULTADOS.....	27
VIII. DISCUSIÓN	38
IX. CONCLUSIONES	43
X. RECOMENDACIONES	45
XI. LITERATURA CITADA	46
XII. APENDICE.....	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro No. 1. Muestras de <i>P. vulgaris</i> seleccionadas para el análisis de diversidad a partir de SSR's.....	19
Cuadro No. 2. Descripción de los marcadores microsatélites.	21
Cuadro No. 3. Descripción de los genes a los cuales los microsatélites están asociados.	22
Cuadro No. 4. Programa utilizado para la amplificación de los microsatélites.	23
Cuadro No. 5 Información alélica para cada uno de los marcadores evaluados según el <i>locus</i>	28
Cuadro No. 6. Información alélica para cada una de las variedades de frijol estudiadas.	30
Cuadro No. 7. Resultados de la prueba de correlación de matrices de Mantel.....	33
Cuadro No. 8. Información alélica para cada una de las variedades según el paquete de marcadores óptimo.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1. Imagen descriptiva de <i>Phaseolus vulgaris</i>	5
Figura No. 2. Distribución de <i>Phaseolus vulgaris</i> en Guatemala.	6
Figura No. 3. Análisis tridimensional de componentes principales basado en 604 genotipos de frijol común de la colección núcleo de germoplasma del CIAT.	9
Figura No. 4. Análisis tridimensional de componentes principales (PCA) de los genotipos mesoamericanos de frijol.	10
Figura No. 5. Filogenia mostrando la similitud genética entre los materiales genéticos de <i>Phaseolus vulgaris</i> silvestre de origen guatemalteco y cultivos mesoamericanos.	11
Figura No. 6. RAPD's en especies de <i>P. vulgaris</i> silvestre; <i>P. vulgaris</i> cultivado de origen Mesoamericano y <i>P. vulgaris</i> cultivado de origen Andino.	12
Figura No. 7. Descripción del funcionamiento de los marcadores microsatélites (SSR's).	14
Figura No. 8. Fórmula para la obtención del Contenido de la Información de Polimórfica (PIC). Donde P_i es la frecuencia alélica, n , el número de alelos del marcador.	14
Figura No. 9. Diagrama de flujo del trabajo de laboratorio.	24
Figura No. 10. Diagrama de flujo del análisis de datos.	26
Figura No. 11. Comparación del tamaño alélico (pb) reportado y observado de los distintos microsatélites.	29
Figura No. 12. PCA utilizando la información de los 14 marcadores utilizados (visualización desde los ejes 2 y 3).	31
Figura No. 13. PCA utilizando la información de los 14 marcadores utilizados (visualización desde los ejes 1 y 2).	32
Figura No. 14. PCA utilizando la información del paquete óptimo de marcadores (BM127, BMd20, BM143, BM175, PV-cct001) (visualización desde los ejes 1 y 2).	35
Figura No. 15. PCA utilizando la información del paquete óptimo de marcadores (BM127, BMd20, BM143, BM175, PV-cct001) (visualización desde los ejes 2 y 3).	36
Figura No. 16. PCA utilizando la información de los dos marcadores más polimórficos (BM127, BMd20) (visualización desde los ejes 1 y 2).	37
Figura No. 17. Diferenciación genética basada en el valor de la prueba F_{st} y análisis filogenético de distintas variedades de frijol.	41

RESUMEN

El frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) es el tercer grano de leguminosas más importante en el mundo, además de ser el cultivo alimentario más importante. En Guatemala se sabe muy poco de la diversidad genética de las variedades locales de este cultivo. Es por ello que es importante enfocar estudios en genética de poblaciones en las distintas regiones del país. Este trabajo pretendió determinar la estructura genética de las variedades de *Phaseolus vulgaris* en una colección de germoplasma (Banco de Semillas de UVG Altiplano) y de muestras colectadas en el altiplano utilizando marcadores microsatélites.

Se seleccionaron 26 muestras de semillas, 15 de éstas se obtuvieron del banco de Semillas de UVG- Altiplano, y 11 fueron colectadas de San Antonio Palopó, Sololá (17 variedades representadas). Todas las muestras se trabajaron en triplicado formando un N=74. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los marcadores microsatélites (15 marcadores). Los alelos fueron visualizados con ayuda de una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Se determinó así el número efectivo de alelos, la frecuencia de los mismos, el contenido de información de polimorfismos (PIC) (Elston, 2005; Hildebrand *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1999) y las distancias genéticas (Nei, 1972). Con ello se construyeron matrices y se comparó la información genética obtenida por marcador. Esto se realizó con una prueba de correlación de matrices de Mantel (1967) y un análisis de componentes principales (PCA). Finalmente se propuso un paquete de óptimo de marcadores.

Se obtuvo una amplificación exitosa de todos los microsatélites con excepción de Bmd08. Se observó que todos los marcadores produjeron múltiples patrones de bandas siendo el marcador BM175 el más numeroso. El marcador con el mayor número de alelos fue BM137 seguido de BM143 y BM175, siendo éstos dirigidos a regiones no codificantes y teniendo los valores del PIC más elevados entre 0.958, 0.939 y 0.937 respectivamente. Los alelos concordaron con los reportados por Blair *et al.* (2003),

Gaitán-Solís *et al.* (2002) y Yu *et al.* (2000), aunque para algunos marcadores los alelos tendieron a presentar mayor cantidad de polimorfismos. Esto indicó que existe una alta diversidad para la región. Con respecto al PCA, se pudieron distinguir 10 agrupaciones. Las variedades que se separaron de la agrupación principal fueron, Altense, Hunapú, DRC3, Texel, A693, 24D, 24C, DRP11 y DRC1. Este resultado indica la alta diferencia entre ellas y por ende su alta diversidad.

Finalmente con los resultados se propuso un paquete de 5 marcadores para un análisis óptimo y eficiente. Todo esto para replicar estudios de alto nivel en condiciones adversas con baja cantidad de recursos. El paquete de 5 marcadores tuvo una correlación de (0.811) con la distancia genética generada con 15 marcadores. Este resultado corrobora la utilidad de utilizar el paquete óptimo en futuros estudios de caracterización genética de frijol en Guatemala.

ABSTRACT

The black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the third most important grain legume in the world, besides being the most important food crop. In Guatemala, we know very little about the genetic diversity of its local varieties. Because of this, it is important to focus studies on population genetics in the different regions of the country. This work tries to determine the genetic structure of the varieties of *Phaseolus vulgaris* in a germplasm collection (UVG-Altiplano Seed Bank) and samples collected on the plateau by using microsatellite markers.

Of the 26 seed samples, 15 came from the UVG-Altiplano Seed Bank and 11 were collected in San Antonio Palopó, Sololá (17 varieties represented). Each sample was analyzed three times, creating an N=74. Polymerase chain reaction (PCR) was used for the amplification of microsatellite markers (15 markers). Allels were visualized with the help of a polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). This method determined their actual number, frequency, polymorphic information content (PIC) (Elston, 2005; Hildebrand *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1999) and genetic distance (Nei, 1972). With the results, it was possible to create matrices and compare the obtained genetic information with each marker. This process was accomplished with a Mantel test of correlation between matrices (1967) and a principal component analysis (PCA). A full group of optimal markers was ultimately found.

The results showed a successful amplification of all the microsatellites, with the exception of BMd08. It was observed that all the markers produced multiple band patterns, being marker BM175 the largest one. BM137 was the marker with the largest number of alleles, followed by BM143 and BM175, since they targeted noncoding regions and had the highest PIC values, in 0.958, 0.939 and 0.937 respectively. Allels conformed to the results reported by Blair *et al.* (2003), Gaitán-Solís *et al.* (2002) and Yu *et al.* (2000), even though for some markers alleles tended to present a higher occurrence of

polymorphism. This was index of the presence of a wide variety in the region. Regarding the PCA, it was possible to distinguish ten groups. The varieties that were separated from the main group were Altense, Hunapú, DRC3, Texel, A693, 24D, 24C, DRP11 and DRC1. This result indicated the wide variety existing among them.

Finally, with these results it was possible to present a group of five markers for an optimal and efficient analysis. All this was made to replicate high-level studies in adverse conditions with low-quantity resources. The five-marker group presented a correlation of (0.811) with the genetic distance produced with 15 markers. This result corroborates the usefulness in using this optimal group of markers in future studies of genetic characterization in beans in Guatemala.

I. INTRODUCCIÓN

El frijol negro común (*Phaseolus vulgaris*) es el tercer grano de leguminosas más importante en el mundo además de ser el cultivo alimentario más importante. Es producido en un área de 18 millones de hectáreas con grandes regiones de producción en América latina y el este y sur de África, siendo en estas regiones uno de los cultivos fundamentales para la seguridad alimentaria y la generación de ingresos (Blair *et al.*, 2009). El frijol cultivado se originó en dos centros de diversidad dando lugar a dos grupos de genes: el acervo genético Mesoamericano (Centroamérica y México) y el Andino (cordillera de Los Andes de Sudamérica) (Blair *et al.*, 2009). Las diferencias entre los pozos genéticos de Mesoamérica y los Andes incluyen el tamaño de la semilla, la morfología de la planta, faseolina (proteína de almacenamiento en la semilla), patrones génicos de los alelos de los diferentes tipos de marcadores moleculares (microsatélites) (Blair *et al.*, 2009).

Los acervos genéticos de las variedades de frijol cultivadas han sido divididos en razas de acuerdo a criterios morfológicos y a su adaptación agro-ecológica (Blair *et al.*, 2009). Cuando se utiliza el término "raza" es para referirse a un grupo de genotipos relacionados en donde los miembros de cada raza tienen características distintivas y específicas el aspecto fisiológico, agronómico, bioquímico y molecular. Esto hace que una raza difiera de otras en las frecuencias alélicas en *locis* de isoenzimas o microsatélites específicamente (Blair *et al.*, 2007) (Díaz y Blair, 2006).

Las seis razas identificadas por Singh *et al.* (1991a) fueron: (1) Durango, (2) Jalisco y (3) Mesoamericana, pertenecientes al acervo genético Mesoamericano. Mientras las razas de (4) Chile, (5) Nueva Granada y (6) Perú pertenecen al acervo genético de los Andes. Luego de esta clasificación la filogenia fue refinada aún más por Beebe *et al.* (2001) para los frijoles mesoamericanos. Proporcionó evidencia molecular para una séptima raza, denominada Guatemala y luego Díaz y Blair (2006) y Blair *et al.* (2006a) propusieron que las razas de Durango y Jalisco se agruparan en una misma ya que existía mucha similitud entre ellas.

Los marcadores moleculares utilizando microsatélites (repeticiones simples de las secuencias en un *loci*) han sido particularmente útiles en el estudio de estructuras dentro de una población debido a su alto nivel de detección de polimorfismos en comparación con otros marcadores dando una mejor resolución en los estudios de diversidad (Díaz y Blair 2006) (Blair *et al.*, 2007). En la actualidad se están implementando métodos de marcaje fluorescente a los microsatélites haciendo que la estimación de las bandas sea mucho más precisa con la ayuda de software de detección considerando esta técnica una de las más precisas entre los marcadores moleculares (Blair *et al.*, 2002). En su defecto puede utilizarse una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) convencional con las mezclas de los marcadores apropiados para dar como resultado un multiplexado o uniplexado (Hayden *et al.*, 2008) según la conveniencia de las condiciones del laboratorio, siendo esta técnica mucho más barata, accesible e igual de útil.

Se ha comprobado que la asociación de rasgos fenotípicos con alelos de microsatélites ha sido práctica en varias especies de cultivos, aunque otros marcadores como SNP (Polimorfismos de un Solo Nucleótido), secuencias de haplotipos o marcadores de alta densidad como DArT (Diversidad de Tecnología de Arreglos) o AFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados) son preferidos para el mapeo de asociación (Rostoks *et al.*, 2006). El número de marcadores utilizados para la asociación genética varía, aunque hay un acuerdo general donde se requerirán más marcadores cuando las especies sean cruces o las muestras de germoplasma posean una amplia diversidad y su desequilibrio de ligamiento sea bajo. El número de marcadores será más bajo para el germoplasma menos diverso, en especies consanguíneas o cuando el desequilibrio de ligamiento es alto (Buckler y Thornsberry, 2002).

En frijol, la evaluación de la diversidad por marcadores de microsatélites ha sido útil para el análisis de la estructura de las razas como se describe en Blair *et al.* (2006a, 2007) y Díaz y Blair (2006), sin embargo hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio para la determinación de las razas locales en las variedades de *Phaseolus vulgaris* del altiplano de Guatemala. Además colecciones de germoplasma como el Banco de Semillas de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) Campus Altiplano, carece de

esta información, siendo ésta una de las únicas colecciones que posee estos individuos en el país.

El objetivo general de este trabajo es determinar la estructura genética de las distintas variedades de *Phaseolus vulgaris* en una colección de germoplasma (Banco de Semillas de UVG Altiplano) utilizando marcadores microsatélites (10 marcadores). Así se podrá evaluar la diversidad genética del germoplasma del Banco de Semillas, observando los polimorfismos que presenten los alelos.

II. ANTECEDENTES

A. Descripción *Phaseolus vulgaris*.

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa de grano que tiene una de las más grandes demandas a nivel mundial siendo cultivado en regiones tropicales como templadas. Éste representa una de las más importantes fuentes de proteínas y calorías en la dieta y especialmente de los habitantes de países tropicales donde complementan los alimentos básicos altos en carbohidratos como maíz, plátano y yuca. Desde el punto de vista de la cantidad consumida, las leguminosas ocupan el segundo lugar, después de los cereales.

1. Descripción botánica de *P. vulgaris*. El frijol es una herbácea leguminosa y su centro de origen es Latinoamérica, específicamente Mesoamérica. Este presenta hojas compuestas de tres folíolos, enteros, ovales, con el ápice agudo; en la base de cada foliolo se encuentra un par de diminutas estípulas (llamadas estípelas). Sus inflorescencias están reunidas en racimos cortos, de color blanco, violeta, rosado (Williams, 1977). Sus frutos son vainas lineares, de hasta 20 cm de largo, a veces cubiertos de pelillos; semillas globosas, variables (Figura No. 1). El frijol pertenece a la familia Fabaceae del orden Fabales.

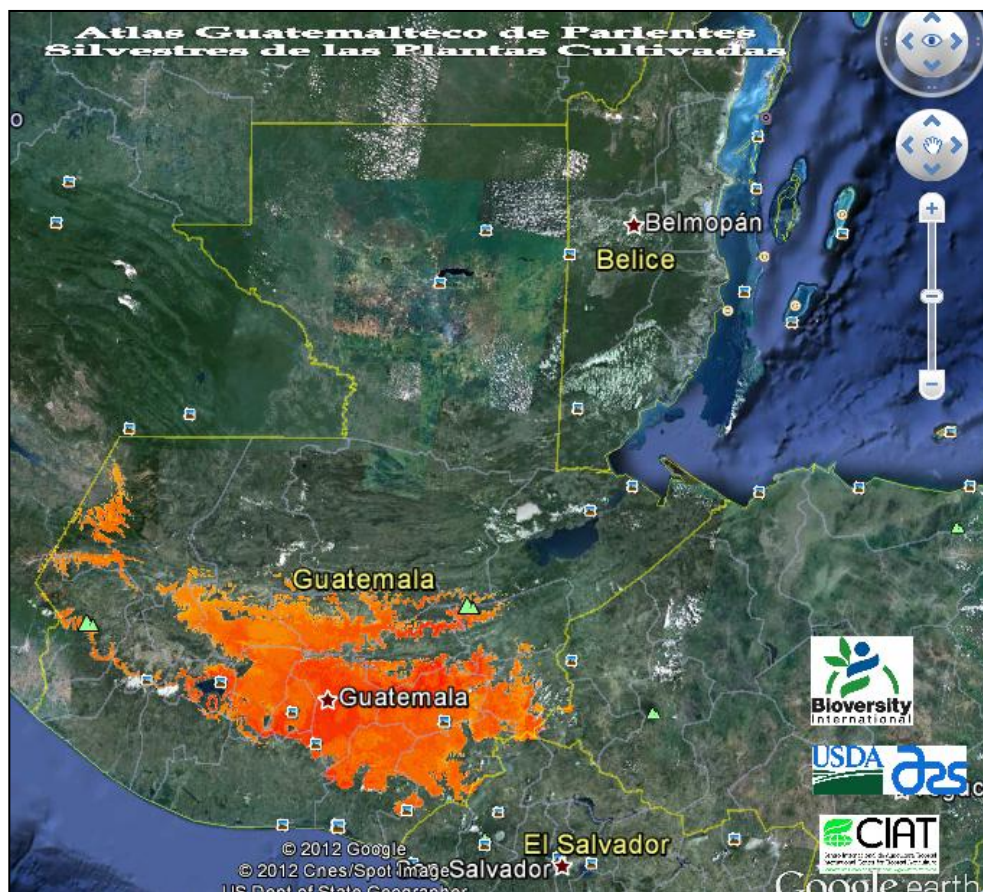
Figura No. 1. Imagen descriptiva de *Phaseolus vulgaris*. Izquierda, dibujo descriptivo. Derecha: fotografía de un individuo silvestre de *P. vulgaris*.



(Azurdia *et al.*, 2011)

a. Distribución y hábitat del género *Phaseolus*. Además del frijol común (*P. vulgaris*), existen cuatro especies domesticadas del género *Phaseolus* (*P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. dumosus* y *P. acutifolius*), todas originarias de Mesoamérica. En Guatemala existen al menos 12 especies de *Phaseolus* (variedades silvestres y domesticadas) (Azurdia *et al.*, 2011). El mayor número de especies silvestres del género están distribuidas en el altiplano central de Guatemala. *P. vulgaris* es una especie que crece en áreas de regeneración secundaria. Se encuentra distribuida en varios departamentos del país. En la zona oriental (Jutiapa, Chiquimula, Santa Rosa y Jalapa), en el centro (Guatemala, Sacatepéquez y Chimaltenango), en el occidente (Quezaltenango, Huehuetenango y Sololá) y en Baja Verapaz y El Progreso (Figura No. 2).

Figura No. 2. Distribución de *Phaseolus vulgaris* en Guatemala. Imagen superior: Distribución del rango potencial de *P. vulgaris* (Azurdia *et al.*, 2011). Imagen inferior: Distribución de las poblaciones silvestres de *P. vulgaris*.



(Azurdia, 1999)

Las recolecciones de *P. vulgaris* silvestre en Guatemala han mostrado que dichas poblaciones están ubicadas en cuatro zonas heterogéneas como son la cuenca del río Motagua (incluye la Sierra de las Minas), la vertiente Pacífica de la cordillera volcánica, la vertiente interior de la cordillera volcánica y la zona Pocomán y Chortíoriental (Azurdia, 1999). En el centro y occidente de Guatemala, el frijol común silvestre se distribuye en el bosque húmedo subtropical templado, caracterizado por un invierno seco marcado, temperatura promedio anual de 16 a 18°C, suelos volcánicos con buen drenaje. Es un bejuco anual de 2-4 m de alto, creciendo en claros naturales de este bosque. En el occidente y altiplano del país, los frijoles silvestres son plantas enredaderas de sotobosque del bosque húmedo montano bajo subtropical (Azurdia, 1999). Las formas silvestres presentan semillas gris-café con rayas oscuras o grises negras o bien totalmente negras, semillas pequeñas (Azurdia, 2006). Sin embargo, es frecuente la presencia de materiales genéticos resultado del escape a partir de material cultivado o bien de introgresión entre silvestre y cultivado, identificándose por color, grano y vaina más grande (Azurdia, 1999).

b. Estado de conservación de *P. vulgaris* La mayoría de poblaciones silvestres de *P. vulgaris* no se encuentran protegidas por áreas de conservación actualmente declaradas haciendo que la conservación *in situ* sea muy difícil. La mayor parte de la diversidad del género se encuentra en el altiplano en donde el Sistema Guatemalteco de Áreas Protegidas (SIGAP) casi no cuenta con áreas para su conservación, siendo las localidades más afectadas la cuenca del Río Motagua en los departamentos de Chimaltenango y El Quiché y los límites de los departamentos de San Marcos y Huehuetenango (Azurdia *et al.*, 2011).

Las poblaciones presentes dentro de áreas protegidas son las del volcán de Agua, volcán de Pacaya y dentro de la Sierra de Las Minas. Por esta razón los esfuerzos de conservación tanto *in situ* como *ex situ* deben enfocarse en dichas regiones y en los centros de mayor diversidad. De acuerdo a la Figura No. 2, en el área mencionada se observa la presencia de más especies, contrastando con las áreas cálidas y húmedas del país. Desde el punto de vista de la conservación *in situ*, esto representa un reto debido a que en el altiplano central no existen áreas de reserva (Azurdia, 1999).

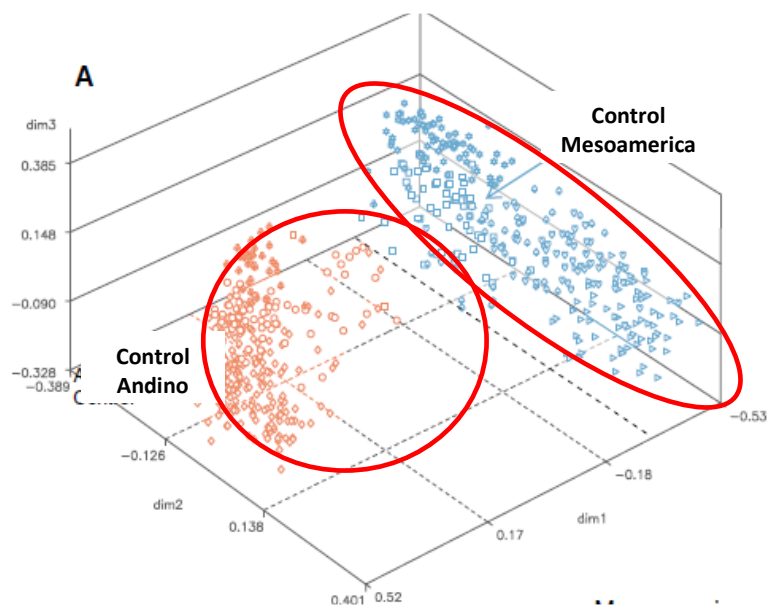
Con respecto a la conservación *ex situ* el germoplasma de las especies de *Phaseolus* silvestres descritas para Guatemala se encuentran conservadas en forma de banco de semillas del ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas) y de UVG-Altiplano además del banco de germoplasma y recursos genéticos del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) en Colombia (Azurdía, 1999). Las amenazas potenciales y reales de las poblaciones de frijol silvestre son la susceptibilidad al fuego y el avance de la frontera agrícola y de pastoreo, especialmente después que el bosque ha sido removido (Azurdía, 1999).

B. Genética poblacional de *P. vulgaris*.

Actualmente se están realizando muchos proyectos de mejoramiento agronómico con *Phaseolus* tanto a nivel nacional como internacional (Blair *et al.*, 2009). Estos programas están abarcando aspectos biotecnológicos. Desde hace dos décadas se ha tratado de incorporar genes de interés para la creación de cultivos recombinantes, pero el proceso de utilización del germoplasma debe ir acompañando de conservación. Por ello es importante contar con la información ecológica de la especie, acervos genéticos (polimorfismos, frecuencias alélicas, etc.) para estudiar la dinámica y la genética poblacional (Azurdía, 1999).

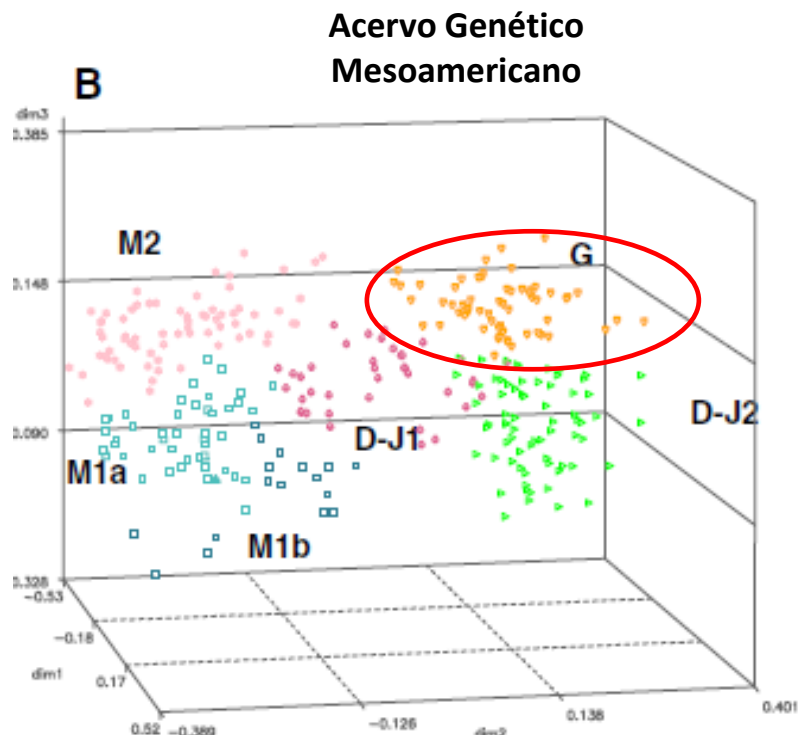
1. Estudios de genética de poblaciones de *P. vulgaris* a nivel Latinoamericano. Blair *et al.* (2009) determinaron los valores de similitud genética de la proporción de alelos compartidos entre las variedades mesoamericanas y andinas. La subdivisión más evidente es la de los dos principales pozos genéticos de frijol siendo ésta la Andina y Mesoamericana (Figura No. 3). Dentro de cada grupo se subdividió en varios subgrupos. Cinco de los subgrupos correspondieron a las divisiones dentro del acervo genético Mesoamericano, mientras que cuatro de los subgrupos se encuentran en el acervo genético de los Andes. En los subgrupos del acervo genético Mesoamericano Blair *et al.* (2009) encontraron a la raza Mesoamérica (subgrupos de M1 y M2), la Durango-Jalisco complejo (subgrupos D-J1 y J2-D) y un tercer grupo en representación de razas de Guatemala (subgrupo de G) (Figura No. 4).

Figura No. 3. Análisis tridimensional de componentes principales basado en 604 genotipos de frijol común de la colección núcleo de germoplasma del CIAT.



(Blair *et al.*, 2009)

Figura No. 4. Análisis tridimensional de componentes principales (PCA) de los genotipos mesoamericanos de frijol. Puede observarse como el acervo genético mesoamericano se divide en los subgrupos D-J1 y D-J2 (Complejo Durango-Jalisco), subgrupo de G (Guatemala) y subgrupos M1a, M1b y M2 para la raza Mesoamericana.



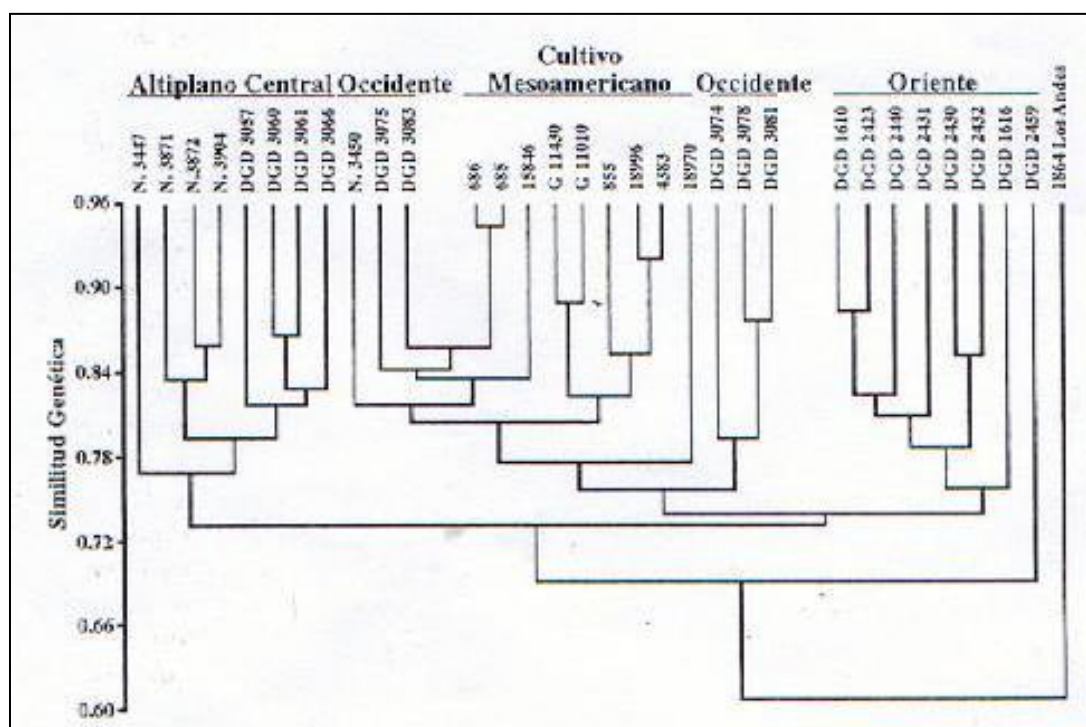
(Blair *et al.*, 2009)

El subgrupo de la raza de Guatemala está conformado por 61 genotipos que fueron predominantemente de tipo enredadera en su mayoría. Los miembros de la raza Mesoamérica provienen de países que son centros de diversidad primaria y secundaria indicando que sus variedades son muy distintas entre sí.

2. Inicios de estudios en genética de poblaciones de frijol en Guatemala. Los primeros trabajos bioquímicos y moleculares para la descripción de *P. vulgaris* en Guatemala fueron desarrollados por Delgado (1985), Debouck (1986), Debouck, Azurdia y Martínez (1996) y Azurdia (1999), determinando que en el país se cuenta con 10 especies del género, cinco de ellas cultivadas, mientras que las restantes se encuentran únicamente en forma silvestre. Se tiene la sospecha que existen, por lo menos, cuatro especies nuevas (Azurdia, 1999).

Schmit *et al.* (1993) estudiaron ADN codificante en especies silvestres de *Phaseolus* y encontraron que mediante el análisis de mutaciones de punto el material procedente de la región central de Guatemala era diferente al de la región oriental. Esto demostró que el altiplano central de Guatemala puede ser un área específica de diversidad. Azurdia (1994) aplicando la RAPDs con 23 marcadores polimórficos y un total de 93 bandas, mostró que los materiales silvestres de origen guatemalteco se diferencian de acuerdo a su región de procedencia. Así, una población está constituida por aquellos provenientes del altiplano central y el otro del oriente del país.

Figura No. 5. Filogenia mostrando la similitud genética entre los materiales genéticos de *Phaseolus vulgaris* silvestre de origen guatemalteco y cultivos mesoamericanos.

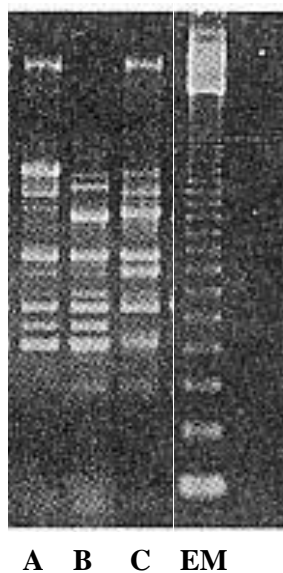


(Azurdia *et al.*, 1999)

Tohme *et al.* (1996) usando la técnica denominada AFLPs en ADN genómico, encontraron que las accesiones de origen guatemalteco (11 en total) representan un grupo de diversidad interesante, el cual es distinto de los materiales silvestres de origen mexicano, algo no reportado previamente. Luego Azurdia *et al.* (1999) condujeron estudios de isoenzimas dirigidas a faseolinas y AFLPs en *Phaseolus* silvestre. Para el

caso del análisis de AFLPs se determinaron en total 163 bandas amplificadas definiendo cinco grupos: (1) Andino, (2) Altiplano Central de Guatemala, (3) Huehuetenango y Quezaltenango, (4) Oriente de Guatemala y (5) Región Central o Mesoamericano (Figura No. 5). Esto indicó que las distintas condiciones eco-fisiográficas en los cultivos guatemaltecos afectan directamente en su genotipo. Mediante el uso de RAPDs (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico) Azurdia (1994) demostró que se pueden encontrar diferencias mayores entre los materiales genéticos en estado silvestre y los materiales cultivados (Figura No. 6).

Figura No. 6. RAPD's en especies de **A**= *P. vulgaris* silvestre; **B**= *P. vulgaris* cultivado de origen Mesoamericano; **C**= *P. vulgaris* cultivado de origen Andino; **EM**= Escalera molecular.



(Azurdia, 1994)

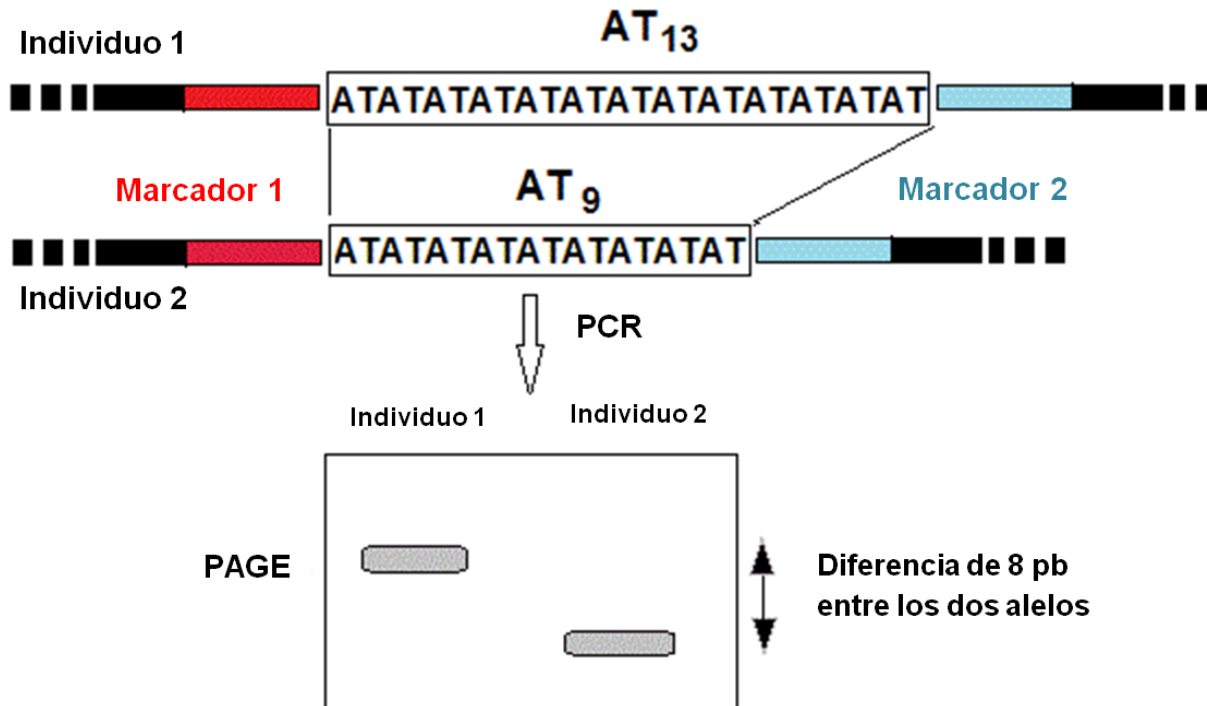
C. Análisis de la diversidad genética por medio de marcadores microsatélites (SSR's).

Los microsatélites son marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigidos a secuencias de repetición de dos, tres o cuatro pares de bases los cuales se repiten varias veces en el genoma. Estos marcadores han sido utilizados para la descripción de la estructura genética de poblaciones de muchos organismos, especialmente para plantas.

1. Descripción de la utilización de microsatélites. En las últimas décadas los microsatélites se han utilizado para estudiar la biodiversidad de la mayoría de plantas cultivadas como maíz (Freitas *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2011), arroz (Cho *et al.*, 2000), sorgo (Schloss *et al.*, 2002) entre otros. La utilidad de estos marcadores es que detectan la longitud de los distintos polimorfismos en *loci* específicos. Otra variable que puede afectar a la variabilidad de estos es si las repeticiones se encuentran dentro de un gen o cerca del mismo (Blair *et al.*, 2006). Los marcadores son dirigidos a Repeticiones de Secuencias Simples (SSR's) (Figura No. 7) que son áreas dentro de un *locus* que están expuestas a altas tasas de mutación. Se crean cebadores que reconocen estas repeticiones y dependiendo de los tamaños de las mismas, estos generarán productos de distintos tamaños que indican a los distintos alelos del individuo.

Debido a la alta tasa de variabilidad y polimorfismos de los SSR's, estos son ideales para el mapeo génico y la caracterización de la diversidad en muchas especies a niveles interespecíficos e intraespecíficos (Matus y Hayes, 2002). Los marcadores microsatélites ya han sido desarrollados para frijol (Yu *et al.*, 2000, Blair *et al.*, 2003, Gaitán-Solís *et al.*, 2003) y gracias a ellos se han estudiado los dos acervos genéticos principales, andino y mesoamericano. Dentro del acervo Mesoamericano, se encuentra la variedad Guatemala que ha presentado mayores diferencias. Es por ello que estudios con SSR's son necesarios para profundizar sobre la rica diversidad del país.

Figura No. 7. Descripción del funcionamiento de los marcadores microsatélites (SSR's).



2. Índice de Información de Contenido Polimórfico (PIC). El Índice de Información de Contenido Polimórfico (PIC) puede ser utilizado para la evaluación de marcadores con respecto al número de alelos que éstos muestran. Éste indica cuáles de los marcadores son más polimórficos y podrían ser utilizados en mapeo génico, análisis filogenético y asociación de genes (Elston, 2005; Hildebrand *et al*, 1992; Guo *et al*, 1999). Este valor es definido por la probabilidad que el genotipo al cual está dirigido el marcador sea heredado a la siguiente generación. Por lo tanto, a mayor cantidad de alelos, mayor será el valor del PIC (Elston, 2005) (Figura No. 8).

Figura No. 8. Fórmula para la obtención del Contenido de la Información de Polimórfica (PIC). Donde P_i es la frecuencia alélica, n , el número de alelos del marcador.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

3. Análisis de Componentes Principales (PCA). El análisis de componentes principales, siendo un análisis multivariado, ha sido muy utilizado para el estudio de

marcadores moleculares por su eficiencia en brindar información a partir de la manera en la cual se agrupan los datos (alelos). Esto se debe a su habilidad de sintetizar información genética multivariada en pocas variables (Jombart *et al.*, 2009). Este tipo de análisis son exploratorios en donde no se requieren fuertes asunciones. El objetivo de este análisis es proveer de manera simplificada y significativa una perspectiva de la información compleja que muchas veces es imposible de percibir ordenando las variables según sus componentes en común. Es por ello que el PCA se ha utilizado en estudios de genética para describir de mejor manera las distancias genéticas de individuos dentro y fuera de su población.

III. JUSTIFICACIÓN

Para los guatemaltecos, especialmente para aquellos de escasos recursos, el frijol es importante para la dieta, aún cuando es consumido en todos los estratos sociales y económicos del país. La importancia de utilizar el frijol como alimento cotidiano reside en que ésta leguminosa contiene entre el 15 y 27% proteína (Azurdia *et al.*, 2009). Por otro lado el frijol en el país, es uno de los mayores cultivos a gran como a pequeña escala. En Guatemala los minifundios (fincas menores de 1 Mz) aportan el 43% la producción total, las fincas familiares (fincas de 10 a 64 Mz) un 41.1% y las multifamiliares medianas (fincas de 1 a 20 caballerías) y grandes (fincas mayores a 20 caballerías) el 15.9%. Además el frijol negro aportó al PIB (Producto Interno Bruto) en 2010 el 1.3%, dejando ganancias de US\$ 7,610,380.00 en su importación y US\$ 808,271.00 en su exportación. Este también generó empleo para 14,685,000 jornales por año (2009) (MAGA, 2011). Es por ello que realizar estudios con frijol es de suma importancia al país.

Con respecto al frijol como recurso genético, en Guatemala se sabe poco de la diversidad genética de las razas en las variedades locales del altiplano central, siendo esta zona un foco de diversidad para el cultivo. El material genético de Guatemala presenta diferencias con respecto a todo el acervo genético mesoamericano indicando alelos diferentes (Blair *et al.*, 2009). Además, la biodiversidad genética de los grupos del altiplano central presenta características únicas (Azurdia *et al.*, 2009). Los últimos estudios genéticos de frijol en el país fueron realizados por Delgado (1985), Debouck (1986), Debouck, Azurdia y Martínez (1996) y Azurdia (1999) hace más de una década. Es de suma importancia enfocar esfuerzos para actualizar la información de la diversidad genética del cultivo. Por lo tanto este trabajo podrá ayudar brindando información para la generación de planes de conservación en donde se tome en cuenta la biodiversidad genética de las variedades locales de frijol y específicamente las del altiplano guatemalteco.

IV. OBJETIVOS

A. General

- Determinar la estructura genética de las distintas variedades de *Phaseolus vulgaris* de la colección de germoplasma del Banco de Semillas de UVG Altiplano utilizando 15 marcadores microsatélites.

B. Específicos

- Evaluar la diversidad genética de un grupo de variedades de *P. vulgaris* pertenecientes al germoplasma del Banco de Semillas UVG Altiplano, evaluando los polimorfismos de un conjunto de microsatélites de ADN codificante y microsatélites no codificantes.
- Optimizar un PCR-SSR's y proponer un paquete de marcadores microsatélites eficiente para estudiar la diversidad genética de variedades locales de *P. vulgaris*.
- Determinar la distancia genética entre los alelos de las distintas variedades de *P. vulgaris*, compararlas entre sí y demostrar si existe una diferencia significativa con ayuda de una prueba de Mantel.
- Determinar la estructura genética entre los subgrupos de *P. vulgaris* de las distintas regiones que componen el altiplano del país por medio de un análisis de componentes principales (PCA).

V. HIPÓTESIS

Hipótesis nula: No existe una correlación entre el número de alelos por *locus* en las variedades de *P. vulgaris* y el índice de contenido de información polimórfica por marcador utilizado.

Hipótesis de trabajo: Existe una correlación entre el número de alelos por *locus* en las variedades de *P. vulgaris* y el índice de contenido de información polimórfica por marcador utilizado.

VI. METODOLOGÍA

A. Caracterización de *P. vulgaris* con marcadores SSR's.

1. Selección de muestras. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Protección Vegetal (LPV) del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (CEAA) del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG). Se seleccionaron 26 muestras de semillas, 15 de éstas se obtuvieron del banco de Semillas de UVG- Altiplano, y 11 fueron colectadas de San Antonio Palopó, Sololá. Estas muestras se seleccionaron con base en las distintas variedades de frijol encontradas en la región (Cuadro No. 1). Todas las muestras se trabajaron en triplicado formando un N=74, estando en este 17 variedades representadas.

Cuadro. No. 1. Muestras de *P. vulgaris* seleccionadas para el análisis de diversidad a partir de SSR's.

No.	ID	Variedad	Procedencia	Fecha de Colecta
1	166	Arbustivo	San Antonio Palopó	28/08/2012
2	167	Arbustivo	San Antonio Palopó	28/08/2012
3	168	Arbustivo	San Antonio Palopó	28/08/2012
4	169	Arbustivo	San Antonio Palopó	28/08/2012
5	170	Arbustivo	San Antonio Palopó	28/08/2012
6	171	Arbustivo	San Antonio Palopó	28/08/2012
7	172	Trepador	San Antonio Palopó	28/08/2012
8	173	Trepador	San Antonio Palopó	28/08/2012
9	174	Trepador	San Antonio Palopó	28/08/2012
10	175	Trepador	San Antonio Palopó	28/08/2012
11	176	Trepador	San Antonio Palopó	28/08/2012
12	177	DRP-11	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
13	178	DRP-12	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
14	179	DRP-25	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
15	180	DRP-40	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
16	181	DRP-52	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
17	182	DRC-1	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
18	183	24C	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
19	184	24D	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
20	185	69-3	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
21	187	98-5	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
22	188	DRC-3	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
23	189	Texel	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
24	190	Altense	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
25	191	Hunapú	Banco de Semillas UVG	05/09/2012
26	192	Anita	Banco de Semillas UVG	05/09/2012

2. Extracción de ADN. Se pusieron a germinar las semillas y de cada plántula se tomó una muestra de la hoja (3-4 discos de material vegetal de 1 cm). Todo el material escogido se maceró con nitrógeno líquido. El ADN se obtuvo a partir del método CTAB propuesto por Murray y Thompson (1980). El protocolo de extracción especificado se describe en el apéndice A. Todas las muestras se trabajaron en triplicado.

3. Cuantificación de ADN y estimación de la Integridad. Se seleccionaron 10 muestras extraídas al azar y se estimó la integridad del ADN extraído. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1% en una solución amortiguadora de TAE 1X (apéndice B). Se cargaron 5 ul de ADN en cada pozo, mezclado con 1 ul de colorante de carga. La electroforesis se corrió durante 45 minutos a 85 voltios. Los geles fueron visualizados con un transiluminador UV (UVP 6.4" LCD) con GelRed® (Biotium).

Al obtener una integridad satisfactoria se llevó a cabo la cuantificación de ADN y la estimación de la pureza. Esto se realizó por medio de un espectrofotómetro (Biophotometer plus, Eppendorf). Se llevaron a cabo diluciones de 1:100 de ADN en agua destilada estéril. Con los resultados de las cuantificaciones se llevaron a cabo diluciones de ADN con una concentración final de 75 ng/ul. Se calculó el intervalo de confianza para las concentraciones de ADN y las purezas obtenidas utilizando la T de Student para una sola variable. Ésta se llevó a cabo en el programa estadístico R (versión 3.0.2).

4. Selección de marcadores para *P. vulgaris*. Se amplificaron 15 fragmentos de microsatélites cubriendo los 11 cromosomas del genoma del frijol de acuerdo al mapa realizado por Blair *et al.* (2009). Los marcadores fueron diseñados según Yu *et al.* (2000), Gaitán-Solís *et al.* (2002) y Blair *et al.* (2003). La selección de los marcadores se llevó a cabo por medio del número de alelos reportados para el acervo genético mesoamericano de frijol en los estudios de Yu *et al.* (2000), Blair *et al.* (2003) y Gaitán-Solís *et al.* (2008). Esto también fue respaldado por los genes específicos con los que algunos de estos microsatélites están asociados (Cuadro No. 3.).

A continuación se presenta el listado de los marcadores utilizados junto con su descripción, secuencia y tamaño del fragmento esperado. En el apéndice C se presenta la

ubicación de los microsatélites en el genoma del frijol (Yu *et al.*, 2000, Blair *et al.*, 2003, Gaitán-Solís *et al.*, 2003).

Cuadro No. 2. Descripción de los marcadores a utilizar, junto con su nombre, nombre del gen a cual va dirigido, secuencia del microsatélite, número de alelos del mismo y la secuencia del marcador.

Marcador (Genbank)	Nombre del transcrito	Frag. (pb)	No. Alelos	Cromo soma	Secuencias (F, R)	Fuente
PV-at001 (U18791)	Precursor de la glucoproteína rica en hidroxiprolina	239	42	11	gggagggtagggaagcagtg gcgaaccacgttcgatgaatga	Yu <i>et al.</i> , 2000
BMd15 (K03288)	Fito-hemaglutinina	166	10	4	ttgccatcgttgcttaattg ttggagggaagccatgatgc	Blair <i>et al.</i> , 2003
PV-ctt001 (J05555)	Proteína quinasa 1	152	9	4	ttcatggatggtggaggaaacag tgccaccacagctttcctc	Yu <i>et al.</i> , 2000
BMd08 (U7053)	Giberelina Oxidasa 20	176	7	NA	ttcatctctctcccgaactt cttttggctgagacatggt	Blair <i>et al.</i> , 2003
BMd20 (X74919)	Endoquitinasa	123	6	5	gttgccaccggtgataatct gtgaggcaagaagcctcaa	Blair <i>et al.</i> , 2003
BMd01 (X96999)	Gen Ypr10	165	6	3	caaatcgcaacacctcaca gtcggagccatcatctgtt	Blair <i>et al.</i> , 2003
PV-cct001 (X79722)	Glicerol 3 SN fosfatasa aciltransferasa	149	6	NA	caaatcgcaacacctcaca gtcggagccatcatctgtt	Yu <i>et al.</i> , 2000
BMd25 (L47221)	Factor 5 de iniciación eucariótico	118	NA	8	gcagatcgctactcaca cgttgacgagaagcatcaag	Blair <i>et al.</i> , 2003
PV-at007 (X80051)	Enzima málica dependiente de NADP	192	10	9	agttaaattatacagggttagctaaatc cattccttcacacattcaccg	Yu <i>et al.</i> , 2000
BM200 (AF483897)	-	221	51	1	tggtggtgttatgggagaag attgtctctgtctattcctccac	Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2002
BM137 (AF483855)	-	155	34	6	cgcttactcactgtacgcacg ccgtatccgagcaccgtaac	Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2003
BM143 (AF483861)	-	143	24	2	gggaaatgaacagaggaaa atgttgggaacttttagtgtg	Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2005
BM175 (AF483886)	-	170	17	5	caacagttaaggctgcaaat ccactcttagcatcaactgga	Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2007
BM183 (AF483888)	-	149	17	7	ctcaaatctattcactggtcagc tcttacagccttgacagacac	Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2008
GATS11	-	306	7	10	cacattggtgctagtgtcgg gaacctgcaaagcaagagac	Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2008

Cuadro No. 3. Descripción de los genes a los cuales los microsatélites están asociados.

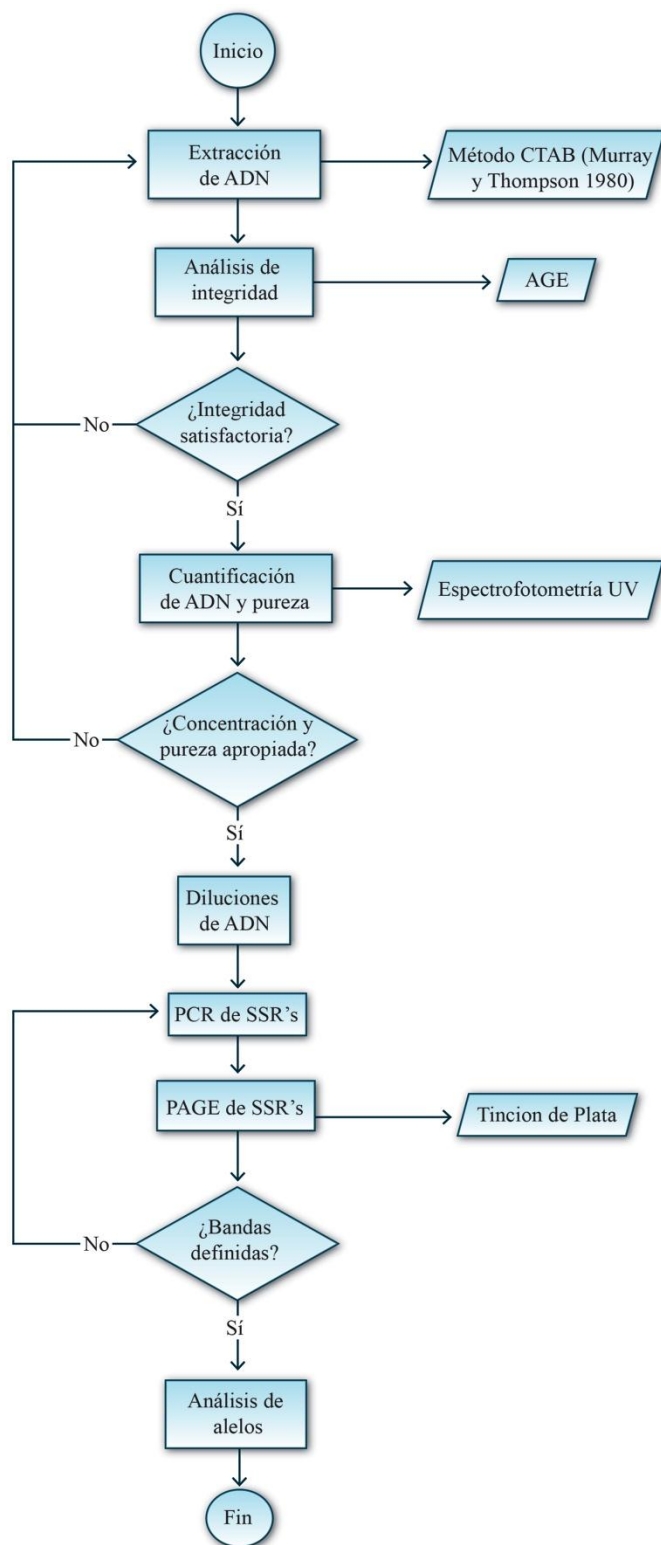
Marcador (Genbank)	Nombre del transcrito	Importancia
PV-at001 (U18791)	Precursor de la glucoproteína rica en hidroxiprolina	HRGP juegan un papel importante en la embriogénesis de la célula vegetal tanto en su forma, en el citoesqueleto como también en la pared celular (Hall y Cannon, 2002; Wegenhart <i>et al.</i> , 2006; Xu <i>et al.</i> , 2011). Entre ellas se encuentran extensinas, las cuales son un pentapéptido de Ser-(Hyp) ⁴ con abundancia de residuos de Tyr, Lys, His y Val (Hall y Cannon, 2002). Estas son importantes en darle la estructura secundaria y terciaria a muchas proteínas, en donde Ser-(Hyp) ⁴ contribuye a la rigidez molecular y los residuos de Tyr permiten el entrecruzamiento de Isoditrosina (responsable de la insolubilidad de la pared celular vegetal) (Fry, 1982; Hall y Cannon, 2002). Las HRGP juegan un papel importante en el aislamiento del hongos en donde estos no pueden penetrar la pared celular (Templeton <i>et al.</i> , 1990; Showalter, 1985). También se encuentran los arabinogalactanos los cuales son uno de los componentes más abundantes en la pared celular (Van Holst y Klis, 1981) el cual tiene propiedad de adhesión celular.
BMd15 (K03288)	Fito-hemaglutinina	La fitohemaglutinina es una lectina tóxica. Esta se encuentra en las leguminosas especialmente en el género <i>Phaseolus</i> (Nasi <i>et al.</i> , 2009). Induce la proliferación celular en la célula vegetal y por ello es utilizado como mitógeno en medicina. Se ha utilizado para la lucha contra el cáncer y VIH. Además de tener un papel nutricional importante en la dieta humana para la síntesis de dinitroclorobenceno (Cunningham-Rundles, 1982).
PV-ctt001 (J05555)	Proteína quinasa 1	La Proteína-1-Kinasa está relacionada con la embriogénesis somática (Karlova <i>et al.</i> , 2006).
BMd08 (U7053)	Giberelina Oxidasa 20	La Giberelina-20-oxidasa media la interacción del ácido abscisión y los brasinosteroides en el control de la floración de las plantas (Domagalska <i>et al.</i> , 2010). Media también la proliferación celular (Ruiz-Rivero <i>et al.</i> , 2007).
BMd20 (X74919)	Endoquitinasa	Catalizan la hidrólisis de polímeros de quitina y quitodextrina típica en la defensa contra hongos (actividad antifúngica) (Ye y Ng, 2002; Dayler <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2005).
BMd01 (X96999)	Gen Ypr10	Familia génica PR (pathogenesis-related) en <i>Phaseolus</i> , se ha visto que estos genes traducen proteínas alérgicas. Estas están expresadas en las raíces de los frijoles. Estos genes se utilizan como marcadores de senectud y enfermedad (Walter <i>et al.</i> , 1996).
PV-cct001 (X79722)	Glicerol 3 SN fosfatasa aciltransferasa	El compuesto cataliza la producción de ácido lisofosfatídico (LPA) que es un intermediario importante en la formación de diferentes tipos de lípidos acílicos (lipid polyesters, almacenamiento y creación de membranas lipídicas). Tiene bastante importancia en el desarrollo de la planta y la síntesis de glicerolípidos (Chen <i>et al.</i> , 2011)
BMd25 (L47221)	Factor 5 de iniciación eucariótico	Se encargan de la traducción eucariota que es el proceso por el cual el ARN mensajero se traduce en proteínas. Este es un gen de mantenimiento (house-keeping gene) (López y Puigdoménech, 1999). También se ha encontrado en algunas plantas que el IF5A media el desarrollo dependiendo de la exposición al ambiente (Chou, 2003).
PV-at007 (X80051)	Enzima málica dependiente de NADP	Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa de malato y piruvato produciendo CO ₂ y NADPH. Se ha descubierto que en frijol ayuda a la defensa contra parásitos en tejido dañado (Schaaf <i>et al.</i> , 1995).

5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para SSR's de *P. vulgaris*. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 12.5 ul conteniendo 75 ng/ul de DNA genómico, 0.2 mM de cada uno de los marcadores, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's total y 1 unidad de polimerasa Taq en 1X buffer de PCR [10 mM de Tris-HCl (pH 7,2), 50 mM de KCl]. La receta de PCR se describe en el apéndice B. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante un programa *touchdown* en el cual la temperatura de anillamiento fue de 59° a 55° (Cuadro No. 4.).

Cuadro No. 4. Programa utilizado para la amplificación de los microsatélites.

Paso	T (C°) - t
1	94° – 4 min.
2	94° – 40 seg.
3	60° – 1 min.
4	72° – 1 min
5	94° – 40 seg.
6	59° – 1 min
7	72° – 1 min
8	Ir al paso 5 (9 veces)
9	94° – 40 seg.
10	55° – 1 min.
11	72° – 1 min.
12	Ir al paso 9 (20 veces)
13	72° – 5 min.
14	20° – 15 min
15	Fin

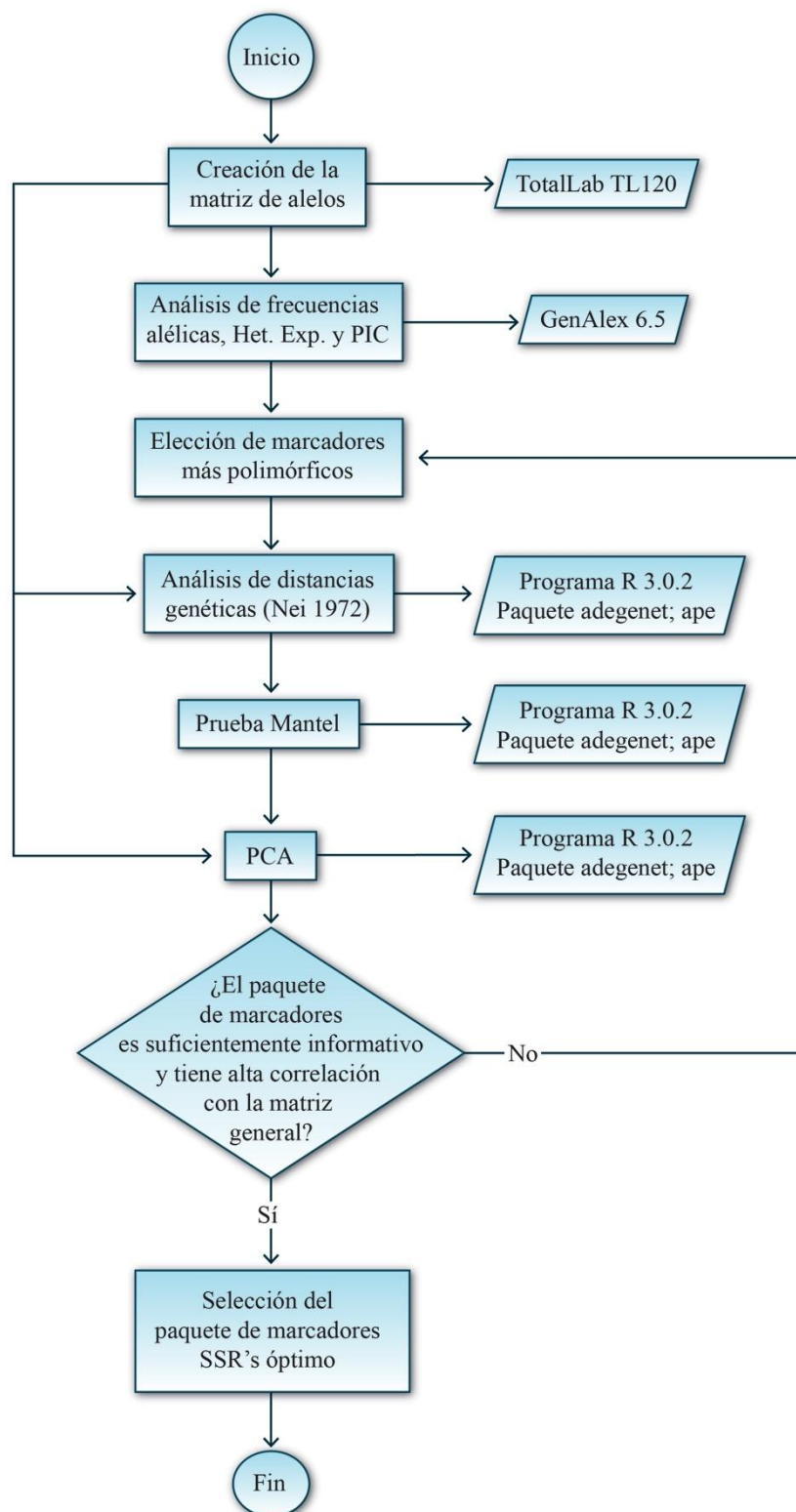
6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) del producto amplificado. Los productos de PCR de los SSR's fueron visualizados en una electroforesis en un gel de poliacrilamida (PAGE) al 20% (37.5 : 2.5 acrilamida: bis-acrilamida) a 15 miliamperios constantes durante 1 hora y 25 minutos. Los geles fueron teñidos con una solución de plata. Como referencia se utilizaron dos escaleras de peso molecular de 1Kb (100 bp PROMEGA y 50 bp PROMEGA). El protocolo de la electroforesis en geles de poliacrilamida es descrito en el apéndice A.

Figura No. 9. Diagrama de flujo del trabajo de laboratorio.

B. Análisis de los datos

La determinación del peso de los fragmentos de amplificación en los geles de poliacrilamida se llevó a cabo en el programa TotalLab TL120 (Nonlinear dynamics) pudiéndose construir una matriz con los distintos alelos de cada marcador. Se determinó el número efectivo de alelos, la frecuencia de los mismos, el contenido de información de polimorfismos (PIC) (Elston, 2005; Hildebrand *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1999) y la heterocigosidad mediante el programa GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse 2012). A partir de estos datos se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) realizado en el programa estadístico R (versión 3.0.2) utilizando el paquete *adgenet* (Jombart, 2008). Además se realizó una correlación de Pearson entre el PIC y el número de alelos.

Con estos datos se determinaron los marcadores más polimórficos y se propusieron paquetes de marcadores para facilitar la estandarización del análisis. Se obtuvieron las distancias genéticas (Nei, 1972) de la matriz general y de las matrices generadas con los paquetes de marcadores. Luego se realizó una prueba de correlación de matrices de Mantel (1967) de 999 permutaciones que comparó las distancias genéticas de los paquetes de marcadores contra la de la matriz general. Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) de cada uno de estos paquetes, estos también se compararon con el PCA de la matriz general. Este análisis se llevó a cabo en el programa estadístico R. Finalmente se pudo determinar el paquete de marcadores óptimo.

Figura No. 10. Diagrama de flujo del análisis de datos.

VII. RESULTADOS

Siguiendo los objetivos del presente estudio junto a la metodología propuesta, se obtuvieron los siguientes resultados:

A. Extracción de ADN

Se obtuvo ADN genómico íntegro (con poca cola de barrido en la prueba de electroforesis de agarosa) de cada individuo. Éste presentó una concentración media de 1486.47 ng/ul \pm 695.90 y con una pureza de 2.24 \pm 0.16 (razón A₂₆₀/A₂₈₀). Los resultados de las cuantificaciones para cada una de las muestras se presentan en el apéndice E. Se pudo observar que las muestras con mayor concentración de ADN fueron las de las variedades Trepador (\approx 3000 ng/ul), Texel (\approx 1500 ng/ul), Altense (\approx 2000 ng/ul) y Hunapú (\approx 2000 ng/ul).

B. Caracterización de los marcadores microsatélites

Se probó un total de 15 marcadores microsatélites de los cuales, seis estaban dirigidos a regiones no codificantes de ADN. Estos fueron descritos por Gaitán-Solís *et al.* (2006). Los otros nueve estaban dirigidos a regiones codificantes para genes específicos. Cinco de estos fueron descritos por Blair *et al.* (2003) y cuatro por Yu *et al.* (2000). El marcador BMd08 descrito por Blair *et al.* (2003) fue el único que no fue tomado en cuenta para este estudio por su inconsistencia y bajo porcentaje de amplificación. Las secuencias más comunes de microsatélites fueron de dos pares de bases, CT, TA y GA (Cuadro No. 5). La media de repeticiones de los microsatélites evaluados fue 14.26 \pm 11.16.

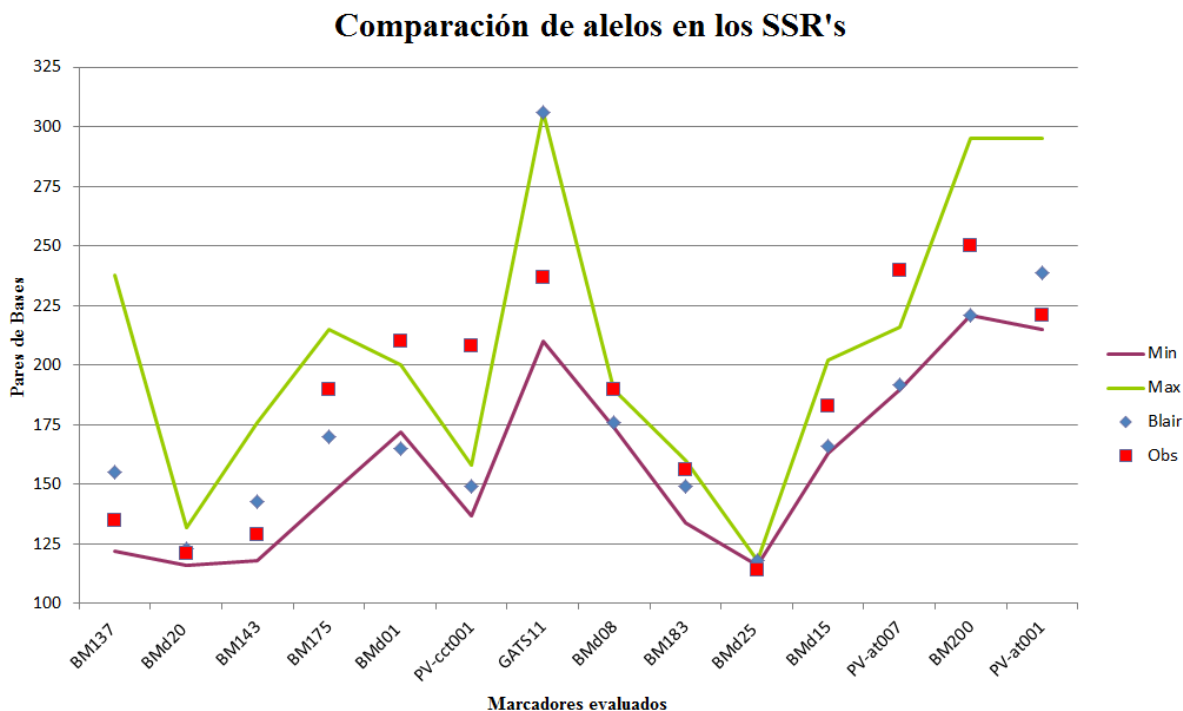
Todos los microsatélites amplificaron y sus fragmentos mostraron diferentes longitudes de tamaño (pares de bases) mostrando así el número de alelos para cada variedad. Por otro lado todos los microsatélites exceptuando BM143 y BMd01, produjeron múltiples patrones de bandas siendo el marcador BM175 el más diverso. Los marcadores asociados a genes específicos como aquellos que no, presentaron la misma tasa de polimorfismos. Todos los microsatélites probados presentaron un promedio de 33 alelos con alta información polimórfica (Cuadro No. 5).

Cuadro No. 5 Información alélica para cada uno de los marcadores evaluados según el *locus*.

ID	Marcador	Sec. (Rep.)	pb	No. Alelos	Het. Exp.	Het. Obs.	PIC
A	BM200	AG (10)	250	27	0.751	0.000	0.75
B	BM143	GA (35)	129	42	0.939	0.095	0.939
C	BMd01	AT (9)	210	39	0.936	0.054	0.936
E	BM175	AT (5) / GA (19)	190	42	0.937	0.149	0.937
F	BM137	CT (33)	135	47	0.958	0.541	0.958
G	BM183	TC (24)	156	39	0.908	0.203	0.907
H	BMd25	GAT (6)	114	21	0.905	0.014	0.905
I	PV-at007	AT (12)	240	25	0.785	0.000	0.784
J	GATS11	CT (14)	237	32	0.930	0.000	0.929
K	PV-at001	TA (22)	221	15	0.422	0.000	0.422
L	BMd15	AG (6)	183	28	0.873	0.000	0.872
M	BMd08	CT (7)	190	34	0.913	0.216	0.912
N	BMd20	TA (5)	121	32	0.942	0.081	0.942
O	PV-cct001	CTT (7)	208	39	0.937	0.000	0.936

Algunos de los tamaños de los alelos concordaron con los reportados por Blair *et al.* (2003), Gaitán-Solís *et al.* (2002) y Yu *et al.* (2000) mas se observó que los alelos más comunes tendieron a tener más pares de bases que el de la media reportada sin salirse del rango de alelos mínimos y máximos (apéndice E). Los fragmentos observados para los marcadores PV-cct001, BMd01, PV-at007 y BMd25 no han sido reportados, todos exceptuando el último, superan el rango de pares de bases esperadas (Figura No. 11). Todos estos fueron marcadores asociados a la codificación de genes específicos.

Figura No. 11. Comparación del tamaño alélico (pb) reportado y observado de los distintos microsatélites. Se observa el valor reportado (rombo) y el valor observado (cuadro) para cada microsatélite. Además se muestra el límite superior e inferior del número de alelos esperados para cada marcador.



El marcador con el mayor número de alelos fue BM137 (47) seguido de BM143 (42) y BM175 (42), siendo estos dirigidos a regiones no codificantes y teniendo los valores del PIC más elevados entre 0.937 y 0.958 (Cuadro No. 5). Todos los marcadores, exceptuando BM200 y PV-at001, mostraron un número mayor de alelos y PIC que el reportado en la literatura. La correlación entre el número de alelos por *locus* y el índice de contenido de información polimórfica fue significativa con un valor $R = 0.7561$ ($t = 3.88$, $P = 0.001$). Con respecto a los SSR's dirigidos a genes específicos, se pudo encontrar que los marcadores más polimórficos estuvieron asociados a genes relacionados con la producción de endoquitinasa (BMd20), Ypr10 (BMd01) y Glicerol 3 SN fosfatasa aciltransferasa (PV-cct001).

Se realizó un análisis de componentes principales con los alelos obtenidos para cada individuo de las distintas variedades (Figuras No. 12 y 13). Se pudieron distinguir

Figura No. 12. PCA utilizando la información de los 14 marcadores utilizados (visualización desde los ejes 2 y 3).

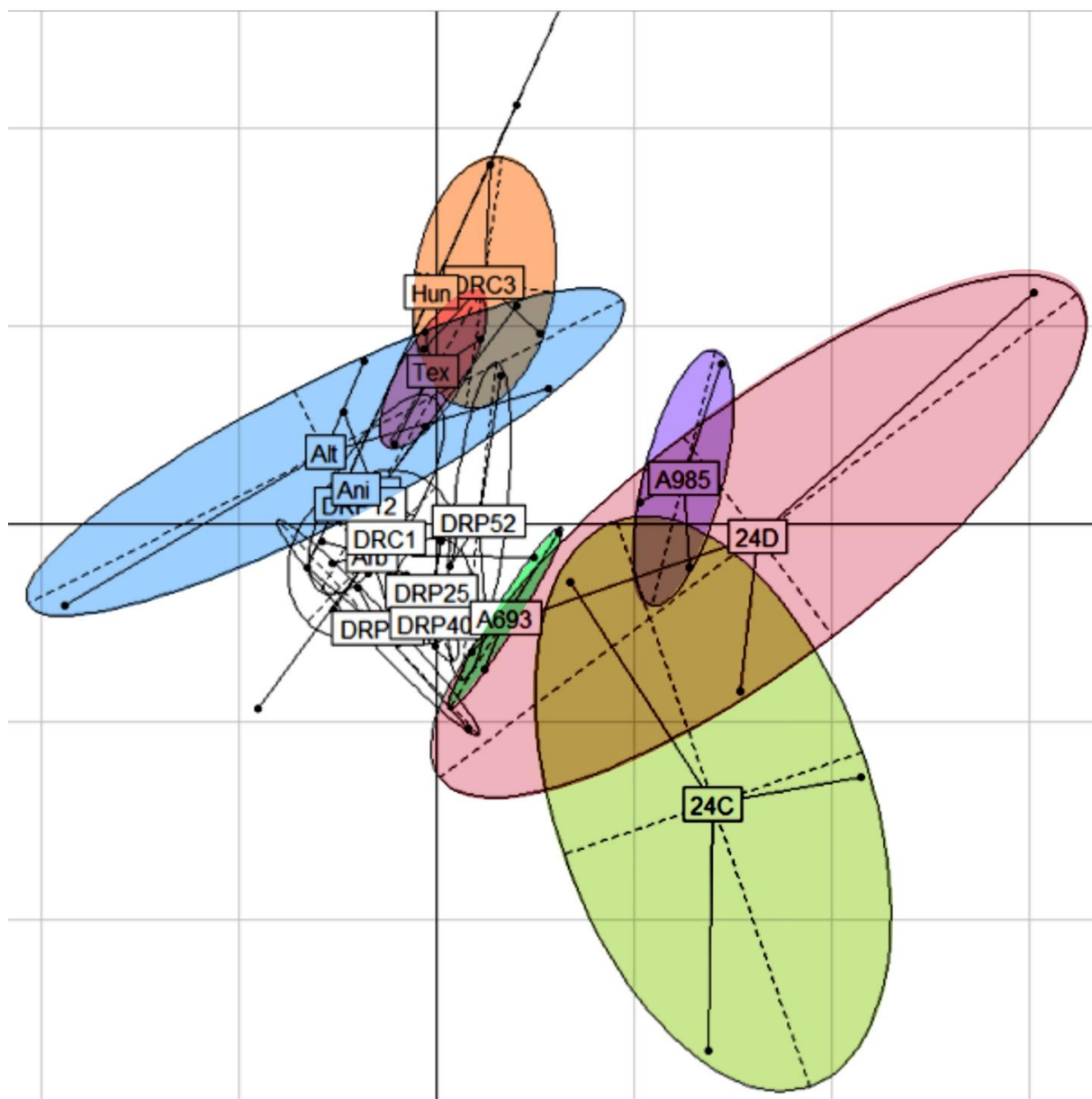
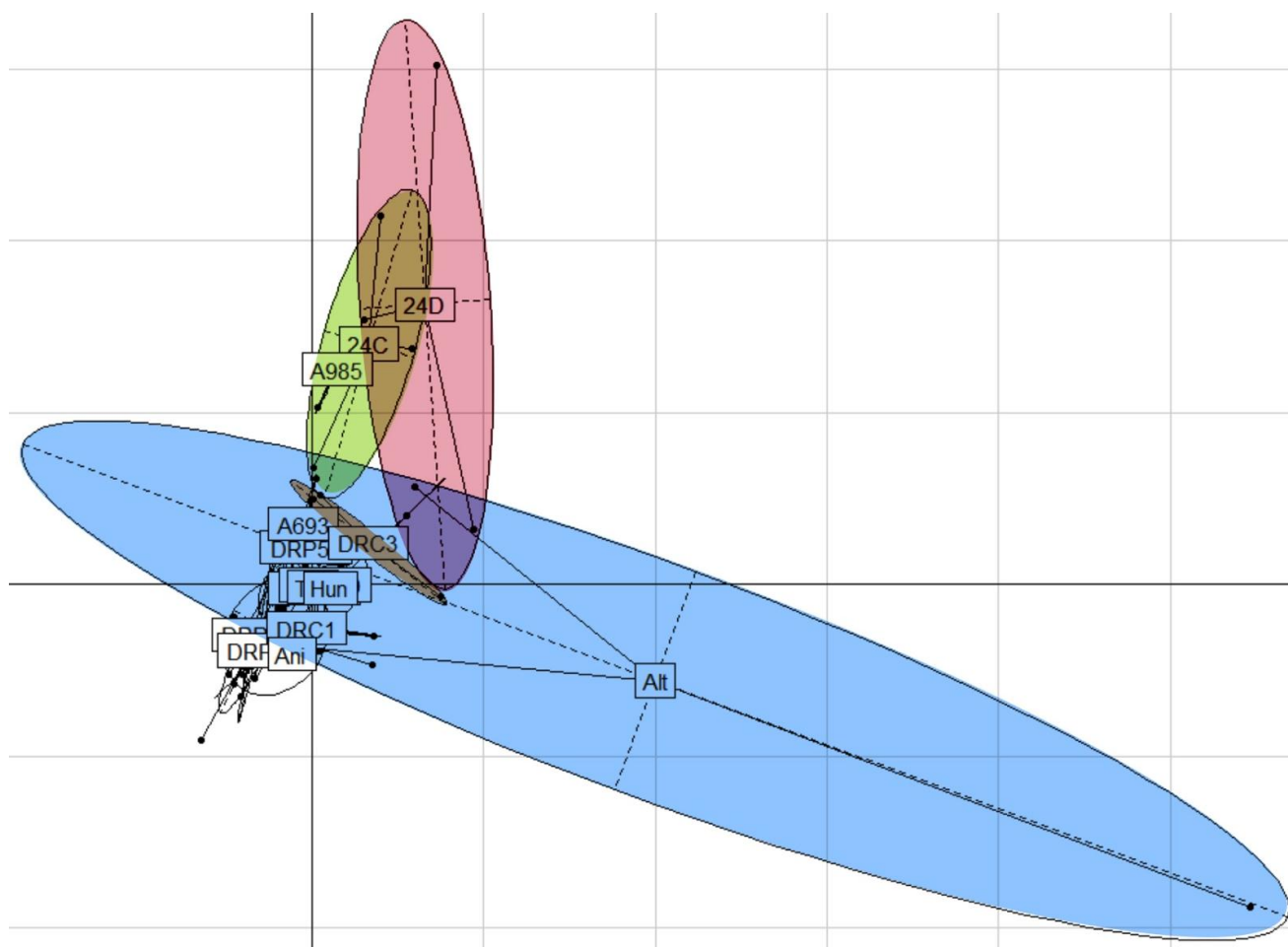


Figura No. 13. PCA utilizando la información de los 14 marcadores utilizados (visualización desde los ejes 1 y 2).



C. Selección del paquete óptimo de marcadores.

Luego de haber llevado a cabo el análisis con los 14 marcadores efectivos, se quiso seleccionar un paquete de SSR's que fuera significativamente informativo. Considerando que el frijol es una de las leguminosas que representa gran parte de la producción agrícola en Guatemala (MAGA, 2011) como en América Latina (Blair *et al.*, 2006; 2011), se necesita facilitar el estudio del mismo y ahorro de recursos en países en vías de desarrollo.

Con la información alélica obtenida se escogieron los siete marcadores más polimórficos (Entre paréntesis su letra de identificación), BM137 (F), BMd20(N), BM143 (B), BM175 (E), PV-cct001(O), BMd01 (C), y GATS11 (J). Para la selección se

tomó en cuenta el PIC, la heterocigosidad esperada y el número de alelos obtenidos. Se hicieron 6 paquetes de marcadores incluyendo a los más polimórficos, en cada uno se fue excluyendo al SSR menos informativo hasta quedar con un paquete de dos marcadores. Se calculó la distancia genética (Nei, 1972) de cada una de las matrices generadas y se comparó contra la matriz general de los 15 marcadores con una prueba de correlación de matrices de Mantel (1967) (Cuadro No. 7).

Cuadro No. 7. Resultados de la prueba de correlación de matrices, Mantel, para cada uno de los paquete de marcadores evaluados.

Matriz	Mantel	Valor P
FNBEOCJ	0.838	0.0001
FNBEOC	0.829	0.0001
FNBEO	0.811	0.0001
FNBE	0.77	0.0001
FNB	0.68	0.0001
FN	0.612	0.0001

Se pudo observar que sí hubo una correlación entre todas las matrices ($P < 0.001$) con la matriz de 15 marcadores. Los paquetes de marcadores que presentaron mayor correlación ($R > 0.8$) fueron FNBEO (0.811), FNBEOC (0.829) y FNBEOCJ (0.838). Al realizar el análisis de componentes principales (PCA) de los paquetes se determinó que el más informativo y eficiente fue FNBEO (Figuras No. 13 y 14). Se pudo distinguir 10 agrupaciones. Las variedades que se separaron de la agrupación principal fueron, Altense (22 alelos), Hunapú (12 alelos), DRC3 (16 alelos), Texel (18 alelos), A693 (16 alelos), 24D (16 alelos), 24C (16 alelos), DRP11 (17) y DRC1 (15), siendo estos dos últimos no discriminados por el paquete general y sí por el paquete óptimo. La única variedad que no fue discriminada totalmente por el paquete óptimo fue A985 sin embargo en la Figura No.14. se observa claramente contenida en la agrupación de la variedad Arbustivo.

Se determinó además el marcador más polimórfico para cada variedad y el número de alelos del mismo (Cuadro No. 8). Se observó el mismo fenómeno en donde las variedades más polimórficas fueron en las que más individuos se evaluaron. Aun así ninguna de ellas presentó diferencias significativas que las hiciera separarse en el PCA.

Cuadro No. 8. Información alélica para cada una de las variedades según el paquete de marcadores óptimo.

Variedad	n	No. Alelos	B	E	F	N	O	No. Alelos del SSR más polimórfico
Arbustivo	17	66			■			19
Trepador	14	43			■			13
DRP11	3	17			■			5
DRP12	3	17			■			5
DRP25	3	13	■	■		■		3
DRP40	3	13		■			■	3
DRP52	3	14	■	■		■	■	3
DRC1	3	15	■	■				4
24C	3	16			■			4
24D	3	16			■			5
A693	3	16			■			4
A985	3	16			■			4
DRC3	3	16		■	■			4
Texel	3	18		■	■			5
Altense	3	22		■	■			6
Hunapú	2	12		■	■			3
Anita	2	10		■	■			4

Por último se puede observar que solamente utilizando el paquete de marcadores F y N, aun habiendo una correlación media ($R > 0.6$), estos no son lo suficientemente informativos. Solamente una población DRP11 es discriminada (Figura No. 15). Es por ello que se ratifica el paquete de marcadores óptimo.

Figura No. 14. PCA utilizando la información del paquete óptimo de marcadores (BM127, BMd20, BM143, BM175, PV-cct001) (visualización desde los ejes 1 y 2).

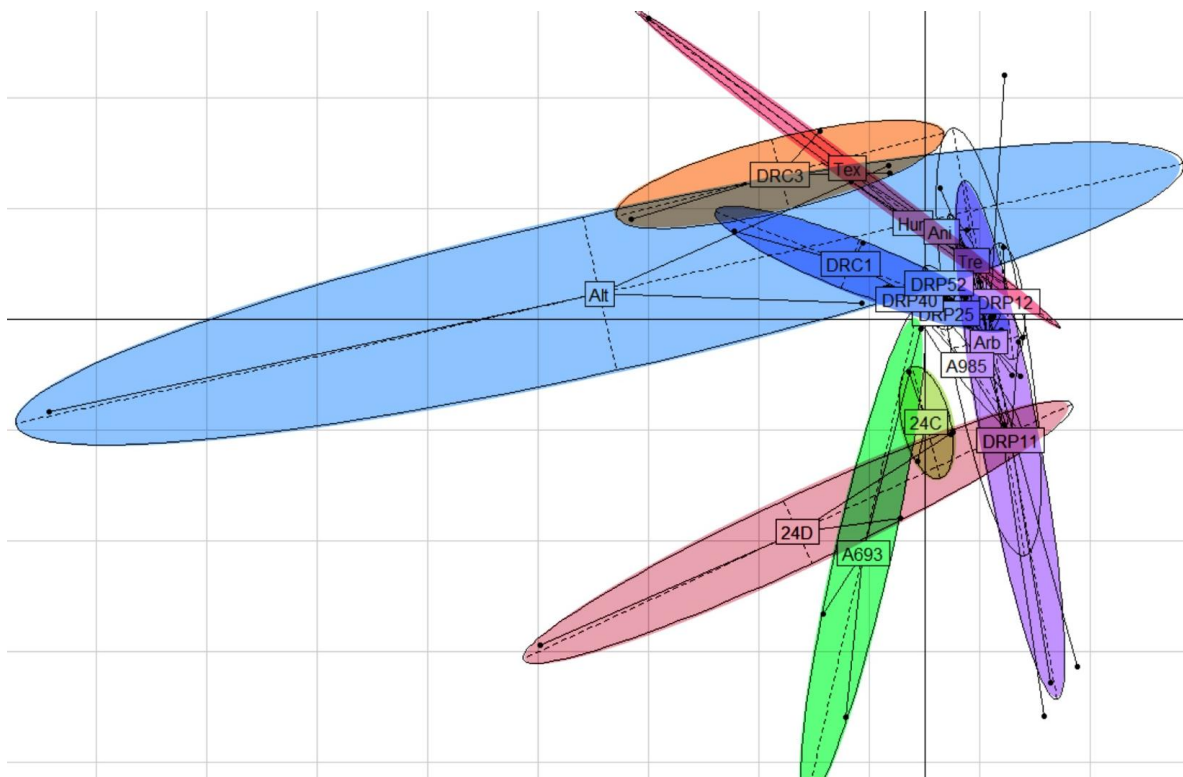


Figura No. 15. PCA utilizando la información del paquete óptimo de marcadores (BM127, BMd20, BM143, BM175, PV-cct001) (visualización desde los ejes 2 y 3).

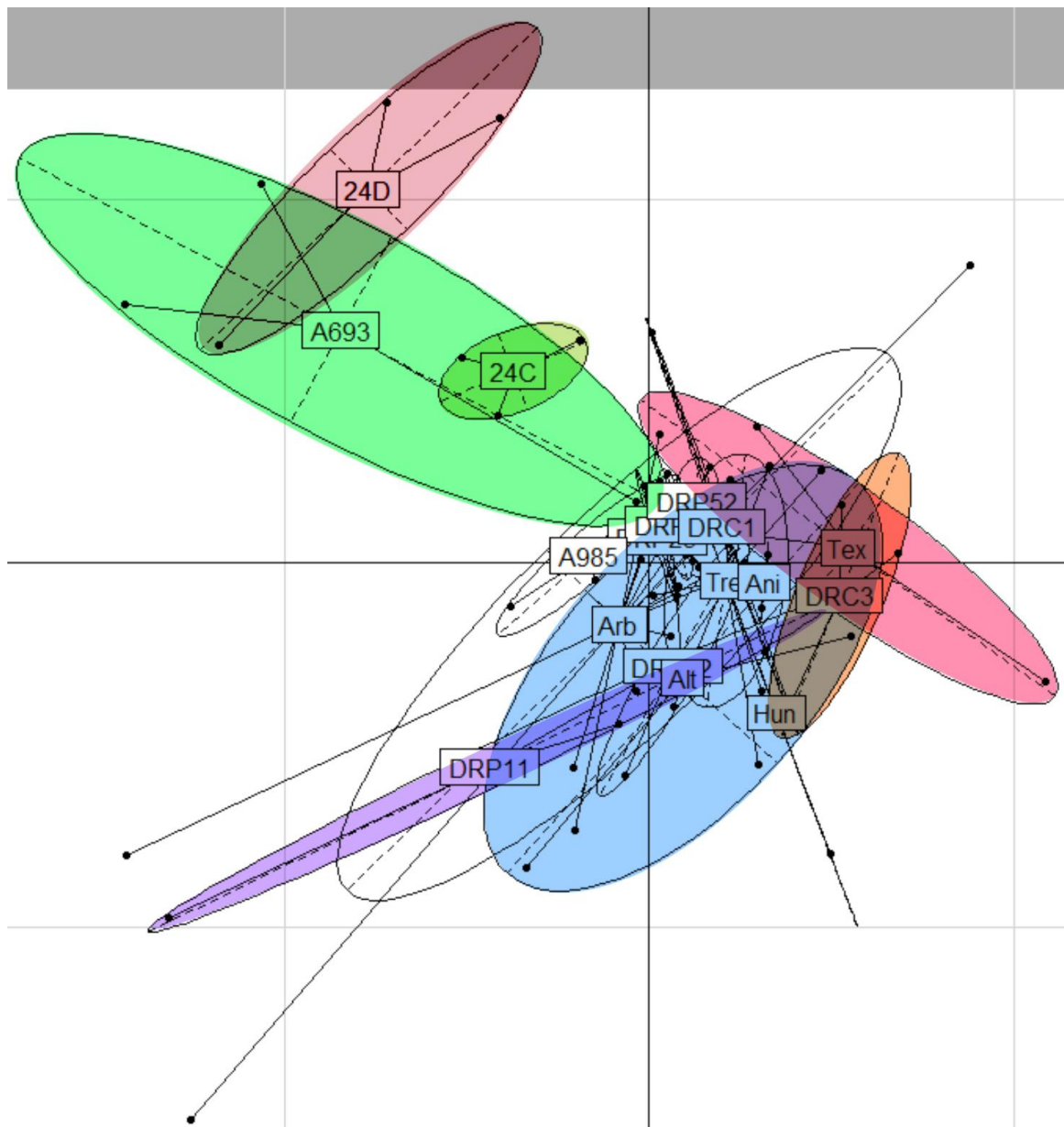
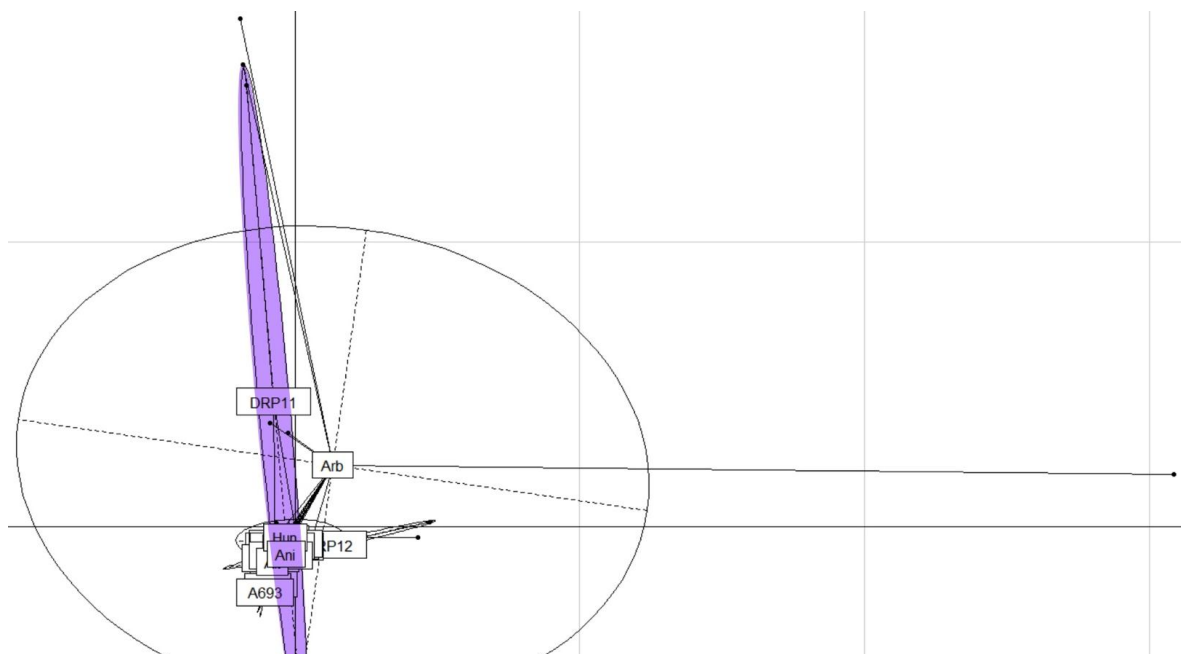


Figura No. 16. PCA utilizando la información de los dos marcadores más polimórficos (BM127, BMd20) (visualización desde los ejes 1 y 2).



VIII. DISCUSIÓN

Los múltiples patrones de bandas producido por los marcadores, especialmente el marcador BM175 pueden deberse a la separación del *loci* por causa de una duplicación (Blair *et al.*, 2003). La localización de estos *loci* en el genoma pueden reflejar la probabilidad de duplicaciones en familias de genes (Jones *et al.*, 2002). Esta información debe de ser corroborada con la secuenciación de estos fragmentos y bioinformática. Los marcadores asociados a genes específicos como aquellos que no estaban dirigidos a secciones codificantes no presentaron ninguna diferencia entre la tasa de polimorfismos. A diferencia de lo encontrado en la literatura donde generalmente los microsatélites asociados a genes tienden a ser menos polimórficos (Blair *et al.*, 2003). Esto se ha observado en otros cultivos como arroz (Cho *et al.*, 2000) y sorgo (Schloss *et al.*, 2002). Este resultado debe de ser corroborado aumentando el número de muestras evaluadas para cada variedad.

No se observó ninguna diferencia en el número de alelos por *locus* ni en el PIC observado para ninguno de los microsatélites (ADN codificantes y no codificantes). Esto difirió con los estudios de Blair *et al.* (2006) donde se encontró que los marcadores dirigidos a secuencias de genes resultaron menos polimórficos. Las diferencias en la variabilidad alélica de los microsatélites evaluados pudo deberse a las diferencias en la tasa de mutación y presión selectiva en cada uno de los *locus* (Métais *et al.*, 2002). Además esta variabilidad también es influenciada por la secuencia repetida o motivo, longitud y contexto genómico (Blair *et al.*, 2006). La correlación entre el número de alelos por *locus* y el índice de contenido de información polimórfica fue significativa ($t = 3.88$, $P < 0.005$) lo que muestra que cualquiera de los dos valores es un buen estimador para la determinación del valor polimórfico de los marcadores para estudios de diversidad de frijol.

Se pudo observar una mayor tasa de polimorfismos en las variedades del altiplano guatemalteco que en algunas variedades evaluadas por Blair *et al.* (2006). Es evidente la alta diversidad de la región al comparar lo obtenido en este estudio contra lo esperado (Figura No. 11). Estos datos se corroboran con el estudio de Blair *et al.* (2006) donde se

observa a la raza Guatemala siendo la más diversa del acervo genético mesoamericano. Se recomienda incluir en estudios posteriores a más individuos de la región como a otros del acervo genético mesoamericano. Se sugiere además incluir datos fenológicos y fenotípicos de cada uno de los individuos evaluados. Ya que muchos de éstos han sido evaluados previamente con estudios agronómicos.

Con respecto a los SSR's dirigidos a genes específicos, se pudo encontrar que los marcadores más polimórficos estuvieron asociados a los genes de la producción de endoquitinasa (BMd20), Ypr10 (BMd01) y Glicerol 3 SN fosfatasa aciltransferasa (PV-cct001). El marcador BMd20 está asociado a la producción de endoquitinasas, las cuales son enzimas que catalizan la hidrólisis de polímeros de quitina y quitodextrina típico en los hongos. El locus donde se encuentra este gen presentó una alta tasa de polimorfismos, lo cual puede llegar a expresarse en un fenotipo resistente al ataque de hongos. Esto puede corroborar los resultados de los ensayos agronómicos realizados por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola de Guatemala (ICTA, 1996) para las variedades Hunapú y Altense.

Las variedades Hunapú y Altense fueron producidas para adaptarse a localidades del altiplano guatemalteco (1600-2300 msnm). Esta región presenta condiciones climáticas que favorecen el desarrollo de enfermedades fúngicas como la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha de *Ascochyta* (*Ascochyta* sp.) y roya de frijol (*Uromyces phaseoli*). La enfermedad que más afecta al frijol en Guatemala es la antracnosis. Los marcadores dirigidos a genes de resistencia antifúngica podrían ser útiles en futuros estudios de recursos genéticos, fitopatología y cambio climático, evidenciando la gran utilidad de la tipificación de la diversidad genética en estas disciplinas.

Según Ávalos (2004) existe una alta variabilidad genética en los mutantes de las variedades Altense y Hunapú evaluadas con AFLP's. Sería interesante evaluar la tasa de polimorfismos con SSR's y comparar los resultados, tomando en cuenta lo discutido anteriormente. Se ha observado que en frijol, los microsatélites confieren una observación más aproximada de la biodiversidad comparado con otras técnicas como AFLP's, RFLP's y RAPD's (Blair *et al.*, 2007). Pudiéndose enriquecer los resultados

observando como la inducción de mutaciones podría ser útil para el fitomejoramiento del frijol.

Por los estudios realizados por Blair *et al.* (2006), todos los microsatélites evaluados han presentado ser más útiles para el mapeo genético del acervo andino que el del mesoamericano. Por ello, sugerir paquetes específicos de marcadores, ayuda a futuras investigaciones en la región a tener resultados más informativos con menores recursos. Se pudo observar las subdivisiones existentes entre las diferentes muestras de frijol provenientes del altiplano del país. Estos resultados deben ser enriquecidos no solamente con información genética, fenológica, morfológica sino con la que pueden brindar los ensayos agronómicos. Blair *et al.* (2007) demostró que existen más divisiones basadas en los aspectos agroecológicos que en los morfológicos en una población.

La biodiversidad descrita en frijol ha sido mayor en comparación con otros granos, es por ello que se sugiere que en el proceso de domesticación del frijol, han ocurrido varios eventos de hibridación entre los acervos genéticos andino y mesoamericano. Se sugiere incluir más individuos de la región para observar si los resultados de este estudio corroboran lo encontrado por Blair *et al.* (2006) para la raza Guatemala.

En la caracterización genética por microsatélites realizada por Blair *et al.* (2009), la raza Guatemala presenta alta biodiversidad, confirmando los resultados de este estudio. La alta biodiversidad obtenida puede explicarse al observar el valor de diferenciación genética (F_{st}) de las razas Guatemala y Durango-Jalisco (Figura No. 17). El F_{st} de ambas razas es muy similar indicando que ambas comparten alelos, ósea una historia genética en común (Bird *et al.*, 2014; Holsinger y Weir, 2009). Esta hipótesis podría ser respaldada estudiando los alelos fijados en los ancestros de ambas razas, tomando en cuenta que la región es centro de origen para el cultivo. El comportamiento de estos alelos puede observarse en cómo algunos marcadores son más informativos para cada acervo específicamente. Por ejemplo, pudo corroborarse que los marcadores BM175 (E) y BM200 (F) son sumamente informativos para el acervo mesoamericano, las variedades de la región.

Figura No. 17. Diferenciación genética basada en el valor de la prueba F_{st} y análisis filogenético de distintas variedades de frijol (Blair *et al.*, 2009). El análisis filogenético se basó en el método de “unión de vecino” (Neighbor-Joining) con el coeficiente de Nei. **D-J:** Durango-Jalisco. **G:** Guatemala. **M:** Mesoamérica. **NG:** Nueva Granada. **P:** Perú.

	D-J1	D-J2	G	M1	M2	NG1	NG2	P1	P2
D-J1	-								
D-J2	0.133	-							
G	0.138	0.044	-						
M1	0.238	0.077	0.17	-					
M2	0.268	0.079	0.167	0.037	-				
NG1	0.563	0.474	0.453	0.536	0.514	-			
NG2	0.469	0.381	0.365	0.447	0.429	0.063	-		
P1	0.44	0.364	0.349	0.424	0.412	0.129	0.028	-	
P2	0.446	0.364	0.345	0.432	0.433	0.241	0.118	0.058	-

(Blair *et al.*, 2009)

Otra hipótesis para explicar la alta diversidad es el fenómeno de introgresión. Los frijoles andinos tienden a tener una mayor tasa de polimorfismos (Blair *et al.*, 2006) y esto se ha observado en algunas razas como Perú. Los procesos de introgresión pueden producir combinaciones interesantes en las distintas variedades de una localidad. Estas pueden conferir mayor adaptabilidad al estrés ambiental, resistencia a plagas y mayor calidad nutricional (Blair *et al.*, 2009). Aunque para la región, esto es poco probable.

La diversidad encontrada en este estudio es muy valiosa considerando el alto nivel de producción de frijol en la región. Comparado con otros países, la producción de frijol en Guatemala es de vital importancia para los habitantes. El altiplano guatemalteco lo componen los departamentos de Quiché, Huehuetenango, San Marcos, Quetzaltenango, Totonicapán, Sololá y Chimaltenango. Estos son los departamentos con mayor densidad poblacional (198 habitantes/Km²), siendo la mayoría territorio indígena y en donde el índice de pobreza extrema es el mayor (INE, 2011). El frijol junto a otros granos representan la fuente mayoritaria de proteínas en estas poblaciones vulnerables.

En conclusión, la presente investigación representa el montaje de una línea de investigación de diversidad genética para el frijol en Guatemala. La implementación de los marcadores más polimórficos será de gran utilidad para el análisis y monitoreo de

poblaciones locales. La caracterización de la diversidad genética dentro de la población de frijol del altiplano del país será de suma relevancia y utilidad para bancos de germoplasma, estudios de fitopatología, seguridad alimentaria, conservación de recursos genéticos y cambio climático. Esto hará que estas colecciones sirvan como referencia para futuros estudios de mejoramiento y conservación de este cultivo. Este trabajo podrá colaborar en el estudio de la dinámica y estructura de las población de frijol en Guatemala y así poder llegar a documentar la historia genética del género en el país.

IX. CONCLUSIONES

1. Se logró extraer ADN de *P. vulgaris* con alta integridad y pureza, adecuado para el análisis con marcadores microsatélites (SSR's).
2. Todos los microsatélites amplificaron y mostraron diferentes longitudes de fragmentos mostrando así el número de alelos para cada variedad. Por otro lado todos los microsatélites exceptuando BM143 y BMd01, produjeron múltiples patrones de bandas siendo el marcador BM175 el más numeroso.
3. Los alelos concordaron con los reportados por Blair *et al.* (2003), Gaitán-Solís *et al.* (2002) y Yu *et al.* (2000) sin embargo se observó que los alelos más comunes tendieron a tener más pares de bases que el de la media reportada.
4. Los fragmentos observados para los marcadores PV-cct001, BMd01, PV-at007 y BMd25 no han sido reportados, todos exceptuando el último, superan el rango de pares de bases esperadas.
5. El marcador con el mayor número de alelos fue BM137 (47) seguido de BM143 (42) y BM175 (42), siendo estos dirigidos a regiones no codificantes y teniendo los valores del PIC más elevados (entre 0.937 y 0.958).
6. La correlación entre el número de alelos por *locus* y el índice de contenido de información polimórfica fue significativa con un valor $R = 0.7561$ ($t = 3.88$, $P = 0.001$).
7. Con respecto a los SSR's dirigidos a genes específicos, se pudo encontrar que los marcadores más polimórficos estuvieron asociados a genes relacionados con la producción de endoquitinasa (BMd20), Ypr10 (BMd01) y Glicerol 3 SN fosfatasa aciltransferasa (PV-cct001).
8. El paquete óptimo de marcadores microsatélites para estudiar la diversidad local de frijol fue BM137 (F), BMd20 (N), BM143 (B), BM175 (E) y PV-cct001 (O). Éste presentó una correlación significativa ($R = 0.811$, $P < 0.001$) con la matriz general (15 marcadores).

9. Con el Análisis de Componentes Principales (PCA) se pudo distinguir 10 agrupaciones. Las variedades que se separaron de la agrupación principal fueron, Altense (22 alelos), Hunapú (12 alelos), DRC3 (16 alelos), Texel (18 alelos), A693 (16 alelos), 24D (16 alelos), 24C (16 alelos), DRP11 (17 alelos) y DRC1 (15 alelos).

X. RECOMENDACIONES

1. Incluir un mayor número de individuos de cada variedad para tener una representación significativa para el análisis de genética de poblaciones. Se sugiere además incluir individuos de cada una de las regiones del país y del acervo genético mesoamericano.
2. Incluir además individuos del acervo genético andino al igual que un mayor número de marcadores microsatélites dirigidos a este. Con ello se podrá tener un análisis más completo en el cual pueda comprobarse la hipótesis que relaciona la alta diversidad con la presencia de alguna introgresión.
3. Incluir en futuros estudios la fenología y fenotipo de cada uno de los individuos evaluados.
4. Secuenciar genes nucleares y del cloroplasto de los individuos para observar de manera certera la biodiversidad genética. Con esto se podrá llegar a relacionar filogeográficamente estas interacciones y se explicará con mayor claridad los procesos de fijación de alelos para cada variedad.

XI. LITERATURA CITADA

- Almeida, C. & E. Amorim, F. Barbosa, J. Cardoso, M. de Melo. 2011. *Genetic variability in populations of sweet corn, common corn and teosinte*. Crop breeding and applied biotechnology 11: 64-69.
- Avalos, A. 2004. *Caracterización de 20 variedades mutantes de frijol (Phaseolus vulgaris L.) mediante la técnica del AFLP*. Tesis de licenciatura no publicada. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 103 pags.
- Azurdia, C. 1994. *Genetic diversity in the Phaseolus vulgaris complex in Guatemala*. Ph D. thesis, Davis California, EEUU. 138 pags.
- Azurdia, C. 1999. *Recursos Genéticos de Phaseolus*. Documento en línea. Fecha de consulta: 09.VI.2012 .
- Azurdia, C. 2006. *Conocimiento de la Biodiversidad de Guatemala a nivel bioquímico y molecular: Implicaciones en conservación*. Guatemala y su Biodiversidad. Capítulo 10: La biodiversidad agrícola y forestal de Guatemala. CONAP.
- Azurdia, C. & K. Williams, D. Williams, V. Van Damme, A. Jarvis, S. Castaño. 2011. *Atlas Guatemalteco de Parientes Silvestres de las Plantas Cultivadas*. USDA-ARS. Bioversity International. CIAT.
- Bird C. & S. Karl, P. Smouse, R. Toonen. 2014. *Detecting and measuring genetic differentiation*. CrustIssues 19:31-55.
- Blair M. & G. Iriarte, S. Beebe. 2006. *QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean x wild common bean (Phaseolus vulgaris L.) cross*. Theor Appl Genet 112:1149–1163.

- Blair M. & J. Diaz, R. Hidalgo, L. Diaz, M. Duque. 2007 *Microsatellite characterization of Andean races of common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Theor Appl Genet 116:29–43.
- Blair M. & M. Giraldo, H. Buendia, E. Tovar, M. Duque, S. Beebe. 2006a. *Microsatellite marker diversity in common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Theor Appl Genet 113:100–109.
- Blair M. & V. Hedetale, S. McCouch. 2003. *Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (Oryza sativa L.)*. Theor Appl Genet 105:449–457.
- Blair, M. & L. Díaz, H. Buendía, M. Duque. 2009. *Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (Phaseolus vulgaris L.)*. Theor Appl Genet 119:955–972.
- Blair, M. & L. Gonzalez, P. Kimani, L. Butare. 2010. *Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (Phaseolus vulgaris L.) from Central Africa*. Theor Appl Genet 121: 237-248.
- Buckler, E. & J. Thornsberry. 2002. *Plant molecular diversity and applications to genomics*. Curr Opin Plant Biol 5:107–111
- Cho, Y. & T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Lipovich, S. McCouch, J. Park, N. Ayres, S. Cartinhour. 2002. *Diversity of microsatélites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (Oryza sativa L.)*. Theor Appl Genet 100:713-722.
- Chou, W. & Y. Huang, W. Tsay, T. Chiang, D. Huang, H. Huang. 2004. *Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eIF5A, is involved in developmental and environmental responses*. Physiologia Plantarum. 121:50-57.

- Cunningham-Rundles, S. 1982. *Effects of nutritional status on immunological function. The American journal of Clinical Nutrition.* 35:1202-1210.
- Dayler, C. & P. Mendes, M. Prates. C. Bloch, O. Franco, M. Grossi-de-Sá. 2005. *Identification of a novel bean α -amylase inhibitor with chitinolytic activity.* FEBS Letters. 579:5616-5620.
- Debouck, D. 1986. *Phaseolus germplasm collection in western Guatemala.* International Board for Plant Genetic Resources. Rome Italy. Mimeographed. 20 pags.
- Debouck, D. & C. Azurdia, E. Martinez. 1996. *Recoleccion de germoplasma de especies de Phaseolus silvestre en el centro y occidente de Guatemala.* En: Azurdia, C. (ed.) *Lecturas en Recursos Fitogeneticos.* Instituto de Investigaciones Agronomicas, Facultadde Agronomia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 86-94.
- Delgado, A. 1985. *Systematics of the genus Phaseolus (Leguminosae) in Mexico and Central America.* PhD. Dissertation. University of Texas. Austin. EEUU.
- Domagalska, M. & E. Sarnowska, F. Nagy. S. Davis. 2010. *Genetic Analyses of Interactions among Gibberellin, Abscisic Acid, and Brassinosteroids in the Control of Flowering Time in Arabidopsis thaliana.* Hormones and Flowering. 5: 1-8.
- Elston, R. 2005. *Polymorphism Information Content.* Encyclopedia of Biostatistics. John Wiley & Sons.
- Freitas, T. & P. Wietholter, C. Almeida, S. Delmar, F. Bered, M. de Melo, J. Barbosa. 2011. *Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers.* Ciacia Rural, Santa Maria. 41:205-211.

- Fry, S. 1982. *Isodityrosine, a new cross-linking amino acid plant cell-wall glycoprotein*. *Biochem. J.* 204:449 – 455.
- Guo, X. & R. Elston. 1999. *Linkage information content of polymorphic genetic markers*. *Human Heredity.* 49:112-118.
- ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas). 1996. *ICTA Altense e ICTA Hunapú, dos nuevas variedades de frijol negro para el altiplano de Guatemala*. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola. Publicación Técnica 33:1-6.
- INE (Instituto Nacional de Estadística). 2011. *Pobreza y Desarrollo, un enfoque departamental. Resultados de la Encuesta Nacional de Condiciones de Vida – ENCOVI-*. INE. Guatemala. 31 pags.
- Hall, Q. & M. Cannon. 2002. *The Cell Wall Hydroxyproline-Rich Glycoprotein RSH Is Essential for Normal Embryo Development in Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 14:1161–1172.
- Hildebrand, E. & D. Torney, R. Wagnes. 1992. *Informativeness of Polymorphic DNA Markers*. *Los Alamos Science.* 20:100-102.
- Holsinger, K. & B. Weir. 2009. *Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{st}* . *Nature Reviews: Genetics.* Vol 10. 639-650.
- Jombart, T. 2008. *Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers*. *Bioinformatics* 24:1403-1405.
- Jombart, T. & D. Pontier, A. Dufour. 2009. *Genetic markers in the playground of multivariate analysis*. *Heredity* 102:330-341.

- Jones, E. & M. Dupall, J. Dumsday, L. Hughes, J. Forster. 2002. *An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (Lolium perenne L.)*. Theor Appl Genet. 24:405-415.
- Hayden M. & T. Nguyen, A. Waterman, G. McMichael, K. Chalmers. 2008. *Application of multiplex-ready PCR for Fluorescence based SSR genotyping in barley and wheat*. Mol Breeding 21:271–281
- Karlova, R. & S. Boeren, E. Russinova, J. Aker, J. Vevoort, S. de Vries. 2006. *The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive*. The Plant Cell. 18:626-638.
- MAGA (Ministerios de Agricultura, Ganadería y Alimentación). 2011. *El Agro en Cifras*. Informe del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Dirección de Planeamiento.
- Mantel, N. 1967. *The detection of disease clustering and a generalized regression approach*. Cancer Research 27(2):209–220.
- Matus I. & P. Hayes. 2002. *Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats*. Genome 45:1095-1106.
- Métais, I. & B. Hamon, R. Jalouzot, D. Peltier. (2002). *Structure and level of genetic diversity in various vean types evidenced with micosatellite markers isolated from a genomic enriched library*. Theor Appl Genet 104:1346-1352.
- Murray, M. & G. Thompson. 1980. *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. Nuclei Acid Research 8 (19):4321-4325.
- Nasi, A. & G. Picariello, P. Ferranti. 2009. *Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety*. Journal of Proteomics. 72:527-538.

- Nei, M. 1972. *Genetic distance between populations*. Am. Nat. 106:283-292.
- Peakall, R. & P. E. Smouse. 2012. *GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update*. Bioinformatics 28(19):2537-2539.
- Rostoks N. & L. Ramsay, K. MacKenzie, L. Cardle, P. Bhat, M. Roose, J. Svensson, N. Stein, R. Varshney, D. Marshall, A. Graner, T. Close, R. Waugh. 2006. *Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties*. Proc Natl Acad Sci USA 103:18656–18661.
- Ruiz-Rivero, O. & I. Rieu, N. Fernandez-García, J. Griffiths, S. Powers, F. Gong, T. Linhartova, S. Eriksson, O. Nilsson, S. Thomas, A. Phillips y P. Hedden. 2008. *The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle*. The Plant Journal. 53: 488-504.
- Schloss, S. & S. Mitchell, G. White, R. Kukatla, R. Bowers, A. Paterson, S. Kresovich. 2002. *Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench]*. Theor Appl Genet 105:912-920.
- Shaaf, J. & M. Walter, D. Hess. 1995. *Primary Metabolism in Plant Defense*. Plant Physiol. 108:949-960.
- Showalter, A. & J. Bell, C. Cramer, J. Bailey, J. Varner, C. Lamb. 1985. *Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection*. Proc. Natl. Acad. 82:6551-6555.
- Singh S. & P. Gepts, D. Debouck. 1991a. *Races of common bean (Phaseolus vulgaris, Fabaceae)*. Econ Bot 45:379–396.

- Templeton, M. & R. Dixon, C. Lamb, M. Lawton. 1990. *Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Transcripts Exhibit Different Spatial Patterns of Accumulation in Compatible and Incompatible Interactions between Phaseolus vulgaris and Colletotrichum lindemuthianum*. Plant Physiol. 1265-1269.
- Van Holst, G. y F. Klis. 1981. *Hydroxyproline Glycosides in Secretory Arabinogalactan-Protein of Phaseolus vulgaris*. L. Plant Physiol. 68:979-980.
- Wegenhart, B. & L. Tan, M. Held. 2006. *Aggregate structure of hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP) and HRGP assisted dispersion o carbon nanotubes*. Nanoscale Res Lett. 1:154–159.
- Williams, T. 1977. *Comprehensive Index to the Flora of Guatemala*. Fieldiana: Botany. Field Museum of Natural History. Chicago, EEUU.

XII. APÉNDICE

A. Protocolos de extracción de ADN y Electroforesis con Geles de Poliacrilamida

1. Protocolo de extracción de ADN genómico total con solución amortiguadora CTAB
 1. Agregar 600uL de buffer CTAB (2% CTAB, 2% Polivinilpirrolidona, 100mM Tris-HCl pH 8, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 0.2% β -mercaptoetanol) el cual debe estar previamente calentado a 65°C para posteriormente seguir macerando mecánicamente. La receta se encuentra en el apéndice B.
 2. Incubar con agitación las muestras a 65°C por 30min. (Boekel, Shake N´ Bake Hibridization Oven).
 3. Agregar un volumen (400uL) de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclando por inversión.
 4. Centrifugar a 12,000rpm por 10min (Eppendorf Centrifuge, 6526D).
 5. Al sobrenadante agregarle 60 ul de acetato de amonio y 400 ul de Isopropanol.
 6. Incubar a -20°C durante 30 min y repetir la centrifugación.
 7. Descartar el sobrenadante y agregar 250uL de etanol al 70% repitiendo el mismo ciclo de centrifugación, descartando nuevamente el sobrenadante.
 8. Secar el precipitado al aire y se resuspender en 20-40uL de buffer TE (10mM Tris, llevar a pH 8.0 con HCl; 1 mM EDTA) precalentado a 60°C.
 9. Almacenar a 4°C.
2. Protocolo de electroforesis en geles de Poliacrilamida (PAGE)
 1. Armar el sistema Miniprotean 2 (BioRad).
 2. Realizar el gel con la receta descrita en el apéndice B. Esperar de 20-30 min para esperar que polimericen.
 3. Colocar dentro de la cámara de electroforesis vertical los genes y llenar con buffer TBE. La receta está descrita en el apéndice B.

4. Cargar la muestra (3-6 uL) y las escaleras moleculares (1.5 uL).
 5. Luego se corre por una hora y 20 min a 15 miliamperios constantes.
 6. Fijar en solución de ácido acético por 20 min. La receta de esta solución se encuentra en el apéndice B.
3. Protocolo de tinción y revelado de geles de poliacrilamida (PAGE)
 1. Recuperar la solución de ácido acético.
 2. Lavar por dos minutos con H₂O d (tres veces).
 3. Incubar en solución de tinción por 30 minutos. La receta de esta solución se encuentra en el apéndice B.
 4. Lavar por 10 segundos con H₂O d.
 5. Incubar en solución de revelado fría. La receta de esta solución se encuentra en el apéndice B.
 6. Detener el revelado con la solución de ácido acético recuperada.
 7. Percar los geles con papel filtro y cubrirlos con un acetato.
 4. Recetas para la preparación de distintas soluciones
 1. Receta para preparación del buffer CTAB 2X

Reactivo	[stock]	[1X] 100 mL
Tris-HCl pH 7.8	1 M	10 mL
EDTA pH 8.0	0.5 M	4 mL
NaCl	5 M	30 mL
CTAB	10%	20 mL. 2g/100mL
B-mercapto (en fresco, luego de esterilizar)	14.4 M	1%. 1mL

2. Receta para preparación del bufer TAE 50X

Reactivo	[stock]	[10X] 1L
Trizma base	121.14 g/mol	242 g
EDTA NA2	372.24 g/mol	16.8 g
Ácido Acético Glacial	100%	57.1 g

3. Receta para preparación del bufer TBE

Reactivo	[stock]	[1X] 1L Corrida	[5X] 25ml Geles
Trizma base	121.14 g/mol	10.8 g	1.35 g
EDTA NA2	372.24 g/mol	0.93 g	0.11 g
Ácido Bórico	61.83 g/mol	5.5 g	0.687 g

4. Receta para la preparación de los geles de poliacrilamida (20%)

Reactivo	[stock]	1 Gel	4 Geles
H2O destilada	-	2.25 mL	9 mL
Buffer TBE	5X	0.6 mL	2.4 mL
Acrilamida	40% (37.5:2.5 Acrilamida: bis-acrilamida)	2.85 mL	11.4 mL
APS	25%	8 uL	32 uL
TEMED	-	8 uL	32 uL

5. Receta para la preparación de la solución de ácido acético

Reactivo	[1X] 150 mL
Ácido Acético Glacial	15 mL

6. Receta para la preparación de la solución de tinción de plata

Reactivo	[stock]	[1X] 150 mL
AgNO ₃	0.10%	0.15 g
Formaldehido	37.50%	225 uL

7. Receta para la preparación de la solución de revelado

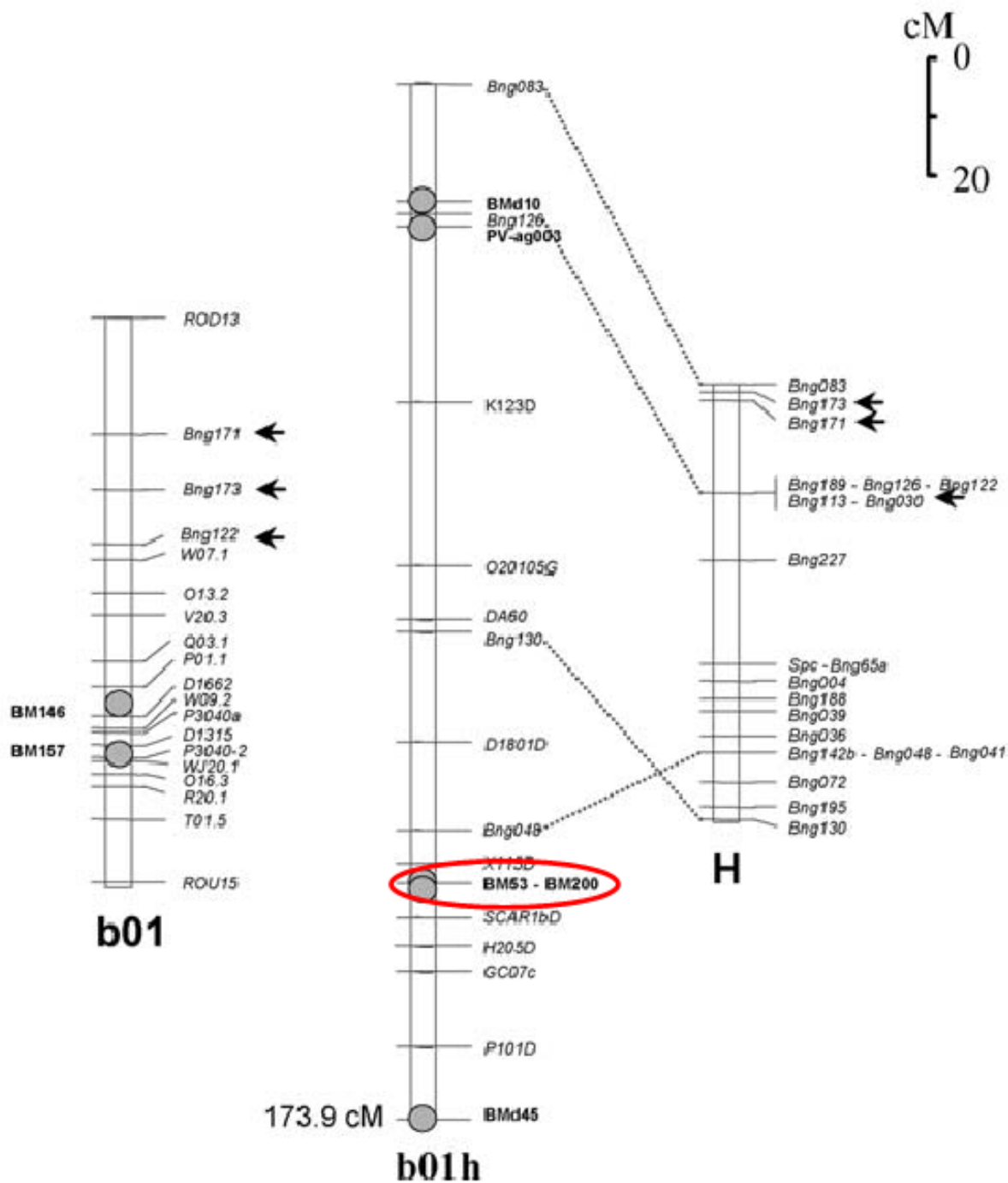
Reactivo	[stock]	[1X] 150 mL
NaCO ₃	-	4.5 g
Formaldehido	37.50%	225 uL
Tiosulfato	10%	7.8 uL

8. Receta de PCR para SSR's

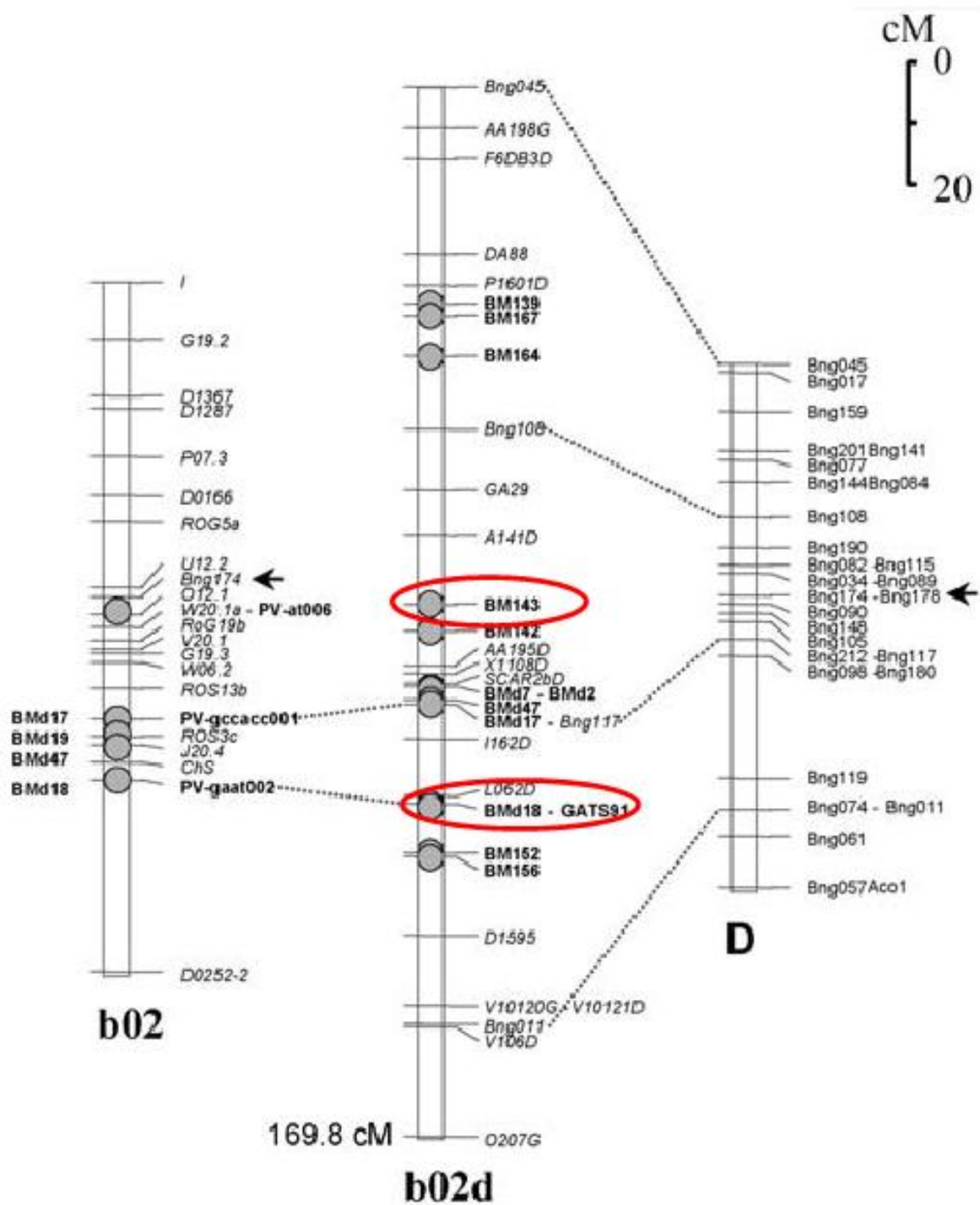
Reactivo	[stock]	[1X]	Vol 1X (mL)
H ₂ O	-	-	7.35
Buffer	10X	1X	1.25
dNTP's	2.5 mM	0.1 mM	0.75
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	0.5
Primer Forward	5 mM	0.2 mM	0.5
Primer Reverse	5 mM	0.2 mM	0.5
Taq (Promega)	5 U/uL	1 U	0.15
ADN	75 ng/uL	75 ng/uL	1.5
Vol. Reacción			12.5 mL

B. Idiogramas donde se presenta la ubicación de los microsatélites en el genoma del frijol (*Yu et al*, 2000, *Blair et al*, 2003, *Gaitán-Solís et al*, 2008).

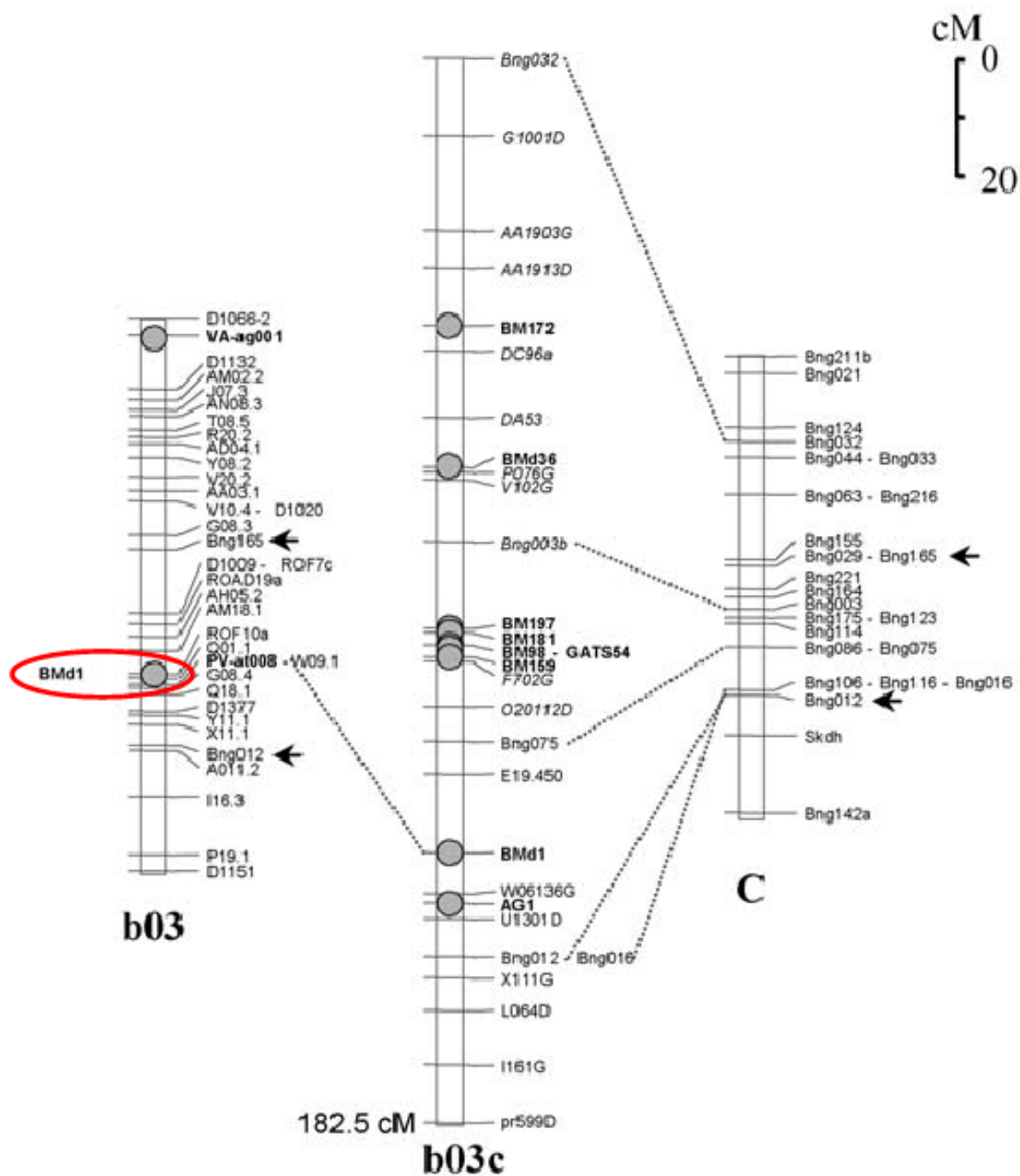
1. Idiograma del Cromosoma 1 de *P. vulgaris* (*Yu et al*, 2000). En él se marca en un círculo la ubicación de los microsatélites.



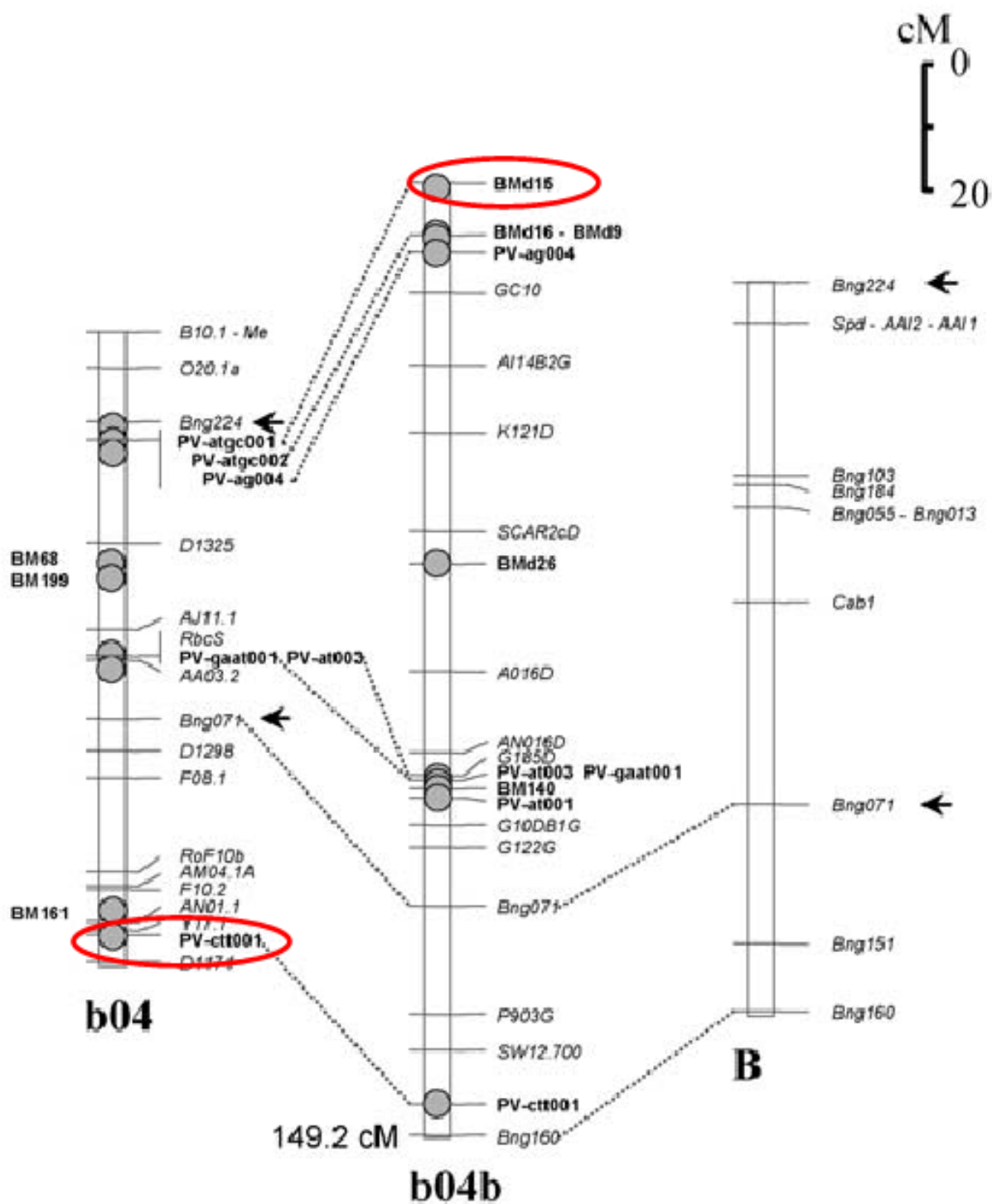
2. Idiograma del Cromosoma 2 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca un círculo la ubicación de los microsatélites.



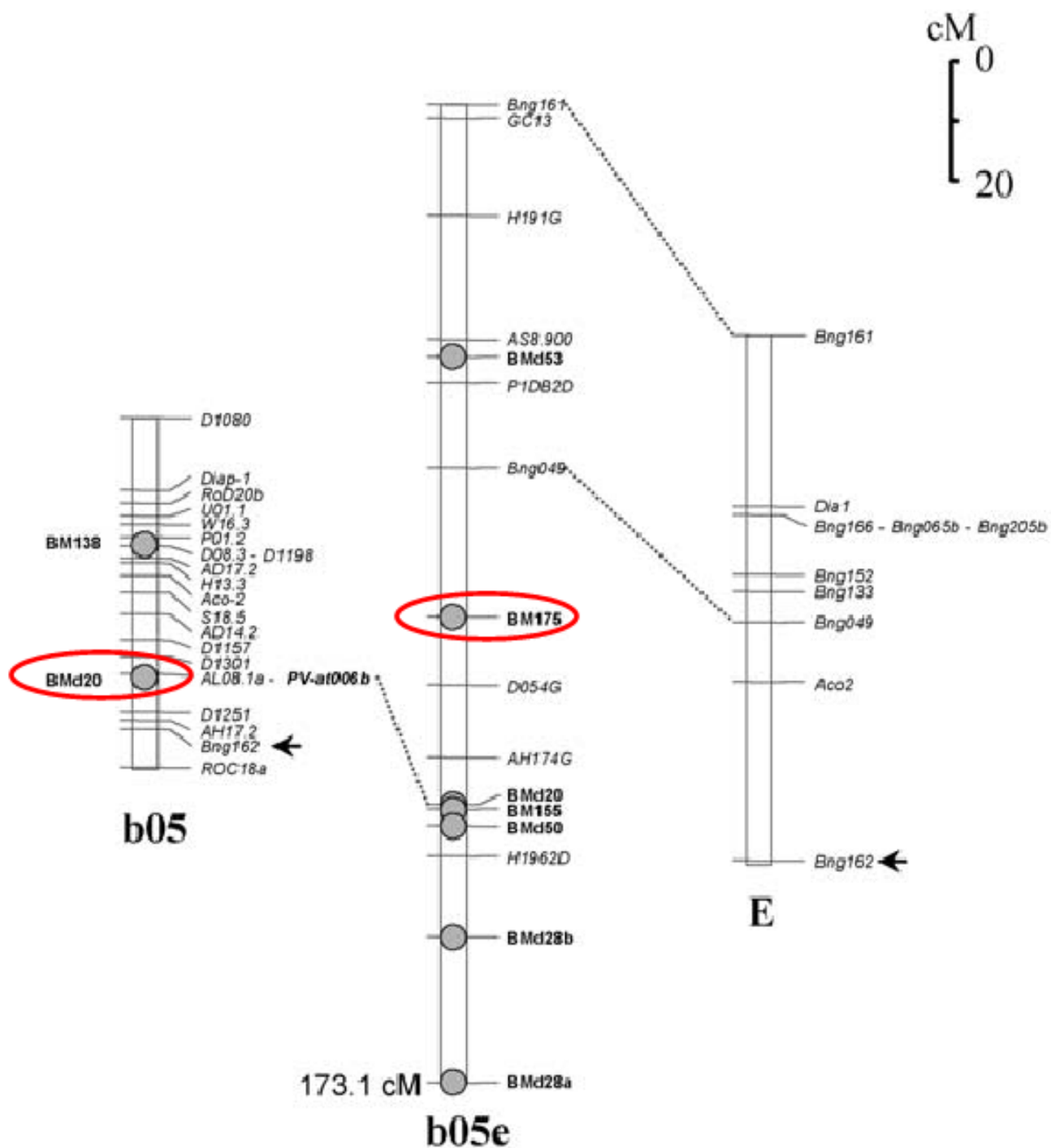
3. Idiograma del Cromosoma 3 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca un círculo la ubicación de los microsátelites.



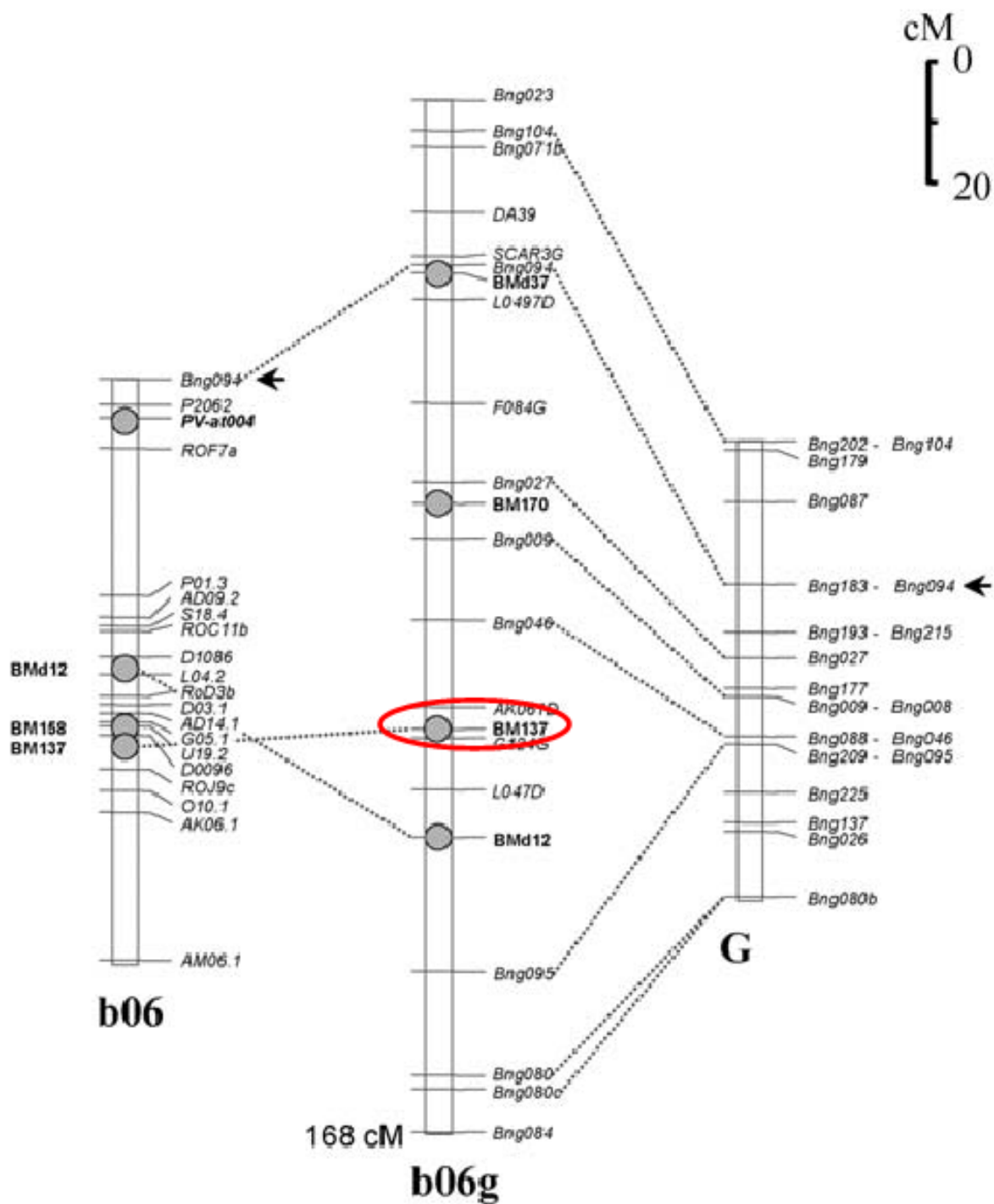
4. Idiograma del Cromosoma 4 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca un círculo la ubicación de los microsátélites.



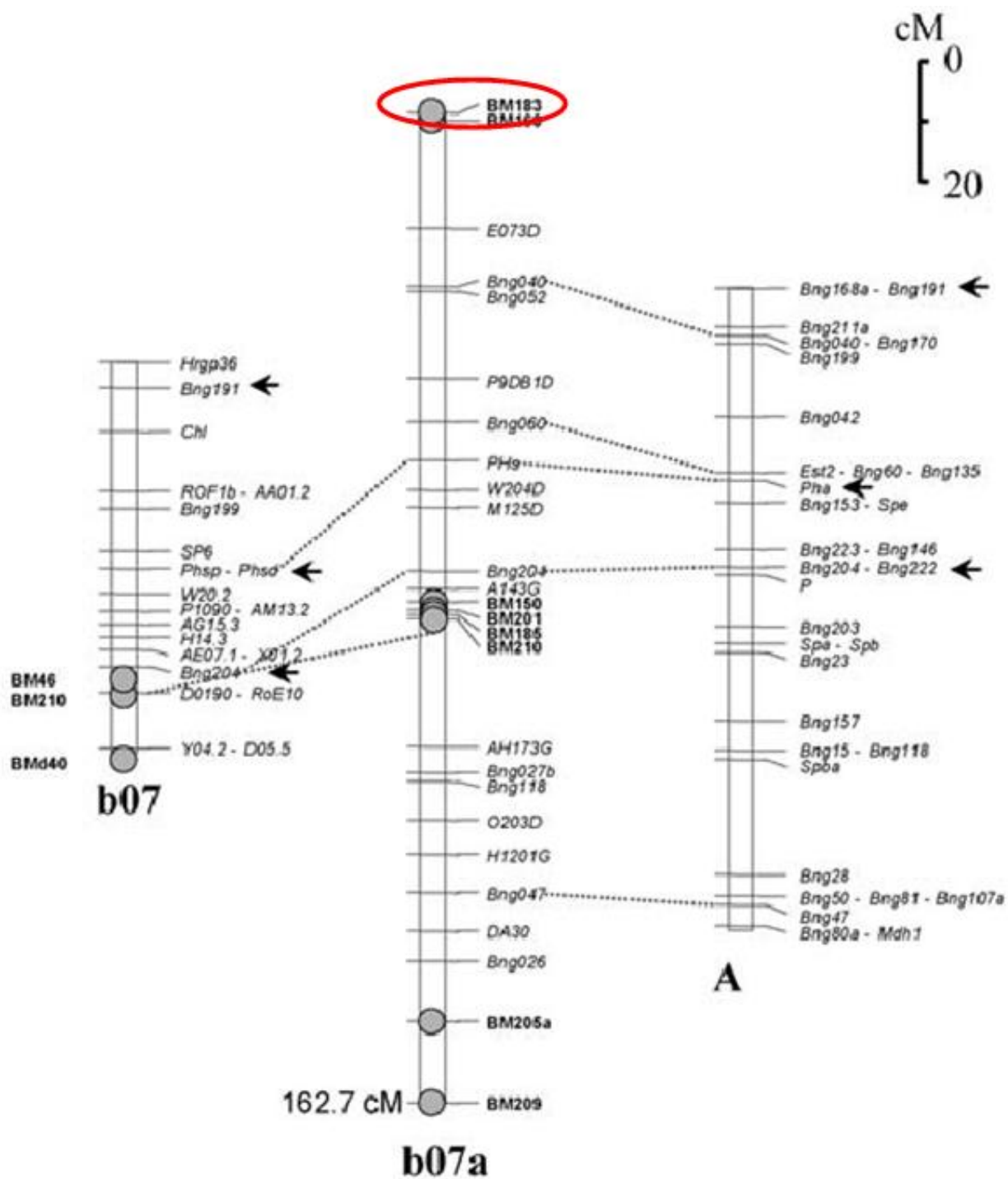
5. Idiograma del Cromosoma 5 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca un círculo la ubicación de los microsátélites.



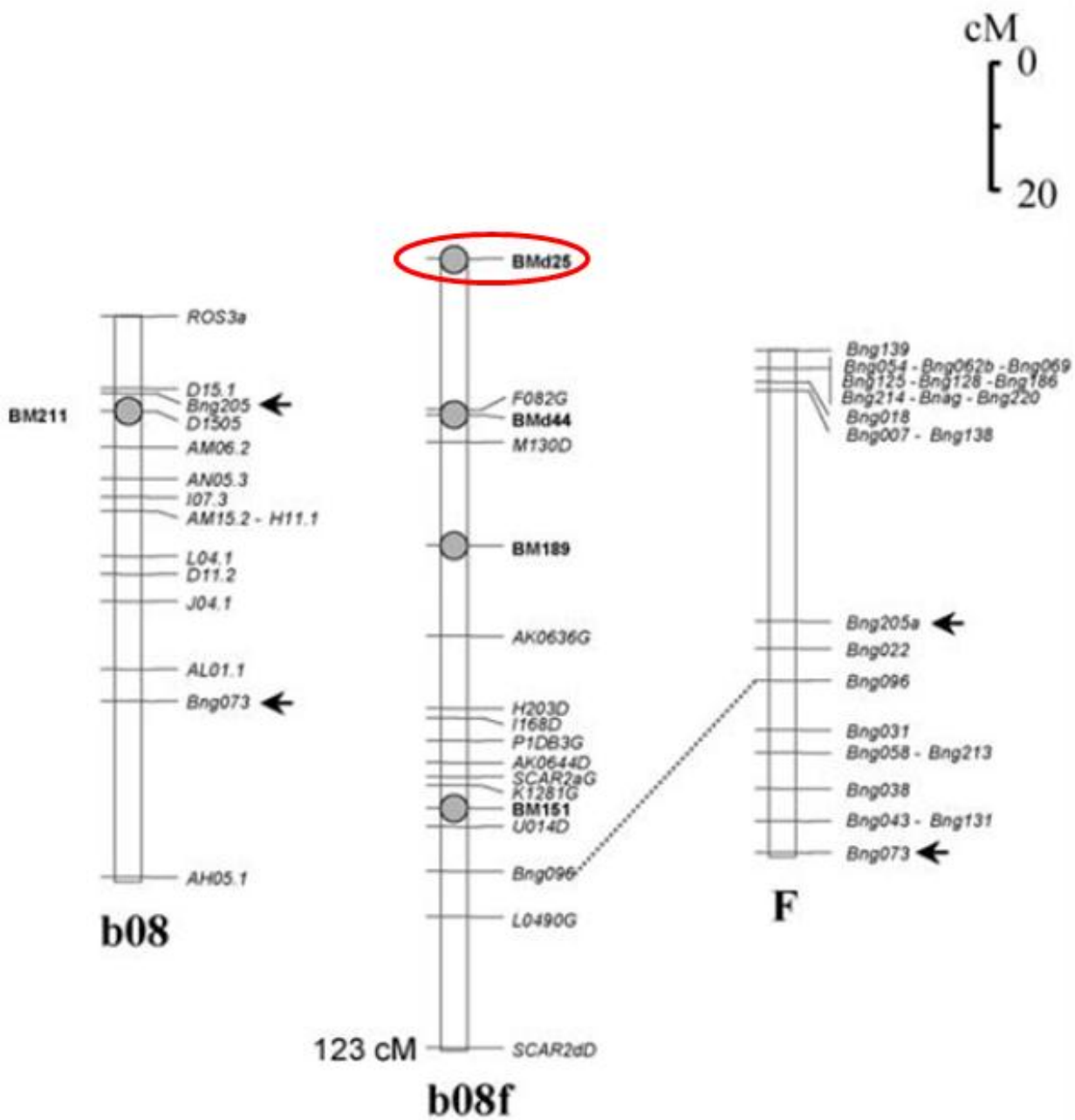
6. Idiograma del Cromosoma 6 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca en un círculo la ubicación de los microsátélites.



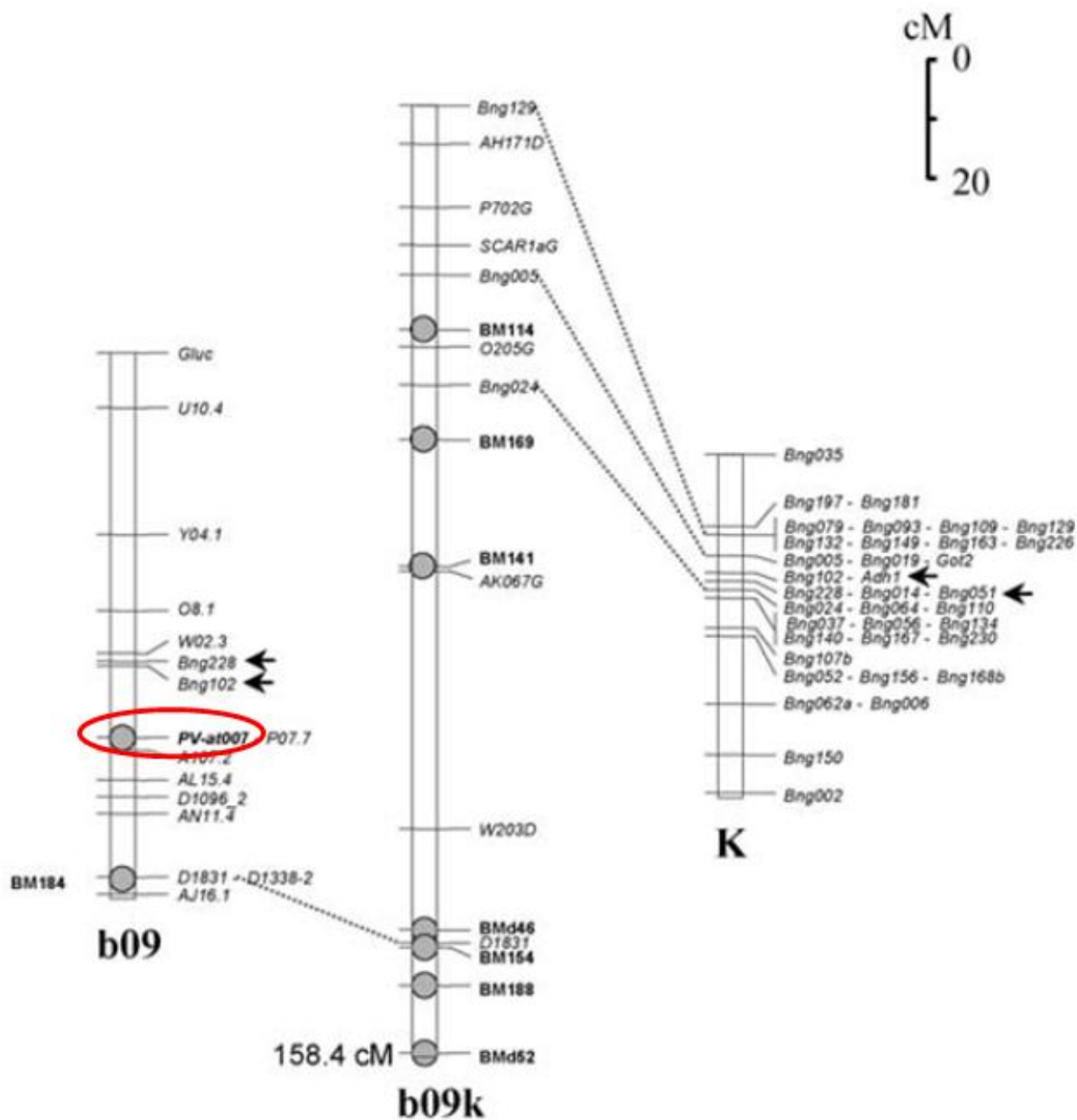
7. Idiograma del Cromosoma 7 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca un círculo la ubicación de los microsátélites.



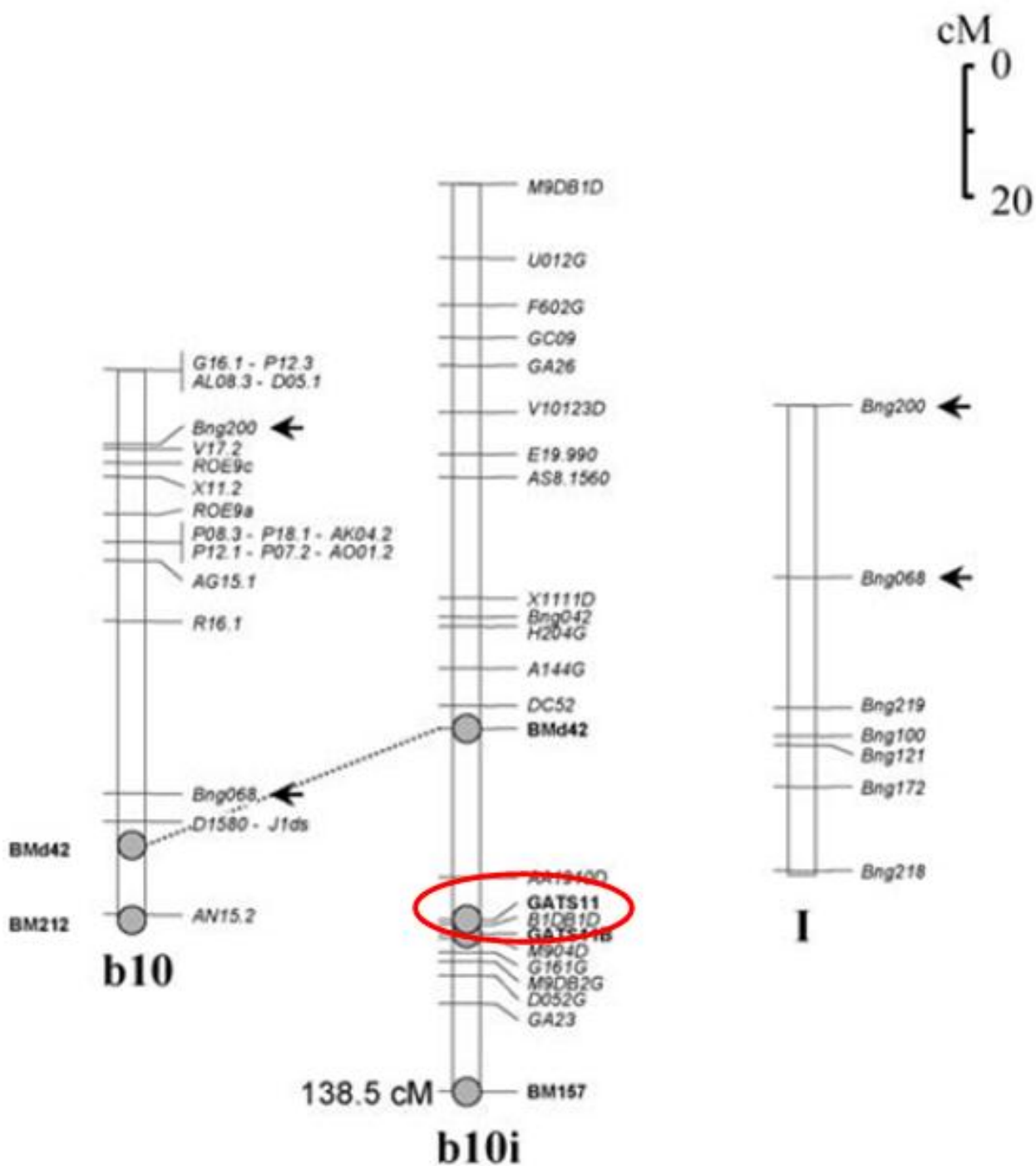
8. Idiograma del Cromosoma 8 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca con un círculo la ubicación de los microsátelites.



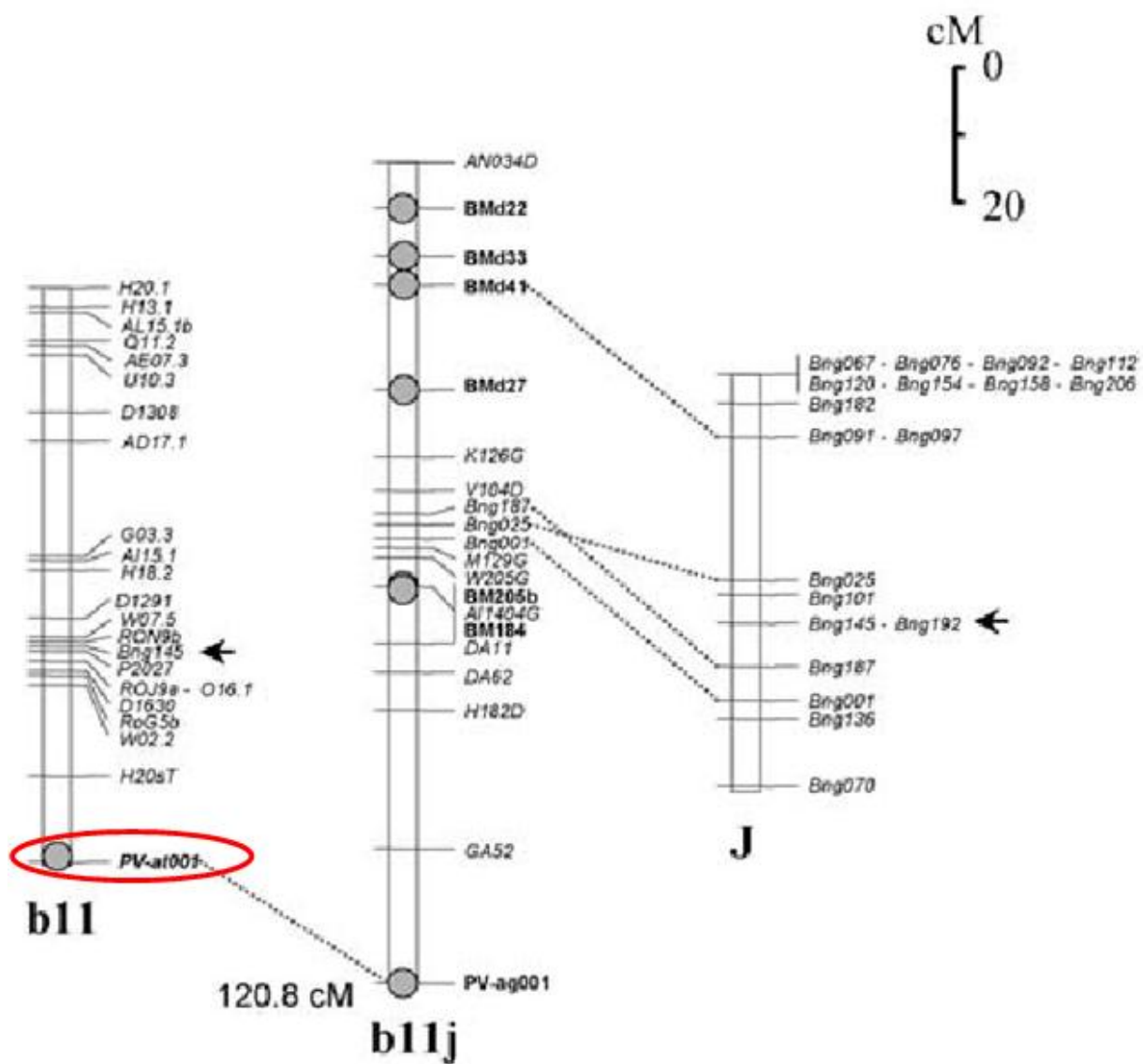
9. Idiograma del Cromosoma 9 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca en un círculo la ubicación de los microsátelites.



10. Idiograma del Cromosoma 10 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca en un círculo la ubicación de los microsátélites.

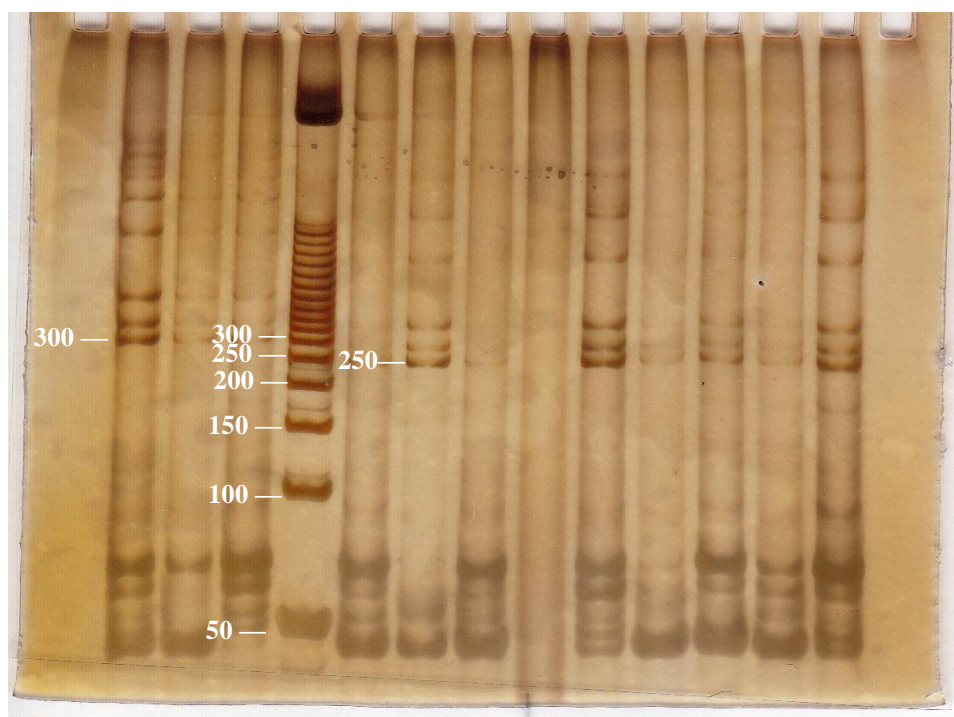


11. Idiograma del Cromosoma 11 de *P. vulgaris* (Yu *et al*, 2000). En él se marca en un círculo la ubicación de los microsátélites.

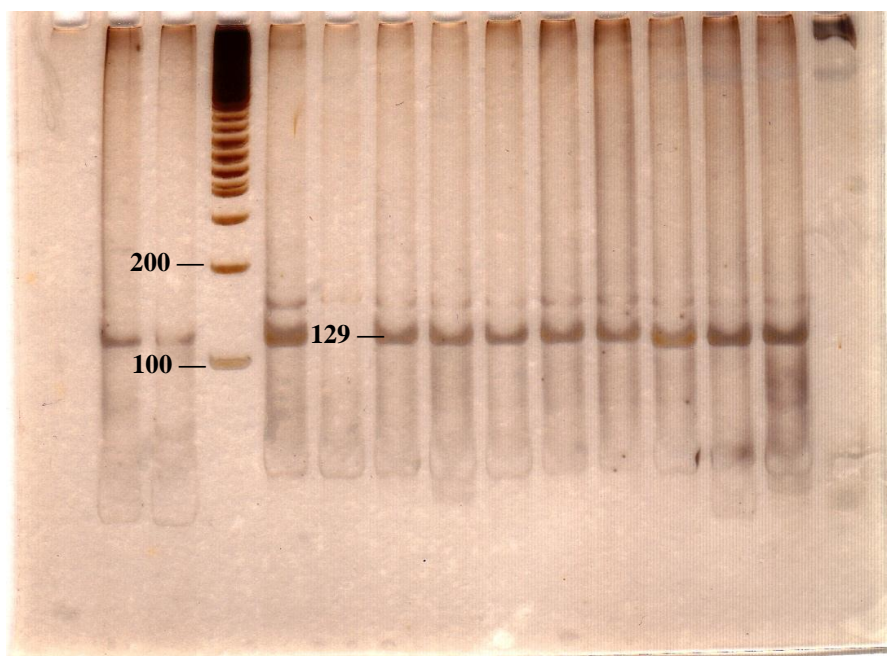


C. PAGE's de los productos de amplificación de los distintos SSR's.

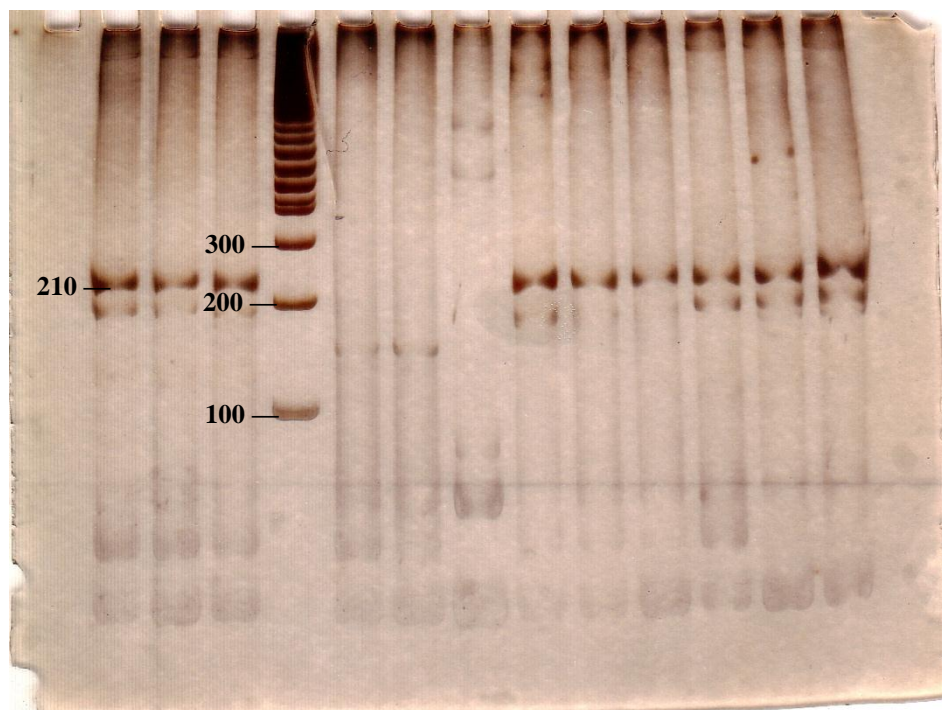
1. Productos del marcador BM200. En él se observa los alelos de 250 y 300 pb.



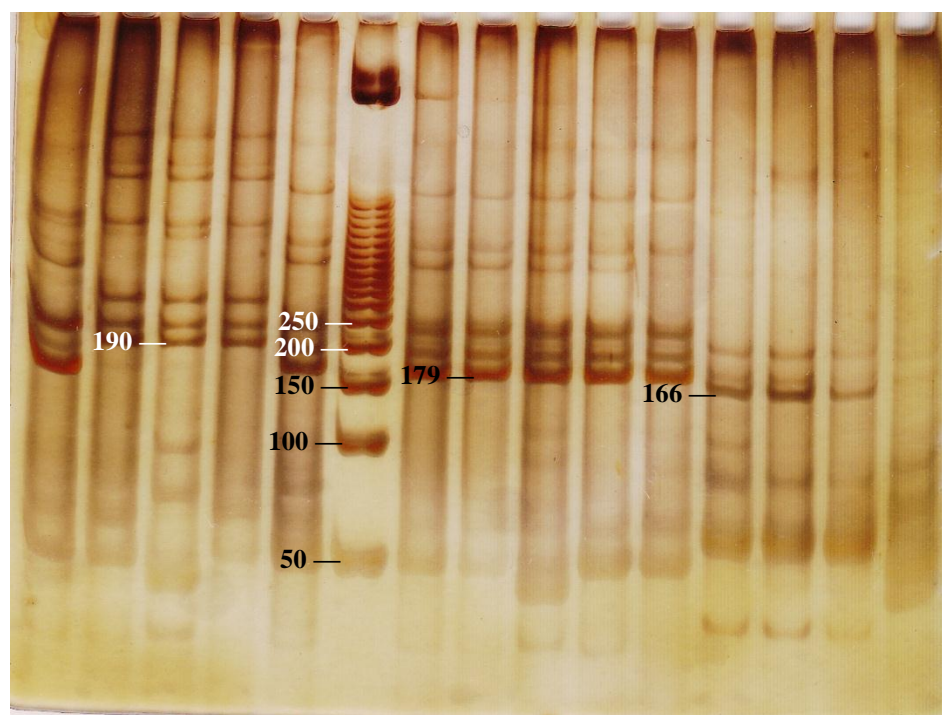
2. Productos del marcador BM143. En él se observa el alelo de 129pb.



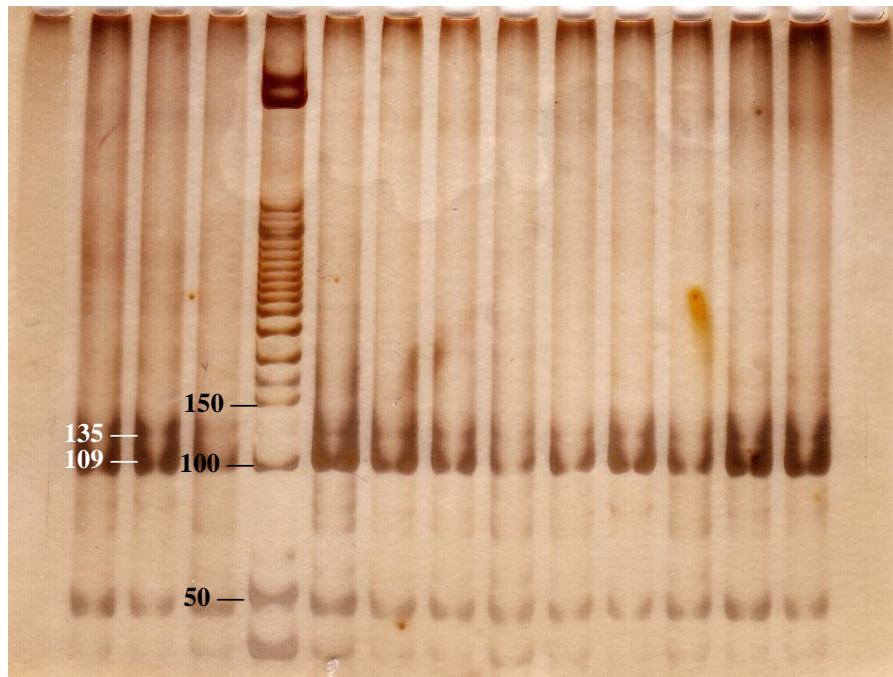
3. Productos del marcador BMd01. En él se observa el alelo de 210pb.



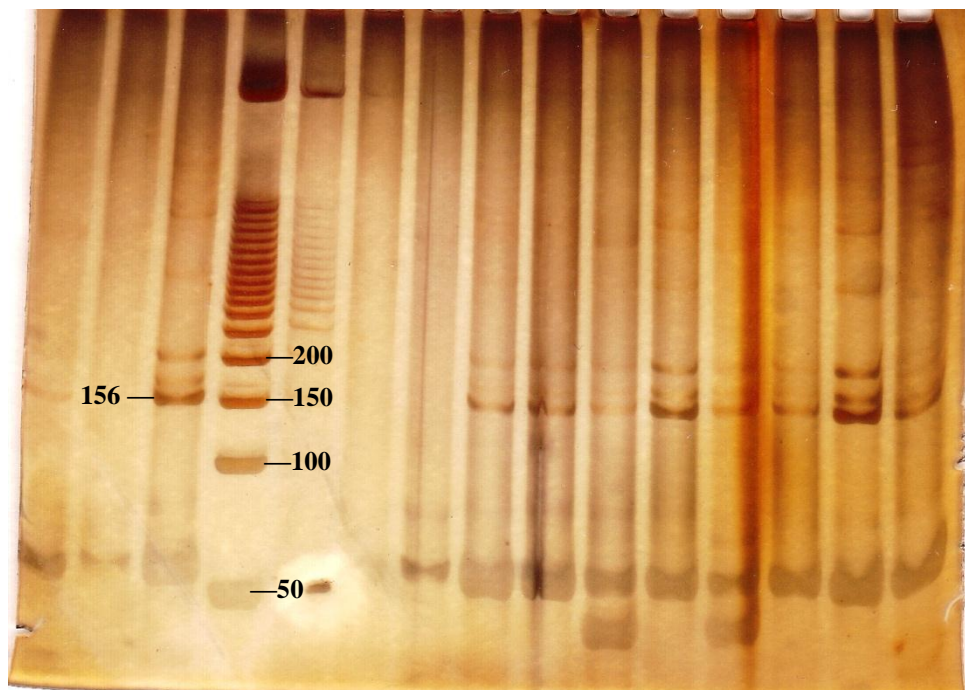
4. Productos del marcador BM175. En él se observan los alelos de 190, 179 y 166 pb.



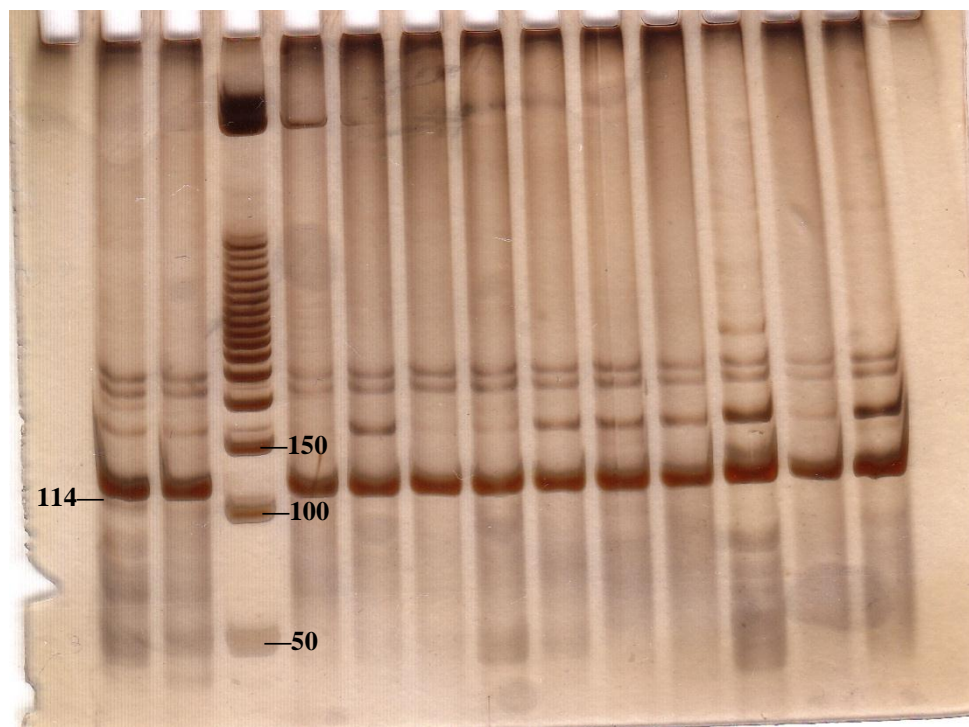
5. Productos del marcador BM137. En él se observan los alelos de 135 y 109 pb.



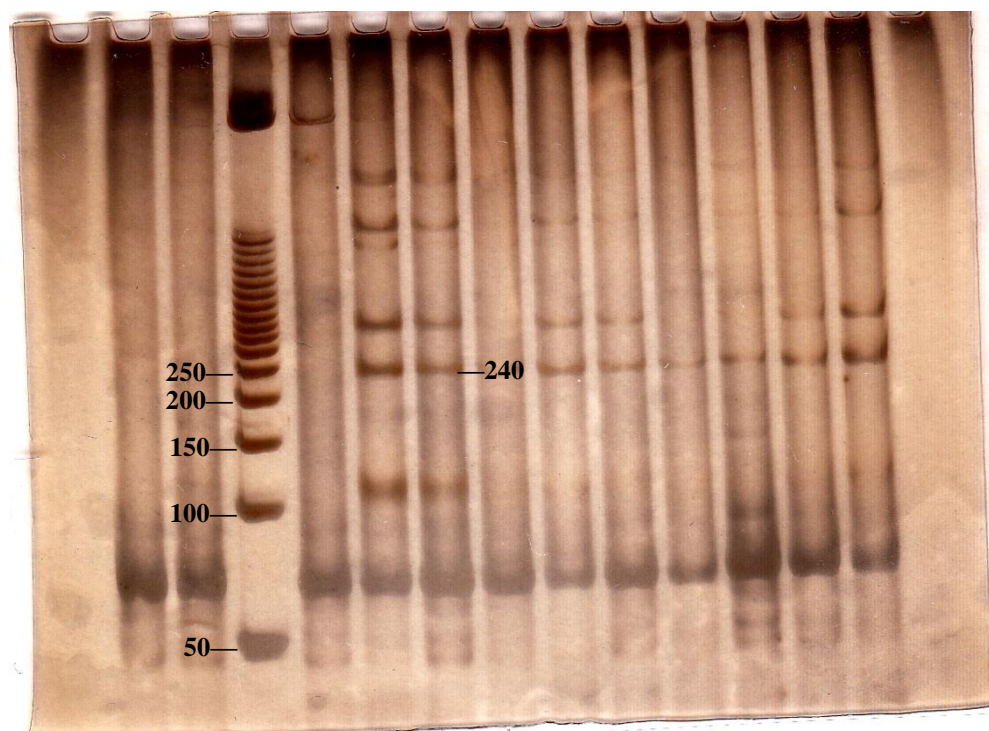
6. Productos del marcador BM183. En él se observa el alelo de 156pb.



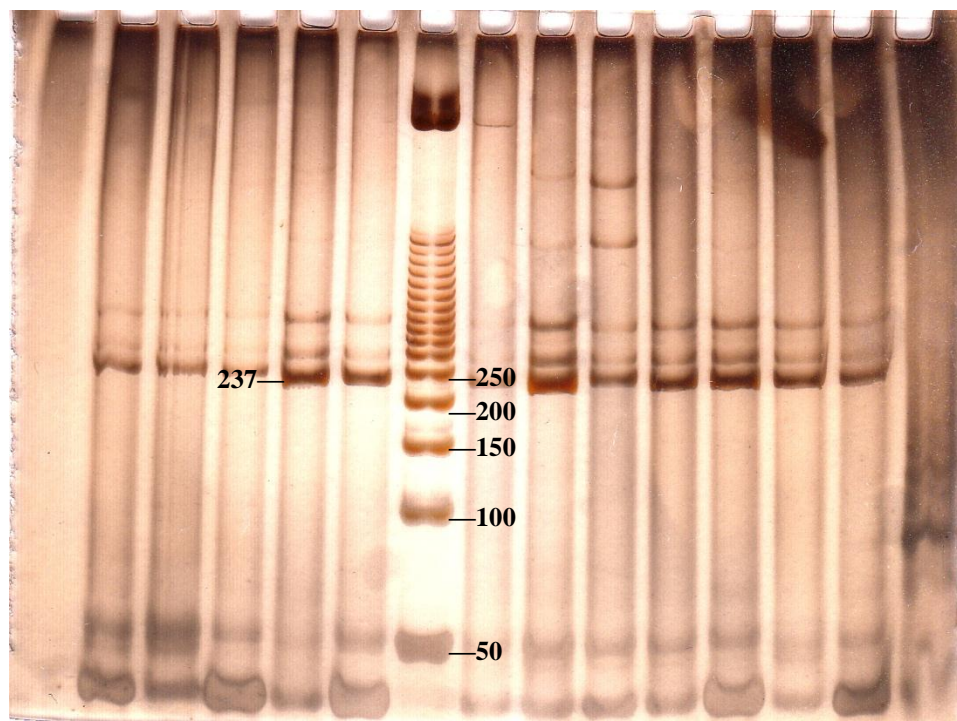
7. Productos del marcador BMd25. En él se observa el alelo de 114pb.



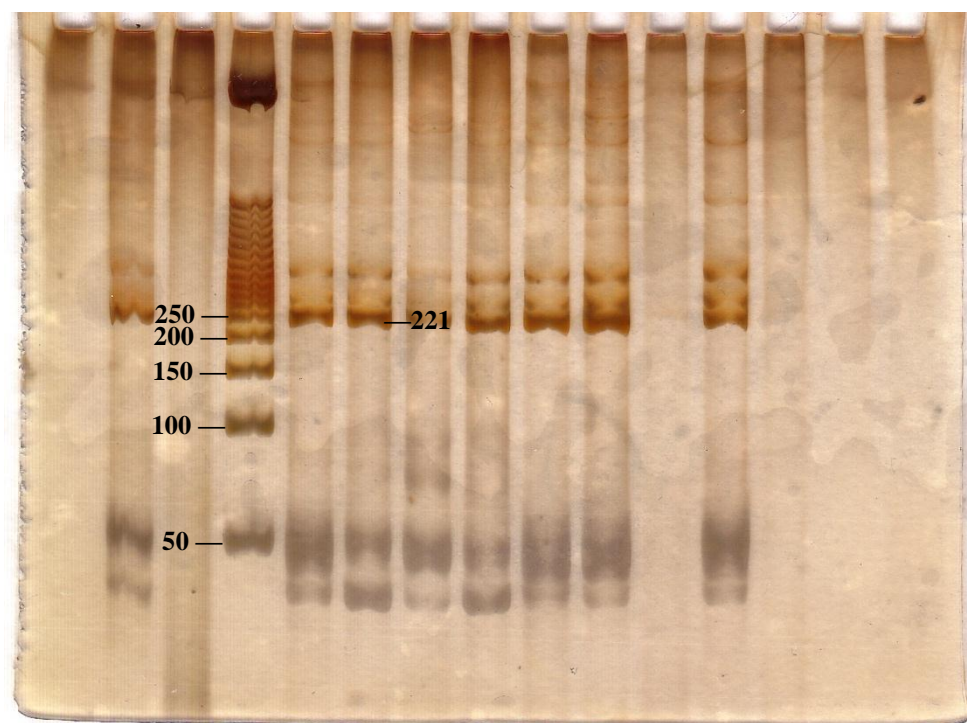
8. Productos del marcador PV-at007. En él se observa el alelo de 240pb.



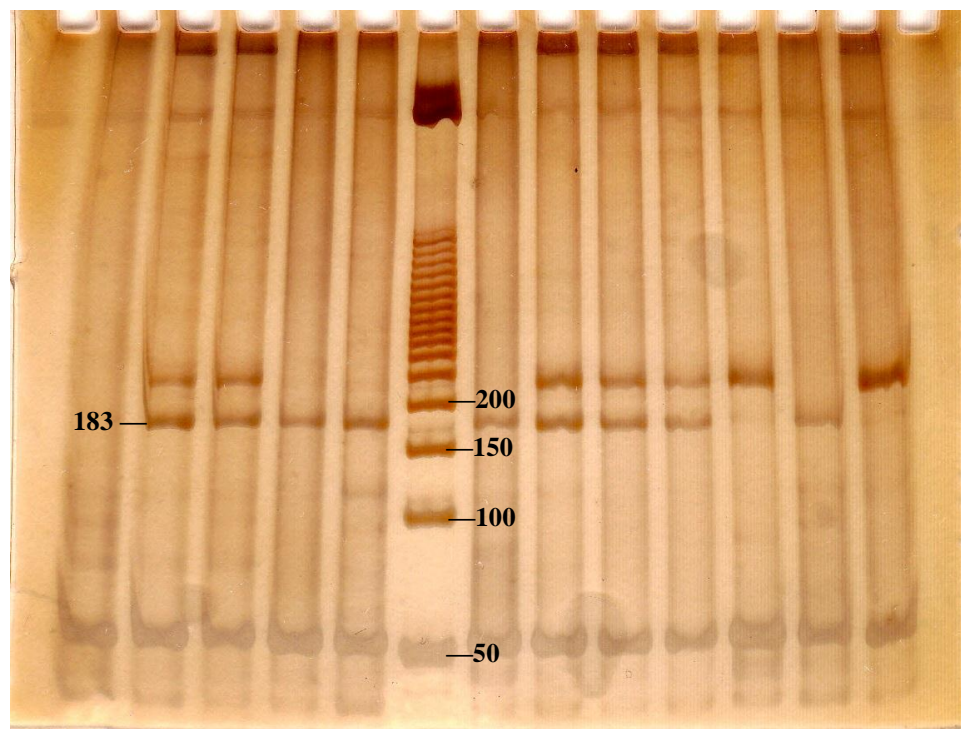
9. Productos del marcador GATS11. En él se observa el alelo de 237pb.



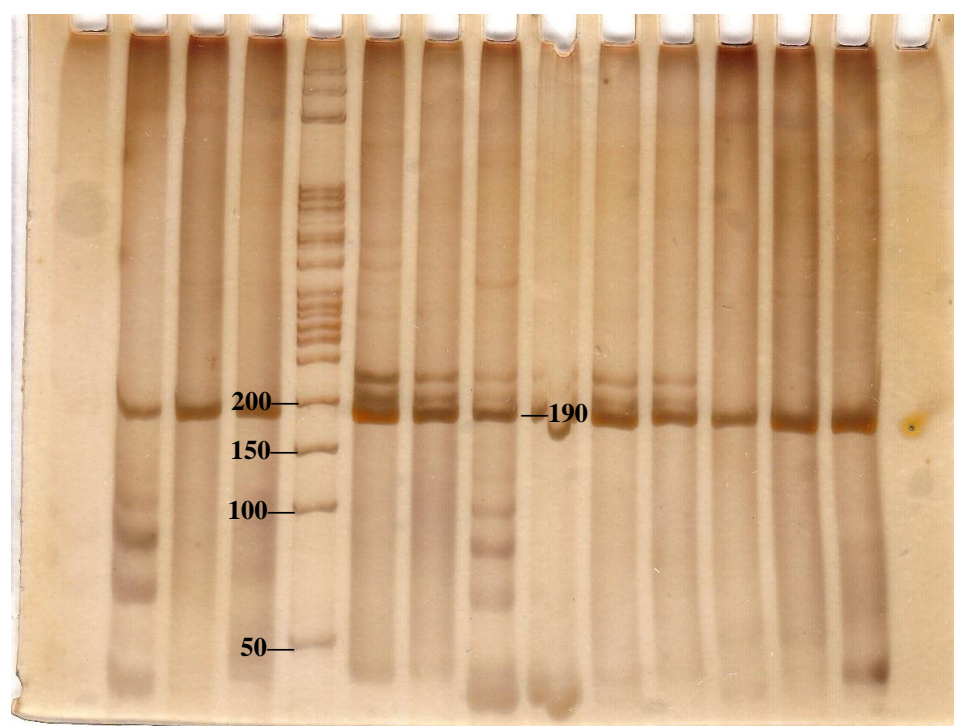
10. Productos del marcador PV-at001. En él se observa el alelo de 221pb.



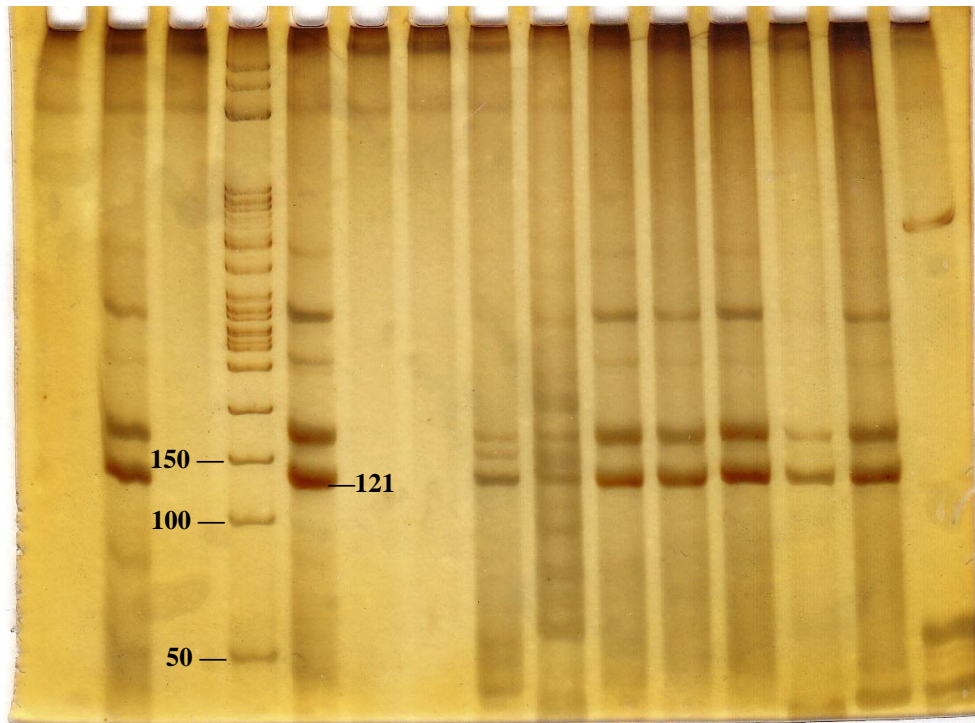
11. Productos del marcador BMd15. En él se observa el alelo de 183pb.



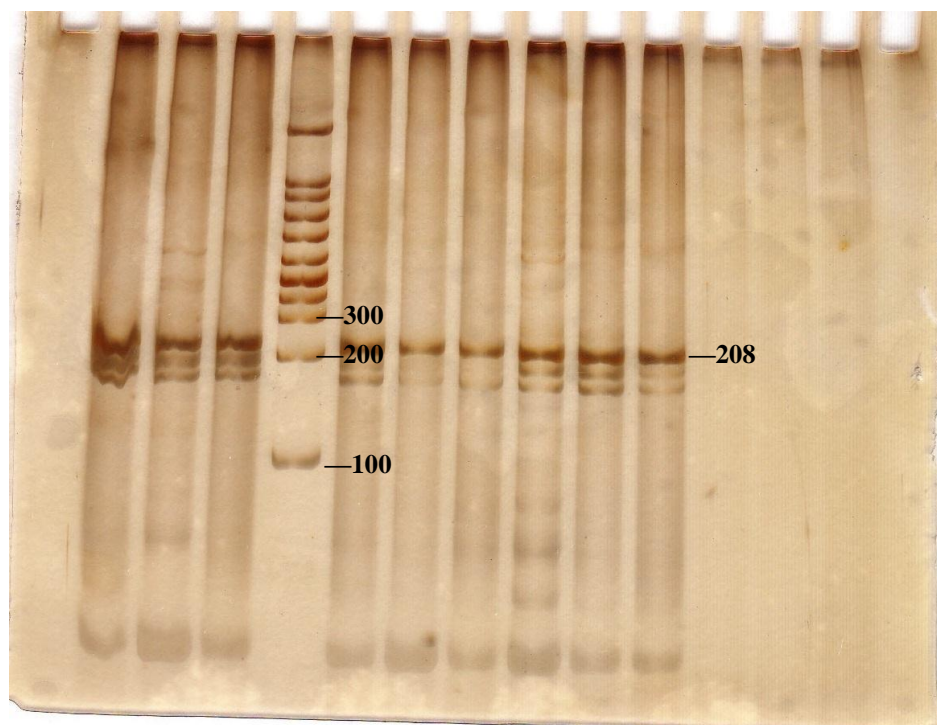
12. Productos del marcador BMd08. En él se observa el alelo de 190pb.



13. Productos del marcador BMd20. En él se observa el alelo de 121pb.



14. Productos del marcador PV-cct001. En él se observa el alelo de 208pb.



D. Resultados de los distintos análisis realizados.

1. Cuadro con la cuantificación y pureza de cada una de las muestras. **Mx:** Número de muestra. **Var:** Variedad. **[ADN]:** Concentración de ADN en ng/uL. **Pureza:** Relación 260/280 de absorbancia para determinar el índice de pureza.

Mx	Var	[ADN]	Pureza	Mx	Var	[ADN]	Pureza
1661	Arb	4481	1.92	1791	DRP25	308	2.04
1662	Arb	920	1.92	1792	DRP25	540	2.54
1663	Arb	854	1.99	1793	DRP25	468	2.75
1671	Arb	521	2.16	1801	DRP40	505	2.2
1673	Arb	415	2.61	1802	DRP40	600	2.4
1681	Arb	1755	2.01	1803	DRP40	463	2.12
1682	Arb	1505	2.03	1811	DRP52	1142	2.11
1683	Arb	1447	1.95	1812	DRP52	649	2.49
1691	Arb	657	1.92	1813	DRP52	1172	2.17
1692	Arb	823	1.92	1821	DRC1	694	2.46
1693	Arb	547	1.95	1822	DRC1	708	2.4
1701	Arb	905	2.14	1823	DRC1	499	2.8
1702	Arb	648	2.2	1831	24C	220	2.13
1703	Arb	669	2.12	1832	24C	339	3
1711	Arb	1037	2.07	1833	24C	657	2.49
1712	Arb	489	2.46	1841	24D	456	2.72
1713	Arb	474	2.28	1842	24D	356	2.66
1721	Tre	1641	1.96	1843	24D	611	2.23
1722	Tre	4719	1.89	1851	A693	1135	2.87
1723	Tre	2259	1.99	1852	A693	461	3.6
1731	Tre	1556	2.03	1853	A693	289	2.57
1732	Tre	1278	1.99	1871	A985	631	2.77
1733	Tre	3100	2	1872	A985	562	2.46
1741	Tre	4678	1.95	1873	A985	878	2.67
1742	Tre	4087	1.99	1881	DRC3	632	3.1
1743	Tre	8227	1.96	1882	DRC3	272	3.18
1751	Tre	5427	2.04	1883	DRC3	402	2.1
1753	Tre	4725	2.01	1891	Tex	812	1.99
1761	Tre	3018	2.02	1892	Tex	2555	1.95
1762	Tre	3318	2	1893	Tex	789	1.98
1763	Tre	4156	2.04	1901	Alt	2848	1.99
1771	DRP11	692	2.24	1902	Alt	1786	2.03
1772	DRP11	1877	2.07	1903	Alt	1389	1.85
1773	DRP11	571	2.4	1911	Hun	1852	2.03
1781	DRP12	1527	2.09	1913	Hun	1957	2.04
1782	DRP12	1908	2.06	1921	Ani	2145	2.14
1783	DRP12	640	2.27	1922	Ani	666	2.25

2. Matriz de alelos para cada uno de los marcadores de SSR's. A continuación se presenta cada muestra (**Mx**) con la descripción de su variedad (**Var**) y los alelos encontrados para cada uno de los marcadores.

Mx	Var	BM200	BM143	BMd01	BM175	BM137	BM183	BMd25	PV-at007	GATS11	PV-at001	BMd15	BMd08	BMd20	PV-cct001
1661	Arb	250/250	141/141	233/233	179/179	133/113	155/155	121/121	228/228	221/221	221/221	253/253	190/190	138/138	229/229
1662	Arb	250/250	129/129	227/227	190/190	110/110	155/155	118/118	240/240	228/228	221/221	183/183	178/178	129/129	208/208
1663	Arb	250/250	103/103	238/238	176/176	120/104	155/155	116/116	216/216	228/228	221/221	248/248	185/185	121/121	218/218
1671	Arb	250/250	129/129	210/210	190/190	173/173	155/155	118/118	240/240	237/237	221/221	183/183	176/176	121/121	208/208
1673	Arb	250/250	129/129	225/225	190/190	105/105	155/155	114/114	240/240	261/261	221/221	183/183	150/150	128/128	208/208
1681	Arb	250/250	136/136	230/230	166/166	100/100	150/150	114/114	212/212	257/257	221/221	240/240	203/203	125/125	211/211
1682	Arb	250/250	138/138	232/232	166/166	100/100	147/147	114/114	212/212	253/253	221/221	238/238	190/190	126/126	217/217
1683	Arb	250/250	143/118	235/235	167/167	100/100	149/149	114/114	216/216	248/248	221/221	238/238	190/190	125/125	208/208
1691	Arb	250/250	101/101	232/232	171/171	094/094	149/149	114/114	219/219	236/236	221/221	183/183	188/188	130/130	217/217
1692	Arb	250/250	127/127	224/224	174/174	100/100	148/148	114/114	219/219	241/241	221/221	183/183	186/186	127/127	218/218
1693	Arb	250/250	109/109	234/234	190/190	096/096	149/149	114/114	240/240	235/235	221/221	250/250	190/190	127/127	229/229
1701	Arb	305/305	136/136	241/207	165/165	178/178	142/169	117/117	237/237	238/238	221/221	240/240	197/197	139/129	214/214
1702	Arb	300/300	106/106	241/205	169/169	131/104	161/149	119/119	256/256	248/248	221/221	230/230	190/190	131/123	231/231
1703	Arb	315/315	143/143	241/202	176/176	127/108	163/150	118/118	240/240	239/239	221/221	221/221	198/198	135/124	225/225
1711	Arb	250/250	141/141	235/235	183/183	132/109	152/152	118/118	240/240	248/248	221/221	162/162	190/190	131/131	221/221
1712	Arb	294/294	140/140	238/238	183/183	128/107	151/151	118/118	240/240	253/253	221/221	163/163	190/190	127/127	219/219
1713	Arb	250/250	164/123	241/241	179/179	126/104	156/156	116/116	240/240	264/264	221/221	165/165	190/190	129/129	219/219
1721	Tre	250/250	143/143	238/238	190/190	125/101	147/147	118/118	230/230	237/237	221/221	183/183	191/191	119/119	218/218
1722	Tre	245/245	151/151	232/232	196/196	127/103	150/150	117/117	240/240	237/237	221/221	183/183	181/181	114/114	218/218
1723	Tre	250/250	140/140	230/230	196/196	124/105	154/154	120/120	236/236	241/241	221/221	183/183	189/189	126/126	215/215
1731	Tre	250/250	129/129	210/210	190/190	135/135	155/155	119/119	240/240	237/237	221/221	183/183	160/160	121/121	208/208
1732	Tre	250/250	129/129	210/210	190/190	135/135	155/155	122/122	240/240	237/237	221/221	183/183	190/190	121/121	208/208
1733	Tre	250/250	129/129	210/210	190/190	135/135	155/155	116/116	240/240	237/237	221/221	183/183	154/154	121/121	208/208
1741	Tre	245/245	127/127	194/194	209/209	126/101	165/165	123/123	208/208	250/250	221/221	183/183	179/179	118/118	222/222
1742	Tre	241/241	132/132	192/192	200/200	123/103	161/161	121/121	210/210	254/254	221/221	185/185	182/182	120/120	214/214
1743	Tre	254/254	138/138	237/237	205/205	133/113	162/162	120/120	240/240	252/252	221/221	189/189	189/189	121/121	222/222
1751	Tre	250/250	129/129	210/210	168/168	135/135	155/155	119/119	240/240	237/237	221/221	183/183	190/190	121/121	208/208
1753	Tre	250/250	129/129	210/210	190/190	135/135	155/155	113/113	240/240	237/237	221/221	183/183	190/190	121/121	208/208
1761	Tre	250/250	129/129	210/210	190/190	135/135	155/155	116/116	240/240	237/237	221/221	183/183	132/132	121/121	208/208
1762	Tre	230/230	111/111	210/210	197/197	136/111	156/156	114/114	240/240	240/240	221/221	183/183	190/190	128/128	222/222
1763	Tre	250/250	107/107	210/210	190/190	135/135	155/155	117/117	240/240	237/237	221/221	183/183	190/190	121/121	208/208

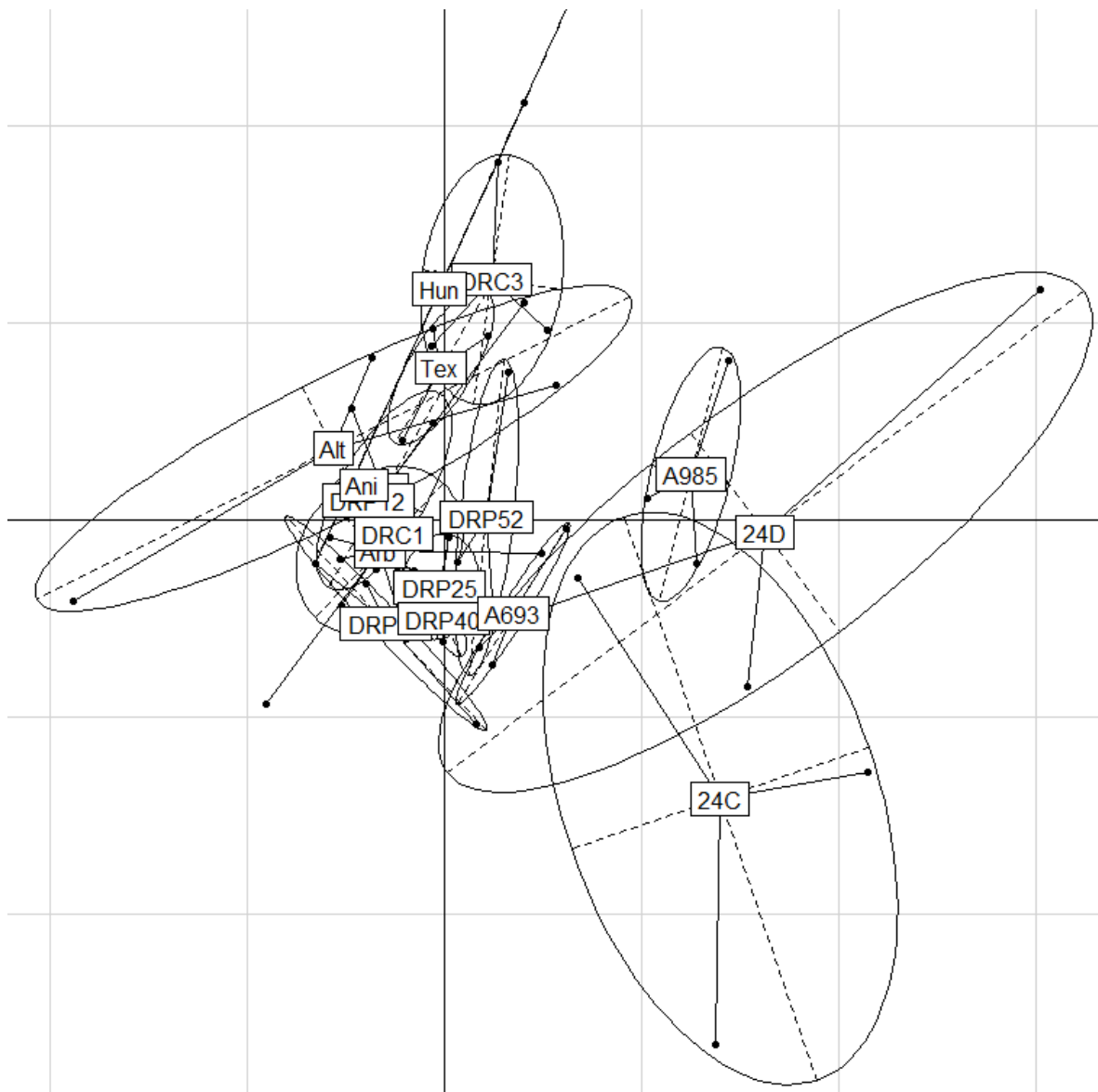
Mx	Var	BM200	BM143	BMd01	BM175	BM137	BM183	BMd25	PV-at007	GATS11	PV-at001	BMd15	BMd08	BMd20	PV-cct001
1771	DRP11	250/250	108/108	240/240	161/161	133/107	166/150	109/109	240/240	223/223	221/221	183/183	180/180	145/145	210/210
1772	DRP11	241/241	107/107	237/237	162/162	133/112	167/150	109/109	240/240	222/222	194/194	183/183	190/190	141/141	205/205
1773	DRP11	250/250	106/106	224/190	165/165	131/109	151/151	110/100	240/240	219/219	194/194	176/176	181/181	142/142	209/209
1781	DRP12	306/306	113/113	201/201	190/190	127/107	150/150	120/120	240/240	221/221	221/221	183/183	178/178	129/129	213/213
1782	DRP12	319/319	107/107	194/194	184/184	133/110	154/154	114/114	230/230	226/226	221/221	183/183	178/178	128/128	219/219
1783	DRP12	302/302	145/145	194/194	192/192	133/112	155/155	117/117	230/230	225/225	221/221	183/183	182/182	127/127	223/223
1791	DRP25	250/250	120/120	210/210	179/179	155/155	135/135	14/114	240/240	222/222	243/243	173/173	189/189	117/177	140/140
1792	DRP25	208/208	142/142	150/150	170/170	156/156	136/136	116/116	250/250	221/221	221/221	171/171	189/189	113/113	141/141
1793	DRP25	208/208	107/107	210/210	161/161	156/156	137/137	114/114	256/256	235/235	244/244	172/172	188/188	114/114	140/140
1801	DRP40	250/250	108/108	147/147	159/159	155/155	150/150	115/115	256/256	274/274	246/246	173/173	187/187	113/113	142/142
1802	DRP40	250/250	108/108	210/210	156/156	156/156	142/142	115/115	281/281	240/240	243/243	173/173	189/189	111/111	145/145
1803	DRP40	250/250	122/122	149/149	158/158	155/155	146/146	118/118	320/320	231/231	243/243	173/173	189/189	109/109	140/140
1811	DRP52	260/260	110/110	189/189	166/166	155/155	181/159	117/117	250/250	245/245	221/221	174/174	209/187	114/114	225/225
1812	DRP52	250/250	121/121	189/189	172/172	157/157	176/160	119/119	219/219	231/231	221/221	172/172	202/188	117/117	218/218
1813	DRP52	277/277	109/109	191/191	170/170	157/157	172/154	124/124	252/252	227/227	221/221	164/164	202/190	108/108	214/214
1821	DRC1	250/250	131/118	192/192	252/252	156/156	200/174	115/115	240/240	226/226	221/221	188/188	202/187	109/109	226/226
1822	DRC1	233/233	108/108	194/194	240/201	155/155	196/173	111/111	240/240	219/219	221/221	182/182	203/186	112/112	206/206
1823	DRC1	234/234	129/129	192/192	233/202	155/155	150/150	114/114	240/240	216/216	221/221	184/184	205/191	111/111	206/206
1831	24C	209/209	107/107	156/156	165/165	164/151	131/131	112/112	241/241	197/197	237/237	180/180	189/189	114/114	137/137
1832	24C	202/202	104/104	153/153	168/168	165/151	134/134	113/113	237/237	205/205	233/233	178/178	186/186	113/113	133/133
1833	24C	250/250	110/110	210/210	172/172	167/151	130/130	113/113	228/228	237/237	240/240	178/178	188/188	119/119	132/132
1841	24D	229/229	158/158	183/183	208/208	164/152	162/145	114/114	226/226	237/237	235/235	176/176	207/197	109/109	203/203
1842	24D	230/230	159/159	188/188	208/208	159/151	164/147	113/113	231/231	254/254	230/230	175/175	208/195	106/106	200/200
1843	24D	250/250	161/161	189/189	206/206	162/151	159/146	114/114	236/236	250/250	221/221	175/175	209/196	107/107	201/201
1851	A693	250/250	109/109	200/200	175/175	163/150	198/149	118/118	236/236	245/245	221/221	176/176	206/194	113/113	198/198
1852	A693	319/319	156/156	199/199	169/169	162/151	196/152	119/119	230/230	237/237	221/221	180/180	202/192	105/105	192/192
1853	A693	250/250	125/125	204/204	167/167	162/151	148/148	120/120	233/233	241/241	221/221	178/178	207/190	116/116	196/196
1871	A985	296/296	114/114	227/227	168/168	161/149	145/145	117/117	240/240	235/235	173/173	185/185	207/195	121/121	231/231
1872	A985	296/296	123/123	229/229	165/165	161/150	146/146	117/117	231/231	239/239	172/172	178/178	205/192	126/126	234/234
1873	A985	293/293	109/109	190/190	172/172	159/150	145/145	117/117	231/231	243/243	177/177	164/164	206/194	128/128	238/238
1881	DRC3	240/240	109/109	193/193	248/211	115/102	145/145	118/118	248/248	237/237	221/221	168/168	199/199	111/111	244/244
1882	DRC3	240/240	128/128	221/221	235/200	119/102	141/141	121/121	246/246	236/236	221/221	167/167	193/193	110/110	238/238
1883	DRC3	240/240	110/110	227/227	235/200	119/103	155/155	117/117	250/250	254/254	221/221	172/172	194/104	110/110	234/234
1891	Tex	241/241	144/144	210/210	207/207	103/103	155/155	115/115	240/240	243/243	221/221	167/167	190/190	121/121	208/208
1892	Tex	246/246	166/166	217/217	230/200	101/101	155/155	111/111	269/269	243/243	221/221	167/167	192/192	109/109	249/249
1893	Tex	256/256	162/143	222/222	231/201	102/102	154/154	113/113	240/240	238/238	221/221	171/171	200/200	110/110	240/240
1901	Alt	254/254	129/129	208/208	244/207	100/100	153/153	106/106	284/284	233/233	224/224	175/175	197/197	111/107	249/249
1902	Alt	245/245	246/146	181/181	243/206	114/102	157/157	108/108	289/289	224/224	217/217	177/177	189/189	112/107	244/244
1903	Alt	236/236	129/129	232/232	253/209	115/101	154/154	131/131	240/240	228/228	221/221	173/173	200/200	115/108	245/245
1911	Hun	236/236	139/139	201/201	214/179	111/102	156/156	125/125	268/268	233/233	230/230	182/182	193/193	118/118	233/233
1913	Hun	250/250	129/129	210/210	190/190	135/135	155/155	126/126	240/240	237/237	221/221	183/183	193/193	129/129	208/208
1921	Ani	237/237	164/164	200/200	190/190	119/103	155/155	120/120	240/240	235/235	221/221	177/177	190/190	139/139	208/208
1922	Ani	250/250	129/129	199/199	190/190	121/102	155/155	117/117	240/240	237/237	221/221	183/183	190/190	145/145	208/208

3. Cuadro de comparación de la información alélica observada contra la obtenida por Blair *et al* (2009).

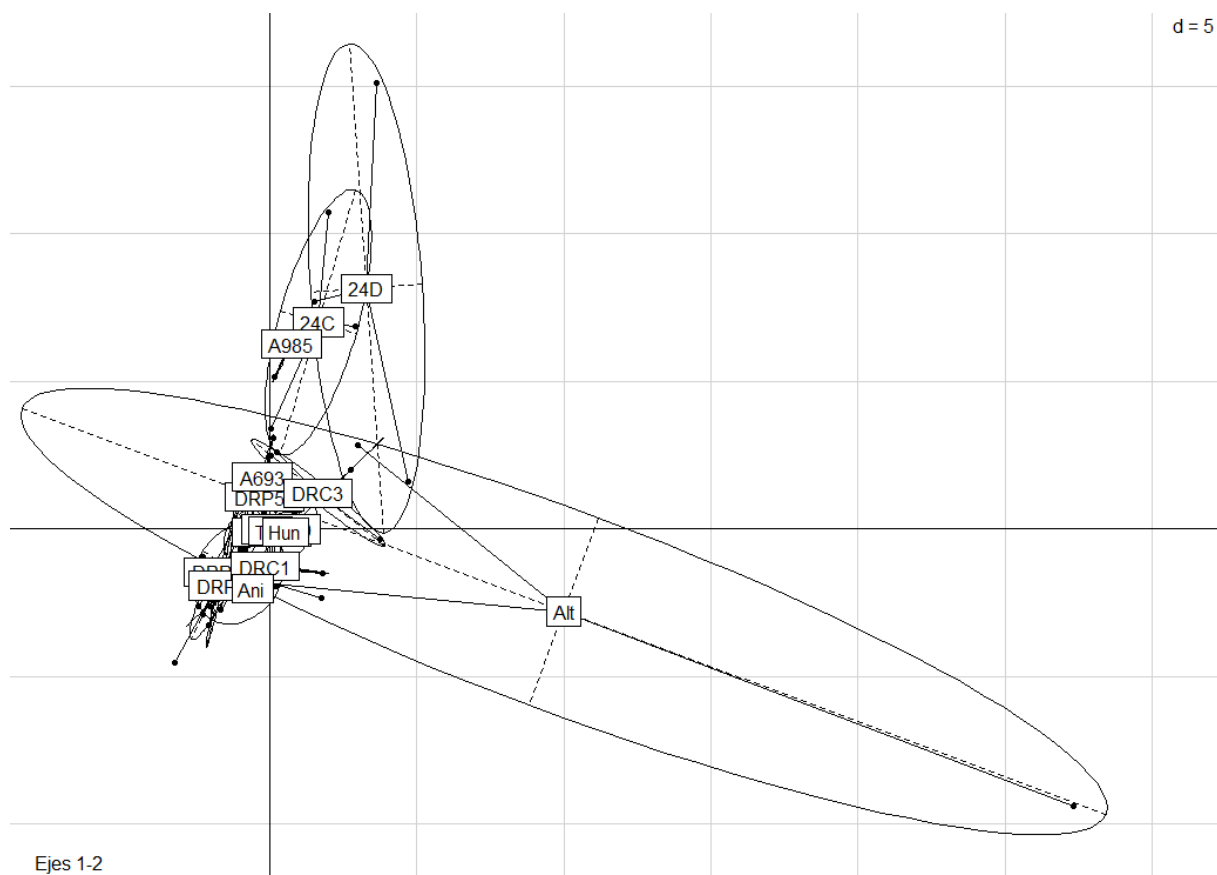
Marcador	Frag. (pb)		No.		Frag.	No. Alelos		Het. Exp.		Het. Obs.		PIC	
	Blair (2008)	Blair (2008)	Blair (2008)	Blair (2008)		Blair (2008)	Alelos Blair (2008)	Blair (2008)	Blair (2008)	Blair (2008)	Blair (2008)	Blair (2008)	Blair (2008)
BMI37	155	122	34	34	135	47	47	0.949	0.958	0	0.541	0.95	0.958
BMd20	123	116	6	6	121	32	32	0.715	0.942	0.048	0.081	0.558	0.942
BMI43	143	118	24	24	129	42	42	0.826	0.939	0.077	0.095	0.925	0.939
BMI75	170	145	17	17	190	42	42	0.598	0.937	0.048	0.149	0.828	0.937
BMd01	165	172	6	6	210	39	39	0.476	0.936	0	0.054	0.782	0.936
PV-ccf001	149	137	6	6	208	39	39	0.272	0.937	0.234	0.000	0.214	0.936
G-ATS11	306	210	7	7	237	32	32	NA	0.930	NA	0.000	NA	0.929
BMd08	176	174	7	7	190	34	34	0.594	0.913	0.019	0.216	0.454	0.912
BMI83	149	134	17	17	156	39	39	0.707	0.908	0.04	0.203	0.751	0.907
BMd25	118	116	3	3	114	21	21	NA	0.905	NA	0.014	NA	0.905
BMd15	166	163	10	10	183	28	28	0.607	0.873	0.297	0.000	0.458	0.872
PV-at007	192	190	10	10	240	25	25	NA	0.785	NA	0.000	NA	0.784
BMI200	221	221	51	51	250	27	27	0.961	0.751	0.042	0.000	0.899	0.75
PV-at001	239	215	42	42	221	15	15	0.952	0.422	0.047	0.000	0.972	0.422

E. Análisis de Componentes Principales (PCA) sin alteración.

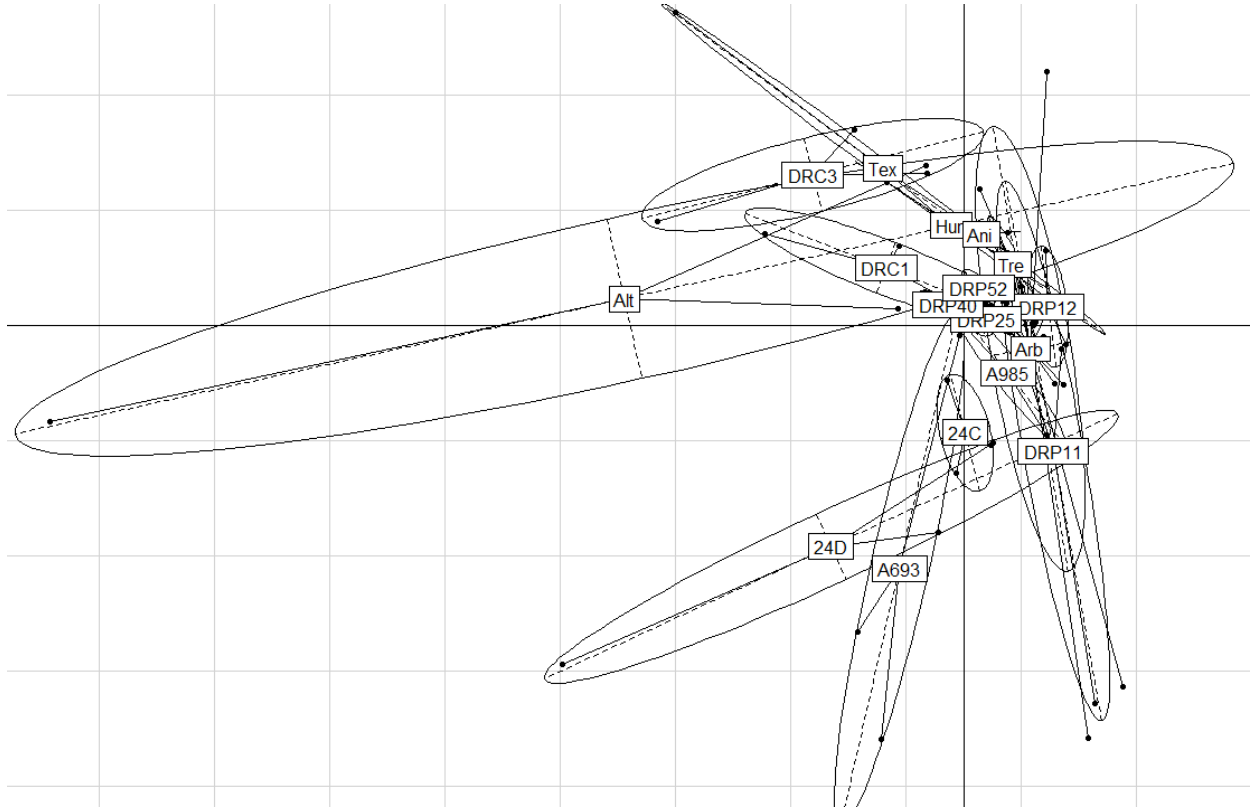
1. PCA utilizando la información de los 14 marcadores utilizados (visualización desde los ejes 2 y 3).



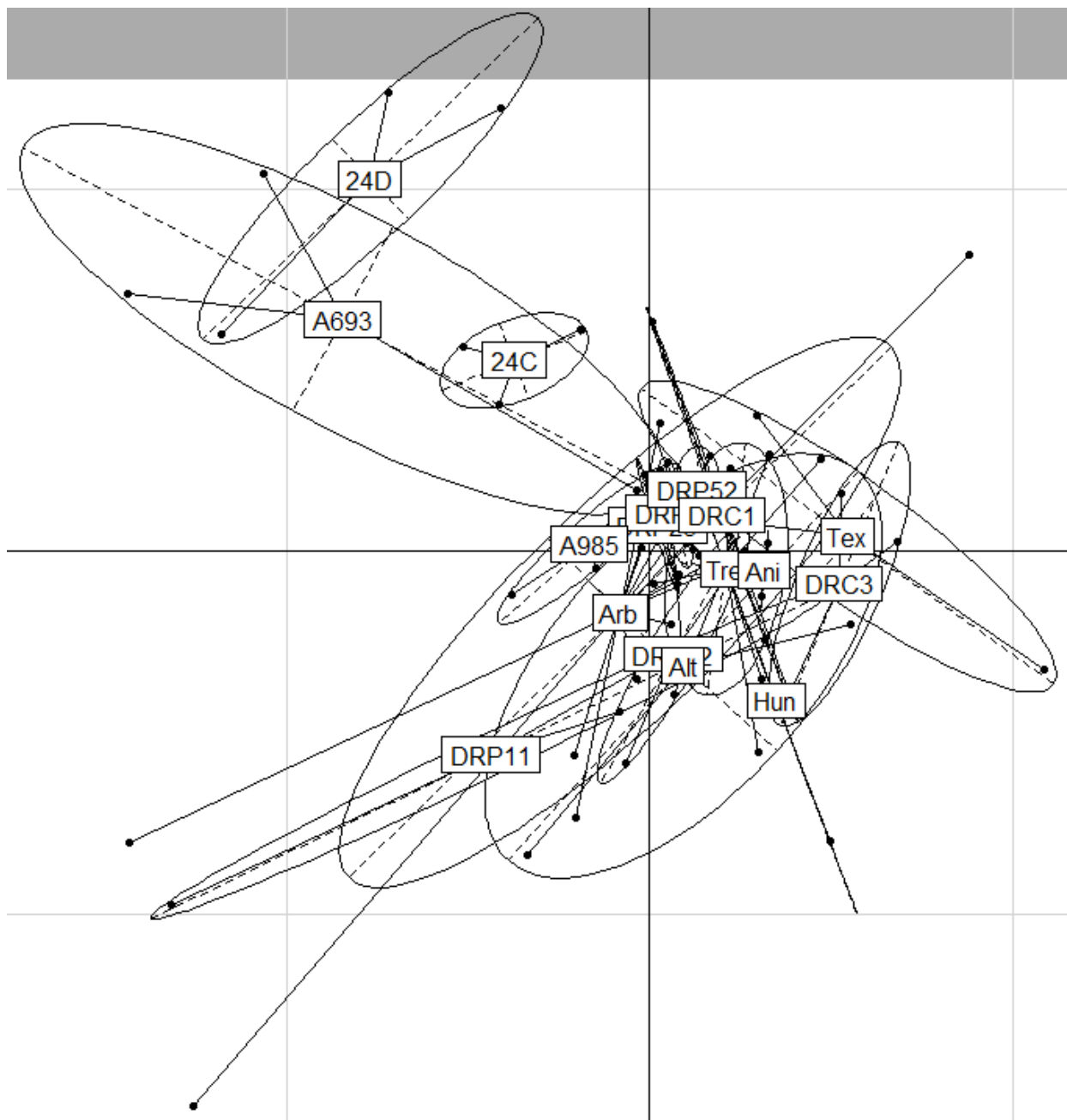
2. PCA utilizando la información de los 14 marcadores utilizados
(visualización desde los ejes 1 y 2).



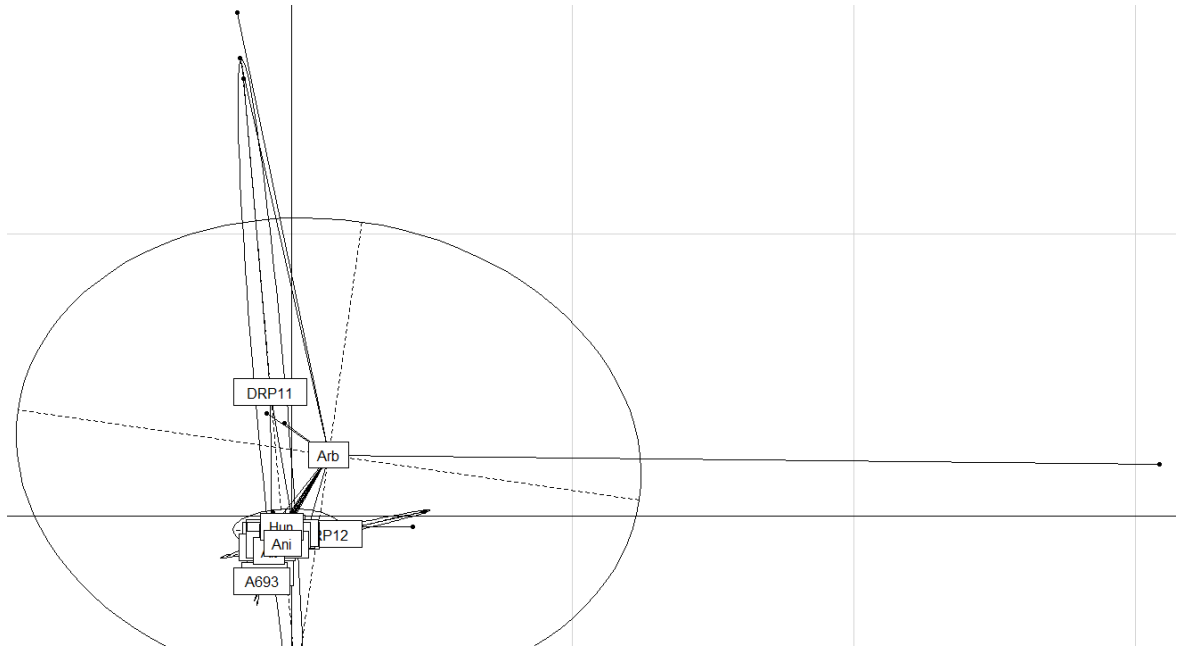
3. PCA utilizando la información del paquete óptimo de marcadores (BM127, BMd20, BM143, BM175, PV-cct001) (visualización desde los ejes 1 y 2).



4. PCA utilizando la información del paquete óptimo de marcadores (BM127, BMd20, BM143, BM175, PV-cct001) (visualización desde los ejes 2 y 3).



5. PCA utilizando la información de los dos marcadores más polimórficos (BM127, BMd20) (visualización desde los ejes 1 y 2).



6. PCA utilizando la información de los dos marcadores más polimórficos (BM127, BMd20) (visualización desde los ejes 2 y 3).

