

ESCUELA POLITECNICA DEL EJERCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA COLECCIÓN
LOJANA DE FREJOL ARBUSTIVO (*Phaseolus vulgaris*
L.) CONSERVADA EN EL BANCO NACIONAL DE
GERMOPLASMA DEL INIAP – ECUADOR**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGIA

ELABORADO POR:

VERÓNICA ALEJANDRA BONILLA HERMOSA

SANGOLQUI, 20 de Mayo de 2010

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

Verónica Alejandra Bonilla Hermosa

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vanessa Andrade

Lugar y fecha: SANGOLQUÍ, 20 de Mayo de 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. VERÓNICA ALEJANDRA BONILLA HERMOSA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

20 de Mayo de 2010

Fecha

Dra. Patricia Jiménez

Dra. Karina Proaño

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “Caracterización molecular de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP-ECUADOR”, realizado por la egresada Verónica Alejandra Bonilla Hermosa, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP y financiado por los proyectos de Fortalecimiento-Seguridad Alimentaria, componente Biotecnología, se deja en libertad de la autora y del INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Verónica Alejandra Bonilla Hermosa que lo entregue al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 20 de Mayo de 2010

Ing. Rafael Vargas
COORDINADOR DE CARRERA

Dr. Eduardo Morillo
CODIRECTOR (INIAP)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, VERONICA ALEJANDRA BONILLA HERMOSA

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Caracterización molecular de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP-ECUADOR”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 20 de Mayo de 2010

Verónica Alejandra Bonilla Hermosa

AUTORIZACIÓN

Yo, VERONICA ALEJANDRA BONILLA HERMOSA

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución de la tesis de grado titulada: “CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA COLECCIÓN LOJANA DE FRÉJOL ARBUSTIVO (*Phaseolus vulgaris* L.) CONSERVADA EN EL BANCO NACIONAL DE GERMOPLASMA DEL INIAP-ECUADOR”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 20 de mayo del 2010

Verónica Alejandra Bonilla Hermosa

DEDICATORIA

A los pilares de mi vida Teresa, Héctor, Katty, Héctor A. y José

VERÓNICA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la vida, por permitirme disfrutar de ella y compartirla con toda la gente maravillosa que ha puesto a mi lado.

Quiero expresar un especial agradecimiento al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), que por medio de los Proyectos de Fortalecimiento-Seguridad alimentaria componente Biotecnología, financió los costos operativos para la consecución de la presente investigación.

Expreso mis sinceros agradecimientos al Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) del a través del Dr. Eduardo Morillo, jefe del Departamento, por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo, por su guía y ayuda en todo momento.

A la Ing. Karina García, por guiarme en todo el proceso, por sus correcciones y por compartir conmigo sus conocimientos tanto en la parte experimental como en el análisis estadístico de los datos. A la Ing. Gabriela Miño por su ayuda en la parte logística, sus enseñanzas y ayuda en el laboratorio y por permitirme participar en sus proyectos de investigación. Sobre todo gracias por brindarme su amistad.

Al Programa de Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG), por medio del Ing. Eduardo Peralta por permitirme realizar esta investigación con las accesiones sembradas por dicho programa.

Al Centro Internacional de la Papa, por permitirme realizar varios geles de agarosa en su laboratorio y facilitarme algunos reactivos para el desarrollo de esta tesis.

A la Escuela Politécnica del Ejército, facultad de Ingeniería en Biotecnología, a todos mis profesores por los conocimientos y la formación personal recibidos a lo largo de la carrera. En especial a mi Directora la Dra. Patricia Jiménez y a mi Codirectora la Dra. Karina Proaño por su apoyo en la corrección de la tesis y las recomendaciones brindadas.

A todos mis compañeros egresados del DNB, tanto de biología molecular como de cultivo de tejidos, que convivimos juntos esta etapa de realización de nuestras tesis, por su apoyo y ayuda constantes. Gracias a todos ustedes por ofrecerme su amistad y porque juntos compartimos agradables momentos.

A todos mis amigos y amigas, por darme su cariño y apoyo incondicional, por compartir su vida y experiencias conmigo, mil gracias por todos los momentos vividos que siempre quedarán grabados en mi mente y en mi corazón.

A toda mi familia, especialmente a mis padres y hermanos, por su amor, su apoyo, sus enseñanzas y constante preocupación, muchas gracias por confiar en mí, a ustedes les debo todo lo que soy. A José, mi mitad, por su amor, por caminar junto a mí en la vida por estar a mi lado siempre apoyándome e incentivándome para seguir adelante a pesar de todas las dificultades. Gracias a ustedes puedo ser una mejor persona cada día.

A todos quienes de una u otra forma me apoyaron y colaboraron en la realización de este estudio.

MUCHAS GRACIAS.....

VERÓNICA

INDICE DE CONTENIDOS

LISTADO DE TABLAS.....	xiii
LISTADO DE FIGURAS.....	xiv
LISTADO DE ANEXOS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii

CAPÍTULO 1: INTRODUCCION

1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	3
1.4 Marco Teórico.....	3
1.4.1 Fréjol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	3
1.4.1.1 Descripción botánica del fréjol común.....	5
1.4.1.2 Origen y domesticación del fréjol común.....	6
1.4.1.3 Producción e importancia del cultivo del fréjol.....	7
1.4.1.4 Diversidad genética del fréjol común.....	9
1.4.2 Caracterización molecular del germoplasma.....	10
1.4.2.1 Marcadores Moleculares.....	11
1.4.2.2 Microsatélites.....	12
1.4.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	15
1.4.2.4 Analizador de ADN LI-COR 4300.....	16
1.5 Hipótesis.....	18

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes.....	19
2.2 Zona de Estudio.....	19
2.2.1 Fase de campo.....	19
2.2.2 Fase de laboratorio.....	19
2.3 Período de tiempo de investigación.....	20
2.4 Análisis bioinformático.....	20

2.5	Procedimiento.....	20
2.5.1	Material vegetal.....	20
2.5.2	Caracterización Molecular.....	22
2.5.2.1	Extracción de ADN genómico.....	22
2.5.2.2	Cuantificación de ADN.....	23
2.5.2.3	Amplificación de Microsatélites.....	23
2.5.2.4	Genotipaje de la colección lojana de fréjol arbustivo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L) en el Software SAGA ^{GT} Microsatellite.....	26
2.5.2.5	Amplificación y genotipaje en el secuenciador ABI-310 de los loci SSR no amplificados (gaps) en algunas accesiones de fréjol Arbustivo.....	27
2.6	Análisis de datos	28
2.6.1	Análisis de diversidad genética	28
2.6.2	Estructura Genética	30
2.6.2.1	Análisis de Agrupamiento.....	30
2.6.2.2	Métodos Multivariados.....	31
2.6.2.3	Estadísticas F.....	32
2.6.2.4	Análisis Molecular de Varianza.....	33
2.6.2.5	Distancia Genética	33
2.6.3	Identificación de duplicados.....	34

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1	Caracterización molecular	35
3.1.1	Extracción y cuantificación de ADN genómico.....	35
3.1.2	Amplificación de microsatélites.....	35
3.1.2.1	Pruebas de amplificación de las muestras de ADN.....	35
3.1.2.2	Pruebas de amplificación y de duplexaje de SSR con la técnica M13-tailing para el analizador LI-COR 4300.....	36
3.1.3	Genotipaje de la colección lojana de fréjol arbustivo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	38
3.1.4	Amplificación y genotipaje de gaps	40
3.2	Análisis de datos.....	41
3.2.1	Diversidad genética de la colección lojana de fréjol arbustivo.....	41
3.2.2	Estructura genética.....	45

3.2.2.1	Análisis de agrupamiento.....	45
3.2.2.2	Métodos Multivariados.....	48
3.2.2.3	Estadísticas F.....	50
3.2.2.4	Análisis Molecular de Varianza.....	51
3.2.2.5	Distancia Genética.....	51
3.2.3	Diversidad genética comparativa de los grupos G1 y G2 de la colección lojana de fréjol arbustivo.....	52
3.2.4	Análisis de Coordenadas Principales (PCO) para el grupo G2.....	55
3.2.5	Identificación de duplicados.....	56

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1	Sobre la selección de los marcadores SSR para el estudio.....	57
4.2	Diversidad genética de la colección lojana de fréjol arbustivo.....	58
4.3	Diferenciación genética de los grupos G1 y G2 de la colección lojana de fréjol arbustivo.....	60
4.4	Comparación de la diversidad genética en los grupos G1 y G2.....	63
4.5	Análisis de variabilidad genética del grupo G2 (Andino).....	65

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES67

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....69

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....71

ANEXOS.....84

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1	Coctel de reacción para la amplificación de microsatélites individuales y en dúplex, mediante la técnica M-13 tailing.....	25
Tabla 3.1	Combinaciones de duplexaje SSR para el genotipaje de la colección lojana de fréjol arbustivo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	37
Tabla 3.2	Primers individuales SSR para el genotipaje de la colección lojana de fréjol arbustivo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	37
Tabla 3.3	Alelos registrados con sus respectivas frecuencias para 122 accesiones de fréjol arbustivo con nueve loci SSR. En azul se muestran los alelos menos frecuentes de cada locus SSR y en rojo están los alelos más frecuentes.....	42
Tabla 3.4	Parámetros de diversidad genética observados en la colección lojana de fréjol arbustivo, con 122 individuos y nueve marcadores SSR.....	44
Tabla 3.5	Valores Eigen y porcentajes individuales y acumulados de la varianza para las tres primeras coordenadas, para la colección lojana de fréjol arbustivo.....	48
Tabla 3.6	Estadísticas F (Weir y Cockerham, 1984) para 122 accesiones de fréjol arbustivo analizadas con nueve loci SSR.....	51
Tabla 3.7	Parámetros de diversidad genética observados en los grupos G1 y G2 de la colección lojana de fréjol arbustivo.....	53
Tabla 3.8	Alelos exclusivos para los grupos G1 y G2 de accesiones de fréjol arbustivo analizadas con nueve loci microsatélites.....	54

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Detección de los IR dye de los primers mediante los detectores del LI-COR 4300 (LI-COR Biosciences, 2009).....	18
Figura 2.1 Fotografías de la recolección de fréjol arbustivo en la Granja Experimental Tumbaco.....	21
Figura 3.1 Cuantificación de muestras de ADN genómico de las accesiones de fréjol arbustivo (Carril 1 al 16: muestras de ADN, carril inicial: marcador de peso molecular).....	35
Figura 3.2 Productos de amplificación de las muestras de fréjol arbustivo en gel de agarosa al 2%, con el primer BM-164 (Carriles 1 al 9: bandas del SSR, carril inicial: marcador de peso molecular 100bp).....	36
Figura 3.3 Gel que muestra la amplificación de si accesiones de fréjol arbustivo, con las combinaciones A y B de loci SSR.....	38
Figura 3.4 Imágenes de los geles obtenidos en SAGA ^{GT} Microsatellite versión 3.3, que indican algunos alelos correspondientes a los nueve loci SSR analizados, el BM-143 se observa como el más polimórfico. Los individuos heterocigotos se señalan con óvalos rojos.....	39
Figura 3.5 Imágenes de los geles obtenidos en SAGA ^{GT} Microsatellite versión 3.3, que indican algunos alelos correspondientes a los nueve loci SSR analizados. Los individuos heterocigotos se señalan con óvalos rojos.....	40
Figura 3.6 Dendrograma UPGMA basado en la distancia de alelos compartidos (DAS), que indica la agrupación de las 122 accesiones de fréjol arbustivo.....	46
Figura 3.7 Árbol NJ basado en la distancia de alelos compartidos (DAS), que indica la agrupación de las 122 accesiones de fréjol arbustivo.....	47
Figura 3.8 Análisis de Coordenadas Principales, obtenido con el coeficiente de similitud SM, que indica la agrupación de 122 accesiones de fréjol arbustivo en las dos primeras coordenadas. En color naranja se indican las accesiones del grupo G1 y en azul las accesiones del grupo G2.....	49
Figura 3.9 Análisis de Coordenadas Principales, que indica la agrupación de 122 accesiones de fréjol arbustivo analizados con nueve loci SSR en las tres primeras coordenadas.....	50

Figura 3.10 Análisis de Coordenadas Principales, obtenido con el coeficiente de similitud SM, que indica la dispersión de 104 accesiones de frejol arbustivo del grupo G2 en las dos primeras coordenadas.....55

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A. Lista de las 123 accesiones lojanas de fréjol arbustivo de la colección del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.....	84
ANEXO B. Microsatélites de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. seleccionados para el estudio de variabilidad genética (Gaitán-Solís <i>et al.</i> , 2002; Blair, com. Pers.).....	87
ANEXO C. Matriz genotípica base con las tallas de los alelos encontrados en el genotipaje de 122 accesiones de frejol arbustivo mediante 9 locus SSR. Matriz base para el análisis de datos en los diferentes programas estadísticos. A1: alelo 1 y A2: alelo 2.....	88

RESUMEN

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más importantes para el consumo humano a nivel mundial por su alta concentración de proteínas, especialmente en países de bajos recursos económicos. El objetivo del presente estudio fue caracterizar molecularmente 123 accesiones de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP- Ecuador, mediante 10 marcadores microsatélites marcados con fluorescencia por la técnica M13-Tailing. Se extrajo el ADN de las accesiones mediante un kit comercial, se amplificaron los SSRs mediante PCR y se genotiparon en el analizador de ADN LI-COR 4300. Se detectaron 83 alelos con un promedio de 9.22 alelos por marcador, además se encontró una alta diversidad genética de 0,723 y una heterocigosidad observada de 0.109. Los métodos UPGMA, Neighbor-Joining y el Análisis de Coordenadas Principales revelaron dos grupos de accesiones dentro de la colección lojana, que corresponden presumiblemente a los acervos Mesoamericano y Andino considerando las diferencias en caracteres morfológicos y en los estadísticos F_{st} (0.307), AMOVA (31%) y distancia genética de Nei (1.63) que mostraron alta diferencia genética entre ambos grupos, además de la presencia de alelos exclusivos para cada grupo. El grupo predominante y con mayor diversidad genética fue el de accesiones posiblemente andinas, pero no presentó una subestructuración definida. La gran variabilidad genética encontrada en la colección lojana de fréjol arbustivo puede ser de mucha utilidad para futuros proyectos de mejoramiento genético y de conservación del germoplasma.

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume for human consumption in the world for its high protein concentration, especially in countries with low economic resources. The objective of this study was to characterize the genetic variability of 123 accessions of the bush bean Loja`s collection (*Phaseolus vulgaris* L.) preserved in Germplasm's National Bank of the INIAP – Ecuador, using 10 SSR primer pairs marked with fluorescence by the technology M13-Tailing. The DNA of the accessions was extracted by a commercial kit, the SSRs were amplified by PCR and the products were genotyped in the DNA analyzer LI-COR 4300. Eighty-three alleles were detected with average of 9.22 alleles per locus, in addition, a high genetic diversity (0,723) was found and the observed heterozygosity was 0.109. The methods UPGMA, Neighbor-Joining and the Principal Coordinate Analysis revealed two groups of accessions inside the Loja`s collection, that probably belong to the Mesoamerican and Andean major gene pools considering differences in some morphologic traits and in the statisticians F_{st} (0.307), AMOVA (31 %) and Nei's genetic distance (1.63) that showed high genetic difference between both groups, furthermore each group presented exclusive alleles. The possible Andean group was predominant and it had major genetic diversity than the Mesoamerican group, but the Andean group didn't show a clear substructure. The great genetic variability found in bush bean Loja`s collection, can be very useful in future projects of genetic improvement and of germplasm conservation.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas de mayor consumo en el mundo, por su sabor y por el grado de nutrientes proteicos, carbohidratos, minerales y fibra, con los que aporta en la dieta diaria humana.

En el Ecuador existe una gran variedad en lo que a fréjol se refiere, específicamente la provincia de Loja es considerada uno de los principales centros de diversificación de esta leguminosa (Debouck, 1992). Es así que de las 190 accesiones de fréjol arbustivo colectadas en el Ecuador y almacenadas en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP, a Loja le corresponden 123 accesiones, es decir 65% de las accesiones ecuatorianas, un porcentaje que hace de ésta provincia una región de interés para el análisis de la diversidad de fréjol local.

Esta colección de fréjol de alto valor agronómico aún no ha sido estudiada genéticamente, por ello, la información de su organización genética y de la relación existente entre el material es escasa; la falta de una caracterización hace que no se conozca el potencial uso de su germoplasma y además dificulta la identificación y selección de materiales promisorios para procesos de fitomejoramiento. Incluso dentro de la colección pueden existir materiales considerados como accesiones diferentes que resulten ser duplicados del mismo material, lo cual conlleva a una sobreestimación de la diversidad existente.

Otro problema es que en la actualidad la destrucción de hábitats, los cambios en los hábitos alimenticios, la modernización de las prácticas agrícolas y el desplazamiento de los cultivos autóctonos están causando erosión genética y provocan el abandono y la desaparición de muchos cultivares tradicionales, como ciertas variedades de fréjol, que han sido manejados por diversas culturas y comunidades (González, 2002).

Por todo esto, es importante que se realice una caracterización molecular de fréjol arbustivo, lo que contribuirá a conocer la diversidad genética de las accesiones evaluadas. Esta información dará las bases para establecer programas de recuperación del cultivo y de mejoramiento genético, lo cual ayuda a garantizar el uso y conservación de este germoplasma de amplio interés económico.

El presente estudio se enfoca en la colección de accesiones lojanas, es complementario y forma parte del proyecto de caracterización molecular de toda la colección de fréjol arbustivo conservada en el Banco de Germoplasma del INIAP.

1.2 Justificación

Dada la importancia agronómica del fréjol en nuestro país y a nivel mundial, es primordial estudiarlo a nivel molecular mediante marcadores moleculares microsatélites, los cuales proporcionan una información complementaria a los estudios morfo-agronómicos, no requieren de largos periodos de tiempo para coleccionar los datos y, además, no están influenciados por el medio ambiente (Becerra y Paredes, 2000).

En el Ecuador, recientemente, se ha iniciado la investigación a nivel genético, por lo que éste estudio contribuye al conocimiento de la diversidad genética de nuestros recursos fitogenéticos, como es el caso del fréjol arbustivo, el cual aun no sido estudiado molecularmente.

A partir de la caracterización molecular de las diferentes accesiones lojanas de fréjol arbustivo, se puede conocer su variabilidad genética, establecer semejanzas y diferencias entre las accesiones y distinguir genotipos estrechamente relacionados; todo esto es importante para identificar materiales promisorios de mayor producción, adaptabilidad y resistencia a enfermedades, es decir para encontrar genes de interés agronómico. Los resultados obtenidos de la caracterización molecular serán complementados con estudios morfológicos y agronómicos del fréjol, y toda la información en conjunto aportará en el mejoramiento de estrategias y tecnologías de cultivo, cosecha y post cosecha, a la potenciación de los recursos genéticos de fréjol arbustivo, principalmente de origen local y de uso tradicional, así también al desarrollo de proyectos de fitomejoramiento; lo que implica una mayor producción y por ende

mayores beneficios económicos para los agricultores, además de lograr un desarrollo sustentable y mejores condiciones de vida para el país. La información de la diversidad genética Loja permitirá comparar con la riqueza genética de otras regiones del país con perspectivas de establecer estrategias de conservación *in-situ* de esta leguminosa.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar molecularmente la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP- Ecuador, mediante marcadores microsatélites.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la variabilidad genética de 123 accesiones de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L) provenientes de la provincia de Loja con 10 marcadores microsatélites (SSR).
- Estimar el nivel de heterocigosidad y diversidad alélica de la colección lojana de fréjol arbustivo.
- Determinar duplicados y grupos representativos de la diversidad en la colección lojana de fréjol.
- Identificar zonas de mayor diversidad genética de *P. vulgaris* en la provincia de Loja.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El cultivo de fréjol común es considerado uno de los más antiguos, los hallazgos arqueológicos en Centro y Suramérica indican que era conocido unos 5000 años antes de la era cristiana (Debouck, 1984).

El género *Phaseolus*, consta de aproximadamente 55 especies en el continente americano (Debouck, 1991). Cinco especies del género son cultivadas y tienen importancia económica a nivel mundial: *Phaseolus vulgaris* L., *P. coccineus*, *P. polyanthus*, *P. acutifolius* y *P. lunatus* (Baudoin *et al.*, 2004).

De estas especies, la más conocida es *Phaseolus vulgaris* L., que es una dicotiledónea herbácea anual, perteneciente al orden fabales, familia de las fabáceas y tribu Phaseolae. Presenta una enorme variabilidad genética y existen miles de cultivares silvestres y cultivados que producen semillas de varios tamaños, formas.

El fréjol común se cultiva desde los trópicos hasta las zonas templadas de prácticamente todo el mundo, su diseminación a otras partes del mundo se dio a partir del descubrimiento de América (Debouck, 1984). La forma silvestre del género *Phaseolus* se extiende desde Durango o tal vez desde Chihuahua en México (Nabhan *et al.*, 1986) hasta San Luis, Argentina (Burkart & Bucher, 1953) bajo una distribución continua usualmente arriba de 1000 m.s.n.m.

En nuestro país, según el III Censo Agropecuario, la superficie cosechada de fréjol voluble y arbustivo, al año, es de aproximadamente 117.907 has en grano verde y seco (MAG, 2005), de esta superficie aproximadamente la mitad de los cultivos son del tipo arbustivo (Voyses, 2000) y su cultivo va en aument. Si se toma en cuenta el volumen total de producción, el fréjol arbustivo tiene un mayor aporte por sus mayores rendimientos unitarios en relación al fréjol voluble (Lépiz *et al.*, 1995). Los factores que han impulsado el aumento de siembra de fréjol arbustivo son: el buen precio de fréjol rojo moteado en Colombia, las facilidades para su exportación y la disponibilidad de una tecnología que puede alcanzar rendimientos de 1.5 ton/ha o más, bajo un buen manejo (Lépiz *et al.*, 1995).

El fréjol común es un cultivo diploide $2n=22$ de reproducción autógama (Mora, 1997). La morfología floral que posee favorece el mecanismo de autopolinización, ya que las anteras están al mismo nivel que el estigma y ambos órganos están envueltos completamente por la quilla. Llegada la dehiscencia de las anteras, habitualmente con las flores aún cerradas, el polen cae directamente sobre el estigma y se da la polinización (Debouck, 1984). El cruzamiento natural también puede ocurrir en

diferentes grados según la variedad, la distancia entre las plantas, las condiciones ambientales de la localidad y la época del año. Se ha observado que en *P. vulgaris* el porcentaje de cruzamiento natural es mayor entre variedades cultivadas que entre silvestres (Miranda, 1974).

1.4.1.1 Descripción botánica del fréjol común

Aunque generalmente se distingue la raíz principal, el sistema radical tiende a ser fasciculado, fibroso en algunos casos, existe una amplia variación, incluso dentro de la misma variedad; la planta presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales, los cuales son colonizados por bacterias del género *Rhizobium* que fijan el nitrógeno atmosférico (Debouck, 1984).

Posee un tallo herbáceo, delgado, de 4 a 7 mm de diámetro y con sección cilíndrica (Heike, 2005). El tallo puede ser erecto (fréjol arbustivo), semipostrado o postrado (fréjol voluble) (Debouck, 1984). Las ramificaciones guías tienen una longitud entre 20 a 60 cm de crecimiento erecto o decumbente. Dentro del fréjol arbustivo existen dos tipos de hábitos de crecimiento que son el determinado arbustivo y el indeterminado arbustivo, en el primero el tallo principal y las ramas laterales terminan en inflorescencia que detiene el crecimiento, en cambio en el segundo tipo, las plantas continúan creciendo durante la floración porque no terminan en inflorescencia. En ambos tipos el tallo permanece erecto (Debouck, 1984).

Las hojas del fréjol pueden ser simples o compuestas con pelillos y siempre están asociadas con las estípulas presentes en los nudos, las simples aparecen en el segundo nudo del tallo principal y las compuestas en toda la planta, tienen tres folíolos acorazonados unidos por la base con peciolo y raquis acanalados. El folíolo central es simétrico y los dos laterales son asimétricos (Debouck, 1984; Lagordo, 2004).

Sus inflorescencias pueden ser laterales o terminales dispuestas sobre pedúnculos más cortos que las hojas, ubicados en las axilas de las hojas (Heike, 2005).

El fréjol tiene flor papilionácea de simetría bilateral. El cáliz es un tubo campanulado que hacia el ápice se divide en 5 lóbulos, dos de los cuales se encuentran parcialmente unidos. La corola es pentámera con tres pétalos, su color va de rosa-púrpura a casi blanca, el pétalo más externo se llama estandarte, en seguida se ubica un par de pétalos laterales similares entre sí, llamados alas y por último los dos más internos, generalmente fusionados forman la quilla que presenta el ápice largo y torcido en espiral que envuelve a los 10 estambres y al ovario, con un estilo largo y delgado, terminado en un estigma pequeño (Heike, 2005).

El fruto es una vaina de dos valvas que provienen del ovario comprimido. Las semillas se alternan en las dos valvas. La vaina tiene pelos muy pequeños y a veces con epidermis cerosa. Puede ser de diversos tamaños, colores, uniformes o con rayas dependiendo de la variedad y de la edad del cultivo (Debouck, 1984; Lagordo, 2004).

Su semilla generalmente es de forma cilíndrica, ariñonada, esférica u ovalada. Tiene una amplia variación de color (blanco, rojo, café, crema, negro, etc.) y de brillo, también existe combinación de colores, todo dependiendo de la variedad (Debouck, 1984).

1.4.1.2 Origen y Domesticación del fréjol común

Los centros de origen del fréjol común han sido propuestos y discutidos por muchos autores, pero en general se sabe que las variedades cultivadas actualmente son el resultado de un proceso de domesticación y evolución a partir de una forma silvestre *Phaseolus vulgaris* var. *aborigeneus* (Beebe, 1988; Rodrigo, 2000), procedente de dos centros de origen, uno en México y América Central y otro en América del Sur, dando lugar a dos pools genéticos separados, el Centroamericano y el Andino, que se distinguen a nivel morfológico, fisiológico y molecular (Gepts *et al.*, 1986; Engleman, 1979). Estos grupos se han definido en base al tipo de proteína de reserva (Gepts *et al.* 1986), variación isoenzimática y el tamaño de las semillas (Singh *et al.* 1991), estos dos grupos presentan una gran divergencia genética debido a su aislamiento geográfico (Rosas 1998).

Las principales evidencias para asegurar que el origen del fréjol se dio en estas dos regiones, son la gran diversidad genética presente y los restos arqueológicos, de plantas domesticadas y fenotípicamente similares a los cultivares actuales (Rodrigo, 2000), esto prueba la antigüedad de su cultivo específicamente en México y Perú (Ospina *et al.*, 1980).

Los sucesos de domesticación tuvieron lugar hace, por lo menos, 10.000 años. La domesticación aumenta la producción de la semilla, facilita las fases culturales, permite una homogénea sincronización desde la germinación hasta la cosecha y amplía los límites ecológicos en áreas geográficas y en tolerancia de hábitat. El proceso de domesticación aumenta la variabilidad de ciertos caracteres, pero reduce otros, los cuales se mantienen en el material silvestre. Los caracteres que han aumentado su diversidad, en *P. vulgaris*, con la domesticación han sido: el color y la fibrosidad de la vaina, la forma de la semilla y la resistencia a enfermedades (Engleman, 1979).

1.4.1.3 Producción e importancia del cultivo del fréjol

Los principales países productores de fréjol son Brasil, México, Estados Unidos, Argentina, China, Japón, Turquía y algunos países de África y Europa. América Latina es, sin duda, la región de mayor producción y consumo, ya que más del 45% de la producción mundial proviene de esta zona (Voyses, 2000).

En el Ecuador, las zonas productoras de fréjol arbustivo se localizan tanto en valles (1.000 y 2.500 m.s.n.m), como en las estribaciones de la cordillera (800 y 1200 m.s.n.m) (MAG, 2005). En la sierra se encuentra el 90% del área total cultivada, su producción se centra en las provincias de Carchi, Imbabura, Tungurahua y Loja. El fréjol se cultiva en una amplia variedad de tipos de suelo, sistemas de cultivo, condiciones climáticas, manejo agronómico, problemas de producción y rendimientos unitarios (Lépiz *et al.*, 1995). Generalmente, el fréjol arbustivo se siembra en unicultivo pero ocasionalmente, en algunos valles, se puede observar intercalado con caña de azúcar, maíz, yuca, frutales u hortalizas (Lépiz *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 1996).

En el caso del fréjol voluble, este predomina en la sierra alta, de 2400 a 2900 m.s.n.m. (Voysesst, 2000) casi en las mismas provincias en que se obtiene el fréjol arbustivo, con la diferencia que el voluble requiere otras condiciones agronómicas tales como son la altitud, el tipo de suelo, etc. Ambos tipos de fréjol crecen a temperaturas de 16 a 20 °C y lluvias de 300 a 700 mm (MAG, 2005).

El fréjol es un alimento con alto contenido proteico y de bajo costo comparado con productos de origen animal que también contienen proteínas. El contenido de proteína en el fréjol varía de 22% a 32% dependiendo de la variedad, también contiene otros componentes como carbohidratos (entre 60 y 70%), grasas, vitaminas y minerales. El fréjol es una excelente fuente de tiamina (vitamina B1), niacina, riboflamina (vitamina B12), vitamina C, potasio, fosforo, hierro, magnesio y manganeso, en menor proporción contiene zinc, calcio y cobre (Vega & Chiriboga, 1989; Broughton *et al.*, 2003).

Aproximadamente el 75% de la proteína del grano de fréjol es del tipo de las globulinas, a estas globulinas de las semillas de *Phaseolus* se denominan faseolinas, que a más de ser la principal proteína de almacenamiento de las semillas sirve como marcador para estudios evolutivos y de diversidad (Ishino y Ortega, 1975).

Al fréjol se lo utiliza principalmente en forma de vainitas como verdura, grano tierno para preparar sopas y ensaladas, y grano seco para sopas, ensaladas, refritos, estofados y menestras. Además se emplea en la industria de enlatados con una amplia aceptación del público (Vega y Chiriboga, 1989; MAG, 2002).

Las hojas, el tallo o la planta completa de esta leguminosa constituye un alimento excelente para el ganado como forraje verde y seco. Además, puede servir como abono verde para el mejoramiento del suelo, ya que tiene la capacidad de fijar el nitrógeno del aire gracias a las bacterias simbióticas (*Rhizobium etli*), presentes en los nódulos de sus raíces (Debouck, 1984), esta capacidad se aprovecha especialmente cuando se practican la rotación de cultivos y los cultivos asociados (Frijol y chícharo, 1981).

1.4.1.4 Diversidad genética del fréjol común

La diversidad o variación de características morfológicas y moleculares refleja una combinación de los factores ecológicos, genéticos e históricos. Esta variación se debe a diferencias en la constitución genética individual e intrapoblacional y puede estar asociada a procesos sexuales o no sexuales. Existe variación a nivel individual, poblacional y específico, pero la individualidad de estas tres entidades no siempre es tan evidente y obvia, especialmente al nivel de poblaciones y especies, por lo que se necesitan marcadores cuya presencia común sea indicadora de conexión ontogenética, genética o histórica (González, 1998).

La diversidad genética del género *Phaseolus* ha sido conservada a través de la domesticación realizada por las etnias americanas, así como por el tipo de distribución de la misma. Existe una amplia diversidad morfológica en las especies cultivadas de fréjol común, pero la diversidad genética es mucho mayor en las especies silvestres, lo cual indica que solo una pequeña porción de esa variabilidad ha sido domesticada a través de los años (Vargas *et al.*, 2000). La mayor variabilidad de materiales silvestres se demuestra con la presencia de más tipos de faseolinas que en los cultivados, además los materiales silvestres son resistentes a brúchidos por presentar la proteína arcelina, mientras que los materiales cultivados son susceptibles a dichos insectos (Beebe, 1988). Otra muestra de diversidad genética de especies silvestres es la existencia del complejo “cultivo-maleza”, presente en lugares aislados de agricultura rudimentaria, los cuales podrían ayudar en programas de mejoramiento (Vargas *et al.*, 2000).

Es posible distinguir cuatro centros de diversidad de fréjol común: el andino, el colombiano, el ecuatoriano junto con el norte del Perú y el mesoamericano. Además existen centros de diversidad secundaria en África, Brasil, Europa, el este medio y América del Norte (Broughton *et al.*, 2003). En cuanto a poblaciones silvestres y a materiales cultivados, existe más variabilidad de fréjol en el sur de los Andes, en comparación con el norte y con América Central, (Beebe, 1988).

Singh *et al.*, (1991) de acuerdo con criterios morfológicos y ecológicos, dividieron al germoplasma de fréjol común en seis razas: el germoplasma Andino en las razas Chile, Nueva Granada y Perú, y el germoplasma Mesoamericano en las razas Durango, Jalisco y Mesoamérica. La raza Nueva Granada representa accesiones de semilla mediana a grande de hábito de crecimiento arbustivo e incluye la mayoría de los cultivares de semilla grande usados actualmente, su nombre indica un posible origen en el norte de los Andes, se cultiva en altitudes medias de los Andes y África y en lugares bajos cálidos de Brasil, México y el Caribe. La raza Perú contiene al fréjol que crece en los Andes arriba de los 2000 m.s.n.m.; la raza Chile se caracteriza por su hábito de crecimiento indeterminado postrado, semilla mediana de colores pálidos, se distribuye en las zonas secas del sur de los Andes, además se produce en Turquía, Irán y China (Beebe *et al.*, 2001). Las variedades de las razas Durango y Mesoamérica son cultivadas en todo el mundo, mientras que, la raza Jalisco solo se cultiva en los valles de México (Rodrigo, 2000).

1.4.2 Caracterización molecular del germoplasma

En la actualidad existen muchas técnicas moleculares que han permitido conocer el contenido genético de los organismos, estimar su diversidad, sus relaciones filogenéticas, identificar variedades, hacer mapeos genéticos, establecer las semejanzas o diferencias entre individuos, tanto en poblaciones silvestres y cultivadas (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La información molecular de la diversidad de una especie almacenada en un banco de germoplasma, enriquece la base genética para ser utilizada en un programa de mejoramiento, además, se puede analizar redundancias y deficiencias en las colecciones de germoplasma, lo que proporciona datos sobre la eficacia de colecta, mantenimiento, manejo y ampliación de la colección de germoplasma (Phillips *et al.*, 1993). Con los datos obtenidos se puede crear una colección nuclear sin materiales repetidos y que sea de fácil acceso al mejorador genético (Frankel, 1984).

Dentro de lo que es fitomejoramiento, la caracterización molecular de la diversidad genética proporciona datos útiles para seleccionar progenitores de las poblaciones básicas, estas poblaciones se establecen gracias al cruzamiento de

materiales superiores, con el fin de maximizar la distancia génica y de recombinar genes de nuevas maneras para que presenten características interesantes (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.4.2.1 Marcadores Moleculares

La identificación varietal con datos sobre la morfología y fisiología de las plantas tiene limitaciones: los ensayos de campo que requieren largo tiempo de observación, bajo número de marcadores morfológicos, limitado polimorfismo, identificación solo a nivel de la planta entera o adulta y posibilidad de interferencia epistática o ambiental (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Estos inconvenientes han sido eliminados gracias al desarrollo de los marcadores moleculares basados en la variabilidad del ADN o de proteínas (antígenos e isoenzimas) y pueden ser detectados en cualquier momento del desarrollo de la planta, se puede partir solo de células o tejidos, dan una mayor cantidad de información y permiten establecer en pocos días un perfil único para cada variedad.

Los marcadores moleculares basados en proteínas tienen el inconveniente de que no son capaces de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas, debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro y de una época del año a otra. Por ello, se han desarrollado los marcadores moleculares basados en ADN, que son segmentos de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear, son de tamaño y peso molecular conocido. Estos marcadores se usan para "marcar" la posición de un gen en concreto o la herencia de una característica de interés particular en un cultivo y se consigue estabilidad en la identificación de especies y variedades (Claros, 2001; Beltrán, n.a.). Además los marcadores de ADN permiten una distinción más precisa de genotipos que los "descriptores" morfológicos (Aranzana *et al.*, 2001).

Los marcadores moleculares han ayudado a detectar polimorfismo a nivel individual, poblacional o específico. A nivel del ADN los más comunes son la hibridación de ADN, los fragmentos de restricción de longitud polimórfica ("RFLPs"), los mapas génicos, el polimorfismo del ADN amplificado al azar ("RAPDs"), la huella

digital del ADN ("VNTRs" o "fingerprinting"), los microsatélites (SSRs), la conformación polimórfica de cadena sencilla ("SSCP"), los mapas de sitios de restricción polimórficos en productos de PCR ("MRSPs"), la amplificación selectiva de fragmentos de restricción ("AFLPs"), electroforesis de ADN en geles en gradientes desnaturalizantes ("DGGE") y la secuencia de ADN, entre otros. Gran parte de ellos basados en la PCR. Estos han favorecido la investigación de problemas ecológicos o sistemáticos como análisis de parentesco, diversidad genética, heterocigosidad, variación geográfica, hibridación, delimitación geográfica de especies, especiación y filogenias de especies, identificación de entradas, selección de características agronómicas de importancia, estimación de distancias génicas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos, etc (González, 1998).

Los atributos ideales de un gen marcador son: polimorfismo, herencia mendeliana y no epistasia, insensibilidad a la influencia y efectos ambientales, ausencia de efectos en el desarrollo de la planta (es decir comportamiento como un gen neutro), facilidad en la expresión, distribuido por todo el genoma, simplicidad en la identificación y análisis, codominancia y posibilidad de detección en las primeras fases de desarrollo de la planta (Moreno-González, 1996). También, debe ser reproducible, de ensayo rápido, sencillo y de fácil acceso (González, D., 1998).

Las caracterizaciones morfológicas tienen limitaciones, pero a pesar de eso, dan una información muy precisa de las características agroecológicas de los cultivos, por ello, para el agrupamiento de genotipos y para el fitomejoramiento lo óptimo es complementar esta información con la generada por los marcadores moleculares y bioquímicos para llegar a un mejor entendimiento de la diversidad de los materiales (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.4.2.2 Microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencia simple (SSR, en inglés), son regiones genómicas en las cuales se repite múltiples veces un par de bases o un pequeño número de pares de bases de ADN, generalmente menor a 6 pb (Rongwen *et al.*, 1995). Los fragmentos tienen una longitud entre 15 y 50 pb (Petes *et al.*, 1997). Las repeticiones pueden ser repeticiones tándem perfectas, imperfectas (es

decir interrumpidas por varios nucleótidos no repetidos) o repeticiones compuestas (Hearne *et al.*, 1992). Se cree que los microsatélites se originaron por deslizamiento hacia atrás de una hebra hija sobre su hebra molde durante la replicación del ADN, de manera que la misma secuencia corta se copia dos veces (Lodish *et al.*, 2005), y además se sabe que la variación de microsatélites se debe a una disminución de la ADN polimerasa durante la replicación y/o un crossing-over desigual, que da como resultado diferentes números de copias de las secuencias núcleo (Schlötterer y Tautz, 1992; Métais *et al.*, 2002).

Actualmente, los microsatélites son los marcadores moleculares más polimórficos que existen, los cuales están ampliamente distribuidos en plantas (uno cada 50 mil pb) y los elementos más comunes repetidos son los dinucleótidos AT y AG (Morgante & Olivieri, 1993).

Los loci SSR son amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por un par de primers o cebadores (20 a 30pb) complementarios a las secuencias que flanquean al microsatélite; los segmentos amplificados son muy polimórficos gracias a la presencia de diferentes números de elementos repetidos y cada segmento representa un alelo distinto del mismo locus (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Jordano, n.a). La existencia de múltiples versiones de un SSR hace más probable que éste produzca un patrón de segregación informativo en una estirpe dada y por ende sea de uso más general en el mapeo de las posiciones de genes específicos (Lodish *et al.*, 2005).

Los microsatélites generalmente se visualizan en geles de poliacrilamida donde se puede detectar las diferencias entre las repeticiones simples y todos los alelos posibles. Al ser marcadores codominantes, las frecuencias alélicas se pueden determinar directamente (Karp *et al.*, 1997).

Para optimizar recursos es posible analizar varios locus SSR a la vez, es decir, más de un par de primers en la misma reacción PCR, siempre y cuando los alelos de cada locus tengan tamaños suficientemente diferentes, que migren hacia sitios separados en el gel y que tengan una temperatura de anillamiento similar; este método de genotipificación se denomina “multiplex” (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Los SSRs presentan varias ventajas respecto a otros marcadores como isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD, por ejemplo, los SSR poseen mayor contenido de información de polimorfismo (PIC – Polymorphism Information Content), lo cual permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados (Becerra & Paredes, 2000), presentan mayor simpleza tecnológica y automatización, son multialelicos, codominantes, tienen alta heterocigosidad, alta reproducibilidad entre laboratorios, generan mayor cantidad y calidad de información (hipervariabilidad, análisis locus a locus), permiten detectar todos los alelos posibles de un locus, no requieren de alta concentración y calidad de ADN y presentan una distribución homogénea en el genoma nuclear (aproximadamente cada 10 Kbp); todo esto los ha convertido en una de las técnicas más poderosas para el mapeo genético, la identificación de individuos, detectar variación genética tanto a nivel individual como poblacional, para análisis de parentesco y genética de poblaciones, entre otros (Ortiz *et al.*, 2000).

Por otro lado, la mayor limitación de los SSRs es el costoso y complicado proceso de desarrollo y obtención, se necesita personal especializado y equipamiento sofisticado para el clonaje y secuenciamiento automático de los loci SSR (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Un problema al utilizar estos marcadores es que pueden existir alelos nulos (no se visualizan) como resultado de mutaciones en el sitio de apareamiento del cebador, lo cual hace que heterocigotos con alelos nulos puedan ser clasificados como homocigotos (Karp *et al.*, 1997). Otra limitación es la presencia de "bandas tartamudas", que son productos de la amplificación que difieren en una unidad de repetición con respecto al alelo original, estas pueden ser confundidas como alelos, complicando el análisis genotípico (Chambers & MacAvoy, 2000).

Los microsatélites han sido ampliamente utilizados en fréjol para la identificación de cultivares, para análisis de diversidad genética (Métais *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008), construir mapas de ligación molecular y como marcadores para selección asistida (Yu *et al.*, 2000), todo esto a partir de 1999, gracias a que Yu *et al.* (1999) fueron los primeros en estudiar los SSRs en *P. vulgaris* L., demostrando que su frecuencia es muy alta en el genoma de ésta leguminosa, posteriormente el número de microsatélites se incrementó por Gaitán *et al.* (2002) y Blair *et al.* (2003).

El Centro de Agricultura Tropical (CIAT), a través de Blair *et al.* (2006) usaron con mucho éxito los microsatélites para separar los materiales en el pool Andino y Mesoamericano, determinaron las razas que poseen mayor diversidad dentro de cada pool genético y diferenciaron accesiones silvestres de las cultivadas.

En un estudio realizado por Díaz y Blair (2006), sobre el análisis de la estructura de la raza mesoamericana de fréjol, se constató que los microsatélites son efectivos y rápidos para analizar la variabilidad genética, que tienen una alta sensibilidad, son muy informativos y que la diversidad de SSR parece estar asociada a variación agronómica, por ello pueden ser aplicados en colecciones de germoplasma.

Blair *et al.* (2007a) demostraron que los marcadores SSR determinan con mayor nivel de detalle la estructura y procesos de flujo genético de las razas andinas superando los marcadores RAPD, RFLP y AFLP. Además Blair *et al.* (2007b) por medio de microsatélites caracterizaron una colección de fréjol andino y evaluaron la diferencia genética entre las razas Nueva Granada y Perú.

1.4.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR – Polimerase Chain Reaction) es muy utilizada para el estudio de marcadores moleculares. Desde su aparición, se convirtió en una herramienta poderosa para estudios genético-moleculares, debido a su facilidad de aplicación, rapidez, versatilidad y sensibilidad. Esta comprende la síntesis *in vitro* de millones de copias de un fragmento específico de ADN, por lo que bastan pequeñas cantidades del ADN molde para realizar un estudio genético (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Cuando las secuencias de los nucleótidos de los extremos de una región de ADN se conocen, el fragmento intermedio puede amplificarse mediante la PCR.

El procedimiento de PCR comienza con la desnaturalización a 95°C de la doble hélice de ADN, dejando dos hebras simples. Luego al ADN desnaturalizado se le añaden dos oligonucleótidos (primers o iniciadores) sintéticos complementarios a los extremos 3' del segmento de ADN molde a una temperatura que va de 50 hasta 60°C, dependiendo del primer, ya que cada uno tiene una temperatura específica de

“annealing” o anillamiento (temperatura a la que el primer se une a la cadena de ADN molde). Estos oligonucleótidos específicos se hibridan a sus secuencias complementarias de las muestras de ADN y sirven como cebadores para la síntesis de una nueva cadena de ADN en presencia de desoxinucleótidos (dNTP's) y una ADN polimerasa resistente a la temperatura, Taq polimerasa, que extiende los cebadores a temperaturas de hasta 72°C. Cuando se completa la síntesis, toda la mezcla se vuelve a calentar a 95°C para desnaturalizar los dúplex de ADN recién formados, luego se baja la temperatura para otro ciclo de síntesis, así sucesivamente. Los ciclos repetidos de desnaturalización y síntesis amplifican rápidamente la secuencia de interés, la cual se puede incrementar un millón de veces después de 20 ciclos (Lodish *et al*, 2005).

1.4.2.4 Analizador de ADN LI-COR 4300

El LI-COR 4300 (DNA43-0626) es un instrumento de tercera generación, semi-automático con una tecnología sumamente sensible de detección de fluorescencia infrarroja. Dicha detección infrarroja es una ventaja clave ya que las moléculas biológicas, geles y placas de vidrio tienen poca fluorescencia infrarroja, entonces las señales del marcador fluorescente son limpias y fuertes y se detectan con una alta sensibilidad (LI-COR Biosciences, 2009). Este equipo utiliza electroforesis en geles de acrilamida (KB^{Plus} Gel Matrix 6.5%, Cat. No. 827-05607) para sus diversas aplicaciones que son la secuenciación de ADN, análisis de AFLPs, de microsatélites, cDNA AFLPs, tilling y eco-tilling. Para el análisis de microsatélites utiliza un software SAGA_{GT} versión 3.3 (LI-COR Biosciences, 2009).

Las ventajas al utilizar este secuenciador son las siguientes (LI-COR Biosciences, 2009):

- Semi-automatización del proceso que elimina el laborioso proceso de tinción de geles con nitrato de plata, lo cual minimiza el tiempo.
- Mediante el software SAGA_{GT}, la interpretación y el análisis de microsatélites es más fácil y rápido.
- Rapidez en el análisis de las muestras, la corrida de un gel se realiza en una hora y media aproximadamente, mientras que en los antiguos geles con tinción de plata tarda unas 9 horas.

- Permite el marcaje de primers con dos compuestos fluorescentes infrarrojos (IRDyes) uno a 700nm y otro a 800nm, los cuales se detectan independientemente, así se puede analizar cuatro SSR en una sola corrida electroforética (un dúplex con cada marcador), lo cual acelera el proceso de genotipaje.
- La detección infrarroja reduce el costo por genotipaje, ya que se requiere menos reactivo para dicha detección.

Dentro de lo que es análisis de microsátélites, las aplicaciones del analizador LI-COR 4300, son el genotipaje para estudios de ligamiento genético, determinación de heterozigosidad, caracterización molecular de colecciones de germoplasma, identificación de paternidad, identificación forense de muestras, entre otras. El análisis de microsátélites se realiza mediante la técnica M13-tailing, que consiste en añadir una secuencia de nucleotidos (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3') al extremo 5' del primer forward SSR que se va a analizar. Durante la PCR, esta cola de nucleotidos se une al IRDye-labeled M13 Primer (secuencia complementaria marcada con fluorescencia infrarroja a 700 u 800 nm) que es añadido al coctel de reacción (LI-COR Biosciences, 2004), entonces los productos de amplificación SSR quedan marcados para luego ser detectados gracias a los láseres del analizador LI-COR 4300.

En el LI-COR 4300 se cargan las muestras manualmente en un gel de acrilamida y luego a partir del servidor se inicia la corrida electroforética. En la parte inferior del gel, las muestras pasan frente a dos láseres (700 y 800nm) y los fotodiodos detectan la fluorescencia IR de los primers, la filtración óptica asegura que cada detector mida la fluorescencia de uno sólo de los marcadores infrarrojos de los primers, lo cual evita la superposición de bandas en la imagen final (Figura 1.2.). En el software Saga_{GT} o en el internet browser se puede visualizar una imagen separada (similar a un autoradiograma) de cada IR dye en tiempo real (LI-COR Biosciences, 2009).

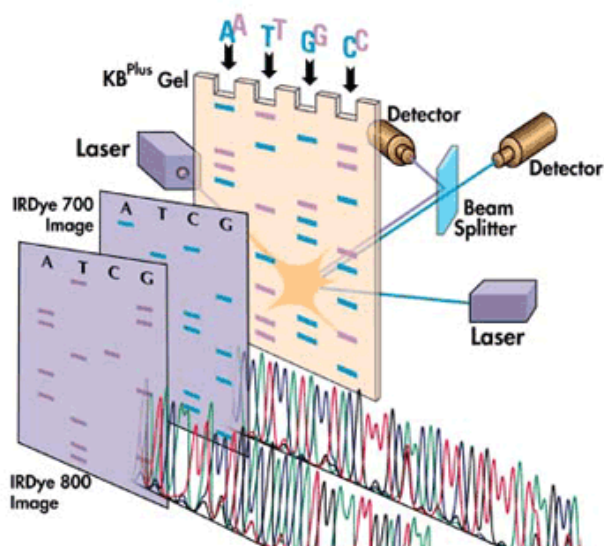


Figura 1.1 Detección de los IR dye de los primers mediante los detectores del LI-COR 4300 (LI-COR Biosciences, 2009).

El software Saga_{GT} es un asistente para el análisis y genotipaje de las imágenes proporcionadas por DNA Analyzer LI-COR 4300, este software elimina los cuellos de botella del genotipaje tradicional, automatiza la electroforesis, la recolección y transferencia de datos, ubica los carriles, localiza los estándares de talla, calibra los tamaños de las bandas y realiza el marcaje de los alelos de SSRs. (LI-COR Biosciences, 2004).

1.5 Hipótesis

Ho. Los microsatélites no revelan variabilidad genética en las accesiones de *P. vulgaris* de Loja, del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.

Ha. Los microsatélites revelan variabilidad genética en las accesiones de *P. vulgaris* de Loja, del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.

CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS

2.1 Participantes

La presente investigación fue realizada en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) a través del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) bajo la dirección del Dr. Eduardo Morillo, jefe del departamento, y gracias al Proyecto de Fortalecimiento 1521 del Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG).

2.2 Zona de estudio

2.2.1 Fase de campo

El muestreo del material vegetal de fréjol arbustivo se realizó en la Granja Experimental Tumbaco del INIAP, ubicada en la parroquia de Tumbaco, cantón Quito de la provincia de Pichincha. Se encuentra a una altitud de 2348 m.s.n.m., latitud 0° 13' S y longitud 78° 24' O, posee una precipitación anual de 715 mm y una temperatura media de 17.5° C.

2.2.2 Fase de laboratorio

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicada en la parroquia Cutuglahua, cantón Mejía de la provincia de Pichincha. Esta estación se encuentra a una altitud de 3050 m.s.n.m, latitud 0°22'15''S y longitud 78°33'14''O, posee una precipitación anual de 1400 mm y una temperatura media de 11.6 ° C¹.

¹ Fuente: Anuario Meteorológico de la Estación Izobamba, EESC-INIAP.

Dicho laboratorio cuenta con áreas para: preparación de medios, extracción de ADN, PCR, electroforesis vertical, genotipaje, autoclavado, una sala de gases y una sala oscura para tinción de geles de agarosa.

2.3 Periodo de tiempo de la investigación

El tiempo de duración de la presente investigación fue de 14 meses.

2.4 Análisis bioinformático

El genotipaje de la colección lojana de fréjol arbustivo se realizó en el software Saga^{GT} Microsatellite, que es un asistente de lectura de las imágenes obtenidas gracias al Analizador de ADN LI-COR 4300 (DNA43-0626) (LI-COR, Lincon, NE, USA, Biosciences). Los datos obtenidos en este software fueron importados a Excel y convertidos en una matriz que muestra las accesiones con sus tamaños alélicos, ésta a su vez se importó a varios paquetes estadísticos de genética poblacional: PowerMarker V3.0 (Liu y Muse, 2005), FSTAT (Goudet, 2001), NTSYS (Rohlf, 2002), Genetix (Belkhir *et al.* 2000), Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001), GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995), GenAIEx ver. 6 (Peakall y Smousse, 2005) y TREEVIEW 1.6.6 (Page, 2001). Los parámetros de diversidad determinados fueron: contenido de información polimórfica, riqueza alélica, heterocigosis observada y esperada al equilibrio de Hardy-Weinberg, alelos exclusivos, parámetros F (índices de fijación Fis, Fit y de diferenciación genética entre poblaciones Fst), AMOVA, distancia genética de Nei. Adicionalmente se realizó un análisis de agrupamiento o *Cluster analysis* y análisis multivariados (PCO) e identificación de duplicados mediante comparación de genotipos multilocus SSR.

2.5 Procedimiento

2.5.1 Material Vegetal

Las accesiones de fréjol arbustivo fueron sembradas en un ensayo de caracterización morfoagronómica por el Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA) en la Granja Experimental Tumbaco del INIAP (Figura

2.1). La toma de muestras se realizó en la etapa de floración de las plantas, se tomó los trifolios más jóvenes de una planta por accesión, ya que en este periodo es posible distinguir la mezcla de semilla en cada accesión. Las muestras se almacenaron congeladas a -20°C . La lista de accesiones y su identificación, según el Banco de germoplasma, se detalla en el Anexo A.



Figura 2.1 Fotografías de la recolección de fréjol arbustivo en la Granja Experimental Tumbaco

2.5.2 Caracterización molecular

2.5.2.1 Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN de las accesiones de fréjol arbustivo se realizó con el kit comercial de extracción “Purelink 96 Genomic DNA Kit (INVITROGEN Ref. No. K1821-04)” modificando el protocolo del fabricante. Para lo cual, se maceró una pequeña cantidad de muestra fresca con 180 ul de buffer de digestión hasta tener una pasta homogénea, a esto se añadió 15 ul de RNAsa y 15 ul de Proteinasa K, se agitó en vórtex y se incubó en baño maría a 55°C durante 15 minutos. El lisado obtenido fue centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a cada uno de los 96 pocillos de una placa incluida en el kit, luego se añadió 200 ul de buffer de ligación y se cubrió la placa con una lámina adhesiva de aluminio. Se agitó enérgicamente la placa y se centrifugó unos segundos, para retirar los residuos de la lámina adhesiva. Luego se adicionó en cada pocillo 200 ul de etanol al 95% y se agitó en vórtex. Posteriormente, con una nueva placa y las columnas de extracción del kit, se armó la estructura placa-columnas y se transfirió el contenido de la placa antigua a los pocillos de las columnas. La estructura armada fue centrifugada a 2300 g durante 8 minutos, con ello el ADN queda adherido a la columna. Se eliminó el líquido que quedo en la placa inferior y se ensambló nuevamente la estructura placa-columnas, luego se añadió 500 ul de buffer de lavado No. 1 a cada pocillo de las columnas y se centrifugó a 2300 g por 8 minutos. Después de descartar el líquido de la placa, se añadió, a cada pocillo de las columnas, 500 ul de buffer de lavado No. 2, se centrifugó la estructura a 2300 g por 15 minutos. Se eliminó la placa inferior con su contenido y se armó la estructura con otra nueva placa. En cada pocillo de las columnas se colocó 200 ul de buffer de elusión y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 2300g durante 15 minutos para recuperar el ADN adherido. Finalmente, se obtuvo el ADN en el líquido resultante en la placa. Se cubrió la placa con la lámina adhesiva y se almacenó a -20°C.

2.5.2.2 Cuantificación de ADN

El ADN se cuantificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y con tampón TAE 1X comparándolo con el marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (10068-013 INVITROGEN®). Para cargar en los pocillos del gel, el ADN se mezcló con “blue juice” en proporción 4:1 respectivamente para dar peso y color a la muestra. Se dejó correr la electroforesis durante 30 minutos a 100 voltios y finalmente se visualizaron las bandas en el fotodocumentador uv Dolphin View. Según la estimación de la cuantificación se estandarizó la concentración de ADN, de todas las accesiones, a 5 ng/ul con agua de tartrazina (colorante biológico azoico), para las posteriores pruebas de amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

2.5.2.3 Amplificación de Microsatélites

Luego de realizar pruebas preliminares, para la etapa de amplificación, se seleccionaron 10 primers SSRs a partir de 16 iniciadores reportados por Gaitán *et al.* (2002) y nueve utilizados por el CIAT (M. Blair, com. Pers), esta selección se realizó en geles denaturantes de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata, los primers se escogieron en base a su polimorfismo y la calidad de producto amplificado, sus características se detallan en el Anexo B.

Pruebas de amplificación de las muestras de ADN

Se realizaron pruebas de amplificación con dos primers SSR, para verificar la buena calidad de las muestras de ADN de las accesiones, para esto se utilizó el coctel de reacción de Viruel y Hormaza (2004), el volumen total de reacción fue de 7.5 ul que contenía: 2ul de ADN a una concentración de 5ng/ul, 1.5ul de Buffer Gotaq Colorless Promega 5x, 0.6ul de MgCl₂ Promega 25mM, 0.15 dNTP's Invitrogen 10mM, 0.75ul de Primer F+R Invitrogen 20mM, 0.125ul de GoTaq DNA Polimerasa Promega 5U/ul y 2.38 ul de agua ultra pura. El mix de cada reacción se cubrió con una gota de aceite mineral para evitar su evaporación durante la PCR, que fue realizada en un termociclador PTC-200 M. J. Research y el programa de amplificación consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización

cíclica a 94°C por 45 segundos, luego 45 segundos de anillamiento a la temperatura establecida para cada primer, 1 min de elongación cíclica a 72°C, y un ciclo final de elongación a 72°C por 7 min (Morillo, 2002).

El resultado de la amplificación se verificó en gel de agarosa al 2% con tampón TAE 1X y teñido con bromuro de etidio, junto con el marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (INVITROGEN Cat. No. 10488-058). Los productos de amplificación se mezclaron en proporción 4:1 con buffer de carga “blue stop” y la electroforesis fue realizada a 110 voltios durante 1 hora.

Pruebas amplificación y de duplexaje de los SSR con la técnica M13-tailing SSR para el analizador LI-COR 4300

Los 10 primers SSR escogidos para el estudio se enviaron a sintetizar con el fragmento o cola M-13 para su posterior análisis en el Analizador de ADN LI-COR 4300. Con estos primers se realizó pruebas de amplificación para comprobar que poseen el tamaño correcto y para determinar a qué longitud de onda (700 u 800 nm) amplifican mejor. Primero se amplificaron todos los SSRs con el marcaje a 700 nm y aquellos microsatélites que no dieron buenos productos se volvieron a amplificar con el marcaje a 800 nm.

Debido a que el analizador de ADN LI-COR 4300 permite analizar cuatro locus microsatélites en una sola corrida electroforética (dos con el marcaje a 700nm y dos a 800nm), se realizaron pruebas de dúplex PCR para determinar las mejores combinaciones de primers. Estas pruebas consisten en amplificar dos iniciadores en una misma reacción PCR. Para seleccionar los iniciadores de cada combinación se tomó en cuenta que éstos tengan una temperatura de anillamiento lo más similar posible, que entre los fragmentos amplificados resultantes exista al menos 30 pb de diferencia y que la marcación de fluorescencia M13 sea la misma.

Para estas pruebas se utilizó siete muestras de ADN y un control negativo para cada SSR. El coctel de reacción utilizado para la amplificación en individual y dúplex SSR se describe en la Tabla 2.1. A este mix además de los reactivos usuales se le adiciona el reactivo Primer M13 Fwd IRDye 700 y 800 nm (Cat. No. 829-05570 LI-

COR) para dar la fluorescencia, este coctel se debe cubrir de la luz para que no se degrade el reactivo fluorescente. El coctel de cada reacción se cubrió con una gota de aceite mineral y se amplificó en el termociclador TProfessional Basic Gradient Biometra con el siguiente programa (Morillo, 2002): la denaturación inicial consta de dos pasos, el primero es a 94°C por 10 minutos y el segundo es a 95°C por 4 minutos, esto seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 95°C, 2 minutos de anillamiento a la temperatura reportada de cada primer, 2 minutos de elongación a 72°C, y luego de los 25 ciclos, una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Luego de la PCR, los productos amplificados se denaturaron a 95°C por 5 minutos y enseguida se colocaron en hielo. Se tomó aproximadamente 0.8 ul de producto amplificado y se cargó en cada pocillo del gel de acrilamida del LI-COR 4300 junto con un marcador de peso molecular 50-350pb IRDye 700 u 800 nm (Cat. No. 829-05344 LI-COR). Primero se cargan las muestras a 800 nm y luego de correr tres minutos se cargan las muestras a 700 nm, el tiempo de corrida electroforética total fue de una hora y media a 1500 voltios. La imagen de las bandas se visualizó en tiempo real en el internet browser, donde se comprobó la correcta amplificación de los SSRs comparando sus tamaños esperados con el marcador de peso.

Tabla 2.1 Coctel de reacción para la amplificación de microsatélites individuales y en dúplex, mediante la técnica M-13 tailing.

Reactivos	PCR dúplex (1 Reacción)	PCR individual (1 Reacción)	Concentración Final
ADN (5ng/ul)	1 ul	1 ul	10 ng
5x Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega)	1 ul	1 ul	1X
MgCl ₂ Promega (25mM)	0,5 ul	0,5 ul	2,5 mM
dNTP's Invitrogen (5mM)	0,2 ul	0,2 ul	0,2 mM
M13 700-800 LI- COR (1uM)	0,88 ul	0,5 ul	0,18 uM 0.1 uM
Primer 1 F-M13 (1uM)	0,05 ul	0,05 ul	0,15 uM
Primer 1 R (10 uM)	0,08 ul	0,08 ul	0,15 uM
Primer 2 F-M13 (1uM)	0,05 ul	-----	0,15 uM
Primer 2 R (10 uM)	0,08 ul	-----	0,15 uM
GoTag DNA Polymerase Promega (5U/ul)	0,05 ul	0,05 ul	0,05 U/ul
Agua	1,11 ul	1,62 ul	
Volumen Total	5,0 ul	5,0 ul	

2.5.2.4 Genotipaje de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L) en el Software SAGA^{GT} Microsatellite

El genotipaje se realizó en el analizador de ADN LI-COR 4300 junto con el software de análisis SAGA^{GT} Microsatellite.

Los productos amplificados fueron cargadas en los pocillos de un gel de poliacrilamida al 6.5%, que se preparó mezclando 20 ml de Gel Matrix KB Plus 6.5% (Cat. No. 827-05607, LI-COR), 150 ul Persulfato de Amonio (APS) 10% y 15 ul de TEMED, esta mezcla se la colocó entre dos placas de vidrio, previamente lavadas con el detergente Alconox y con isopropanol, luego se colocó el peine para formar la línea base y se dejó polimerizar por 1 hora. Posteriormente se ensambló la placa de poliacrilamida en el equipo LI-COR 4300, para la corrida electroforética se utilizó el buffer TBE 1x KB Plus LI-COR.

Antes de cargar las muestras se creó un proyecto llamado Fréjol, en software SAGA^{GT}, donde primero se ingresó las tallas del marcador de peso molecular IRDye 700 u 800 nm que van desde 50 a 350 pb; luego se ingresó el nombre, rango de tamaño esperado, marcaje y combinaciones de los loci SSR y finalmente se introdujo las identificaciones de las accesiones de fréjol estableciendo su posición en los 96 pocillos del gel. Luego de introducir toda esta información se creó un gel donde se asignó la accesión y el marcador de peso molecular que le corresponde a cada pocillo y también el locus o dúplex de loci con los que se va a analizar a dichas muestras. En seguida, se inició la pre-corrida que dura 25 minutos, antes de cargar las muestras, para que los lasers se enfoquen y reconozcan al gel.

Para cargar, los productos amplificados fueron diluidos con blue stop en proporción 1:3 respectivamente, para darles peso, color y ayudar a su denaturación, luego se los denaturó a 95°C por 5 minutos y rápidamente se pasaron a hielo para cargarlos en el orden establecido con la micropipeta Hamilton, junto con el marcador de peso molecular IRDye 30-350 pb, previamente denaturado 1 minuto a 95°C. La corrida electroforética duró 2 horas a 1200 voltios.

Cuando los locus marcados con IRDye M-13 pasan frente a los lasers del equipo, son reconocidos de acuerdo a su longitud de onda en 700 u 800 nm y se presentan en forma de bandas en la pantalla del computador, en tiempo real. Al terminar la corrida, dicha imagen queda guardada en SAGA^{GT} en formato tif.

Para genotipar, en SAGA^{GT} se abrió el proyecto Fréjol, se escogió el gel requerido y se abrió la imagen, donde por medio de unas marcas “x” se estableció si las bandas correspondían a los alelos de accesiones homocigotas (una banda) o heterocigotas (dos bandas) en cada carril, al confirmar el genotipaje se genera un reporte que muestra las tallas de los alelos de cada locus SSR en pares de bases y las frecuencias alélicas en porcentaje. Todo este proceso se realizó hasta completar las 123 accesiones de fréjol con los 9 SSR analizados.

2.5.2.5 Amplificación y genotipaje en el secuenciador ABI-310 de los loci SSR no amplificados (gaps) en algunas accesiones de fréjol arbustivo

Luego del genotipaje de toda la colección de fréjol arbustivo, por medio del analizador LI-COR 4300, se encontró que 19 accesiones de fréjol arbustivo no produjeron resultados para el locus BM-140 y 16 accesiones no amplificaron el locus BM-160. Para dichas accesiones, se utilizó el método de genotipaje con el secuenciador ABI-310.

Para la amplificación de ADN se siguió el mismo protocolo utilizado para las pruebas de amplificación de las muestras de ADN, con la diferencia de que en este caso se utilizó los primers forward marcados con fluorocromos para que puedan ser detectados por el secuenciador ABI-310. El mix de reacción empleado fue el de Viruel y Hormaza (2004) citado anteriormente y la PCR se realizó en el termociclador PTC-200 M. J. Research. Los productos amplificados se diluyeron en agua ultra pura en proporción 1:30 respectivamente. También se preparó una mezcla formamida:size estándar (Rox 500 Gene Scan) en proporción 12:1. Después se preparó, para cada muestra, un coctel que contenía 12ul de formamida:size standar con 1ul del producto amplificado diluido, esto se denaturó por 3 minutos a 95°C y se cargó en el secuenciador ABI-310.

El ABI-310 es un secuenciador de un capilar, el cual funciona de forma automática inyectando las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero que funciona como la matriz de acrilamida:bisacrilamida:úrea. A una altura determinada el láser detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de ADN fluorescente y traduce esta emisión de fluorescencia en la secuencia correspondiente. Una vez desarrollada la electroforesis de la primera muestra (en 28 minutos), se inyecta la segunda muestra y se desarrolla nuevamente la electroforesis, así continúa sucesivamente con todas las muestras. El software Gene Mapper 4.0 permite visualizar los resultados en forma de picos para cada alelo, para ello se creó un proyecto, dentro del software, donde se ingresó las accesiones en el orden en que van a ser analizadas por el secuenciador y los rangos de peso de los loci SSR.

2.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos a partir del reporte del software SAGA^{GT} Microsatellite fueron importados a Microsoft Excel, donde se elaboró una matriz genotípica con los tamaños de cada uno de los alelos que presenta un determinado locus, dichos tamaños se pueden cambiar de acuerdo al motif de cada locus. Cuando no se observó amplificación, se consideró como dato perdido.

Esta matriz fue la base para analizar los datos en los diferentes programas computacionales de análisis genético.

2.6.1 Análisis de diversidad genética

Se evaluaron los siguientes parámetros de diversidad:

- **Tamaño de la muestra:** Número de accesiones analizadas.
- **Número de observaciones:** Es el número de alelos o genotipos observados en cada accesión para cada locus SSR. En el caso de que existan datos perdidos, es decir que no existen alelos, el número de observaciones disminuye.
- **Disponibilidad:** Se define como $1 - Obs/n$, donde Obs es el número de observaciones y n es el número de individuos incluidos en la muestra. Muestra el porcentaje de accesiones en el que está presente un locus SSR.

- **Frecuencia alélica:** Se establece dividiendo el número de veces que se presenta una forma alélica de un gen para el número total de alelos de ese gen en la población.
- **Genotipos:** Número de genotipos generados por locus.
- **Número de alelos:** Cantidad de alelos de un locus.
- **Porcentaje de loci polimórficos:** Para que un locus sea considerado polimórfico, el alelo más común de ese locus debe tener un frecuencia poblacional menor al 99%, y de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg², al menos el 2% de la población debe ser heterocigota para ese locus (Aranguren *et al.*, 2005).
- **Coefficiente de inbreeding dentro de la población (f):** es la probabilidad de que ambas copias de un determinado gen sean derivadas de un mismo ancestro.
- **Heterocigosis Observada (H_o):** Indica la proporción de individuos heterocigotos en una población, para cualquiera de los loci, se calcula por cómputo directo (Aranguren *et al.*, 2005). A mayor frecuencia de un alelo, existe menor heterocigosis.
- **Heterocigosis Esperada (H_E):** Es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar, de la población, sean diferentes (Crow y Kimura, 1970). Indica la proporción de individuos heterocigotos, calculada a partir de las frecuencias alélicas conocidas, suponiendo que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg.
- **Contenido de información de polimorfismo (PIC):** Medida relativa de la informatividad de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese marcador y a sus frecuencias relativas en la población. El PIC es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1 (Aranguren *et al.*, 2005).
- **Alelos exclusivos:** Son aquellos que están presentes solo en una población o en individuos con una característica específica, por ejemplo en individuos que habitan en un lugar determinado o que presentan algún fenotipo característico (Alstad *et al.*, 1991).

² El equilibrio o ley de Hardy-Weinberg establece que la composición genética de una población de individuos diploides permanece en equilibrio mientras no exista selección natural, migración y mutaciones. Las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación.

Para determinar éstos parámetros se utilizó el programa PowerMarker versión 3.0 (Lui y Muse, 2005), para ello, primero se importó de Excel la matriz de las accesiones con sus tallas alélicas guardada como archivo de texto “txt”, luego en la barra de menú se escogió “Analysis” y en la opción “Summary” se seleccionó los parámetros a ser determinados, cuyos resultados se muestran en una tabla que puede abrirse en Excel.

2.6.2 Estructura Genética

2.6.2.1 Análisis de Agrupamiento

Este análisis se utiliza para representar gráficamente, mediante un árbol, las relaciones individuales entre las accesiones evaluadas, se basa en una matriz de distancias genéticas individuales. Para ello se utilizó el programa PowerMarker versión 3.0 (Lui y Muse, 2005), el análisis comprende los siguientes pasos:

Cálculos de frecuencia

Las distancias genéticas estiman el tiempo que ha transcurrido desde la separación entre poblaciones y se basan en ciertas diferencias genéticas existentes dentro y entre poblaciones (Aranguren *et al.*, 2005). Bajas estimaciones de distancia pueden indicar una subestructura de la población, o que las poblaciones se separaron desde un corto periodo de tiempo. Cuando dos poblaciones están genéticamente aisladas, la mutación y la deriva genética contribuyen a la diferenciación de las frecuencias alélicas en locus selectivamente neutros. A medida que el tiempo de divergencia entre dos poblaciones aumenta, la diferencia en las frecuencias alélicas también aumenta.

Para calcular las distancias genéticas, la matriz genotípica se convirtió en una matriz de frecuencia con datos binarios (0 y 1), luego se calculó la matriz de distancias con opción de alelos compartidos (Shared Allele Distance, DAS), que calcula las distancias entre individuos de una población.

Construcción de árboles genéticos

Los árboles filogenéticos son una ilustración de las relaciones evolutivas entre un grupo de organismos, los cuales descienden de un antecesor común. Estos árboles se construyen en base a la matriz de las distancias genéticas se utilizan métodos de agrupamiento, como, el método de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética (UPGMA) o el Neighbour Joining (NJ) (Goldstein y Schlotterer, 1999 citado por Aranguren *et al.*, 2005).

El UPGMA construye los árboles o dendrogramas mediante sucesivos agrupamientos bajo el criterio del promedio de la distancia de cada par. Asume una tasa constante de cambios evolutivos, es decir, supone la existencia de un reloj evolutivo, entonces todos los taxa son igualmente distantes a partir de la raíz.

NJ construye árboles mediante sucesivos agrupamientos de alineaciones, tomando en cuenta las longitudes de rama para dichos agrupamientos. Este método asume distintas tasas evolutivas, es decir, no supone un reloj evolutivo, por lo que la longitud de sus ramas son proporcionales a la cantidad de cambio evolutivo.

Luego de realizar los árboles en Power Marker v3.0, fueron visualizados en TREEVIEW 1.6.6 (Page, 2001).

2.6.2.2 Métodos Multivariados

Mediante estos métodos se puede detectar estructuras fuertes dentro de una población, desprendiéndose, en lo posible, de los efectos individuales, es decir, se puede determinar las relaciones entre las accesiones dependiendo de la posición en que se disponen en el espacio, mientras más cerca se encuentran entre sí dos accesiones más estrechamente relacionadas están.

Dentro de estos métodos se encuentra el Análisis de Coordenadas Principales (PCO), que permite detectar los ejes mayores de variación (no solo uno como los métodos de agrupamiento UPGMA y NJ). Este método es homólogo al análisis de

Componentes Principales pero aplicado no a datos derivados de observación sino a una matriz de similitud de estas observaciones entre los individuos analizados (García, 2005). Para realizar el PCO se utilizó el software NTSYS ver.2.1 (Rohlf, 2002). Primero se abrió “NTedit” para importar la matriz binaria calculada en Power Marker 3.0 (Lui y Muse, 2005) y arreglada de Excel (los datos perdidos se asignan con 9) y se guardó en formato “nts” para que pueda ser usada por el software; luego se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente SM de la opción “Simqual”, la matriz obtenida se guardo para ser utilizada en la opción “Dcenter”, y después mediante la opción “EIGEN” se obtuvo la dispersión de las muestras en dos y tres dimensiones y los porcentajes de varianza de cada coordenada.

2.6.2.3 Estadísticas F

Las estadísticas F son tres: F_{IS} (coeficiente de consanguinidad o endogamia intrapoblacional), F_{IT} (coeficiente de consanguinidad total) y F_{ST} (coeficiente del co-ancestro) y fueron introducidas por Wright (1951), quien las definió como correlaciones entre genes en la población a diferentes niveles. El F_{IS} estima la correlación entre dos genes tomados al azar de una subpoblación y el F_{IT} calcula la correlación entre genes tomados al azar del total de la población. Ambos estadísticos miden la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg en la subpoblación o en la población respectivamente, es decir, indican el exceso (valor cercano a 1) o déficit (valor cercano a -1) de heterocigotos presentes (Aranguren *et al.*, 2005). El F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) es la correlación entre dos gametos tomados al azar de cada una de las subpoblaciones y mide el grado de diferenciación genética entre dos subpoblaciones. Los valores del F_{ST} varían entre 0 y 1, cuando $F_{ST} = 0$, las diferentes subpoblaciones se comportan como una sola población y cuando el $F_{ST} = 1$, la estructuración es máxima lo que sugiere que las subpoblaciones presentan diferentes alelos fijados. La significancia del valor F_{ST} fue testada con la prueba G mediante las correcciones de Bonferroni con el software FSTAT.

Nei (1977), reformuló los índices F, basándose en los valores de H_O y H_E (Aranguren *et al.*, 2005), por lo que las estadísticas se pueden calcular con las siguientes fórmulas.

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T} \quad F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S} \quad F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Donde:

H_I = Heterocigosis observada (H_o) de un individuo en la subpoblación

H_S = Heterocigosis esperada (H_e) en las subpoblaciones

H_T = Heterocigosis esperada en la población total

Para calcularlas se utilizó el programa FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2001), para lo cual se transformó la matriz genotípica (de tallas de alelos) a un formato fst por medio del programa GENETIX v. 4.03 (Belkhir *et al.*, 2000) en la opción de menú “outils”. Luego en el FSTAT se abrió el archivo convertido, se marcaron los parámetros requeridos para el análisis y se oprimió “Run”, los resultados se guardaron en formato de texto.

2.6.2.4 Análisis Molecular de Varianza

El análisis molecular de varianza (AMOVA) (Excoffier, Smousse & Quattro, 1992) determina la diferenciación genética entre poblaciones y dentro de las poblaciones. El AMOVA se calculó por medio de programa GenALEX ver. 6 (Peakall y Smousse, 2005).

2.6.2.5 Distancia Genética

La distancia genética refleja la diferenciación a nivel de frecuencias génicas expresada en el número de sustituciones alélicas por locus que se han dado en la evolución separada de dos poblaciones, grupos o especies. Se dice que hay una sustitución alélica cuando un alelo es reemplazado por otro diferente, o cuando un grupo de alelos es reemplazado por un grupo diferente. Existen varios métodos para calcular distancias, pero en este estudio se utilizó el *índice de distancia genética de Nei*

(D) (Nei, 1972, 1978), ya que permite estimar distancias genéticas cuando se dispone exclusivamente de frecuencias alélicas como en este caso. Este índice viene dado por:

$$D = -\ln I_{xy}$$

Siendo I_{xy} el índice de identidad genética media entre las poblaciones x e y , que viene dado por la fórmula:

$$I_{xy} = J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}$$

Donde:

J_{xy} es la media aritmética sobre los r loci estudiados de $j_{xy} = \sum x_i y_i$

J_x es la media aritmética sobre los r loci de $j_x = \sum x_i^2$

J_y es la media aritmética sobre los r loci de $j_y = \sum y_i^2$

Siendo x_i e y_i las frecuencias del alelo i en las poblaciones X e Y

El valor de la identidad de Nei va de 0 a 1, mientras que la distancia genética de Nei puede adquirir valores entre cero a infinito. Estos parámetros fueron calculados en el programa GenAlEx ver. 6 (Peakall y Smouse, 2005), en la opción “Frequency”.

2.6.3 Identificación de duplicados

A partir de la matriz genotípica, que contiene las tallas de los alelos, se identificó los duplicados mediante el software Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001), mediante la opción diploide “double column format” se reconoció a la matriz y luego se escogió la opción “finding matching simples”. Se usó la diferencia de por lo menos un alelo para comparar las tallas.

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1 Caracterización molecular

3.1.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico

Para la extracción de ADN de las accesiones de fréjol se utilizó el kit comercial Purelink 96 Genomic DNA Kit (INVITROGEN Ref. No. K1821-04), empleando material foliar fresco. En el gel de agarosa al 1% se visualizaron las moléculas de ADN sin degradación como bandas únicas (Figura 3.1). El promedio de rendimiento en la extracción de ADN fue de 10.1 μg para la colección lojana de fréjol arbustivo.

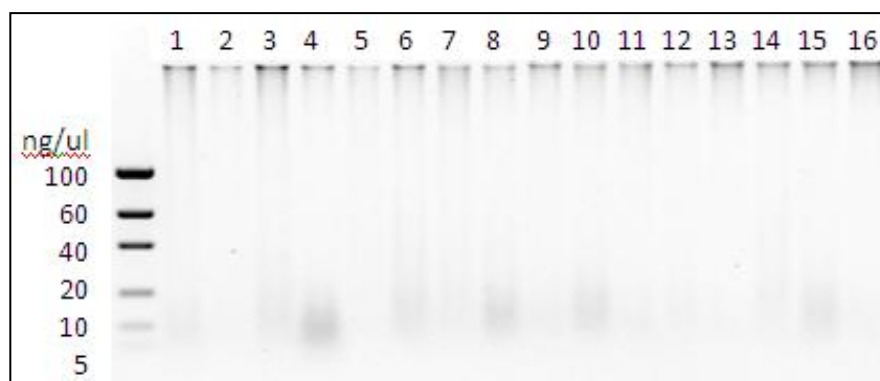


Figura 3.1 Cuantificación de muestras de ADN genómico de las accesiones de fréjol arbustivo (Carril 1 al 16: muestras de ADN, carril inicial: marcador de peso molecular).

3.1.2 Amplificación de Microsatélites

3.1.2.1 Pruebas de amplificación de las muestras de ADN

Las pruebas de amplificación del ADN se realizaron con los primers microsatélites BM-181 y BM-164, con los cuales se obtuvo amplificación en todas las muestras de ADN (Figura 3.2), lo que indica que el protocolo utilizado para la amplificación (ver Capítulo 2), fue el óptimo para este tipo de marcadores moleculares.

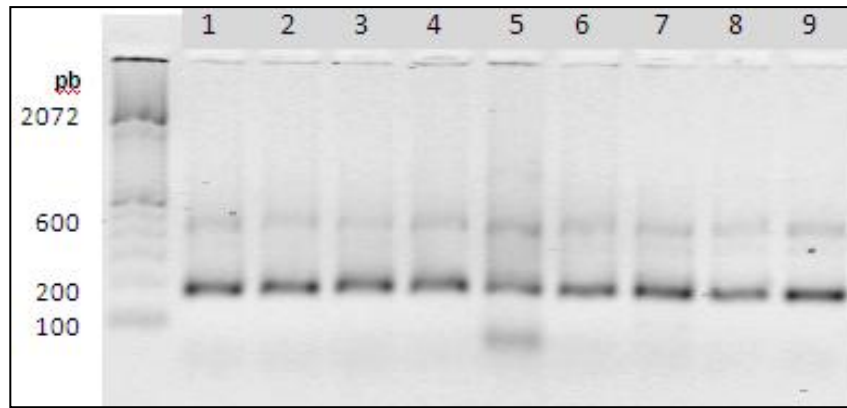


Figura 3.2 Productos de amplificación de las muestras de fréjol arbustivo en gel de agarosa al 2%, con el primer BM-164 (Carriles 1 al 9: bandas del SSR, carril inicial: marcador de peso molecular 100bp).

3.1.2.2 Pruebas de amplificación y de duplexaje de SSR con la técnica M13-tailing para el analizador LI-COR 4300

Con los 10 primers SSR seleccionados (Anexo B) se realizó pruebas de amplificación y se comprobó que todos los primers amplificaron fragmentos de los tamaños esperados. El primer BM 156 fue descartado del análisis por problemas de amplificación, y los nueve SSR restantes se probaron en combinaciones de duplexaje, cinco primers a la longitud de onda de 700 nm y cuatro primers a 800 nm.

Como resultado de las pruebas de duplexaje, se obtuvieron tres combinaciones dúplex para el genotipaje (Tabla 3.1), por la temperatura similar de sus primers y su lejanía respecto al tamaño en pares de bases.

Tabla 3.1 Combinaciones de duplexaje SSR para el genotipaje de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.).

Combinación	Primers SSR	Marcaje	Rango de Tamaño (pb)	Ta* (°C)	Ta* final (°C)
A	BM-139	700 nm	85 - 145	50	50
	BM-154		188 - 248	50	
B	BM-181	700 nm	162 - 222	50	51
	BM-183		119 - 179	52	
C	BM-160	800 nm	181 - 241	52	53,5
	BM-143		113 - 173	55	

*Temperatura de annealing

De acuerdo con éstas pruebas, también se decidió genotipar individualmente a los tres loci SSR restantes (Tabla 3.2), por tener tamaños muy cercanos que podrían confundirse al momento de asignar las tallas de sus alelos.

Tabla 3.2 Primers individuales SSR para el genotipaje de la colección lojana de fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.).

Primer	Marcaje	Rango de Tamaño (pb)	Ta* (°C)
BM-164	700 nm	152 - 212	52
BM-140	800 nm	160 - 210	55
BM-211	800 nm	156 - 216	52

*Temperatura de annealing

En la figura 3.3 se puede apreciar un gel con productos de amplificación de las combinaciones BM-154 – BM-139 y BM-181 – BM-183, junto al marcador de peso molecular 50-350pb IRDye, que indica la diferencia de tamaños en pares de bases entre los loci SSR para que no se sobrelapen.

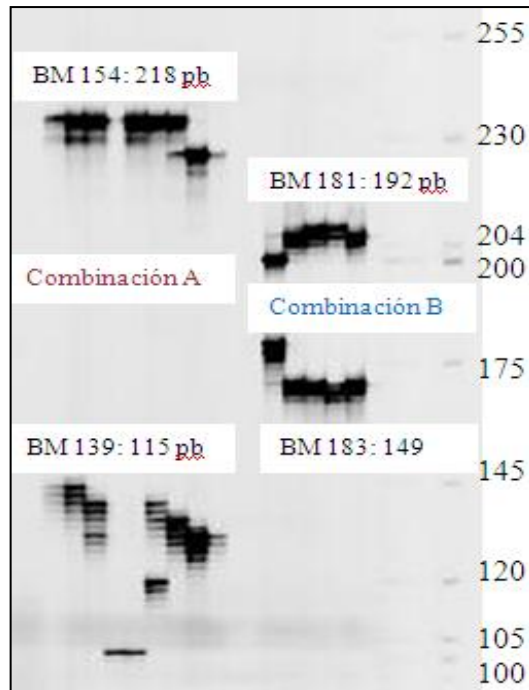


Figura 3.3 Gel que muestra la amplificación de siete accesiones de fréjol arbustivo, con las combinaciones A y B de loci SSR.

3.1.3 Genotipaje de la Colección Lojana de Fréjol Arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L)

Con las combinaciones establecidas se corrieron todas las muestras de la colección lojana de fréjol en el equipo LI-COR 4300 y las imágenes de los geles fueron genotipadas en el software SAGA^{GT} Microsatellite versión 3.3. En las figuras 3.4 y 3.5 se muestra los patrones de bandas obtenidos para los nueve microsatélites amplificados en algunas accesiones de la colección, se puede distinguir los polimorfismos o alelos para cada locus. Se observó que el locus BM-143 fue el más polimórfico (Figura 3.4) y que la mayoría de genotipos fueron homocigotos (Figura 3.4 y 3.5). En general, se obtuvieron buenos patrones de amplificación con todos los SSRs, a pesar de que la lectura de los geles se dificultó debido a la presencia de bandas tartamudas o inespecíficas (*stutter bands*) que pueden confundirse con alelos.

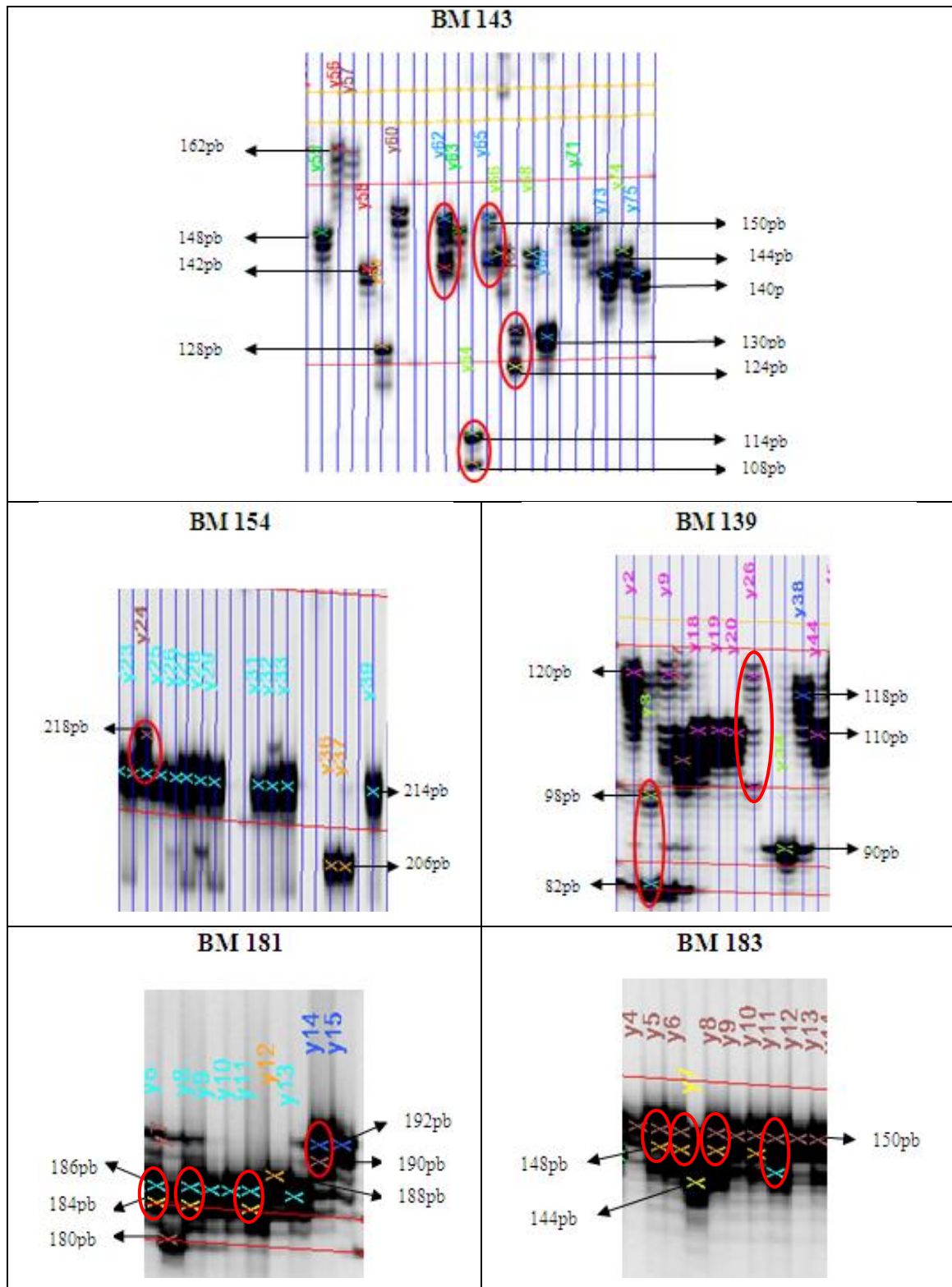


Figura 3.4 Imágenes de los geles obtenidos en SAGA^{GT} Microsatellite versión 3.3, que indican algunos alelos correspondientes a los 9 loci SSR analizados. El BM-143 se observa como el más polimórfico. Los individuos heterocigotos se señalan con óvalos rojos.

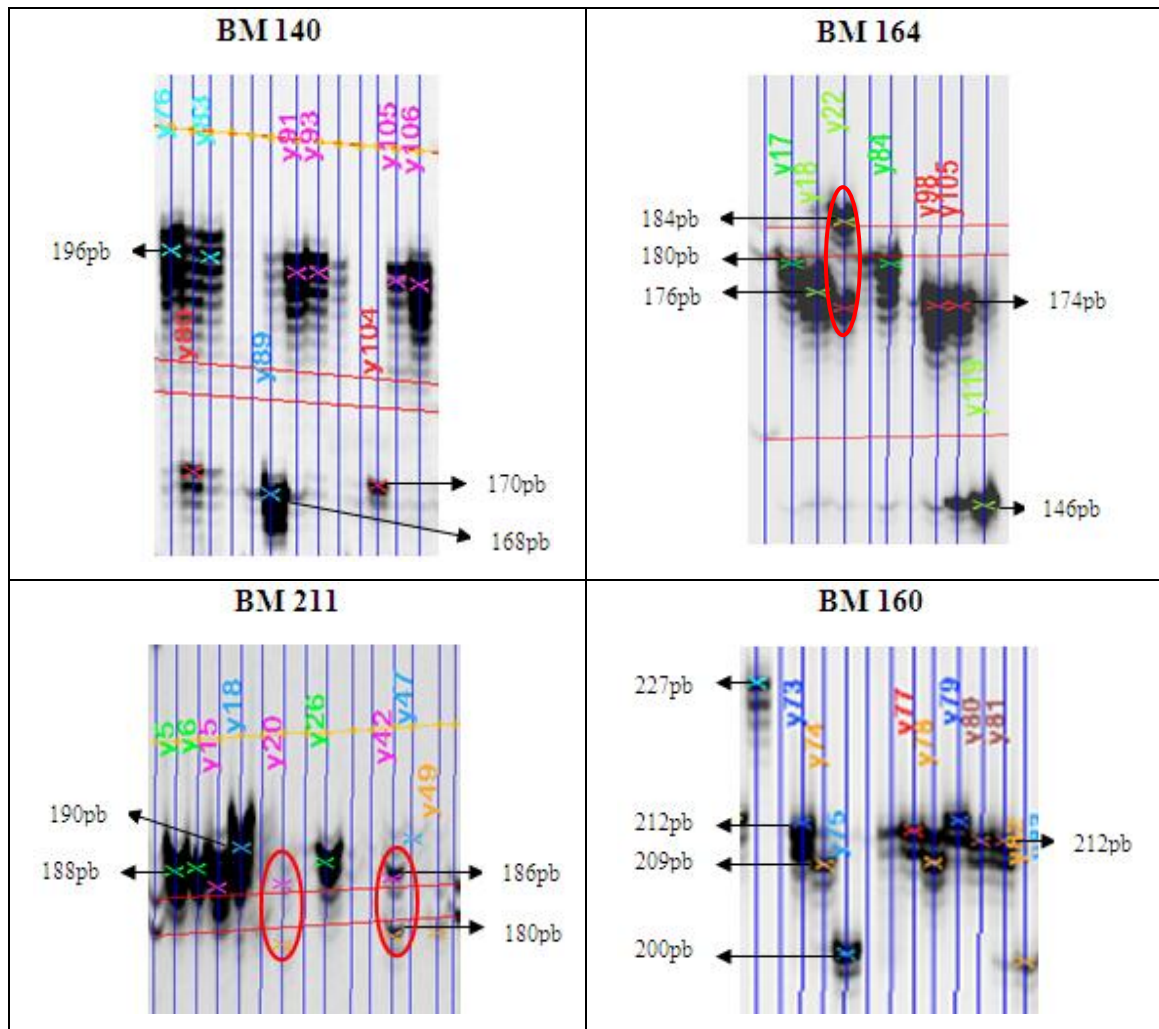


Figura 3.5 Imágenes de los geles obtenidos en SAGA^{GT} Microsatellite versión 3.3, que indican algunos alelos correspondientes a los 9 loci SSR analizados. Los individuos heterocigotos se señalan con óvalos rojos.

3.1.4 Amplificación y genotipaje de gaps

Con los primers BM-140 y BM-160 se obtuvo un alto número de datos faltantes (gaps) para el 14% de las accesiones de fréjol analizadas, mediante. En este tipo de análisis, lo ideal es que el porcentaje de datos perdidos no sobrepase el 10%, para cada locus, por esta razón, el genotipaje se completó con primers fluoromarcados analizados en el secuenciador ABI-310. Con ésta metodología, el BM-140 produjo amplificación para tres de los 19 gaps y el BM-160 amplificó cinco de los 16 gaps, lo que generó un 13% datos perdidos para el locus BM-140 y 9% para el locus BM-160.

3.2 Análisis de datos

Para obtener la matriz genotípica (Anexo C), con los tamaños de los alelos para cada accesión, se utilizó la información de nueve de los 10 loci SSR seleccionados, por la eliminación del BM 156. Además, se eliminó del análisis la accesión ECU-6074 porque presentó datos perdidos en seis de los nueve loci analizados, lo cual afectaría el posterior análisis estadístico.

3.2.1 Diversidad genética de la colección lojana de fréjol arbustivo

En el análisis de 122 individuos analizados con nueve microsatélites, se encontró un total de 83 alelos en toda la población estudiada, con un promedio de 9.22 alelos/locus, un valor significativamente alto. Los tamaños para estos alelos oscilaron entre 82 pb y 246 pb. El locus más polimórfico fue el BM-143 con 16 alelos y el que menor número de alelos tuvo fue el BM-140 con cinco alelos. El rango de diferencia de pares de bases entre alelos fluctuó de 2 a 20 pb (Tabla 3.3).

El alelo más frecuente fue el BM154-214 pb con un valor de 0.735, en tanto que, los alelos BM139-84 pb, BM143-108 pb, BM143-122 pb, BM143-124 pb y BM164-166 pb fueron los de menor frecuencia con un valor de 0.004 cada uno (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Alelos registrados con sus respectivas frecuencias para 122 accesiones de frejol arbustivo con nueve loci SSR. En azul se muestran los alelos menos frecuentes de cada locus SSR y en rojo están los alelos más frecuentes.

Locus	Tamaño esperado* (pb)	Número de alelos	Tamaño encontrado (pb)	Frecuencia alelica
BM-139	115	12	82	0,188
			84	0,004
			90	0,088
			98	0,054
			100	0,083
			102	0,008
			106	0,025
			110	0,250
			114	0,046
			118	0,058
			120	0,096
			122	0,100
BM-154	218	7	206	0,117
			212	0,013
			214	0,735
			218	0,057
			238	0,009
			242	0,043
BM-181	192	7	180	0,143
			182	0,017
			184	0,294
			186	0,361
			188	0,063
			190	0,055
BM-183	149	8	144	0,055
			146	0,050
			148	0,143
			150	0,681
			152	0,013
			158	0,008
			160	0,042
166	0,008			
BM-143	143	16	108	0,004
			114	0,021
			122	0,004
			124	0,004
			128	0,071

BM-143	143	16	130	0,021
			140	0,059
			142	0,034
			144	0,130
			146	0,130
			148	0,130
			150	0,122
			152	0,059
			158	0,071
			160	0,088
162	0,050			
BM-160	211	11	180	0,054
			182	0,063
			184	0,080
			200	0,027
			206	0,027
			209	0,188
			212	0,402
			214	0,071
			217	0,009
			227	0,027
238	0,054			
BM-211	186	6	180	0,148
			182	0,017
			184	0,026
			186	0,370
			188	0,200
190	0,239			
BM-164	182	11	140	0,021
			146	0,128
			162	0,017
			166	0,004
			172	0,058
			174	0,413
			176	0,128
			180	0,149
			182	0,017
			184	0,033
186	0,033			
BM-140	190	5	168	0,212
			170	0,099
			186	0,165
			196	0,373
198	0,151			

* Tamaños reportados por Gaitán *et al.* (2002).

En la tabla 3.4 se observa varios índices de diversidad genética determinados para la colección lojana de fréjol. En promedio se analizó el 95,3 % de las accesiones de fréjol arbustivo. El locus que mayor número de genotipos presentó fue el BM-143 con 25 genotipos y el que menor número de genotipos presentó fue BM-140 con ocho genotipos. Un parámetro muy importante para analizar es la diversidad genética o heterocigosidad esperada (H_E), cuyos valores más altos fueron para los locus BM-143 y BM-139, y en promedio este índice fue de 0.72. Estos dos marcadores fueron también los más polimórficos, ya que presentaron un alto valor de PIC (0.90 y 0.85 respectivamente), en tanto que, los loci BM-154 y BM-183 fueron los que menos información brindaron, con valores de PIC de 0.42 y 0.48 respectivamente.

El marcador BM-183 fue el que mayor número de heterocigotos presentó y en promedio la heterocigosis observada (H_o) fue de 0.11, un valor bajo y razonable debido a la naturaleza autógena de reproducción del fréjol común, que genera homocigotos principalmente (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Parámetros de diversidad genética observados en la colección lojana de fréjol arbustivo, con 122 individuos y nueve marcadores SSR.

Marcador	Número de genotipos	Disponibilidad	Heterocigosis Esperada	Heterocigosis Observada	PIC
BM-139	23	0,984	0,859	0,133	0,845
BM-154	10	0,943	0,440	0,052	0,419
BM-181	13	0,975	0,751	0,185	0,714
BM-183	12	0,975	0,509	0,244	0,482
BM-143	25	0,975	0,905	0,126	0,897
BM-160	14	0,918	0,780	0,054	0,759
BM-211	9	0,943	0,743	0,052	0,702
BM-164	13	0,992	0,768	0,066	0,744
BM-140	8	0,869	0,756	0,066	0,719
Promedio	14,11	0,953	0,723	0,109	0,698

3.2.2 Estructura genética

3.2.2.1 Análisis de Agrupamiento

Para visualizar si las accesiones analizadas tienden a agruparse de alguna forma se realizaron los métodos de agrupamiento UPGMA y Neighbor-Joining (NJ), obtenidos a partir de la distancia de alelos compartidos (DAS: Shared Allele Distance).

El dendograma UPGMA (Figura 3.6) representa gráficamente las relaciones genéticas existentes en la colección lojana de frejol arbustivo. En él se puede observar claramente la formación de dos grupos, A y B. Dentro del grupo A están 17 accesiones de la colección lojana de fréjol arbustivo. El grupo B, por su parte, tiene una predominancia muy alta frente al anterior, ya que reúne a las otras 105 accesiones, entre ellas, una accesión separada (ECU-6106) en la parte superior del árbol. Dentro de este grupo también se puede observar tres subgrupos separados genéticamente, pero a nivel morfológico no presentan ninguna característica en común que los diferencie.

Estos dos grupos A y B probablemente tienen correspondencia con la estructura de acervos mesoamericano y andino respectivamente, determinada por anteriores estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares en fréjol común, pero para corroborar esta suposición se comparó los caracteres morfológicos de las accesiones y se realizó otros análisis estadísticos cuyos resultados se indican posteriormente.

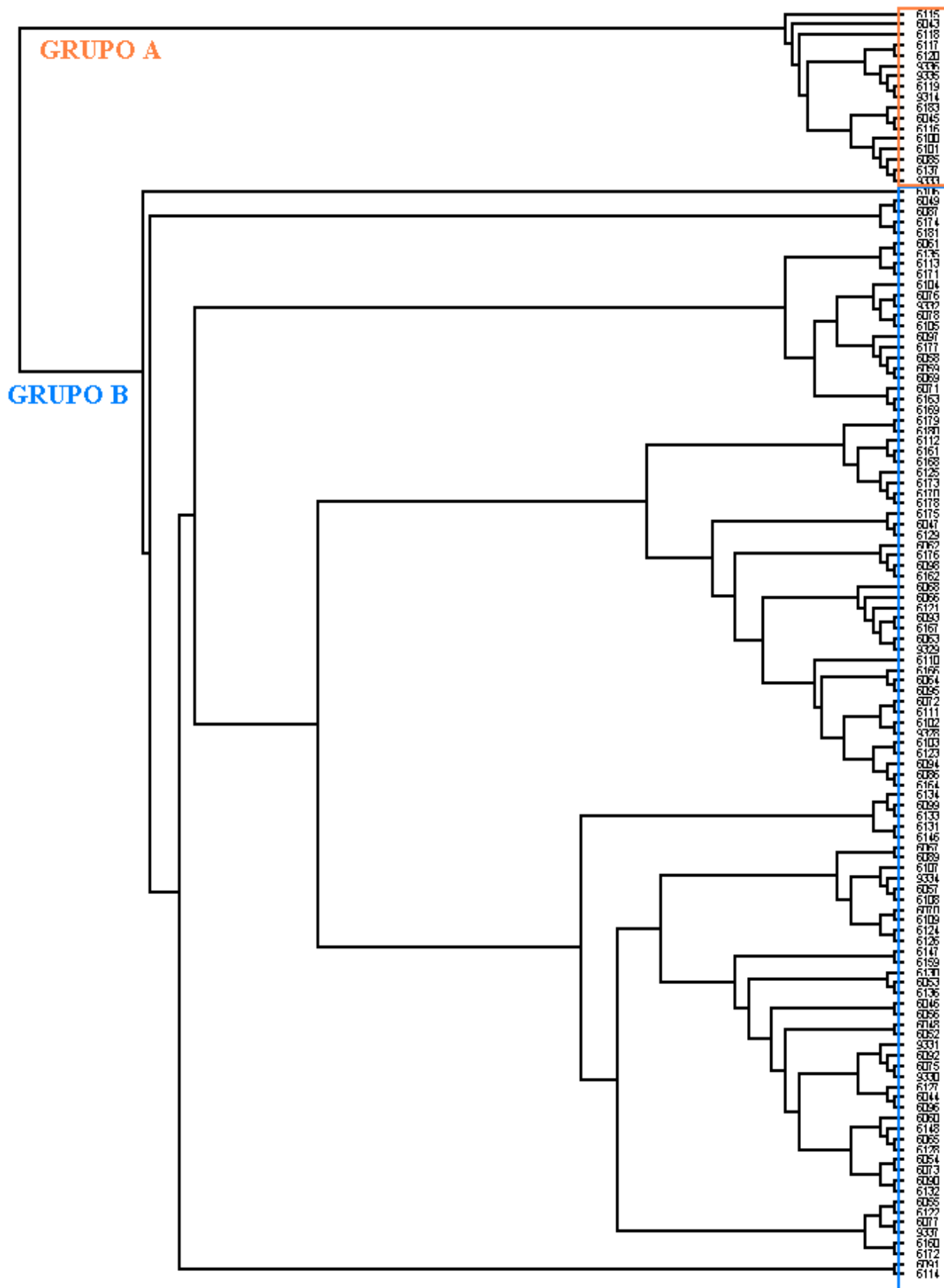


Figura 3.6 Dendrograma UPGMA basado en la distancia de alelos compartidos (DAS), que indica la agrupación de las 122 accesiones de fréjol arbustivo.

Al realizar el árbol NJ se observó la estructura de los grupos A y B (Figura 3.7). Este resultado coincide con lo encontrado en el UPGMA, que probablemente distingue a las accesiones mesoamericanas y andinas, con la diferencia de que en el grupo A, del NJ, se une la accesión ECU-6049 a más de las 17 accesiones agrupadas mediante el UPGMA.



Figura 3.7 Árbol NJ basado en la distancia de alelos compartidos (DAS), que indica la agrupación de las 122 accesiones de fréjol arbustivo.

3.2.2.2 Métodos Multivariados

Mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCO) se detectaron los mayores ejes de varianza, para lo cual se calculó los valores Eigen (Tabla 3.5), que indican el porcentaje individual y acumulado de la variabilidad que se encuentra en cada una de las coordenadas. De esto se obtuvo que, la primera coordenada muestra un 14.4% de la variabilidad de la colección lojana de fréjol, la segunda coordenada muestra un 8.2%, y juntas presentan el 22.6% de la variabilidad total.

Tabla 3.5 Valores Eigen y porcentajes individuales y acumulados de la varianza para las tres primeras coordenadas, para la colección lojana de fréjol arbustivo.

Coordenada	Valor Eigen	Porcentaje Individual (%)	Porcentaje Acumulado (%)
1	2.93	14.37	14.37
2	1.67	8.21	22.58
3	1.50	7.35	29.93

En la figura 3.8 se puede observar que mediante el PCO también se separan dos grupos genéticos respecto a la primera coordenada, el grupo G1 y G2 equivalentes a los grupos A y B respectivamente, encontrados al realizar los métodos UPGMA y NJ (Figura 3.6 y 3.7). Una excepción es la accesión ECU-6049 que según el PCO (Figura 3.7) pertenece al grupo G1, mientras que en el UPGMA se ubica en el grupo B. Dicha accesión junto con la ECU-6043, se encuentran más alejadas del resto de accesiones en el grupo G1, probablemente por compartir ciertas características morfológicas con los individuos del grupo G2, lo que sugeriría un posible evento de introgresión entre los dos grupos.

Dentro del grupo G2 todas las accesiones se encuentran dispersas sin ningún tipo de estructura o separación de grupos.

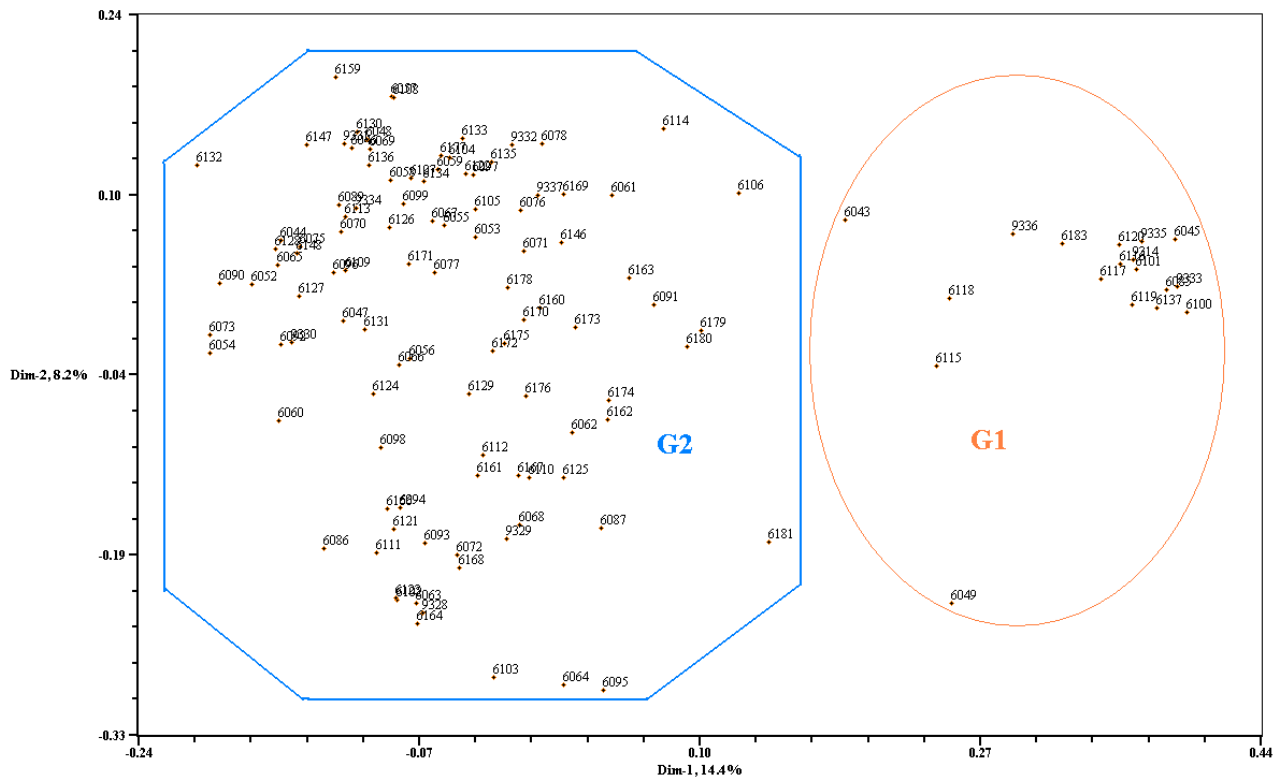


Figura 3.8 Análisis de Coordenadas Principales, obtenido con el coeficiente de similitud SM, que indica la agrupación de 122 accesiones de frejol arbustivo en las dos primeras coordenadas. En color naranja se indican las accesiones del grupo G1 y en azul las accesiones del grupo G2.

En la figura 3.9 se observa una tercera coordenada que muestra un 7.35% de variabilidad adicional (Tabla 3.5), lo que suma un acumulado de 29.9% de la variabilidad total observada para las accesiones de fréjol analizadas. En este gráfico se puede apreciar mucho mejor la distribución espacial de las 122 accesiones en los dos grupos G1 y G2, ya que una de las ventajas de este tipo de gráfico es que se puede observar las relaciones de cada accesión con todas las demás de la colección, siendo esta representación menos lineal y más didáctica que los dendogramas.

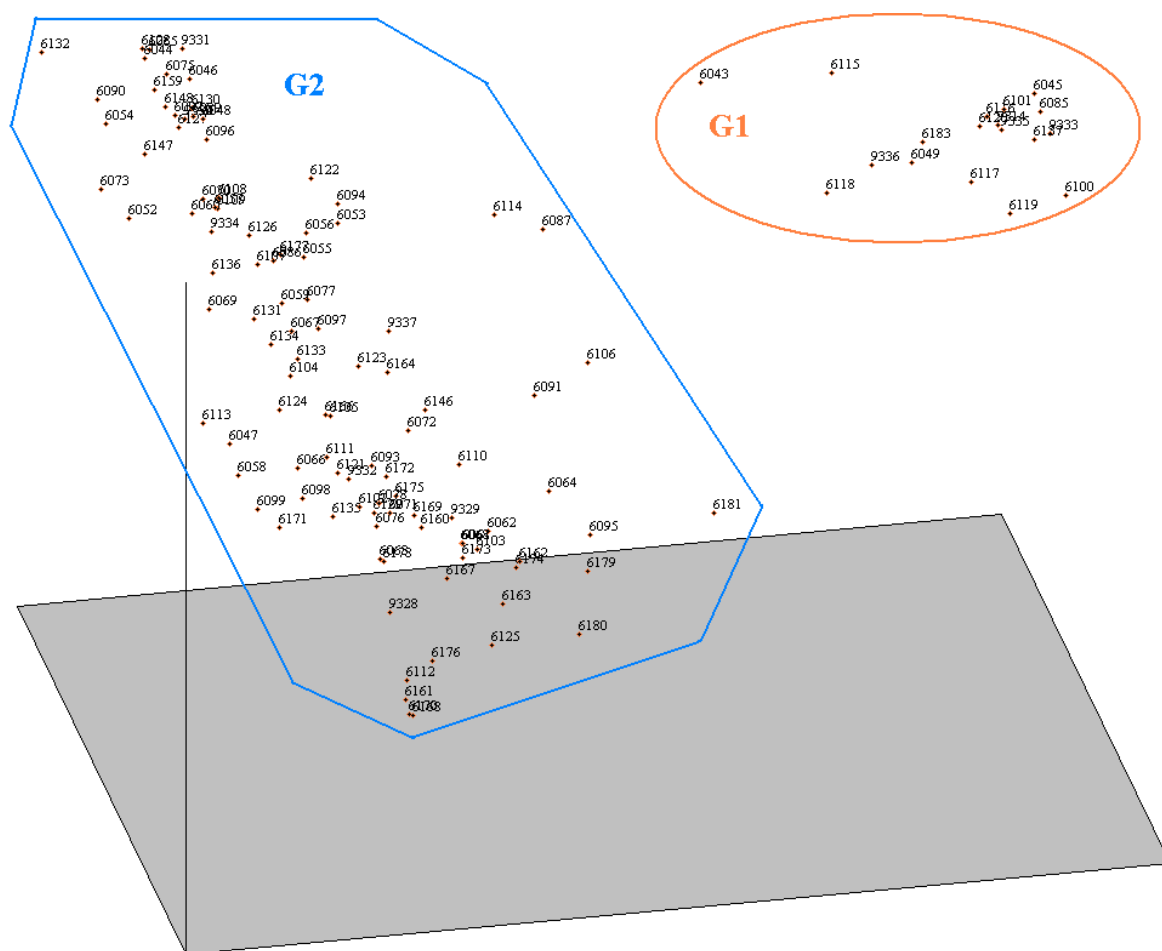


Figura 3.9 Análisis de Coordenadas Principales, que indica la agrupación de 122 accesiones de frejol arbustivo analizados con 9 loci SSR en las tres primeras coordenadas.

3.2.2.3 Estadísticas F

El cálculo del F_{st} determinó una alta diferenciación genética de 0.307 ($P=0.05$) entre los grupos G1 y G2 (Tabla 3.6), formados en el PCO, este valor fue significativo al 95%. Este parámetro indica que del total de varianza genética observada, un 30.7% se debe a diferencias entre los dos grupos.

Para los índices de endogamia total (F_{it}) e intrapoblacional (F_{is}) se encontraron valores positivos para todos los loci, lo que significa que hay un defecto de heterocigotos con respecto a los esperados bajo las condiciones de equilibrio de Hardy-

Weinberg. El Fit tiene un valor de 0.885 y el Fis fue 0.835 (Tabla 3.6). Estos datos indican que un 88.5% de la variación genética se debe a diferencias dentro de toda la colección lojana de fréjol arbustivo y el 83.5% de variación pertenece a diferencias dentro de cada grupo G1 y G2.

Tabla 3.6 Estadísticas F (Weir y Cockerham, 1984) para 122 accesiones de fréjol arbustivo analizadas con 9 loci SSR.

Locus	Fst	Fit	Fis
BM-139	0.286	0.879	0.830
BM-154	0.486	0.930	0.863
BM-181	0.432	0.834	0.707
BM-183	0.514	0.705	0.394
BM-143	0.042	0.866	0.860
BM-160	0.263	0.945	0.925
BM-211	0.310	0.947	0.923
BM-164	0.416	0.941	0.899
BM-140	-0.041	0.911	0.914
Promedio	0.307	0.885	0.835

3.2.2.4 Análisis Molecular de Varianza

Los resultados obtenidos de las estadísticas F fueron corroborados mediante el análisis molecular de varianza (AMOVA). Dicho análisis arrojó un alto valor Fst de 0.314, muy similar al obtenido anteriormente. El AMOVA también mostró que el 31% de la diversidad genética se debe a la diferenciación entre los dos grupos, mientras que el 69% de la diversidad se debe a la diferenciación presente dentro de cada grupo.

3.2.2.5 Distancia Genética

La distancia genética de Nei (1972) entre los grupos G1 y G2 fue alta ($D=1.63$), y como era de esperarse, la identidad genética entre ellos fue baja ($I=0.19$), lo cual sugiere que dichos grupos son muy diferentes y que es muy probable que eso se deba a que pertenecen al acervo mesoamericano y andino respectivamente.

3.2.3 Diversidad genética comparativa de los grupos G1 y G2 de la colección lojana de fréjol arbustivo

Cada uno de los grupos, de la colección lojana de fréjol arbustivo, se analizó por separado para ver si existían diferencias en sus índices de diversidad genética, éstos fueron calculados en el software Power Marker v3.0 (Liu y Muse, 2005).

En la tabla 3.7 se puede apreciar las diferencias en los parámetros de diversidad genética que presentan los grupos G1 y G2 formados en base al PCO. En cuanto a la riqueza alélica el grupo G2 tiene en promedio mayor número de alelos (7.78 alelos/locus) que el grupo G1, seguramente porque abarca a la mayoría de las accesiones. En el grupo G1 el alelo más frecuente fue el BM181-180pb con un valor de 0.889 y los menos frecuentes fueron BM143-108pb, BM143-122pb y BM143-124pb con un valor de 0.028. En tanto que, en el grupo G2 los alelos más frecuentes fueron BM154-214pb y BM183-150pb con valores de 0.803 y 0.802 respectivamente y el alelo menos frecuente en este grupo fue el BM143-142pb con 0.02. El grupo G2 tiene un mayor número de genotipos que el grupo G1. La diversidad genética o H_E fue mayor en el grupo G2 con 0.66 respecto a 0.56 del grupo G1, mientras que, la H_O fue superior en el grupo G1 en relación al grupo G2. El grupo G2 presentó mayor índice de PIC.

El valor Fis tanto en el grupo G1 como en el G2 fue alto y significativo al 95%, su valor positivo indica un déficit de heterocigotos en ambos grupos (Tabla 3.7). Este resultado fue probado por un test exacto utilizando el método de la cadena de Markov en el software GENEPOP versión 3.3 (Raymond y Rousset, 1995).

Tabla 3.7 Parámetros de diversidad genética observados en los grupos G1 y G2 de la colección lojana de fréjol arbustivo.

	Mayor frecuencia alelica		Número de genotipos		Tamaño de la muestra		Número de alelos	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
BM-139	0,833	0,284	5	20	18	104	6	11
BM-154	0,455	0,803	6	7	18	104	6	5
BM-181	0,889	0,416	3	13	18	104	3	7
BM-183	0,306	0,802	6	8	18	104	5	6
BM-143	0,194	0,153	13	18	18	104	10	11
BM-160	0,389	0,473	4	13	18	104	4	10
BM-211	0,719	0,414	6	7	18	104	5	5
BM-164	0,833	0,481	3	10	18	104	3	10
BM-140	0,3	0,38	5	8	18	104	5	5
Promedio	0,546	0,467	5,667	11,556	18	104	5,222	7,778

	H esp		H obs		PIC		Fis*	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
BM-139	0,299	0,857	0,222	0,118	0,291	0,844	0,284	0,864
BM-154	0,723	0,338	0,091	0,048	0,691	0,315	0,885	0,859
BM-181	0,204	0,697	0	0,218	0,194	0,649	1	0,69
BM-183	0,752	0,334	0,167	0,257	0,709	0,305	0,789	0,234
BM-143	0,867	0,891	0,389	0,079	0,853	0,881	0,571	0,912
BM-160	0,677	0,71	0,056	0,053	0,611	0,679	0,922	0,926
BM-211	0,457	0,698	0,188	0,03	0,429	0,645	0,61	0,957
BM-164	0,285	0,707	0,333	0,019	0,258	0,677	-0,14	0,973
BM-140	0,76	0,754	0	0,073	0,72	0,717	1	0,904
Promedio	0,558	0,665	0,161	0,1	0,528	0,635	0,727*	0,852*

* Valor significativo al 95%

En el análisis de diversidad también se encontraron alelos exclusivos, tanto para el grupo G1 como para el grupo G2, en todos los loci SSR (Tabla 3.8), excepto para el BM-140 cuyos alelos fueron compartidos por los dos grupos. La mayor parte de los alelos exclusivos fueron para el grupo G2.

Tabla 3.8 Alelos exclusivos para los grupos G1 y G2 de accesiones de fréjol arbustivo analizadas con 9 loci microsatélites.

Grupo	Locus	Alelos	Frecuencia alelica
G1	BM-139	84	0,028
		238	0,091
	BM-154	242	0,455
		158	0,056
	BM-183	160	0,278
		108	0,028
	BM143	114	0,139
		122	0,028
		124	0,028
		130	0,139
	BM-160	182	0,389
BM-211	182	0,125	
BM-164	140	0,139	
G2	BM-139	90	0,103
		102	0,01
		106	0,029
		114	0,054
		118	0,069
		122	0,118
	BM-154	218	0,063
	BM-181	182	0,02
		188	0,074
		190	0,064
		192	0,079
	BM-183	150	0,802
		152	0,015
		166	0,01
	BM143	140	0,069
		146	0,153
		152	0,069
		158	0,084
		160	0,104
		162	0,059
	BM-160	200	0,032
		206	0,032
		209	0,223
214		0,085	
217		0,011	
227		0,032	
238		0,064	

Grupo	Locus	Alelos	Frecuencia alelica
G2	BM-211	184	0,03
	BM-164	162	0,019
		166	0,005
		172	0,068
		176	0,15
		180	0,175
		182	0,019
		184	0,039
		186	0,039

3.2.4 Análisis de Coordenadas Principales (PCO) para el grupo G2

Este análisis se realizó en el software NTSYS ver.2.1 (Rohlf, 2002). El PCO para el grupo G2 se realizó con la intención de ver si al eliminar las accesiones del grupo G1, existe alguna subestructuración dentro de este grupo. Pero como se puede observar en la figura 3.10, no se diferenciaron subgrupos claramente, sino mas bien una dispersión de las accesiones a lo largo de las dos primeras coordenadas de varianza.

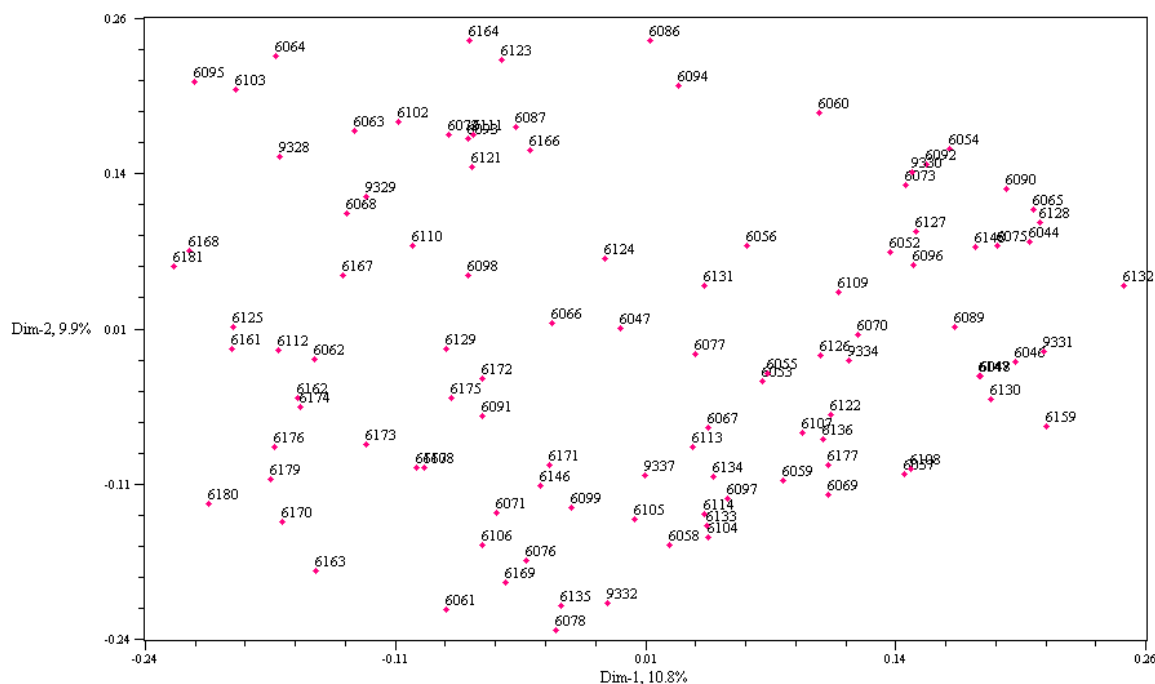


Figura 3.10 Análisis de Coordenadas Principales, obtenido con el coeficiente de similitud SM, que indica la dispersión de 104 accesiones de frejol arbustivo del grupo G2 en las dos primeras coordenadas.

3.2.5 Identificación de duplicados

Con la ayuda del software Excel Microsatellite Toolkit se identificaron dos parejas de duplicados en la colección lojana de fréjol arbustivo, con un 100% de similitud genética. En la primera pareja están las accesiones ECU-6137 y ECU-9333, y en la segunda están la ECU-6072 y la ECU-6111. Estos resultados son muy buenos ya que al existir solo dos casos de duplicados, se puede decir que, no se ha sobreestimado la gran diversidad encontrada en la colección lojana de fréjol arbustivo.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Sobre la selección de los marcadores SSR para el estudio

En la presente investigación se utilizó microsatélites, ya que estos exhiben altos niveles de polimorfismo debido a que las regiones del genoma con repeticiones en tándem son muy sensibles a sufrir errores durante el apareamiento de las cromátidas en el cross-over de la meiosis I y durante la replicación del ADN. Como consecuencia, las células hijas adquieren un número diferente de repeticiones, las cuales generan polimorfismo en la longitud de las bandas observadas en un análisis molecular basado en microsatélites. A pesar de su alto grado de polimorfismo, los SSRs están delimitados por secuencias altamente conservadas, lo que permite el diseño de cebadores para su amplificación por PCR. Estas repeticiones en tándem generalmente tienen alguna relación funcional o estructural, ya sea en la secuencia de ADN o en la proteína, por ésta razón se cree que la evolución los ha preservado (Córdova *et al.*, 2008).

Los microsatélites empleados son marcadores genómicos, es decir, que se ubican en regiones no codificantes del genoma nuclear, éstos generan mayores índices de diversidad que los SSR basados en cDNA o génicos (Díaz y Blair, 2006).

Los microsatélites se han usado con mucho éxito para la caracterización molecular de fréjol, debido que son más polimórficos que otros marcadores usados para este mismo fin, como por ejemplo, la proteína de la semilla Faseolina (Gepts *et al.*, 1986), isoenzimas (Paredes y Gepts, 1995), aloenzimas (Singh *et al.* 1991), RAPDs (Duarte *et al.* 1999; Beebe *et al.*, 2000), RFLPs (Becerra y Gepts, 1994) y AFLPs (Papa y Gepts, 2003; Maras *et al.*, 2008). El alto polimorfismo de los SSRs ha sido comprobado por numerosos trabajos realizados en fréjol, entre ellos, Gaitán *et al.* (2002), Gómez *et al.* (2004), Blair *et al.* (2006), Yu *et al.* (1999), Metais *et al.* (2002), Blair *et al.*, (2007b), además del presente estudio. Esta diferencia de polimorfismo entre los SSRs y otros marcadores puede explicarse por la alta sensibilidad de los microsatélites (Blair *et al.*, 2007a), por su amplia distribución en el genoma de fréjol (Blair *et al.* 2003) y por sus altos niveles de mutación en secuencias altamente conservadas (Ponciano *et al.*, 2009).

4.2 Diversidad genética de la colección lojana de fréjol arbustivo

Uno de los índices de diversidad más importantes es la riqueza alélica, que en el presente estudio fue de 9.22 alelos/locus, un valor mucho mayor respecto al promedio de 5 alelos/locus encontrados en estudios previos (Díaz y Blair, 2006; Ponciano *et al.*, 2009; Gaitán *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2004; Maras *et al.*, 2006), pero fue un valor más cercano al de 10,16 alelos/locus encontrado por González (2008) en un estudio de diversidad de 359 accesiones de fréjol con 30 microsatélites marcados con fluorocromos y genotipados en un secuenciador ABI 3730xl. El resultado encontrado en este estudio se explicaría por la variabilidad del material, proveniente de una zona de origen, así como de la capacidad de la técnica de análisis y método de detección empleado (M13-tailing) para detectar los polimorfismos.

Los microsatélites BM-143 y BM139 fueron los que mayor número de alelos revelaron (Tabla 3.3, ver *Resultados* apartado 3.2.1), lo que podría indicar que poseen alto poder de discriminación, y por ende, que son muy útiles para estudios de diversidad genética en fréjol común. Este hallazgo coincide con caracterizaciones moleculares realizadas por González (2008), Díaz y Blair (2006) y Gaitán *et al.* (2002) donde se reporta al locus BM-143 como uno de los más polimórficos.

Respecto a la heterocigosidad total esperada se obtuvo un alto índice de la misma (0.72), el cual da la idea de que la variabilidad genética de la colección lojana de fréjol arbustivo es alta. Este resultado es muy favorable comparándolo con valores de diversidad genética encontrados en investigaciones previas mediante SSRs, por ejemplo, 0.46 para materiales andinos (Blair *et al.*, 2007a), 0.43 para genotipos mesoamericanos (Ponciano *et al.*, 2009), 0.63 para genotipos de origen andino y mesoamericano (Maras *et al.*, 2008).

En este estudio también se encontró un alto valor promedio de PIC (0.7), valor superior al encontrado por Métais *et al.* (2002) (=0.44) al evaluar 15 SSR polimórficos con 45 líneas de fréjol común, lo que corrobora que la mayoría de loci SSR empleados son muy útiles para este tipo de análisis por su alto contenido de información polimórfica. Además, se vio que el valor de PIC más alto fue del locus BM-143, que también presenta la repetición motif más grande (GA₃₅).

En general, se puede notar que los primers SSRs que mayor número de alelos generan, también son los que mayor H_E (diversidad genética) y mayor PIC presentan, lo que sugiere una correlación positiva entre estos parámetros.

Es importante resaltar que los altos valores encontrados para los diferentes índices de diversidad podrían deberse a que los loci SSR usados han sido reportados como altamente informativos o polimórficos (Gaitán *et al.*, 2002; M. Blair, com. Pers), y también a la base genética del materia analizado. La amplia variabilidad de fréjol se explicaría por el manejo de los agricultores en los agro-sistemas tradicionales, quienes cultivan el grano en pools de variedades, o por hábitos de intercambio de semilla, además del hecho que la provincia de Loja está considerada como un centro de diversificación de fréjol común (Debouck, 1992).

Los resultados obtenidos son muy favorables si este estudio se encamina hacia el mejoramiento genético, ya que existe una amplia variabilidad genética, y por ende hay más posibilidades de encontrar características interesantes que mejoren la productividad y la resistencia a diversos factores bióticos y abióticos perjudiciales en el cultivo de fréjol común.

En lo referente a la heterocigosidad observada (H_o) se obtuvo un valor promedio de 0.11, debido al régimen autógamo de reproducción del fréjol (Graham y Ranalli, 1997), este valor es intermedio, ya que se han encontrado valores más bajos como los reportados por Blair *et al.* (2007a) que fue de 0.038, o por Gómez *et al.* (2004) y Kwak y Gepts (2009) que fue 0.01, y también se han reportado valores más altos como el de 0.2 reportado por González (2008). Ninguno de los SSR analizados presentó valores mayores a 0.2, lo cual confirma el potencial de estos marcadores para análisis de variabilidad, ya que, según González (2008), los marcadores que generan altos valores de H_o son menos útiles, por la posible presencia de bandas inespecíficas que pueden sobreestimar el valor de la H_o . Los patrones de alta heterocigosidad se dan cuando las accesiones no están en generaciones tan avanzadas y todavía sucede segregación o que estos materiales poseen cierto nivel de alogamia (Ponciano *et al.*, 2009). También se sabe que cuando una población está dividida en subpoblaciones aisladas, la H_o es

menor que cuando la población no está dividida, lo cual se conoce como efecto Wahlund (Werner, 2005).

4.3 Diferenciación genética de los grupos G1 y G2 de la colección lojana de fréjol arbustivo

Luego de realizar los análisis de agrupamiento UPGMA y NJ (Figura 3.6 y 3.7, ver *Resultados* apartado 3.2.2.1) y el análisis de coordenadas principales PCO (Figura 3.8, ver *Resultados* apartado 3.2.2.2), se encontró que las accesiones de la colección lojana de fréjol arbustivo estructuraron genéticamente en dos grupos G1 y G2.

Para interpretar el origen de esta estructuración se analizaron sus características morfológicas, proporcionadas por el Programa Nacional de Leguminosas (PRONALEG) del INIAP, el cual realizó la caracterización morfoagronómica de la colección. Se encontró que en el grupo G1 (18 accesiones) el 50% de las semillas de dichas accesiones fueron de tamaño pequeño (hasta 25g/100 semillas) y un 40% fueron medianas (25-40g/100 semillas). Respecto al color del grano el 78% fueron blancos y el resto fueron de color crema, la forma de la mayoría de granos fue redonda (83%) y en el hábito de crecimiento se encontró que gran parte (61%) presentó hábito tipo II (arbustivo indeterminado) y también hábito tipo III (indeterminado postrado) un 22% de las accesiones. Mientras que, dentro del grupo G2 (104 accesiones) se vio que el 63% fueron semillas grandes (desde 40g/100 semillas) y el resto fueron medianas, el color del grano en estas accesiones fue muy variado, gran parte de ellos moteados, la forma también varió aunque predominó la alargada con un 61% y en cuanto al hábito de crecimiento se encontró un 48% de hábito tipo III y un 35% de hábito tipo I (arbustivo determinado).

En base a éstos caracteres morfológicos se puede inferir que los dos grupos diferenciados a nivel molecular corresponderían a los centros de origen del fréjol común, el Mesoamericano y el Andino. Así el grupo G1 pertenecería al acervo mesoamericano y el G2 al andino, esto debido a que según estudios morfológicos anteriores se sabe que el tamaño típico de la semilla mesoamericana es mediano a pequeño (Gepts *et al.*, 1986), el hábito de crecimiento de las plantas es de tipo II y III, existen semillas de color blanco en este acervo y se cultivan en tierras bajas (Beebe *et*

al., 2000), las cuales son predominantes en la provincia de Loja. Mientras que, las semillas del acervo Andino se caracterizan por presentar semillas medianas y grandes (Singh *et al.*, 1991) de todos los colores (Beebe *et al.*, 2000). Según la información disponible es posible que todos los materiales del grupo G2 pertenezcan a la raza andina Nueva Granada (NG) ya que ésta presenta únicamente tipo crecimiento arbustivo y se cultiva en tierras bajas y climas templados de la región norte de los Andes, en cambio en las otras razas andinas predomina el hábito de crecimiento voluble y tipo III y crecen en zonas altas (PRONALEG, com. Pers.; Beebe *et al.*, 2001).

Es interesante notar que en el centro del gráfico del PCO (Figura 3.8, ver *Resultados* apartado 3.2.2.2) se distinguen dos accesiones del grupo G1 (ECU-6043 y ECU-6049), las cuales podrían ser candidatos de introgresión, por su posición intermedia entre los dos grupos genéticos en el PCO, y sus características morfológicas, ya que presentan semilla grande, propia de los andinos, y se ubican dentro del grupo de mesoamericanos como respuesta a su perfil molecular. Esta posible introgresión se pudo dar ya que los fréjoles mesoamericanos se han cultivado desde tiempos pre-colombinos en la región andina según evidencias arqueológicas (Beebe *et al.*, 2001) y a pesar de que el fréjol es una especie autógama, se han reportado considerables porcentajes de alogamia (Brunner y Beaver, 1989; Ibarra-Pérez *et al.*, 1997) y de flujo genético entre ambos acervos genéticos (Blair *et al.*, 2007), pero para aceptarlas como accesiones introgresadas es necesario hacer estudios morfológicos y bioquímicos más profundos.

Según estos resultados se puede concluir que la diversidad de los microsatélites parece estar asociada a la variación morfológica del fréjol, ya que los genotipos se separaron exactamente de acuerdo a su tamaño y color de semilla (Blair *et al.*, 2007a).

Los criterios morfológicos por si solos no son suficientes para determinar si una accesión pertenece a un acervo genético o a otro, ya que a veces se ha visto características morfológicas de un pool genético en otro, por ello, se corroboró la estructuración obtenida mediante el índice de diferenciación genética F_{st} . Este índice mide las diferencias entre las heterocigosidades esperadas de las subpoblaciones con respecto a la población total, debidas a la subdivisión poblacional y deriva genética, por lo tanto entrega la proporción de la variación genética que es producto de las diferencias entre subpoblaciones (Hartl, 1987). El índice F_{st} entre los grupos G1 y G2 fue 0.307*,

el cual fue significativo al 95%, que según la interpretación reportada (>0.25) indica una alta diferenciación genética (Wright, 1978 y Hartl & Clark, 1997). El valor obtenido implica que existe escaso intercambio genético o flujo de genes entre los dos grupos, y esto se explicaría por el comportamiento predominantemente autógamo de la especie, que limita dicho intercambio (Hill *et al.*, 1998).

En anteriores estudios, al comparar la diferenciación genética entre los acervos mesoamericano y andino, se reportan valores de F_{st} de 0.49 en un estudio en *Phaseolus lunatus* y 0.34 en una colección eslovaca de fréjol común (Maras *et al.*, 2006), según esto se puede decir que el resultado encontrado en el presente estudio es muy similar a aquellos que indican diferencia entre los dos importantes orígenes de la especie.

El AMOVA fue otra herramienta cuantitativa para confirmar la importante diferencia genética existente entre los grupos formados, por medio de este análisis se encontró que existe un 31% de variación entre los grupos, este es un porcentaje considerablemente alto que puede separar a los dos acervos de fréjol.

También se calculó la distancia genética de Nei (1972), que resultó ser grande (1.63) entre los grupos G1 y G2, este valor se encuentra dentro del rango obtenido por otros investigadores (Ponciano *et al.*, 2009) al comparar material mesoamericano y andino. Y como debe ser, la identidad genética fue pequeña (0.19) e incluso menor a la reportada por Díaz y Blair (2006) entre el acervo andino y mesoamericano.

Otro resultado que determina la clara estructuración genética de esta colección lojana de fréjol fue la presencia de alelos exclusivos, tanto para el grupo G1 como para el G2 (Tabla 3.8, ver *Resultados* apartado 3.2.3).

Todos estos resultados muestran que ambos grupos se encuentran bien diferenciados genéticamente entre sí, lo cual, sumado a las características morfológicas que los distinguen, son fuertes herramientas que los acervos mesoamericano y andino están representados en la colección lojana de fréjol arbustivo. Resultados similares fueron encontrados por otros autores, quienes han demostrado que los marcadores microsatélites son efectivos en la separación de las accesiones de acuerdo a su centro de

origen (Metais *et al.*, 2002; Blair *et al.*, 2006; González, 2008; Ponciano *et al.*, 2009; Maras *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2006). Sin embargo, existen otro tipo de marcadores que ayudarían a confirmar en mayor grado esta información, como son las aloenzimas (Singh *et al.*, 1991) y la proteína de la semilla faseolina (Gepts *et al.*, 1986), los cuales han logrado distinguir entre ambos acervos genéticos.

Detectar esta estructuración en dos grupos era un resultado no esperado, ya que, todas las accesiones pertenecen a la colección de fréjol arbustivo de Loja, por lo que se esperaba que todas pertenezcan al centro de origen andino. Este es un resultado interesante e importante, debido a que la información de los datos pasaporte era muy pobre respecto a la procedencia específica del material, no se sabía si era de origen andino o mesoamericano, ni si son silvestres o cultivadas. Este material fue colectado hace cerca de 30 años, donde no se tuvo la precaución de ingresar toda la información necesaria, por lo tanto el análisis molecular provee de una valiosa información para los curadores y mejoradores de germoplasma de fréjol del INIAP.

4.4 Comparación de la diversidad genética entre los grupos G1 y G2

Al encontrar dos grupos, dentro de la colección lojana de fréjol, que tienen correspondencia con la estructura de acervos propuesta (andino y mesoamericano), se buscó evaluar los diferentes índices de diversidad dentro de cada grupo para tener más elementos de discusión.

Todos los índices de diversidad evaluados resultaron ser altos para ambos grupos y al compararlos entre sí, se encontraron índices mayores en el grupo G2 (andinos) que en el G1 (mesoamericanos). Entre ellos, un parámetro que refleja muy bien la variabilidad existente es la heterocigosidad esperada o diversidad genética (Tabla 3.7, ver *Resultados* apartado 3.2.3), cuyos valores, tanto para el grupo andino como para el mesoamericano, fueron altos y muy similares a los presentados por González (2008) para ambos acervos, en un estudio de la colección de fréjol de Ruanda-África. Pero, en otras investigaciones (Becerra *et al.*, 1994; Beebe *et al.*, 2000; Beebe *et al.*, 2001) se evidenció que existe una variabilidad genética más acentuada en el acervo mesoamericano que en el andino, contrario a los resultados presentados aquí, debido al efecto del tamaño de la muestra del grupo G1, representado por 18 accesiones y el

grupo G2 por 104, lo cual hace que se subestime la diversidad genética del grupo mesoamericano G1.

El parámetro de diversidad que se comportó diferente a los demás fue la heterocigosidad observada, que fue mayor para el grupo G1 (Tabla 3.7, ver *Resultados* apartado 3.2.3), es decir, en el grupo mesoamericano existió mayor número de heterocigotos que en el andino. Este parámetro indicaría que en la colección analizada, el porcentaje de alogamia es mayor en las accesiones mesoamericanas que en las andinas, es decir, que el grupo mesoamericano es más diverso, y en este sentido, concuerda con el hecho de que el acervo mesoamericano presente una mayor base genética o con mayor variabilidad que el andino (Beebe *et al.*, 2000).

La baja heterocigosidad concuerda con el hecho de que se haya encontrado valores positivos y altos del coeficiente de endogamia intrapoblacional F_{is} en los grupos G1 y G2 (Tabla 3.7, ver *Resultados* apartados 3.2.3 respectivamente), ya que éste mide la reducción de heterocigosidad de un individuo debido a los apareamientos no aleatorios dentro de una subpoblación, lo cual produce un exceso de homocigotos y esto a su vez, hace que exista una desviación de las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg en dicha subpoblación.

Así mismo, el coeficiente de endogamia total (F_{it}) resultó ser alto (Tabla 3.6, ver *Resultados* apartado 3.2.2.3), este mide la reducción de heterocigosidad de un individuo debido a los apareamientos no al azar en la subpoblación (F_{is}) y a la subdivisión de la población (F_{st}). El F_{it} mostró que existe un déficit global de heterocigotos y un desequilibrio de Hardy-Weinberg dentro toda la colección lojana de fréjol arbustivo. Los resultados tanto del F_{is} como de F_{it} son coherentes con aquellos encontrados por Gómez *et al.* (2004) en un estudio de diversidad de fréjol común de Nicaragua.

Baudoin *et al.* (2002) sugiere que la presencia de muchas generaciones de plantas cultivadas en los mismos sitios, son otro factor que favorece al desequilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones y esto se contempla particularmente en la provincia de Loja, ya que los agricultores por muchos años han cultivado el fréjol arbustivo en sus valles semicálidos intercalado con maíz, caña de azúcar o yuca (Jiménez *et al.*, 1996).

El AMOVA mostró un 69% de variación dentro los grupos G1 y G2, esta alta variabilidad a pesar de la relativamente baja heterocigosidad observada en dichos grupos (Tabla 3.7, ver *Resultados* apartado 3.2.3) demuestra que probablemente el alto grado de autopolinización ocurre dentro de cada accesión, no entre ellas, lo que provoca el apareamiento de individuos homocigotos diferentes alelicamente entre sí (Gómez *et al*, 2004; Blair *et al*, 2007a). Esto también puede deberse a la selección realizada por los agricultores o por el banco de germoplasma de donde se obtuvieron dichas accesiones (Blair *et al*, 2007a).

La considerable diversidad genética encontrada en ambos grupos, sugiere que los agricultores pueden estar contribuyendo al mantenimiento o incluso al aumento de la diversidad a través de encruzamientos intencionales o no intencionales. Esta variabilidad podría ser el resultado de diversos factores como el manejo agronómico, la selección humana y natural, el intercambio local, nacional o inclusive internacional de la semilla y los eventos naturales de polinización cruzada o alogamia.

En la colección lojana de fréjol arbustivo se encontró gran variedad de tipos de fréjol, referente a sus colores, por lo que se puede decir que existen redes de distribución y que estos fréjoles han tenido una buena aceptación de los consumidores, así como una buena adaptación ambiental, factores fundamentales para la conservación de la variabilidad existente en esta colección.

4.5 Análisis de variabilidad genética del grupo G2 (Andino)

Como era de esperarse, en la colección lojana de fréjol arbustivo, existe una mayor representatividad del acervo Andino, por tratarse de cultivares tradicionales o “*landraces*”. El análisis multivariado realizado para este grupo, no diferenció estructura genética alguna, y más bien proyecta a las 122 accesiones a lo largo de las dos primeras coordenadas, que solo extraen el 20.7% de la varianza total, sin tendencia tampoco de agrupamiento de acuerdo a las razas determinadas dentro del tipo andino (Figura 3.10, ver *Resultados* apartado 3.2.4).

Este resultado concuerda con lo reportado por otras investigaciones (Becerra *et al.*, 1994; Beebe *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2009), que afirman que el pool andino no tiende a diferenciarse entre razas genéticamente (Beebe *et al.*, 2000). Se ha visto que las razas andinas se diferencian más en su morfología y régimen de adaptación que a nivel genético, por ello se continúa investigando para encontrar sutiles patrones de diversidad dentro del pool andino, asociado al hábito de crecimiento. Lo contrario sucede con el pool mesoamericano, donde hay razas bien definidas que se logran diferenciar en grupos mediante marcadores moleculares (Beebe *et al.*, 2000).

La amplia dispersión de las accesiones del grupo G2 en análisis multivariado se debe a su gran variabilidad, generada posiblemente por un cierto porcentaje de alogamia entre ellas, ya que según Blair *et al.* (2007) existe flujo de genes en el pool andino. Esta importante variabilidad encontrada en el grupo andino es un resultado interesante, ya que en investigaciones previas concluyen que el acervo andino presenta una estrecha base genética (Beebe *et al.*, 2000), debida la intensa presión de selección de la variabilidad morfológica en gran parte del genoma original andino, lo que implica que los fréjoles andinos se derivarían de una o muy pocas poblaciones silvestres y por ello se separaron más de la diversidad de sus silvestres, que los mesoamericanos, en lo que se refiere al tamaño de semilla y al rango e intensidad de sus colores (Beebe *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2009). Pero si se toma en cuenta que la colección analizada, en la presente investigación, pertenece a la provincia de Loja, se esperaría encontrar una alta variabilidad genética, ya que como se ha mencionado, esta provincia es uno de los principales centros de diversificación del fréjol (Debouck, 1992).

Toda la información generada en esta investigación resultará de mucha utilidad para futuros proyectos de mejoramiento del fréjol arbustivo, en vistas de generar nuevas variedades con características que beneficien tanto al agricultor como al consumidor, este conocimiento también ayudará a mejorar las estrategias de cultivo para establecer programas de conservación de toda esta riqueza genética perteneciente a la provincia de Loja.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

La caracterización molecular de 123 accesiones de la colección lojana de fréjol arbustivo, mediante el uso de nueve microsatélites genómicos, determinó elevados niveles de riqueza alélica (9.22 alelos/locus) y de contenido de información polimórfica (0.7) en la colección, demostrando una alta variabilidad genética y un alto nivel de polimorfismo en los materiales analizados.

La heterocigosidad observada (0.109), demostró que la colección lojana de fréjol arbustivo presenta una heterocigosis coherente con su régimen reproductivo autógamo, y además, que la base genética de la colección es considerablemente alta.

El análisis de diversidad distinguió dos grupos genéticos en la colección lojana de fréjol arbustivo, bien estructurados y diferenciados, que muy posiblemente corresponden a los acervos Andino y Mesoamericano, este hallazgo se corroboró con las diferencias morfológicas y los parámetros estadísticos empleados, análisis de agrupamiento y multivariado, F_{st} (0.307*), AMOVA (31%) y la distancia genética de Nei (1.63).

Los análisis estadísticos demuestran una mayor representatividad del acervo Andino, en la colección lojana de fréjol arbustivo, ya que éste agrupa a la mayoría de las accesiones (104 materiales), mientras que el tipo Mesoamérica está representado por un grupo de 18 accesiones. El grupo Andino mostró una gran variabilidad genética, mayor a la del acervo Mesoamericano, a diferencia de trabajos anteriores que exhiben una estrecha base genética para el tipo andino, este resultado confirma a la provincia de Loja como un importante centro de diversificación de fréjol.

La identificación de microcentros de diversidad de *P. vulgaris* en de la provincia de Loja, se vio dificultada por la falta de información sobre el origen y sitios de colecta de las accesiones de fréjol arbustivo, colectas que en su mayoría datan de hace aproximadamente 30 años.

En la colección lojana de fréjol arbustivo se encontraron solo dos casos de identidad genética entre las accesiones analizadas, lo cual indica una alta representatividad de los materiales, y que su significativa diversidad genética no está sobreestimada.

El presente estudio de caracterización molecular de germoplasma de fréjol arbustivo constituye una parte fundamental para conocer, usar y conservar los recursos genéticos presentes en un centro de origen y diversificación de ésta leguminosa, como es la provincia de Loja, ya que este germoplasma posee un alto potencial y forma un importante reservorio de genes para fines de mejoramiento genético.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

Es recomendable confirmar la distinción genética entre los posibles grupos Mesoamericano y Andino, encontrados en la colección lojana de fréjol arbustivo, utilizando controles y materiales representativos de estos dos acervos genéticos.

Es importante complementar la información molecular obtenida en la presente investigación con la información morfoagronómica de la colección lojana de fréjol arbustivo estudiada por el Programa Nacional de Leguminosas del INIAP, para identificar los perfiles moleculares de materiales que posean características de interés agronómico como alto rendimiento, adaptabilidad o resistencia a enfermedades, para que estos individuos sean usados en futuros programas de mejoramiento genético.

Al conocer la gran variabilidad genética encontrada en la colección lojana de fréjol arbustivo, se sugiere establecer programas y actividades para la recuperación y conservación del diverso germoplasma lojano, que se está perdiendo por enfocar el cultivo solo en pocas variedades comerciales.

El presente estudio forma parte del proyecto de caracterización molecular de la colección nacional de fréjol arbustivo del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP, por esta razón se recomienda comparar la diversidad genética encontrada aquí con la diversidad del resto de las accesiones tanto nacionales como internacionales que posee la colección nacional del INIAP.

Esta investigación es el primer reporte sobre la caracterización de variabilidad genética de fréjol en el Ecuador, por ello sería importante realizar investigaciones más profundas a nivel molecular y bioquímico, pero también se debe tomar en cuenta la experiencia directa de los agricultores poder llegar a conclusiones que permitan interpretar de mejor manera la información genética, con perspectivas de desarrollar diversos proyectos agrícolas que beneficien tanto a los productores como a los consumidores de esta importante leguminosa.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA

1. Alstad, D., Hotchkiss, S., Corbin, K. (1991). Gene flow estimates implicate selection as a cause of scale insect population structure. *Evolutionary Ecology*, 5, 88-92.
2. Aranguren, J., Román, R., Isea, W., Villasmil, Y. y Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 13 (1), 30-42.
3. Aranzana, M.J., J. Ballester, J. Carbó y P. Arús. (2001). Microsatélites: marcadores de alta eficiencia para la identificación varietal de melocotonero. *Fruticultura Profesional*, (118).
4. Baudoin, J.P., Rocha, O., Degreef, J., Maquet, A., Guarino, L. (2004). Ecogeography, demography, diversity and conservation of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 12. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute.
5. Becerra, L. y Gepts, P. (1994). RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centers of origin. *Genome*, 37, 256–263.
6. Becerra V., & Paredes M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc*, 60 (3), 270-281.
7. Beebe, S (Ed.). (1988). Temas actuales de mejoramiento genético del frijol común. Memorias del taller internacional de mejoramiento genético del frijol. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
8. Beebe, S., Skroch, P., Tohme, J., Duque, M., Pedraza, F. y Nienhuis, J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*, 40, 264–273.

9. Beebe, S., Rengifo, J., Gaitan, E., Duque, M. & Tohme, T. (2001). Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), A.A. 6713, Cali, Colombia. *Crop Science.*, 41, 854–862
10. Belkhir K, *et al.* (2000). GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II. Montpellier (France).
11. Beltrán, L. n.a. Marcadores Moleculares. Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas. Universidad Cayetano Heredia. Perú. Extraído el 26 de Septiembre de 2008 de: www.upch.edu.pe/facien/dbmbqf/gorjeda/cursos/geneticagen/MM-IV.ppt
12. Blair, M., Pedraza, F., Buendía, H., Gaitán, E., Beebe, S., Gepts, P., Tohme, J. (2003). Development of a genome-wide anchored microsatellite for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical Applied genetics*, 107, 1362–1374.
13. Blair, M., Giraldo, M., Buendía, H., Tovar, E., Duque, M. & Beebe, S. (2006). Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical Applied genetics*, 113(1), 100-115.
14. Blair, M, Díaz, J., Duque, M., Hidalgo, R. (2007a). Evidencia molecular de diferenciación genética e introgresión entre razas de frijol común del acervo andino. *Acta Agronómica*, 56 (4).
15. Blair, M., Díaz, J., Hidalgo, R., Díaz, L., Duque, M. (2007b). Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical Applied genetics*, 116 (1), 29-43.
16. Broughton, W., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. Published by Kluwer Academic Publishers. *Plant and Soil*, 252, 55–128.

17. Burkart & Bucher (1953). En Vargas, P. Alvarado, S. Muruaga, J. Guillén, H. Ortega, J. Montero, B. Acosta J. Azpíroz, H. (2000). Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. México.
18. Brunner, B. R, y Beaver, J. S. (1989). Estimation of outcrossing of the common bean in Puerto Rico. *Horticultural Science*, 24, 669-671.
19. Chambers & MacAvoy (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte B*. En Yáñez, V. (2002). Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima-Perú.
20. Claros, G. (2001). Marcadores Moleculares: Que son, como se obtienen y para qué sirven. Málaga- España. Extraído el 26 de Septiembre de 2008 de <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>
21. Córdova, J., Mendivelso, J. Niño, L. (2008). Búsqueda de Secuencias Microsatelites en Fríjol Común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia.
22. Crow, J. & Kimura M. (1970). *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper and Row, Publishers.
23. Cruz, J., Camarena, F., Pierre, J., Huaranga, A. y Blas, R. (2009). Evaluación Agromorfológica y Caracterización Molecular de la Ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.). *IDESIA*, 27(1), 29-40.

24. Debouck, D. (1984) Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Segunda edición. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
25. Debouck, D. (1991). Systematics and morphology. In: "Common beans: research for crop improvement". En Maquet, A., Vekemans, X. & Baudoin, J. (1999). Phylogenetic study on wild allies of Lima bean, *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae), and implications on its origin. *Plant Systematics and Evolution*, 218, 43-54.
26. Debouck (1992). Frijoles, *Phaseolus* spp. In: "Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492." En González, E. (2002). Agrobiodiversidad. Proyecto Estrategia Regional de Biodiversidad para los Países del Trópico Andino. Maracay – Venezuela. Extraído el 5 de Enero de 2009 a partir de <http://www.comunidadandina.org/desarrollo/te3.PDF>
27. Díaz, L., Blair, M. (2006). Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theoretical Applied genetics*, 114, 143–154.
28. Duarte, J., Dos santos, J., Melo, L. (1999). Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 22 (3), 419-426.
29. Durán, L., Blair, M., Giraldo, M., Macchiavelli, R., Prophete, E., Nin, J., Beaver, J. (2005). Morphological and Molecular Characterization of Common Bean Landraces and Cultivars from the Caribbean. *Crop Sci.*, 45, 1320–1328.
30. Engleman, E. (Ed). (1979). Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Chapingo – México.

31. Excoffier, L., Smousse, P., Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
32. Ferreira, M. & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Primera edición. Brasilia – Brasil: EMBRAPA-CENARGEN.
33. Frankel (1984) en Ferreira, M. & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Primera edición. Brasilia – Brasil: EMBRAPA-CENARGEN.
34. Frijol y chícharo. (1981). Primera Edición. Editorial Trillas: México, D.F.
35. Gaitán-Solís, E., Duque, C., Edwards, K., & Tohme, J. (2002). Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Science*, 42, 2128-2136.
36. García, K. (2008). Estudio de la diversidad genética de *Phaseolus lunatus* L. en zonas silvestres y cultivadas en la provincia de Imbabura-Ecuador mediante el uso de microsatélites. Escuela Politécnica del Ejército. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí-Ecuador. p 41.
37. Gepts, P., Osborn, T., Rashka, K. y Bliss, F. (1986). Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40(4), 451-468.
38. Gómez, O., Blair, M., Frankow, B. y Gullberg, U. (2004). Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Science*, 44, 1412–1418.
39. González, D. (1998). Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.

Extraído el 15 de Diciembre de 2008 de
http://www.filogenetica.org/dolores_pdfs/Gonzalez1998.pdf

40. González, L. (2008). Evaluación de la diversidad genética en una colección de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de Ruanda (Africa). Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. CIAT. Bogotá-Colombia.
41. Goudet. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities ad fixation indices (version 2.9.3). Extraído de <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
42. Graham, P. y Ranalli, P. (1997). Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crop Res.*, 53,131–146.
43. Hartl, D., Clark, A. (1997). Principles of Population Genetics. Tercera Edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.
44. Hearne, C., Ghosh, S. y Todd, J. (1992) Microsatellite for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.*, 8, 288–294. En Yu, K., Park S., Poysa V. (1999). Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42.
45. Heike (ed.). 2005. Frijol silvestre. Extraído el 10 de Noviembre de 2008 de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm>
46. Hill *et al.* (1998). Quantitative and ecological aspects of plant breeding, en Gómez, O., Blair, M., Frankow, B. y Gullberg, U. (2004). Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Science*, 44, 1412–1418.
47. Ibarra-Pérez, J. F., Ehdai, B., y Waines G. (1997). Estimation of outcrossing rate in common bean. *Crop Science*, 37, 60-65.

48. Ishino y Ortega (1975) en Gangotena, D. (1983). Caracterización Químico-Nutritiva de los frejoles ecuatorianos. Universidad Central del Ecuador. Quito- Ecuador.
49. Jiménez, R., Ramón, M., Lépiz, R. & Ullauri, J. (1996). El cultivo de fréjol común en los valles de la provincia de Loja: Agronomía y manejo de plagas. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Quito, Ecuador.
50. Jordano, P. n. a. Utilidad y aplicaciones de técnicas moleculares en ecología y conservación. Estación Biológica de Doñana, CSIC. Perú. Extraído el 5 de Enero de 2009 de <http://ebd10.ebd.csic.es/pdfs/resumen.pdf>.
51. Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K., Ayad, W. y Hodgkin, t. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Extraído el 5 de Enero de 2009 de <http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/biodiversity/publications/138.pdf>.
52. Kwak, M. y Gepts, P. (2009). Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theor Appl Genet*, 118, 979-992.
53. Lagordo, A. (2004). Judía. Habichuela. Fríjol. *Phaseolus vulgaris*. Extraído el 11 de Octubre de 2008 de <http://es.geocities.com/plantasantonio/judia.html>.
54. Lépiz, R., Peralta, E., Minchala, L. & Jiménez, R. (1995). Diagnóstico Agrosocioeconómico del cultivo de fréjol en la Sierra Ecuatoriana. Quito, Ecuador: INIAP-PROFRIZA.
55. LI-COR Biosciences. 2004. Automated Microsatellite Analysis. Lincoln, Nebraska 68504 USA. Extraído el 23 de Junio de 2009 de <http://www.licor.com/bio/PDF/genomics/microsat.pdf>

56. LI-COR Biosciences. 2009. Biotechnology, Advanced Discovery with Infrared Imaging. Extraído el 5 de Julio de 2009 a partir de <http://www.licor.com/bio/applications/applications.jsp>
57. Liu, K., & Muse, S. (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21(9), 2128-2129.
58. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., & Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Quinta edición. Buenos Aires – Argentina: Editorial Médica Panamericana.
59. Maras, M., Sušnik, S., Meglič, V. y Šuštar, J. (2006). Characterization and genetic diversity changes in the slovenian common bean, cešnjevca landrace. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48(2), 39–47.
60. Métais, I., Hamon, B., Jalouzot, R., Peltier, D. (2002). Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theor Appl Genet*, 104(8), 1346-1352.
61. MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA ACUACULTURA Y PESCA DEL ECUADOR (MAG). (2005). El Fréjol. Extraído el 20 de Noviembre de 2008 de: http://www.sica.gov.ec/cadenas/frejol/docs/frej_esp.htm
62. Miranda (1974) en Engleman, E. (Ed). (1979). Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Chapingo – México.
63. Mora, O. (1997). Origen e importancia del cultivo de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 23:225-234. Extraído el 9 de Octubre de 2008 de http://www.redpav.avepagro.org.ve/fagro/v23_2/v232m006.html.

64. Moreno-González, J. (1996). Marcadores moleculares en la mejora genética de plantas. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Extraído el 22 de Mayo de 2009 de <http://www.segenetica.es/docencia/marcmol.html>
65. Morgante & Olivieri (1993) en Ferreira, M. & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Primera edición. Brasilia – Brasil: EMBRAPA-CENARGEN.
66. Morillo E. (2002). Protocolos de Marcadores Moleculares. Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito-Ecuador.
67. Nabhan *et al.* (1986). En Vargas, P. Alvarado, S. Muruaga, J. Guillén, H. Ortega, J. Montero, B. Acosta J. Azpíroz, H. (2000). Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. México.
68. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106, 283-292.
69. Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
70. Ortiz, J., Aguinagalde, I., y Martín, J. (2000). Identificación varietal. p. 515-560. En Mathias, M., Sagredo, B., Kalazich J. (2007). Uso de Marcadores SSR para Identificación de Germoplasma de Papa en el Programa de Mejoramiento de INIA de Chile. *Agric. Téc.*, 67 (1), 270-281.
71. Ospina, H., Hidalgo, R., Song, L. & Gepts., P. (1980). Diversidad genética de las especies cultivadas del género *Phaseolus*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

72. Page, R. (2008). TreeView 1.6.1.6. Disponible en: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
73. Papa, R. y Gepts, P. (2003). Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 239–250.
74. Paredes, M. and Gepts, P. (1995). Extensive introgression of Middle American germplasm into Chilean common bean. *Gen. Res. and Crop Evo.*, 42, 29-41
75. Park, S. (2001). Trypanotolerance in West African Cattle and the population genetic effects of selection. University of Dublin.
76. Peakall, R. Y Smouse, P. (2005). GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. The Australian National University. Canberra, Australia.
77. Petes T., Greenwell, P. y Dominska, M. (1997). Stabilization of microsatellite sequence by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 146, 491–498. En Yu, K., Park S., Poysa V. (1999). Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42.
78. Phillips *et al.* (1993). En Ferreira, M. & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Primera edición. Brasilia – Brasil: EMBRAPA-CENARGEN.
79. Ponciano, K., Villatoro, J. y Molina, L. (2009). Caracterización preliminar con microsatélites de la colección guatemalteca de Frijol Común Trepador. *Agronomía mesoamericana*, 20(2), 245-254.
80. Rodrigo, A. (2000). Caracterización morfoagronómica y bioquímica del germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. Universidad de Santiago de Compostela. Pontevedra, España.

81. Rodríguez, G y Santiago, M. (2008). Secuenciación automática de ADN. Servicio de Secuenciación automática de ADN. Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB - CSIC). Extraído el 25 de Mayo de 2009 de <http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaADN/biomed1.htm#tipos>
82. Rohlf J. (2002). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York-United States of America.
83. Rongwen, J., Akkaya, M., Bhagwat, A., Lavi, U. y Cregan, P. (1995). The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 43–48.
84. Rosas J. (1998). El cultivo del frijol común en América tropical. Zamorano Academic Press, Tegucigalpa, Honduras. 52 p. En Miranda, S., Rosas, J., Aranda, L., Ortiz, O., Ponce, M., Ríos, H. (2006). Análisis molecular de la diversidad genética de frijol común manejada por campesinos en Cuba. *Agronomía Mesoamericana*, 17(3), 369-382.
85. Schlötterer y Tautz (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20, 211–215. En Yu, K., Park S., Poysa V. (1999). Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42.
86. Singh, S., Nodari, R. y Gepts, P. (1991). Genetic Diversity in Cultivated Common Bean: I. Allozymes. *Crop Sci*, 31, 19-23.
87. Vargas, P. Alvarado, S. Muruaga, J. Guillén, H. Ortega, J. Montero, B. Acosta J. Azpíroz, H. (2000). Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y

- Pecuarias. Campo Experimental Valle de México. Extraído el 12 de Noviembre de 2008 de <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfG027.pdf>
88. Vega, J y Chiriboga, C. (1989). El fréjol su valor nutritivo y algunas formas de utilización. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Quito, Ecuador.
89. Viruel, M. y Hormaza, J. (2004). Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn, Sapindaceae). *Theoretical Applied genetics*, 108, 896-902.
90. Voysest, O. (2000). Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999. Cali, Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
91. Weir, B.S., & Cockerham, C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
92. Werner, P. Analysis of Molecular Variance (AMOVA). Obtenida el 22 de febrero de 2010 de <http://userwww.sfsu.edu/~efc/classes/biol710/amova/amova.htm>.
93. Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen*, 15,323-354.
94. Wright, S. (1978) Evolution and the Genetics of Population, Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago. En Balloux, F. y Lugon, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11, 155-165.
95. Yu, K., Park S., Poysa V. (1999). Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42.
96. Yu, K., Park S., Poysa V., Gepts, P. (2000). Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The American Genetic Association*, 91, 429-434

97. Zhang, X., Blair, M. & Wang S. (2008). Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers. *Theoretical Applied genetics*, 117(4), 629-40.

ANEXOS

ANEXO A. Lista de las 123 accesiones lojanas de fréjol arbustivo de la colección del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.

Número	Código ECU	Cantón	Nombre local	Origen
1	6043	Catamayo	Bayo alargado	Colecta
2	6044	Loja	Canario alargado	Colecta
3	6045	Loja	Bayo obscuro	Colecta
4	6046	Loja	Rosado pintado	Colecta
5	6047	Loja	Morado anchado	Colecta
6	6048	Loja	Morado pintado	Colecta
7	6049	Loja	Café claro	Colecta
8	6052	Loja	Peruano 32	Colecta
9	6053	Loja	Pintado 2	Colecta
10	6054	Loja	Seda 9-3	Colecta
11	6055	Loja	Julián 1-1	Colecta
12	6056	Loja	Mataleño 45-1	Colecta
13	6057	Loja	Percal 11-4	Colecta
14	6058	Loja	Perú 14-1	Colecta
15	6059	Loja	Perú 14-2	Colecta
16	6060	Loja	Mantequilla 35-2	Colecta
17	6061	Loja	Bayo pintado-2	Colecta
18	6062	Loja	Entreverado -38-1	Colecta
19	6063	Loja	Entreverado -38-1	Colecta
20	6064	Loja	Entreverado -38-2	Colecta
21	6065	Loja	Mantequilla 16-1	Colecta
22	6066	Loja	Bola ent. 29-2	Colecta
23	6067	Loja	Percal 34	Colecta
24	6068	Loja	Bola 19-1	Colecta
25	6069	Loja	Colorado 30-2	Colecta
26	6070	Loja	Mantequilla 28-1	Colecta
27	6071	Loja	SN-JP-29-2	Colecta
28	6072	Loja	Chalsedo redondo	Colecta
29	6073	Loja	Colorado 30-1	Colecta
30	6074	Loja	Amarillo 23-1	Colecta
31	6075	Loja	Amarillo 23-2	Colecta
32	6076	Loja	Chabelo 20	Colecta
33	6077	Loja	Bola rosada-24	Colecta
34	6078	Loja	Chabelo 20	Colecta
35	6085	Loja	Blanco	Colecta
36	6086	Loja	Bola-60	Colecta
37	6087	Loja	Amarillo	Colecta
38	6089	Loja	Rosado manchado	Colecta
39	6090	Loja	Amarillo tacho	Colecta
40	6091	Loja	Rosado manchado	Colecta

Continuación Anexo A...

Número	Código ECU	Cantón	Nombre local	Origen
41	6092	Loja	Amarillo tacho	Colecta
42	6093	Loja	Crema jaspiado	Colecta
43	6094	Loja	Rosado bolón	Colecta
44	6095	Loja	Blanco bolón	Colecta
45	6096	Loja	Amarillo tacho	Colecta
46	6097	Loja	Amarillo anchado	Colecta
47	6098	Loja	Crema manchado	Colecta
48	6099	Loja	Rojo manchado	Colecta
49	6100	Loja	Blanco	Colecta
50	6101	Loja	Blanco	Colecta
51	6102	Loja	Rosado jaspiado	Colecta
52	6103	Loja	Crema jaspiado	Colecta
53	6104	Loja	Rojo jaspiado	Colecta
54	6105	Loja	Rojo jas. tacho	Colecta
55	6106	Loja	Crema tacho	Colecta
56	6107	Loja	Rosado manchado	Colecta
57	6108	Loja	Rojo manchado	Colecta
58	6109	Loja	Crema manchado	Colecta
59	6110	Loja	Crema manchado	Colecta
60	6111	Loja	Uribe	Colecta
61	6112	Loja	Rojo bolón	Colecta
62	6113	Loja	Rojo alargado	Colecta
63	6114	Loja	Crema tacho	Colecta
64	6115	Loja	Blanco pequeño	Colecta
65	6116	Loja	Blanco	Colecta
66	6117	Loja	Blanco tacho	Colecta
67	6118	Loja	Blanco bolón	Colecta
68	6119	Loja	Blanco pequeño	Colecta
69	6120	Loja	Blanco bolón	Colecta
70	6121	Loja	Crema manchado	Colecta
71	6122	Loja	Rosado jaspeado	Colecta
72	6123	Loja	Crema jaspeado	Colecta
73	6124	Loja	Rojo jaspeado	Colecta
74	6125	Loja	Rosado manchado	Colecta
75	6126	Loja	Crema manchado	Colecta
76	6127	Loja	Amarillo tacho	Colecta
77	6128	Loja	Crema tacho	Colecta
78	6129	Loja	Crema manchado	Colecta
79	6130	Loja	Amarillo tacho	Colecta
80	6131	Loja	Café jaspeado	Colecta
81	6132	Loja	Amarillo tacho	Colecta
82	6133	Loja	Negro tacho	Colecta
83	6134	Loja	Amarillo tacho	Colecta
84	6135	Loja	Rojo manchado	Colecta
85	6136	Loja	Crema manchado	Colecta

Continuación Anexo A...

Número	Código ECU	Cantón	Nombre local	Origen
86	6137	Catamayo	Blanco	Colecta
87	6146	Calvas	Amarillo	Colecta
88	6147	Calvas	Mantequilla	Colecta
89	6148	Espíndola	Rojo jaspeado	Colecta
90	6159	Calvas	Rojo tacho	Colecta
91	6160	Calvas	Rojo racho	Colecta
92	6161	Espíndola	Uribe	Colecta
93	6162	Espíndola	Rojo tacho	Colecta
94	6163	Espíndola	Rojo moteado	Variedad mejorada
95	6164	Espíndola	Rojo tacho	Colecta
96	6166	Espíndola	Amarillo tacho	Colecta
97	6167	Espíndola	Amarillo oscuro	Colecta
98	6168	Espíndola	Crema moteado	Colecta
99	6169	Espíndola	Rosado tacho	Colecta
100	6170	Espíndola	Amarillo	Colecta
101	6171	Espíndola	Rojo jaspeado	Colecta
102	6172	Espíndola	Rojo jaspeado	Colecta
103	6173	Espíndola	Rojo alargado	Colecta
104	6174	Espíndola	Rojo jaspeado	Colecta
105	6175	Espíndola	Rojo manchado	Colecta
106	6176	Espíndola	Rojo manchado	Colecta
107	6177	Espíndola	Rojo manchado	Colecta
108	6178	Espíndola	Rojo alargado	Colecta
109	6179	Espíndola	Rojo manchado	Colecta
110	6180	Espíndola	Rojo oscuro	Colecta
111	6181	Espíndola	Amarillo claro	Colecta
112	6183	Espíndola	Rojo bolón	Colecta
113	9314	Loja	Percal blanco	Colecta
114	9328	Loja	E-1028	Colecta
115	9329	Loja	E-1039	Colecta
116	9330	Loja	E-1053	Colecta
117	9331	Loja	E-1058-1	Colecta
118	9332	Loja	E-1059	Colecta
119	9333	Loja	E-1073	Colecta
120	9334	Loja	E-1169	Colecta
121	9335	Loja	E-1209	Colecta
122	9336	Loja	E-1376	Colecta
123	9337	Loja	E-1060	Colecta

ANEXO B. Microsatélites de *Phaseolus vulgaris* L. seleccionados para el estudio de variabilidad (Gaitán-Solís *et al.*, 2002; Blair, com. Pers.)

Núm	Locus	Secuencia		Secuencia iniciador	Tm* (°C)	Tamaño (pb)
		SSR	5' a 3'			
1	BM-139	(CT)25	Forward Reverse	TTAGCAATACCGCCATGAGAG ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	50	115
2	BM-140	(GA)30	Forward Reverse	TGCACAACACACATTTAGTGAC CCTACCAAGATTGATTTATGGG	55	190
3	BM-143	(GA)35	Forward Reverse	GGGAAATGAACAGAGGAAA ATGTTGGGAACTTTTAGTGTG	55	143
4	BM-154	(CT)17	Forward Reverse	TCTTGCGACCGAGCTTCTCC CTGAATCTGAGGAACGATGACCAG	50	218
5	BM 156	(CT)32	Forward Reverse	CTTGTTCCACCTCCCATCATAGC TGCTTGATCTCAGCCAGAATC	52	267
6	BM-160	(GA)15(GAA)5	Forward Reverse	CGTGCTTGCGAATAGCTTTG CGCGGTTCTGATCGTGACTION	52	211
7	BM-164	(GT)9(GA)21	Forward Reverse	CCACCACAAGGAGAAGCAAC ACCATTCAGGCCGATACTION	52	182
8	BM-181	(CT)17	Forward Reverse	ATGCTGCGAGTTAATGATCG TGAGGAGCAAACAGATGAGG	50	192
9	BM-183	(TC)14	Forward Reverse	CTCAAATCTATTCACTGGTCAGC TCTTACAGCCTTGCAGACATC	52	149
10	BM-211	(CT)16	Forward Reverse	ATACCCACATGCACAAGTTTGG CCACCATGTGCTCATGAAGAT	52	186

*Tm: temperatura de anillamiento

ANEXO C. Matriz genotípica base con las tallas de los alelos encontrados en el genotipaje de 122 accesiones de frejol arbustivo mediante 9 locus SSR. Matriz base para el análisis de datos en los diferentes softwares estadísticos. A1: alelo 1 y A2: alelo 2. Los datos perdidos se señalan con el signo “?”.

CODIGO ECU	CANTON	BM-139		BM-154		BM-181		BM-183		BM-143		BM-160		BM-211		BM-164		BM-140	
6043	Catamayo	82	100	?	?	186	186	148	148	128	144	184	212	180	180	146	146	196	196
6044	Loja	120	120	214	214	186	186	150	150	146	146	212	212	186	186	174	174	198	198
6045	Loja	82	98	242	242	180	180	146	146	142	150	184	184	180	180	140	146	168	168
6046	Loja	120	120	214	214	186	186	150	150	158	158	212	212	186	186	186	186	168	168
6047	Loja	100	122	214	214	184	186	148	150	144	144	209	209	188	188	174	174	168	168
6048	Loja	82	90	214	214	184	186	148	150	146	146	212	212	186	186	162	162	168	168
6049	Loja	84	110	206	212	180	180	144	144	128	150	182	182	180	186	146	174	196	196
6052	Loja	90	120	214	214	184	186	148	150	144	144	212	212	186	186	174	174	168	168
6053	Loja	120	120	214	214	186	186	150	150	146	146	209	209	186	186	146	176	196	196
6054	Loja	110	122	214	214	186	186	148	150	146	158	212	212	186	186	174	174	196	196
6055	Loja	82	82	214	214	184	186	148	150	146	146	227	227	186	186	176	176	186	186
6056	Loja	110	120	206	214	188	188	150	150	158	158	212	212	186	186	186	186	186	186
6057	Loja	100	100	214	214	186	186	150	150	146	146	212	212	188	188	172	172	168	168
6058	Loja	90	90	214	214	190	192	148	150	?	?	209	209	186	186	180	180	186	186
6059	Loja	90	90	214	214	192	192	150	150	150	150	212	212	186	186	180	180	168	168
6060	Loja	110	122	214	214	184	186	146	150	158	158	212	212	186	186	174	174	168	186
6061	Loja	106	106	214	214	192	192	152	152	160	160	206	206	190	190	180	180	?	?
6062	Loja	110	110	206	206	186	186	150	150	144	144	214	214	190	190	176	176	196	196
6063	Loja	110	110	214	214	184	184	150	150	144	150	209	209	186	186	174	174	186	186
6064	Loja	110	110	206	206	184	184	150	150	150	150	209	209	180	186	174	174	186	186
6065	Loja	122	122	214	214	186	186	150	150	150	160	212	212	186	186	174	174	198	198
6066	Loja	110	110	214	214	184	186	150	150	146	146	209	209	188	188	184	184	186	186

Continuación Anexo C...

CODIGO ECU	CANTON	BM-139		BM-154		BM-181		BM-183		BM-143		BM-160		BM-211		BM-164		BM-140	
6067	Loja	118	118	214	214	186	186	150	150	160	160	209	209	188	188	186	186	196	196
6068	Loja	110	110	214	218	?	?	?	?	?	?	209	209	184	184	174	174	168	186
6069	Loja	90	90	214	214	190	192	148	150	150	150	212	212	186	186	180	180	?	?
6070	Loja	100	120	214	214	186	186	148	150	128	142	212	212	188	188	174	174	196	196
6071	Loja	102	102	214	214	188	188	150	150	148	148	209	209	188	188	180	180	186	196
6072	Loja	110	110	214	214	184	184	150	150	150	150	212	212	180	180	174	174	196	196
6073	Loja	114	122	214	214	184	186	148	150	160	160	212	212	186	186	174	174	196	196
6075	Loja	118	118	214	214	186	186	150	150	148	148	212	212	186	186	174	174	198	198
6076	Loja	90	110	214	214	190	190	150	150	140	140	238	238	188	188	180	180	168	186
6077	Loja	82	82	214	214	184	186	148	150	148	148	209	209	186	186	176	176	196	196
6078	Loja	90	90	214	214	190	190	150	150	162	162	238	238	188	188	180	180	170	170
6085	Loja	82	82	242	242	180	180	144	144	122	128	182	182	180	180	146	146	?	?
6086	Loja	110	110	206	206	184	186	148	150	152	152	212	212	186	186	174	174	196	196
6087	Loja	110	110	206	206	186	186	144	144	152	152	184	184	186	186	174	174	196	196
6089	Loja	118	118	214	214	186	186	150	150	160	160	212	212	186	186	186	186	196	196
6090	Loja	122	122	214	214	184	186	148	150	148	148	212	212	186	186	174	174	198	198
6091	Loja	82	82	246	246	192	192	150	150	140	140	238	238	188	188	174	174	?	?
6092	Loja	110	110	214	214	186	186	150	150	160	160	212	212	186	186	174	174	198	198
6093	Loja	118	118	214	214	184	184	150	150	?	?	209	209	180	186	174	174	186	186
6094	Loja	110	110	206	206	186	186	150	150	150	150	212	212	186	186	174	174	196	196
6095	Loja	110	110	206	206	184	184	150	150	128	128	?	?	180	180	174	174	?	?
6096	Loja	120	120	214	214	188	188	150	150	148	146	212	212	186	186	174	174	198	198
6097	Loja	90	90	206	214	188	188	148	150	158	158	238	238	186	186	180	180	168	168
6098	Loja	110	110	214	214	186	186	150	150	162	162	?	?	190	190	174	174	196	196

Continuación del Anexo C...

CODIGO ECU	CANTON	BM-139		BM-154		BM-181		BM-183		BM-143		BM-160		BM-211		BM-164		BM-140	
6099	Loja	98	98	214	214	184	186	148	150	140	140	?	?	190	190	176	176	168	168
6100	Loja	82	82	238	238	180	180	144	146	150	150	182	182	180	190	140	146	?	?
6101	Loja	82	82	246	246	180	180	146	146	142	142	182	182	180	180	146	146	?	?
6102	Loja	110	110	214	214	184	184	150	150	150	150	209	209	186	186	174	174	196	196
6103	Loja	110	110	206	206	184	184	150	150	148	148	?	?	?	?	166	174	196	196
6104	Loja	90	90	214	214	190	190	150	150	128	146	212	212	188	188	180	180	196	196
6105	Loja	90	90	214	214	190	190	150	150	162	162	238	238	186	186	180	180	196	196
6106	Loja	100	100	218	218	186	186	144	144	148	148	184	184	190	190	176	176	168	168
6107	Loja	98	98	214	214	186	186	150	150	162	162	212	212	188	188	172	172	186	196
6108	Loja	100	100	214	214	186	186	150	150	160	160	212	212	188	188	172	172	168	168
6109	Loja	122	122	214	214	186	186	150	150	142	142	212	212	188	188	174	174	196	196
6110	Loja	122	122	214	214	184	184	150	150	128	128	214	214	180	180	174	174	196	196
6111	Loja	110	110	214	214	184	184	150	150	150	150	212	212	?	?	174	174	196	196
6112	Loja	114	114	214	214	184	184	150	150	146	146	209	209	190	190	174	174	170	186
6113	Loja	106	106	214	214	184	186	148	150	142	150	212	227	190	190	180	180	?	?
6114	Loja	82	82	214	214	186	188	166	166	148	148	217	217	188	188	162	162	170	170
6115	Loja	110	120	242	242	180	180	146	146	108	114	182	182	186	186	140	146	?	?
6116	Loja	82	82	242	242	180	180	146	146	142	150	184	184	?	?	146	146	?	?
6117	Loja	82	82	206	206	180	180	158	160	144	144	180	180	182	182	140	146	168	168
6118	Loja	82	82	?	?	184	184	146	146	124	130	184	184	?	?	146	146	198	198
6119	Loja	82	82	?	?	180	180	160	160	144	144	180	180	180	180	146	146	186	186
6120	Loja	82	82	?	?	180	180	158	160	130	130	180	180	182	182	140	146	?	?
6121	Loja	110	110	214	214	184	184	150	150	146	146	214	214	186	186	174	174	186	186
6122	Loja	82	82	214	214	186	186	148	150	146	146	227	227	186	186	176	176	196	196

Continuación del Anexo C...

CODIGO ECU	CANTON	BM-139		BM-154		BM-181		BM-183		BM-143		BM-160		BM-211		BM-164		BM-140	
6123	Loja	110	110	206	206	184	184	150	150	146	146	212	227	186	186	174	174	196	196
6124	Loja	122	122	214	214	184	184	150	150	140	140	212	212	188	188	174	174	186	196
6125	Loja	120	120	218	218	184	184	150	150	144	144	209	209	190	190	174	174	168	168
6126	Loja	122	122	214	214	186	186	150	150	140	140	200	200	188	188	174	174	198	198
6127	Loja	120	120	214	214	186	186	150	150	148	148	212	212	186	186	174	174	196	196
6128	Loja	122	122	214	214	186	186	150	150	158	158	212	212	186	186	174	174	198	198
6129	Loja	100	120	214	214	188	188	150	150	144	150	209	209	188	188	174	174	196	196
6130	Loja	120	120	214	214	186	186	148	150	146	146	214	214	186	186	172	172	198	198
6131	Loja	110	110	214	214	184	186	148	150	150	150	212	212	184	184	172	172	170	170
6132	Loja	?	?	214	214	184	186	148	150	160	160	212	212	186	186	172	172	198	198
6133	Loja	118	118	214	214	186	186	148	150	140	140	200	200	190	190	184	184	168	168
6134	Loja	122	122	214	214	186	186	148	150	140	140	200	200	190	190	172	172	196	196
6135	Loja	?	?	214	214	192	192	150	152	158	158	206	206	190	190	180	180	198	198
6136	Loja	120	120	214	214	186	186	150	150	146	146	212	212	190	190	182	182	?	?
6137	Catamayo	82	82	?	?	180	180	144	144	128	128	182	182	180	180	146	146	?	?
6146	Calvas	114	114	214	214	188	188	148	148	150	150	212	212	190	190	176	176	196	196
6147	Calvas	120	120	214	214	184	186	148	150	158	158	212	212	188	188	182	182	198	198
6148	Espíndola	122	122	214	214	186	186	150	150	158	158	212	212	186	186	174	174	168	168
6159	Calvas	122	122	214	214	182	186	148	150	148	148	212	212	188	188	184	184	198	198
6160	Calvas	100	100	214	214	182	182	150	150	152	152	206	214	184	184	176	176	196	196
6161	Espíndola	100	100	214	214	184	184	150	150	144	144	206	214	190	190	174	174	196	196
6162	Espíndola	110	110	214	214	?	?	?	?	128	128	214	214	190	190	?	?	196	196
6163	Espíndola	114	114	218	218	192	192	150	150	148	148	214	214	190	190	180	180	196	196
6164	Espíndola	110	110	206	206	184	184	150	150	152	152	212	212	186	186	174	174	196	196

Continuación del Anexo C...

CODIGO ECU	CANTON	BM-139		BM-154		BM-181		BM-183		BM-143		BM-160		BM-211		BM-164		BM-140	
6166	Espíndola	110	110	206	214	184	184	150	150	160	160	212	212	?	?	174	174	168	168
6167	Espíndola	118	118	214	214	182	184	150	150	144	144	209	209	180	188	174	174	186	186
6168	Espíndola	110	110	214	214	184	184	150	150	144	144	?	?	190	190	174	174	170	170
6169	Espíndola	114	114	214	214	190	192	150	150	148	148	?	?	180	180	180	180	?	?
6170	Espíndola	100	114	206	214	184	184	150	150	144	144	?	?	190	190	180	180	168	168
6171	Espíndola	106	106	214	214	184	184	150	150	146	146	212	212	190	190	180	180	?	?
6172	Espíndola	98	98	214	214	184	184	150	150	152	152	214	214	186	186	176	176	170	170
6173	Espíndola	98	98	218	218	184	184	150	150	144	144	212	212	190	190	176	176	168	168
6174	Espíndola	98	98	212	212	188	188	150	150	162	162	?	?	190	190	174	174	170	170
6175	Espíndola	98	98	214	214	186	192	148	148	144	144	209	209	190	190	174	174	196	196
6176	Espíndola	110	110	214	214	192	192	150	150	162	162	209	209	190	190	176	176	196	196
6177	Espíndola	90	90	214	214	186	186	150	150	160	160	180	180	186	186	180	180	186	186
6178	Espíndola	100	100	214	214	184	184	150	150	144	144	184	212	190	190	176	176	168	168
6179	Espíndola	82	82	218	218	184	184	148	150	150	150	?	?	190	190	176	176	170	170
6180	Espíndola	100	114	218	218	184	184	150	150	128	128	184	184	190	190	176	176	170	170
6181	Espíndola	110	110	206	206	180	180	148	148	144	144	?	?	190	190	174	174	170	170
6183	Espíndola	82	82	?	?	180	180	148	148	148	148	184	184	180	180	146	146	186	186
9314	Loja	82	82	246	246	180	180	160	160	114	114	180	180	180	180	146	146	?	?
9328	Loja	110	110	214	214	184	184	150	150	152	152	209	209	?	?	174	174	196	196
9329	Loja	110	110	214	214	?	?	?	?	152	152	209	209	?	?	174	174	186	186
9330	Loja	110	110	214	214	186	186	150	150	148	148	212	212	186	186	174	174	198	198
9331	Loja	118	118	214	214	186	186	150	150	148	148	212	212	186	186	184	184	198	198
9332	Loja	90	90	214	214	190	190	150	150	146	146	238	238	188	188	180	180	186	186
9333	Loja	82	82	242	242	180	180	144	144	128	128	182	182	180	180	146	146	170	170

Continuación del Anexo C...

CODIGO ECU	CANTON	BM-139		BM-154		BM-181		BM-183		BM-143		BM-160		BM-211		BM-164		BM-140	
9334	Loja	100	100	214	214	186	186	150	150	160	160	212	212	188	188	174	174	168	168
9335	Loja	82	82	?	?	180	180	160	160	130	130	180	180	180	180	146	146	168	168
9336	Loja	82	82	214	214	180	180	160	160	114	114	184	184	180	188	146	146	196	196
9337	Loja	82	82	214	214	186	186	150	150	148	148	209	209	188	188	176	176	196	196